

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES DE BESANÇON
Année Universitaire 2007 – 2008

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

N° bibliothèque : 25.08.12

Présentée et soutenue publiquement
le 18 décembre 2008 par

Jean-Sébastien GUERRINI-CHAPUIS

**Rôle des papillomavirus
dans la carcinogenèse cutanéomuqueuse**

Sous la direction du Professeur François AUBIN

Composition du Jury :

Directeur de thèse :	Pr François AUBIN	Université de Franche-Comté
Rapporteurs :	Pr Marie-Thérèse LECCIA Dr Gilles TRAVE	CHU de Grenoble ESBS de Strasbourg
Examineurs :	Pr Angel ALONSO Dr Lionel PAZART Dr Jean-Luc PRETET	DKFZ, Heidelberg CHU de Besançon Université de Franche-Comté

Résumé

Le cancer de la peau est le cancer le plus fréquent au monde et son incidence est en constante augmentation. Si la mortalité associée à ces cancers est faible, la morbidité et leur coût pour la société sont très importants, représentant un sérieux problème de santé publique. Les rayonnements ultraviolets (UV) sont le principal agent environnemental responsable de la carcinogenèse cutanée. Cependant d'autres facteurs de risque ont été identifiés dont l'exposition à des agents chimiques comme l'arsenic, le tabac et les goudrons, certains polymorphismes génétiques, le statut immunitaire du patient et l'infection par des papillomavirus humains (HPV).

Les HPV sont le facteur étiologique de la carcinogenèse du col utérin. Concernant la carcinogenèse cutanée, leur implication est démontrée chez les patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme et suggérée chez les patients immunodéprimés. En revanche, leur responsabilité dans la carcinogenèse cutanée des sujets immunocompétents reste à démontrer. Chez ces sujets, les HPV retrouvés au niveau cutané sont pourtant suspectés de jouer un rôle carcinogène en synergie avec les UV. Cependant, les mécanismes d'actions des protéines virales sont encore mal connus et diffèrent d'un type viral à l'autre. Si certaines études suggèrent que ces virus sont capables d'inhiber les mécanismes de défense cellulaire activés en réponse à une exposition aux UV, les études épidémiologiques menées ces dernières années n'aboutissent pas toutes aux mêmes conclusions, et ne permettent pas d'incriminer les HPV de façon certaine dans la carcinogenèse cutanée.

Les résultats présentés dans ce travail mettent en évidence le rôle de multiples facteurs dans la carcinogenèse cutanée. Le tropisme viral, le polymorphisme de la protéine p53 ainsi que la capacité des HPV bêta à inhiber la réponse apoptotique induite par les UV seront discutés.

PERMIS D'IMPRIMER

THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° 25.08.12

Présentée par ~~Madame~~, Monsieur, GUERRINI-CHAPUIS Jean-Sébastien
Né(e) le 15 Mars 1978

et ayant pour titre : *Rôle des papillomavirus dans la
Carcinogenèse cutanéomuqueuse.*

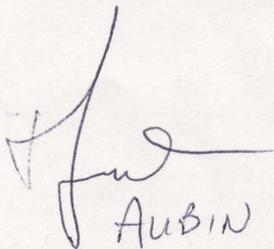
Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le

2609

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

Le Directeur de Thèse,


AUBIN



Le Professeur E. SAMAIN

Résumé

Le cancer de la peau est le cancer le plus fréquent au monde et son incidence est en constante augmentation. Si la mortalité associée à ces cancers est faible, la morbidité et leur coût pour la société sont très importants, représentant un sérieux problème de santé publique. Les rayonnements ultraviolets (UV) sont le principal agent environnemental responsable de la carcinogenèse cutanée. Cependant d'autres facteurs de risque ont été identifiés dont l'exposition à des agents chimiques comme l'arsenic, le tabac et les goudrons, certains polymorphismes génétiques, le statut immunitaire du patient et l'infection par des papillomavirus humains (HPV).

Les HPV sont le facteur étiologique de la carcinogenèse du col utérin. Concernant la carcinogenèse cutanée, leur implication est démontrée chez les patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme et suggérée chez les patients immunodéprimés. En revanche, leur responsabilité dans la carcinogenèse cutanée des sujets immunocompétents reste à démontrer. Chez ces sujets, les HPV retrouvés au niveau cutané sont pourtant suspectés de jouer un rôle carcinogène en synergie avec les UV. Cependant, les mécanismes d'actions des protéines virales sont encore mal connus et différent d'un type viral à l'autre. Si certaines études suggèrent que ces virus sont capables d'inhiber les mécanismes de défense cellulaire activés en réponse à une exposition aux UV, les études épidémiologiques menées ces dernières années n'aboutissent pas toutes aux mêmes conclusions, et ne permettent d'incriminer les HPV de façon certaine dans la carcinogenèse cutanée.

Les résultats présentés dans ce travail mettent en évidence le rôle de multiples facteurs dans la carcinogenèse cutanée. Le tropisme viral, le polymorphisme de la protéine p53 ainsi que la capacité des HPV bêta à inhiber la réponse apoptotique induite par les UV seront discutés.

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements, peut-être la tâche la plus ardue de ces années de thèse. Non qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaîtrait pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur François Aubin, directeur de cette thèse, pour m'avoir fait confiance, encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.

Mes remerciements vont également au professeur Christiane Mougin et au Docteur Jean-Luc Prétet, pour leurs conseils avisés tout au long de ces années de thèse. Merci à vous Christiane pour m'avoir accueilli dans votre équipe et merci à toi Jean-Luc pour avoir accepté de présider mon jury de thèse malgré ton jeune âge.

Merci aux professeurs Marie-Thérèse Leccia et au Docteur Gilles Travé d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse, au Professeur Angel Alonso et au Docteur Lionel Pazart d'avoir bien voulu examiner ce travail. Merci encore à vous Angel, à Evelyn, Xavier et Sven, pour l'accueil que vous m'avez réservé à plusieurs reprises à Heidelberg.

Merci au Docteur Massimo Tommasino pour son accueil chaleureux au sein de son équipe à Lyon. Merci à Majid, Mariam, Uzma, Rosita, Tarik, Véronique, Claudia, Wen et Ikbal pour leur sympathie. Sans votre présence à tous, mes séjours lyonnais auraient été bien différents et beaucoup plus morose.

Je voudrais remercier tous les membres de l'EA : Isabelle, Sylvie et son « pébroque », Manue Maëlle et Marie-Laure, trio insolite qui a toujours répondu à mes petits problèmes techniques et à mes questions les plus sottes (est-ce un pléonasmisme de dire que mes questions sont sottes ?). Merci à Magali pour tous les petits services rendus, et pour le soutien mutuel dans certains moments difficiles. Merci à toi Emilie, qui enrichit notre jolie langue à chacune de tes interventions. Merci à Claudine pour tous les documents que tu m'as fait remplir afin de protéger au mieux ma petite personne. Last but not least, merci à Zélie et Sophie : vous m'avez été fait vivre un enfer salvateur, je crois que personne n'a jamais été aussi infernal avec moi ... « pour mon bien » !

Je n'oublierai pas non plus les anciens de l'EA : Benji, qui m'a dit un jour qu'essayer c'était envisager l'échec, Olivier, dont je me sens un peu l'héritier, Jeff, grand artiste photographe/photoshlopeur et nos concours Benzor, Sylvain, que j'aimerais beaucoup avoir à ma table s'il ne mangeait pas tant et si salement.

«Faire une thèse» est une échappée solitaire au milieu de compagnons de fortune (ou d'infortune). On ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie, jusqu'au jour où nos chemins se séparent. Je ne remercierais pas les autres, membres de l'IETG (oui, IETG, pour ceux qui ont connu !). Je me contenterais de regretter les moments que l'on a passés autour des incomparables repas préparés par Kiki Poto, qui ronchonne comme personne, mais ne m'a finalement pas jeté de cailloux. J'en profite pour te dire qu'il serait sympa de relâcher l'équipe de spéléo. Je pense à Fred qui m'a ouvert au cinéma d'auteur allemand, à Lolo, dont les conversations métaphysiques m'ont beaucoup apporté. Dom, qui est à la philosophie orientale c'est que la musique militaire est à la musique. Francis « les gros bras », Romain « les p'tits bras », Vincent « les nouveaux gros bras » et Zohair ... « le gros » ... je crois que sans vous tout aurait été vraiment bien morne. Les moments de franche rigolade ~~et les conversations sérieuses~~ que nous avons eues me manqueront. Je pense aussi à Mimi et pascal, qui sont en quelque sorte les garantes de la morale de cet endroit (il serait temps de vous y mettre). Je ne remercierais pas non plus Pat « gonade de mammouth », Steph « beau brin de fermière », Audrey « le boulet », Florence, Marie-Blanche, Fabien et Rafika.

Je remercie ceux sans qui rien ne serait arrivé (et certains ne s'en plaindraient pas) ... mes parents. J'aimerais pouvoir dire que vous m'avez apporté une bonne éducation, une morale et de vraies valeurs, mais j'ai peur que certains s'étouffent en lisant ce paragraphe. Merci à vous, vous avez été présents pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies! Merci aussi à Esther et Boubou ... merci pour quoi ? Pour rien, mais surtout pour tout !

Le plus fort de mes remerciements est pour Séverine, Axel et Gabin. Merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire et d'avoir accepté de subir mes humeurs de « barbu en fin de thèse ». Vous êtes et serez toujours une présence indispensable.

Je pense aussi à ceux qui me manquent Marcel mon grand père, et Nanette ma marraine ...

Sommaire

Préambule	9
Revue de la littérature	13
1. Cancers cutanés	15
1.1. Généralités sur le tissu cutané	15
1.2. Aspects cliniques des cancers cutanés	16
1.2.1 Mélanomes cutanés	17
✓ Epidémiologie	17
✓ Clinique	17
✓ Classification des mélanomes (American Joint Committee on Cancer (Balch et al., 2001))	17
✓ Histopathologie	18
✓ Classification moléculaire	18
✓ Traitements	19
1.2.2 Carcinomes cutanés épithéliaux	19
• Les carcinomes basocellulaires	20
✓ Epidémiologie	20
✓ Clinique	20
✓ Histopathologie	20
✓ Traitements (recommandations ANAES 2004)	21
• Carcinomes épidermoïdes	21
✓ Epidémiologie	21
✓ Clinique	22
✓ Histopathologie	22
✓ Traitements	22
1.3. Facteurs de risque des cancers cutanés non mélaniques	23
1.3.1 Polymorphismes génétiques	23
1.3.2 Papillomavirus humains	24
✓ Histoire naturelle de l'infection cutanée à HPV	25
✓ Patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme	26
✓ Patients greffés d'organes	27
✓ Patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine	28
✓ Patients immunocompétents	29
2. Carcinogénèse induite par les rayonnements ultraviolets (UV)	31
2.1. Généralités sur les UV	31
2.2. Relation entre cancers cutanés et exposition aux UV	31
2.3. Dommages cellulaires induits par les UV	32
2.3.1 Mutations génomiques induites par les UV	32
2.3.2 Effet des UV sur le stress oxydant	34
2.3.3 Rôle des UV dans l'immunosuppression	35
2.4. Mécanismes de défense cellulaire contre les lésions induites par les UV ...	36
2.4.1 Mécanismes de défense anti-oxydants	36
2.4.2 Mécanismes de lutte contre les dommages causés à l'ADN	37

✓ Arrêt du cycle cellulaire.....	37
✓ Réparation de l'ADN	39
2.4.3 Elimination des cellules endommagées par les UV	42
✓ Voies apoptotiques déclenchées par les UV.....	42
2.5. Mécanismes carcinogènes induits par les UV	47
2.5.1 Mutations génomiques induites par les UV.....	47
2.5.2 Activation de la prolifération cellulaire par les UV	48
2.5.3 Inhibition de l'apoptose par les UV	48
3. Carcinogénèse associée aux HPV	51
3.1. Structure des HPV.....	51
3.2. Phylogénie des papillomavirus	53
3.3. Cycle viral.....	54
3.4. Le cancer du col utérin, un modèle de carcinogénèse induite par les HPV	56
3.4.1 Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus	57
3.4.2 Mécanismes de la carcinogénèse muqueuse	58
✓ Dérégulation de la prolifération cellulaire	58
✓ Immortalisation cellulaire.....	60
✓ Transformation cellulaire	61
✓ Croissance tumorale et dissémination métastatique	62
3.4.3 Rôle de la protéine E5 dans le processus tumoral	62
3.5. Cancers péniens et infections par HPV	64
3.6. Patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine	66
3.7. Carcinogénèse cutanée associée aux HPV et aux UV	67
3.7.1 Modèles murins de carcinogénèse cutanée associée aux HPV bêta....	67
3.7.2 Effet des UV sur les HPV.....	68
3.7.3 Dérégulation de la prolifération cellulaire.....	69
3.7.4 Immortalisation cellulaire	70
3.7.5 Transformation cellulaire.....	70
3.7.6 Croissance tumorale et dissémination métastatique.....	71
3.7.7 Rôle du système immunitaire au cours de la carcinogénèse cutanée liée aux HPV et aux UV	71
Travaux personnels	75
Contexte et objectifs :.....	77
Publication n°1	79
Publication n°2	105
Publication n°3	117
Discussion et perspectives	125
Conclusion générale.....	137
Références Bibliographiques	141

Annexes	165
Publication n°4	167
Publication n°5	177
Publication n°6	193
 Curriculum Vitae.....	 197

Table des illustrations

Figure 1 : Structure de la peau et de l'épiderme.	16
Figure 2 : Photoproduits dimériques de pyrimidine.	34
Figure 3 : Arrêt du cycle cellulaire suite à l'exposition aux UV.....	39
Figure 4 : Mécanismes de réparation de l'ADN (d'après Averbeck, 2001).	41
Figure 5 : Voie apoptotique extrinsèque.....	43
Figure 6 : Voie apoptotique intrinsèque.....	44
Figure 7 : Voies apoptotiques déclenchées suite à l'irradiation par les UV.	46
Figure 8 : Mécanismes de survie déclenchés par les UV.	50
Figure 9 : Structure de l'HPV 16.....	53
Figure 10 : Arbre phylogénétique des HPV (emprunté à de Villiers et al., 2004)	54
Figure 11 : Cycle réplcatif des HPV.....	56
Figure 12 : Evolution des lésions précancéreuses vers un cancer du col de l'utérus.	57
Figure 13 : Influence de l'oncoprotéine E7 sur la progression du cycle cellulaire.	59
Figure 14 : Influence de l'oncoprotéine virale E6 sur la protéine p53.	60
Figure 15 : Rôle des protéines E5, E6 et E7.....	64
Figure 16 : Mécanismes carcinogènes potentiels des HPV bêta.....	73

Liste des abréviations

8-oxoGua : 8-oxo-7, 8-dihydroguanine
ΔNp73α : isoforme de p73 dont l'extrémité N-terminale est tronquée

A

AIF : apoptosis-inducing factor
ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé
AP endonucléase : apurique ou apyrimidique endonucléase
Apaf1 : apoptosis protease-activating factor-1
ATM : ataxia-telangectasia mutated
ATR : ATM-Rad3-related

B

BER : base excision repair

C

CBC : carcinome basocellulaire
CBP : cAmp response element binding protein
CD : cluster of differentiation
CDC25 : cell division cycle 25 protein
CDK : kinase dépendante de cyclines
CE : carcinome épidermoïde
Chk1 et Chk2 : human checkpoint kinase 1 et 2
CIN : lésions intraépithéliales
CKI : cyclin-dependent kinase inhibitor
CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité I
CPD : dimère de type cyclobutane
CRPV : papillomavirus du lapin
CTLA : cytotoxic T-lymphocyte antigen

D

DD : death domain
DED : death effector domain
DIABLO : direct IAP binding protein with low pI
DISC : death-inducing signaling complex
DMBA : dimethylbenzanthracène
DR4 et DR5 : death receptor (TRAIL receptor)

E

E : early
E6AP : E6 associated protein
EGF-R : epidermal growth factor receptor
ERO : espèces réactives de l'oxygène
ERK : extracellular signal-regulated kinase
EV : épidermodysplasie verruciforme
EVER : epidermodysplasia verruciform gene
EV-HPV : HPV de type EV

F

FADD : Fas-associated protein with death domain
FAK : focal adhesion kinase
FasL : Fas ligand

G

G1, G2 : Gap 1, Gap 2
GADD : growth arrest and DNA damage

H

HDAC : histone déacétylase
hDLG : équivalent humain de la protéine Disc large de la drosophile
HPV : papillomavirus humains
HPV-BR : HPV bas risque
HPV-HR : HPV haut risque
hTERT : human telomerase reverse transcriptase

I

IAP : inhibitor of apoptosis protein
ICP : sujets immunocompétents
IL-10 : interleukine 10

K

kDa : kilodaltons

L

L : late
LAMB3 : laminine β3
LCR : long terminal repeat

M

M : mitose
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MDM2 : mouse double minute 2
MGMT : O(6)-méthylguanine méthyltransférase
miRNA : micro-ARN
MMP : métalloprotéase de la matrice
MTF-1 : metal-responsive transcription factor-1

N

NER : nucleotide excision repair
NMSC : cancer cutané non mélanique

O

OPG : ostéoprotégérine

P

p105^{tb} : le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PCR : polymerase chain reaction
PDZ : PSD-95, DLG, et ZO1
PIN : penile intraepithelial neoplasia
PKCδ : protéine kinase C delta
POL : phase ouverte de lecture
PTCH : récepteur patched hedgehog
PTR : patients transplantés rénaux
PUVA : traitement au psoralen et UVA
PV : papillomavirus

S

S : synthèse

Shh : sonic hedgehog

siRNA : small interfering RNA

Smac : second mitochondria-derived activator of caspases

T

tBid : truncated Bid

TNF : tumor necrosis factor

TNF-R1 : tumor necrosis factor receptor 1

TP53 : gène codant la protéine p53

TPA : triphénylamine

TRADD : TNF-R associated death domain

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

U

UV : rayonnement ultraviolet

V

VEGF : vascular endothelium growth factor

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VLP : virus-like particles

X

XPD : *xeroderma pigmentosum* groupe D

XRCC1 : X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1

Z

ZnT-1 : zinc transporter 1

Préambule

En France, le cancer représente la première cause de mortalité dans la population masculine et la deuxième cause dans la population féminine. Si de nombreux cas de cancers peuvent être expliqués par des caractéristiques personnelles ou des prédispositions génétiques, il est clairement admis à l'heure actuelle que des facteurs environnementaux sont à l'origine de la majorité des cancers. Parmi les facteurs environnementaux à l'origine de différents cancers, on peut distinguer les facteurs chimiques comme la dioxine, les facteurs physiques comme les ultraviolets et certains agents infectieux. En 1999, zur Hausen a estimé que 15 % des cancers étaient induits par des agents infectieux, transmissibles et contagieux comme les parasites, les bactéries, et les virus. Parmi les virus carcinogènes on retrouve entre autres, le virus d'Epstein Barr (EBV) responsable du lymphome de Burkitt et du cancer du nasopharynx, les virus de l'hépatite B et C responsables d'hépatocarcinomes, et les papillomavirus humains (HPV) associés aux carcinomes cutanéomuqueux.

L'implication des HPV dans le cancer du col de l'utérus a été initialement proposée par zur Hausen en 1977 (zur Hausen, 1977), hypothèse récompensée par l'obtention du Prix Nobel de Médecine en 2008. Aujourd'hui, il est clairement établi que les HPV représentent le facteur étiologique principal dans la carcinogenèse cervicale. D'autres cancers ano-génitaux (vulve, vagin, canal anal et pénis) ainsi que des cancers de la tête, du cou, de l'oesophage et de la peau sont également associés aux HPV. Cependant, l'infection virale seule n'est pas suffisante pour expliquer le développement tumoral et d'autres cofacteurs liés au virus (persistance, types, variants, charge virale, intégration), à l'environnement (clusters géographiques, UV), et à l'hôte lui-même (pratiques sexuelles, statut immunitaire, polymorphisme génétique), interviennent dans l'évolution des lésions (Bosch *et al.*, 2002).

Aujourd'hui, le rôle des HPV dans la carcinogenèse cutanée des sujets immunocompétents est encore controversé, et bien que de nombreux travaux fondamentaux mettent en avant des mécanismes carcinogènes potentiels, les études épidémiologiques menées chez ces patients ne permettent pas d'incriminer de façon certaine l'infection virale dans la carcinogenèse cutanée. Dans ce contexte, l'action des protéines virales sur l'apoptose induite par des UVB ainsi que différents facteurs de risque comme le statut immunitaire des patients, le polymorphisme de la protéine p53 et les co-infections par différents types d'HPV ont fait l'objet d'une attention particulière dans ce travail de thèse.

Revue de la littérature

1. Cancers cutanés

1.1. Généralités sur le tissu cutané

Pour revue, Marte *et al.*, 2007

La peau est l'enveloppe de notre corps, à la fois protectrice et lieu d'échanges avec l'environnement. C'est un organe complexe, possédant de nombreuses propriétés physiologiques, dont la surface est la plus étendue de l'organisme. Véritable barrière physique contre les micro-organismes et liquides extérieurs, la peau nous protège d'abord contre les agressions extérieures. Sa pigmentation assure un moyen de défense face aux rayons du soleil. La température du corps est en partie régulée par la peau. La sudation permet un rafraîchissement par évaporation de surface alors que les poils et les cheveux vont créer une zone isolante. Le sébum est impliqué dans les propriétés hydrophiliques et microbicides de la peau. La peau permet aussi de percevoir l'environnement car elle est très riche en terminaisons nerveuses, la rendant sensible à la température, à la pression et à la douleur. Un rôle immunitaire important est attribué à la peau par l'intermédiaire des cellules de Langerhans épidermiques (cellules présentatrices d'antigènes) et par la présence d'une flore microbienne de surface et de molécules anti-microbiennes (immunité innée). Très riche en vaisseaux sanguins, le derme assure une réserve sanguine en concentrant près de 10 % du volume sanguin total. Enfin, grâce à l'exposition aux rayons ultraviolets, la peau participe à la synthèse de la vitamine D, nécessaire à l'homéostasie calcique entre autres.

La peau se divise en trois compartiments majeurs, eux-mêmes stratifiés en différentes couches (Figure 1). Plus ou moins épaisses selon les parties du corps, la couche la plus superficielle est l'épiderme qui se divise en 5 couches cellulaires qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, la couche cornée (*stratum corneum*), la couche claire (*stratum lucidum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche de Malpighi ou couche épineuse (*stratum spinosum*) et la couche basale (*stratum basale*). Alors que les kératinocytes se trouvent dans chaque couche, d'autant plus différenciés que celle-ci est superficielle, les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les terminaisons nerveuses se situent dans les couches basales et supra-basales. Sous l'épiderme se trouve le derme, tissu conjonctif d'épaisseur variable et composé du derme papillaire, du derme réticulaire et du derme profond. Ce tissu conjonctif est constitué de macromolécules protéiques (fibres de collagène, élastine et fibronectine) qui assurent l'assise et l'élasticité cutanées. On y trouve aussi un gel de mucopolysaccharides permettant de capter l'eau et de constituer un réservoir d'hydratation et enfin des cellules immunitaires, des fibroblastes, les vaisseaux et les nerfs. Le derme joue un rôle essentiel dans la thermorégulation, dans la cicatrisation et l'élimination de produits toxiques *via* la sueur, riche en urée. De plus, fortement irrigué, il permet d'assurer la nutrition de l'épiderme par diffusion de molécules du réseau veineux vers les cellules épidermiques. Enfin, la plus profonde des couches de la peau est l'hypoderme, très déformable grâce à sa composition en tissus adipeux et conjonctifs. Servant d'interface entre la peau et les structures mobiles sous-jacentes (muscles, tendons, ligaments), l'hypoderme protège aussi l'organisme contre les chocs. Constituant

15 à 30 % du poids corporel, c'est à la fois une réserve de graisse mobilisable par le corps en cas de forte sous-alimentation et le principal manteau thermique.

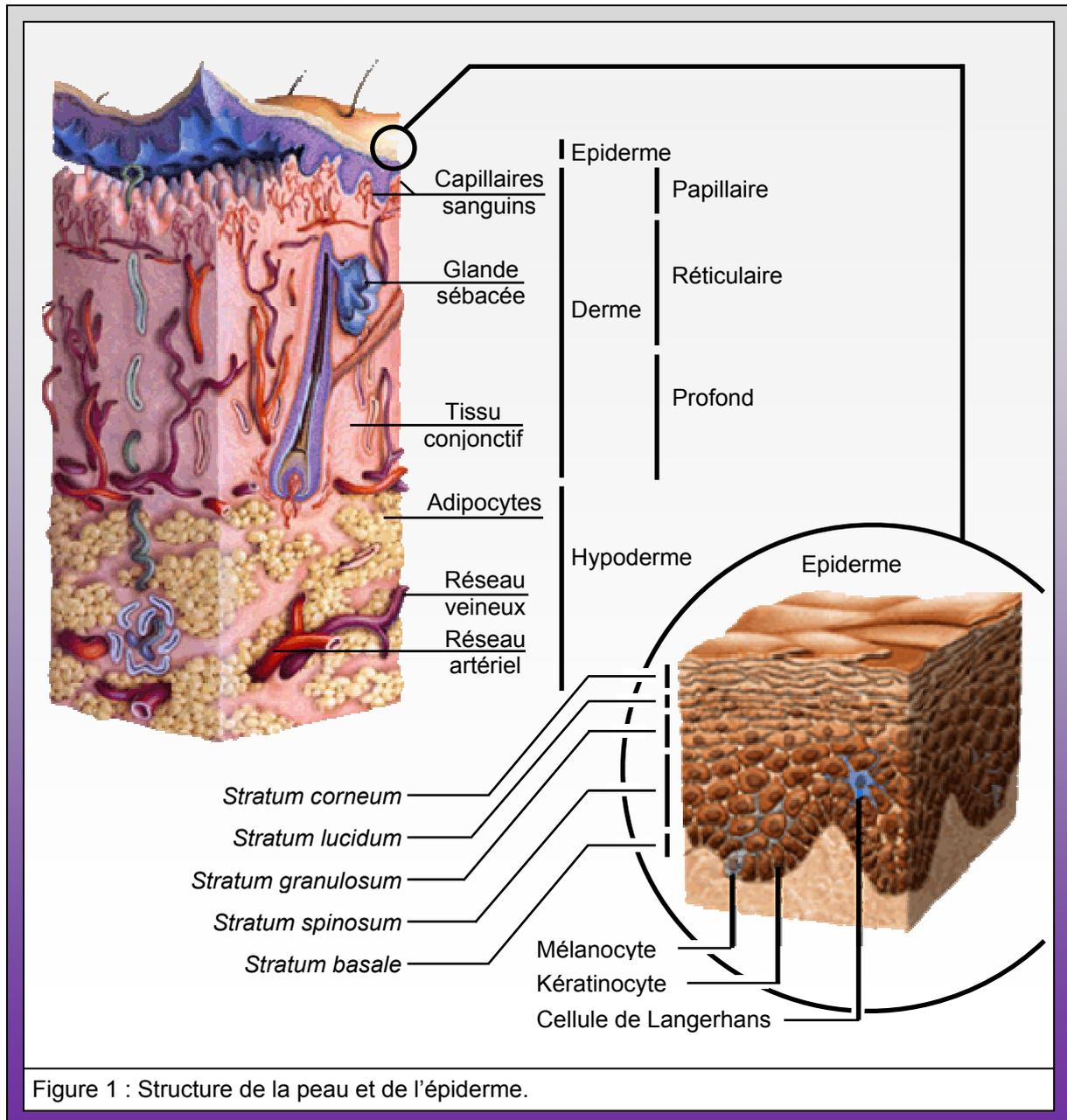


Figure 1 : Structure de la peau et de l'épiderme.

1.2. Aspects cliniques des cancers cutanés

Nous distinguerons dans cette partie les cancers cutanés épithéliaux des mélanomes cutanés. En effet, ces deux types de cancers n'ont pas la même origine cellulaire, les cancers cutanés épithéliaux se développant à partir des kératinocytes et le mélanome à partir des mélanocytes.

1.2.1 Mélanomes cutanés

Comme l'ensemble des cancers cutanés, le mélanome malin est une affection qui connaît une augmentation constante, avec une incidence qui double pratiquement tous les dix ans. Il existe de nombreux arguments pour suspecter le rôle des radiations ultraviolettes dans cette augmentation. Ainsi, l'exposition aux UV est actuellement considérée comme le principal facteur de risque environnemental, mais de nombreux paramètres relatifs à l'irradiation (intensité et périodicité) ou au phototype sont encore mal compris. Cette complexité est illustrée par de nombreux travaux sur la physiopathologie du mélanome (Miller and Mihm, 2006).

✓ *Epidémiologie*

L'incidence du mélanome varie selon la latitude et le phototype, ainsi sa fréquence est 10 fois plus faible dans les populations asiatiques ou noires. Elle est de 8 pour 100 000 habitants en France, 11/100 000 en Scandinavie et atteint 32/100 000 en Australie. Plusieurs facteurs de risque sont aujourd'hui définis, parmi lesquels les rayonnements ultraviolets. L'exposition aux UV est d'autant plus dangereuse qu'elle est intermittente et intense. Il existe aussi des prédispositions génétiques, avec l'existence de mélanomes familiaux. Dans ces familles présentant une prédisposition génétique au développement du mélanome cutané, le risque est multiplié par 8 pour les parents au premier degré. Le nombre de naevus, plus communément appelé grain de beauté, est aussi un facteur de risque (si > 100) et toutes modifications des caractéristiques cliniques d'un naevus doit susciter une attention particulière. Enfin, les derniers facteurs de risque connus sont l'âge et le sexe. En ce qui concerne l'âge, on constate une augmentation d'incidence qui débute après la puberté et atteint un pic d'incidence entre 30 et 50 ans. Quant au sexe, on observe que 2/3 des cas touchent la femme, avec une localisation préférentielle sur la jambe, alors que le mélanome se développe plus fréquemment sur le torse des hommes (47 % des cas). Il est à noter que les facteurs hormonaux et les traumatismes antérieurs sont suspectés, mais leur rôle reste à préciser.

✓ *Clinique*

Le mélanome se développe à partir des mélanocytes, situés dans la couche basale de l'épiderme. La population de cellules malignes se retrouve ensuite aux niveaux épidermique et dermique. Cette population est constituée de mélanocytes éosinophiles à noyaux volumineux, voire monstrueux. On observe une réaction inflammatoire dermique, de type lympho-histiocytaire en périphérie de la tumeur. L'évolution du mélanome s'effectue en deux étapes, avec une première phase de croissance lente, horizontale et intradermique. La seconde phase est plus ou moins rapide, et elle est dite verticale, avec envahissement du derme. Le mélanome est invasif dans 20 % des cas.

✓ *Classification des mélanomes (American Joint Committee on Cancer (Balch et al., 2001))*

La classification des mélanomes est établie en fonction du stade métastatique.

On considère aux stades I et stades II, les tumeurs primitives, caractérisées en fonction de l'épaisseur tumorale et de l'ulcération.

En ce qui concerne l'atteinte ganglionnaire (stade III), 3 facteurs pronostiques indépendants sont considérés : le nombre de ganglions métastatiques, le caractère microscopique (détecté par la

technique du ganglion sentinelle) ou macroscopique (cliniquement palpable) de la métastase ganglionnaire, ainsi que la présence ou l'absence d'ulcération du mélanome primitif. Par ailleurs, les métastases sous-cutanées satellites ainsi que les métastases en transit sont regroupées au sein du stade III.

Le stade IV est caractérisé par les métastases sous-cutanées à distance, les métastases pulmonaires, puis les autres sites et le taux de lactate déshydrogénase.

✓ *Histopathologie*

En fonction de l'existence ou non d'une composante intra-épidermique latérale, il existe une première classification du mélanome (tableau 1).

Composante intra-épidermique latérale	Mélanome
OUI	superficiel extensif sur mélanose de Dubreuilh sur des extrémités inclassable
NON	nodulaire

Tableau 1 : Classification histopathologique des mélanomes malins en fonction de la présence ou non d'une composante intra-épidermique latérale.

L'étude histologique permet aussi de définir une classification et une valeur pronostique en fonction de la profondeur. La classification de Breslow donne l'épaisseur de la tumeur en millimètres et le niveau de Clark permet de définir 5 stades (tableau 2).

Classification de Breslow épaisseur tumorale en mm	Niveau de Clark
	Clark I : mélanome malin strictement intra-épidermique
≤ 1	Clark II : mélanome du derme papillaire
1,1 à 2	Clark III : envahissement de la jonction réticulo-papillaire du derme
2,1 à 4	Clark IV : envahissement du derme réticulaire
> 4	Clark V : envahissement de l'hypoderme

Tableau 2 : Classification histopathologique de Breslow et niveau de Clark en fonction de l'épaisseur et de la profondeur tumorale.

✓ *Classification moléculaire*

Depuis quelques années, la mise en évidence d'altérations moléculaires non spécifiques impliquées dans la mélano-carcinogenèse permet d'envisager une nouvelle classification (Fecher *et al.*, 2007; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). La voie des kinases MAPK-ERK (mitogen-activated protein kinase - extracellular signal-regulated kinase) est largement impliquée dans la progression tumorale.

Plusieurs protéines de cette cascade de signalisation telles que Ras, Raf, Erk sont surexprimées. Par ailleurs, les mutations peuvent être différentes en fonction de la localisation du mélanome primitif. En effet, les mélanomes survenant en zone photo-exposée de façon intermittente (tronc par exemple) présentent des mutations touchant N-RAS seul ou B-RAF avec une perte de PTEN (phosphatase and tensin homolog). Les mélanomes sur zones photo-exposées de façon chronique (visage, cou) et de façon paradoxale des zones acrales et des muqueuses révèlent plutôt des mutations des gènes CDK4 (kinase dépendante de cyclines), TP53, CCND1 (cycline D1) et c-KIT. D'autres mécanismes moléculaires sont aussi décrits tels que la surexpression de Bcl-2, impliquée dans la résistance à l'apoptose. L'analyse du profil moléculaire du mélanome pourrait contribuer à optimiser l'utilisation des nouvelles molécules ciblées (anti-Bcl2, inhibiteur de B-RAF et de c-KIT) (Sekulic *et al.*, 2008).

✓ *Traitements*

Le traitement du mélanome malin se fait essentiellement de façon chirurgicale, et varie en fonction du stade.

Concernant les stades I et II, le traitement est chirurgical avec des marges d'exérèse qui dépendent de l'épaisseur tumorale. Une large exérèse est réalisée entourée d'au moins 3 cm du tissu sain avoisinant. Il se peut que le mélanome nécessite une amputation lorsqu'il siège sur les doigts ou les orteils. La recherche et l'analyse du ganglion sentinelle sont proposées pour les mélanomes d'épaisseur tumorale supérieure à 1 mm. En cas de micro-métastases dans le ganglion sentinelle, un curage ganglionnaire complémentaire est proposé. Un traitement adjuvant par interféron à faibles doses ou à fortes doses (stade II) permettrait alors d'augmenter la période de rémission sans récurrence et peut-être aussi la survie globale. La survie à 5 ans des patients atteints d'un mélanome de stade I est supérieure à 90 % et diminue à 45 % pour les mélanomes d'épaisseur supérieure à 4 mm (stade II).

Pour le stade III, c'est le traitement chirurgical qui sera privilégié, suivi éventuellement d'un traitement adjuvant par interféron à fortes doses. Le taux de survie à 5 ans des patients atteints de mélanome de stade III varie entre 60 % et 30 % en fonction de l'épaisseur de la lésion, du nombre de ganglions envahis et de l'existence ou non d'une rupture capsulaire.

Quant au stade IV, le traitement fait appel aux chimiothérapies avec des taux de réponses faibles (environ 20 %). De nouvelles molécules sont en cours d'expérimentation (anti-Bcl2, anti-CTLA-4, etc...). La chirurgie ne sera proposée que pour une métastase unique ou l'apparition de quelques métastases résiduelles chez un patient ayant bien répondu au traitement systémique.

1.2.2 Carcinomes cutanés épithéliaux

Les cancers cutanés épithéliaux ou carcinomes cutanés non mélaniques (NMSC) sont les plus fréquents des cancers humains en général et des cancers cutanés en particulier. Leur incidence augmente régulièrement du fait de l'allongement de la durée de vie et des comportements, en particulier l'exposition solaire répétée. La grande majorité des carcinomes épithéliaux cutanés sont de bon pronostic, avec une mortalité minime contrastant avec leur caractère récidivant et multiple et le

fait qu'ils touchent une population âgée. En raison du vieillissement de la population, ils constituent un problème de santé publique.

On distingue deux grands types de carcinomes cutanés :

- Les carcinomes basocellulaires (CBC), les plus fréquents (2/3 des carcinomes cutanés chez le sujet immunocompétent) sont des tumeurs d'évolution lente, essentiellement locales, qui ne métastasent jamais.

- Les carcinomes spinocellulaires ou épidermoïdes (CE) ont une évolution locale beaucoup plus agressive et peuvent métastaser. Ils représentent 1/3 des carcinomes cutanés.

Bien que se développant à partir de la même cellule, le kératinocyte, les deux cancers les plus fréquents (CBC et CE) ont une physiopathogénie et un comportement totalement différents, ce qui justifie de les présenter séparément.

- Les carcinomes basocellulaires

- ✓ *Epidémiologie*

Les carcinomes basocellulaires (CBC) touchent en France environ 70 individus pour 100 000 habitants par an. Cette incidence varie en fonction de la latitude et du phototype et atteignent en Australie jusqu'à 400 cas pour 100 000 habitants par an. La plupart de ces carcinomes surviennent après 50 ans et de manière sporadique mais certaines maladies congénitales en favorisent le développement. C'est le cas du *xeroderma pigmentosum*, lié à un déficit autosomique récessif des enzymes de réparation de l'ADN, et du syndrome de GORLIN, ou syndrome des hamartomes basocellulaires, qui associe des maladies du développement à des cancers multiples dont les carcinomes basocellulaires (Lear *et al.*, 2007; Roewert-Huber *et al.*, 2007).

- ✓ *Clinique*

Les CBC ne métastasent pas, mais présentent un potentiel invasif local pouvant entraîner une destruction tissulaire importante. L'incidence maximale du CBC est située entre 45 et 60 ans, sans prédominance de sexe. Typiquement, le CBC est une lésion perlée, papule arrondie translucide télangiectasique qui va s'étaler progressivement. Il existe plusieurs variétés anatomo-cliniques de gravité variable : le CBC nodulaire (60 % des cas), le CBC superficiel (10 à 25 % des cas), le CBC sclérodermiforme (5 % des cas). On trouve également des formes de CBC pigmentées et ulcéreuses.

La distinction entre le CBC et le carcinome épidermoïde est parfois difficile, ceci souligne l'intérêt de la biopsie qui permet de confirmer et préciser le diagnostic et le type histologique.

- ✓ *Histopathologie*

Le diagnostic du CBC est souvent posé cliniquement mais doit être confirmé par l'analyse d'une biopsie. Typiquement, le CBC est formé d'amas cellulaires basophiles à limites nettes, à dispositions périphériques palissadiques. Ces amas sont arrondis, plus ou moins confluent entre eux et certains peuvent être appendus à l'épiderme. Ils peuvent s'associer à une fibrose du derme, et à une différenciation pileuse ou kératinisante. Les formes infiltrantes ou sclérodermiques sont associées à un stroma dense et fibreux et ont des limites imprécises (Xie, 2008).

✓ *Traitements (recommandations ANAES 2004)*

Le geste thérapeutique sera toujours guidé par une analyse histologique préalable qui permet de définir le degré de gravité de la tumeur. Celui-ci s'accroît pour les CBC depuis la forme superficielle jusqu'à la forme sclérodermiforme ou ténébrante. Dans tous les cas, la taille de la tumeur doit être prise en compte. Pour un même type anatomo-clinique, une tumeur supérieure ou égale à 2 cm devra être traitée de manière plus agressive. De même, certaines localisations à haut risque de récurrence (région rétro-auriculaire, paupière, sillon nasogénien, cuir chevelu, extrémités) devront être prises en considération dans la décision thérapeutique. Enfin, on tiendra compte du caractère primitif ou récidivant de la tumeur. Le risque de récurrence est évalué à environ 5 % des CBC. Après une première récurrence, ce risque passe à plus de 40 % pour une récurrence ultérieure.

Le traitement chirurgical permet un contrôle histologique de la pièce d'exérèse et d'en affirmer son caractère complet ou non. Les marges d'exérèse varieront de quelques millimètres à un centimètre en fonction des critères de gravité (recommandations ANAES 2004). Le CBC n'entraîne pas de métastases mais son fort potentiel invasif local peut nécessiter des chirurgies mutilantes aux conséquences fonctionnelles et esthétiques lourdes. Après traitement de toute forme de CBC, une surveillance régulière (tous les six mois, puis tous les ans à vie) est recommandée pour dépister une récurrence de la lésion, mais aussi en raison du risque élevé d'apparition de nouveaux carcinomes cutanés.

Diverses alternatives thérapeutiques peuvent aussi se discuter. Il s'agit de la radiothérapie, de la cryothérapie, de l'immunomodulateur (imiquimod - autorisation de mise sur le marché AMM) et de la photothérapie dynamique topique (AMM).

- *Carcinomes épidermoïdes*

- ✓ *Epidémiologie*

L'incidence des carcinomes épidermoïdes (CE) cutanés est plus faible que celle des CBC. En France, elle est de 10 à 20 pour 100 000 habitants par an chez l'homme et de 5 à 10 pour 100 000 habitants par an chez la femme. En Australie, cette incidence est de 250 pour 100 000 habitants par an. Ici encore, le degré d'ensoleillement et le phototype sont des facteurs de risque importants.

Comme les CBC, la plupart des CE surviennent de manière sporadique. Cependant, il existe aussi des maladies congénitales prédisposant à leur développement comme le *xeroderma pigmentosum* et l'épidermodysplasie verruciforme (EV).

Contrairement au CBC, le CE survient souvent sur une lésion précancéreuse. Les plus fréquentes sont les kératoses photo-induites (kératoses actiniques ou solaires), les radiodermes, les cicatrices (en particulier de brûlures), les plaies chroniques (ulcères de jambes), le lichen scléroseux génital, le lichen érosif buccal et certaines lésions muqueuses virales infectées par le papillomavirus humain de type 16.

✓ Clinique

Le CE est souvent précédé de lésions précancéreuses. Il représente environ 1/3 des carcinomes cutanés et sa répartition selon le sexe est de 2 hommes pour une femme. L'atteinte des muqueuses n'est pas rare. Il s'agit typiquement d'une lésion croûteuse, jaunâtre, indurée avec ulcération centrale. Elle peut parfois prendre un caractère végétant ou bourgeonnant. Des formes de faible malignité (papillomatose orale floride de la muqueuse buccale, *carcinoma cuniculatum* de la plante des pieds à développement endophytique) ont été décrites. Le carcinome intra-épithélial (*in situ*) ou maladie de Bowen est une lésion strictement limitée à l'épiderme, n'ayant pas franchi la membrane basale. Il se présente comme une macule érythémateuse rosée ou brune, bien limitée, de caractère fixe. Il s'observe sur la peau glabre et les muqueuses.

✓ Histopathologie

Le CE se définit histologiquement comme une prolifération de cellules de grande taille organisée en lobules ou en travées plus ou moins anastomosées, souvent mal limitées, de disposition anarchique. Une différenciation kératinisante sous forme de globes cornés est fréquente. Il existe de nombreuses mitoses et des atypies cytonucléaires. La tumeur envahit plus ou moins profondément le derme, voire l'hypoderme au sein d'un stroma inflammatoire. Le caractère peu différencié et l'existence d'un certain degré de neurotropisme sont des facteurs de mauvais pronostic. Selon le degré d'infiltration du derme et de franchissement de la membrane basale, on parle de carcinome *in situ*, de carcinome micro-invasif ou de carcinome invasif.

✓ Traitements

Tout CE doit être considéré comme potentiellement agressif. L'évolution de proche en proche du CE, soit par infiltration, soit le long des vaisseaux ou des nerfs, est agressive et peut aboutir aux premiers relais ganglionnaires ou cheminer par la circulation sanguine jusqu'aux organes internes (poumons, foie, cerveau etc.). On recherchera donc toujours une adénopathie dans le territoire de drainage.

Les CE muqueux (lèvres, régions ano-génitales) sont de moins bon pronostic du fait de la plus grande fréquence des extensions ganglionnaires.

Pour le traitement curatif de l'atteinte primitive, les caractéristiques tumorales à prendre en compte sont les mêmes que pour le CBC et le geste thérapeutique sera toujours guidé par une analyse histologique préalable. Pour le CE, différents facteurs pronostiques sont à prendre en compte. Outre le terrain immunologique (immunosuppression), on s'inquiètera du degré de dédifférenciation et de l'existence ou non d'un neurotropisme. Dans tous les cas également, la taille de la tumeur doit être prise en compte et on peut schématiquement dire que pour le même type histologique, une tumeur de taille supérieure ou égale à 2 centimètres devra être traitée de manière plus agressive. De même, certaines localisations à haut risque de récurrence (sites de fusion embryonnaire : région rétro-auriculaire, paupière, sillon nasogénien, cuir chevelu, extrémités) devront être prises en considération dans la décision thérapeutique. Les localisations muqueuses sont aussi considérées comme des formes plus graves. Enfin, on tiendra également compte du caractère primitif ou récidivant de la

tumeur. Le risque d'une première récurrence est évalué à environ 7 % des CE. Ce risque augmente considérablement après une première récurrence puisqu'il dépasse 60 % des CE.

Ici encore, le traitement de choix est la chirurgie permettant le contrôle histologique de la pièce d'exérèse et de son caractère complet ou non. Les marges sont d'emblée plus larges que pour les CBC, proches du centimètre.

Les autres méthodes sont schématiquement réservées à des malades inopérables ou pour certaines localisations. Il s'agit de la radiothérapie et de la cryochirurgie. La chimiothérapie peut être intéressante dans les tumeurs de grande taille pour réduire la masse tumorale avant l'intervention. En outre, elle est réservée aux formes métastatiques et est basée sur l'utilisation de cisplatine.

Pour le traitement des atteintes ganglionnaires, toute adénopathie suspecte sera analysée. Si son atteinte est confirmée histologiquement, un curage ganglionnaire de la région doit être réalisé. Ce curage pourra être complété par une irradiation de l'aire ganglionnaire en cas d'effraction de la capsule ganglionnaire. Dans le cas des lésions muqueuses, une exploration systématique, uni- ou bilatérale des aires ganglionnaires, même en l'absence de ganglion cliniquement palpable, est conseillée.

Quant au traitement préventif, il repose sur la photo-protection et le suivi régulier des patients à risque ainsi que sur le traitement des lésions précancéreuses.

1.3. Facteurs de risque des cancers cutanés non mélaniques

Le facteur étiologique du CBC le plus fréquemment évoqué est l'exposition solaire intermittente avec effet cumulatif, et cette relation étroite entre soleil et cancers cutanés est bien illustrée par le constat que plus de 85 % d'entre eux surviennent sur des zones photo-exposées (Rigel, 2008). L'exposition solaire chronique est responsable de la formation de lésions précancéreuses, appelées kératoses actiniques qui peuvent régresser spontanément ou au contraire se transformer en un authentique CE. L'exposition solaire chronique est donc à l'origine du CE, expliquant son apparition plus tardive que celle du CBC et l'atteinte préférentielle des personnes âgées, après 60 ans, de phototype clair au niveau des zones photo-exposées (Rigel, 2008). Nous consacrerons un chapitre sur la relation entre le rayonnement ultraviolet et les cancers cutanés. Hormis les UV, de nombreux facteurs de risque ont été identifiés pour être à l'origine des CE dont les cicatrices ou les brûlures, l'exposition à des agents chimiques comme l'arsenic, le tabac et les goudrons, certains polymorphismes génétiques et l'infection par des papillomavirus humains. Parmi ces facteurs de risque, nous nous intéresserons plus particulièrement au polymorphisme du gène TP53 (qui code la protéine p53) et à l'infection virale.

1.3.1 Polymorphismes génétiques

Certains polymorphismes génétiques ont été impliqués dans le développement des carcinomes épidermoïdes dont TP53 (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002; McGregor *et al.*, 2002), l'interleukine 10 (IL-10) (Alamartine *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2008), des gènes codant des enzymes de réparation de l'ADN (Applebaum *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2002) et des systèmes anti-oxydants

(Ramsay *et al.*, 2001). En ce qui concerne le gène TP53, il semble exister un déterminisme génétique expliquant que certains patients vont développer de façon plus fréquente des cancers épithéliaux. En 1998, Storey *et al.* ont suggéré le rôle d'un polymorphisme génétique de TP53 qui s'exprime par la présence d'un résidu proline ou arginine en position 72 de la protéine p53 (Storey *et al.*, 1998). Bien que ces résultats aient été remis en cause (Cenci *et al.*, 2003), les auteurs ont également montré que ce polymorphisme jouait un rôle sur la dégradation de la protéine p53 par l'oncoprotéine E6 de différents HPV alpha. En effet, la présence d'un résidu arginine en position 72 rend la protéine p53 beaucoup plus sensible à la dégradation *in vitro* par l'oncoprotéine virale E6 des HPV muqueux de type 16, 18 ou 11 (Storey *et al.*, 1998). Si aucune étude n'a pu montrer d'association entre le polymorphisme de la protéine p53 et les cancers cutanés chez les patients immunocompétents (Bastiaens *et al.*, 2001; Bendesky *et al.*, 2007; McGregor *et al.*, 2002; Pezeshki *et al.*, 2006), une étude menée dans notre équipe a montré que le génotype arginine/arginine du codon 72 de l'exon 4 de TP53 représentait un facteur de risque potentiel pour le développement des cancers cutanés épithéliaux en zones photo-exposées chez les patients greffés rénaux (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002). En effet, le taux d'homozygotie arginine/arginine était significativement supérieur dans les tumeurs de patients transplantés (83 %) par rapport aux patients immunocompétents avec ou sans tumeurs (60 % et 59 %). McGregor *et al.* ont montré que les individus homozygotes arginine/arginine présentaient une sensibilité cutanée aux UV plus importante que les individus possédant un résidu proline (McGregor *et al.*, 2002). Ces auteurs suggèrent donc que la forme native proline de p53 est plus efficace que la forme arginine dans son rôle de gardienne du génome. A la différence de la forme proline de TP53, la forme arginine serait préférentiellement mutée et persisterait, expliquant son implication dans la carcinogenèse cutanée.

D'autres polymorphismes génétiques ont également été impliqués dans le développement des NMSC. Ainsi, deux études menées sur des cohortes de patients britanniques et australiens ont montré que le polymorphisme de plusieurs gènes de détoxification des radicaux libres, codant des enzymes de la famille des glutathion S-transférases induites par les UV, était associé au risque de développement des cancers cutanés chez les patients greffés rénaux soumis à une forte exposition aux UV (Fryer *et al.*, 2005; Ramsay *et al.*, 2001). De même, le polymorphisme des enzymes XRCC1 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1), XPD (*xeroderma pigmentosum* groupe D) des systèmes de réparations de l'ADN (Applebaum *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2002) et le polymorphisme du gène de l'IL-10 (Alamartine *et al.*, 2003 ; Nagano *et al.*, 2008) ont été impliqués dans le développement de cancers cutanés non mélaniques.

1.3.2 Papillomavirus humains

Un autre facteur carcinogène important est d'origine virale. Les études épidémiologiques conduites durant les trente dernières années ont confirmé le rôle des HPV-HR (HPV à haut risque oncogène) dans les cancers ano-génitaux, mais le rôle des HPV en tant que cofacteurs a aussi été proposé dans l'apparition d'autres tumeurs épithéliales, et un intérêt particulier s'est développé pour le rôle de l'infection par HPV dans le développement de cancers cutanés non mélaniques. Les lésions cutanées associées à HPV se développent plus particulièrement chez les sujets immunodéprimés

(patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme, greffés d'organe ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine) confirmant le rôle du statut immunitaire dans le développement de ces cancers (Grulich *et al.*, 2007). A la différence des HPV impliqués dans la carcinogenèse génitale qui appartiennent tous au genre alpha, les HPV retrouvés dans les cancers cutanés se répartissent dans les cinq genres humains, alpha, bêta, gamma mu et nu (de Villiers *et al.*, 2004).

✓ *Histoire naturelle de l'infection cutanée à HPV*

Puisque les HPV sont spécifiques de l'espèce humaine (Orth *et al.*, 1978), la principale source d'infection par ces virus est l'Homme, suivant un mode de transmission qui peut être direct, par contact cutané (Carr and Gyorfi, 2000), ou indirect, par l'intermédiaire du sol ou d'objets contaminés (Laurent and Kienzler, 1985). Lors d'inoculations expérimentales d'HPV, un délai de 2 à 9 mois est nécessaire avant d'observer la formation d'une lésion verruqueuse clinique (Kang *et al.*, 2000). Le développement d'une lésion suite à une infection par HPV n'est pas systématique et la prévalence de l'infection est beaucoup plus importante que celle des lésions cliniques. Des études ont montré la présence d'HPV au sein des follicules pileux provenant de sourcils de sujets immunocompétents ou immunodéprimés, suggérant l'existence d'un réservoir naturel folliculaire chez presque 90 % des personnes (Boxman *et al.*, 1997; de Koning *et al.*, 2007; Struijk *et al.*, 2003).

Seulement 26 % des individus vont développer des lésions cutanées à HPV (Larsson and Liden, 1980). Ces lésions vont persister plusieurs mois ou plusieurs années avant de régresser spontanément. Environ 35 % des verrues vulgaires régressent en 6 mois (Charleson *et al.*, 1992), et 67 % dans les deux ans suivant leur apparition (O'Brien, 1995). Les infections cutanées à HPV surviennent essentiellement pendant l'enfance. A titre d'exemple, les verrues vulgaires (Fazel *et al.*, 1999) et les myrmécies (Jablonska *et al.*, 1997) sont le plus souvent observées chez l'enfant et l'adolescent. Des facteurs protégeant contre le développement des verrues ont été identifiés à partir d'une cohorte d'écoliers britanniques nés en 1958. Il s'agit de la région de résidence (sud de la Grande-Bretagne), la profession non manuelle du père, le fait d'être enfant unique et l'appartenance à une ethnie non caucasienne (Williams *et al.*, 1993). L'âge au début des manifestations cutanées est dépendant du type d'HPV infectant, et dans une étude de 1997, Rubben *et al.* ont montré que les lésions induites par l'HPV 1 surviennent plus rapidement et persistent plus longtemps que celles induites par les HPV de type 2, 27 ou 57 (Rubben *et al.*, 1997).

La plupart des lésions cutanées induites par HPV régressent spontanément et dans leur étude d'une cohorte d'écoliers britanniques, Williams *et al.* ont observé une régression avant l'âge de 16 ans dans 93 % des cas (Williams *et al.*, 1993). Cependant, le virus persiste à un état latent dans les cellules épidermiques basales et peut être réactivé au cours d'état d'immunosuppression (Hazard *et al.*, 2007). Cette infection latente a été définie par la présence d'ADN viral en l'absence de production de virus (Stubenrauch and Laimins, 1999). L'incidence accrue de verrues cutanées, génitales et de cancer du col utérin chez des patients immunodéprimés en l'absence d'antécédents de telles lésions (Blohme and Bryneger, 1985), ainsi que la présence d'ADN viral en l'absence de lésions morphologiques (Syrjanen, 1989) confirment l'existence d'une infection latente. L'ADN viral est détecté par PCR à la fois dans des écouvillons cutanés de peau normale, et dans des biopsies de

peau normale provenant de patients greffés rénaux, confirmant ainsi la présence ubiquitaire de ces virus (Antonsson *et al.*, 2000). Les études menées chez le lapin en utilisant le CRPV (*cottontail rabbit papillomavirus*, papillomavirus du lapin) confirment le modèle de l'infection latente. Une étude de Schmitt *et al.* ont montré que l'infection par le CRPV cible préférentiellement les cellules souches de follicules pileux à partir desquelles l'infection peut se développer en quelques jours (Schmitt *et al.*, 1996). L'infection du lapin avec de faibles doses de CRPV induit la formation de papillomes viraux dans 20 à 30 % des sites infectés. Les autres sites présentent un aspect histologique normal, mais l'ADN viral peut y être détecté en très faible nombre de copies. De plus, la réactivation par des photosensibilisants permet le développement de papillomes viraux au niveau de ces sites histologiquement normaux (Amella *et al.*, 1994). Alors que le sexe ne semble pas être un facteur de risque dans la survenue des verrues cutanées (Kilkenny *et al.*, 1998), l'origine ethnique caucasienne (Mallory *et al.*, 1991), les professions en contact avec des animaux (Kilkenny and Marks, 1996), le cadre de vie (communautaire, grandes familles) (Williams *et al.*, 1993), l'immunosuppression (Bouwes Bavinck *et al.*, 2007; Harwood *et al.*, 2000), l'âge (Struijk *et al.*, 2003) et les UV (Harwood *et al.*, 1998) sont des facteurs de risque d'une infection cutanée à HPV. C'est cependant le statut immunitaire des patients qui semble jouer un rôle fondamental dans la carcinogenèse cutanée associée à HPV (Bouwes Bavinck *et al.*, 2007; Harwood *et al.*, 2000).

L'association entre l'infection par des HPV et le développement des cancers cutanés, en synergie avec le rayonnement UV, est bien illustrée chez les sujets immunodéprimés. Ceci a d'abord été mis en évidence chez des patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme (EV) qui présentent un déficit génétique responsable d'un déficit de l'immunité cellulaire, en particulier vis à vis des HPV 5 et 8 (Orth, 2008), conduisant à l'apparition de verrues sur toutes les parties du corps (Ramos *et al.*, 2002).

✓ *Patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme*

L'épidermodysplasie verruciforme (EV) est une génodermatose rare qui se transmet selon un mode autosomique récessif. Décrite en 1922 par Lewandowsky et Lutz, cette pathologie est caractérisée par une infection à HPV chronique et disséminée (Lewandowsky and Lutz, 1922). L'EV est considérée comme un modèle de carcinogenèse génétique liée aux HPV (Majewski and Jablonska, 1995). Exclusivement localisées au niveau cutané, les premières lésions de l'EV apparaissent généralement entre 4 et 8 ans. Elles se développent rapidement durant l'enfance. Les lésions de l'EV sont polymorphes (Lutzner *et al.*, 1984). Certaines d'entre elles peuvent ressembler à des verrues planes, alors que d'autres évoquent des kératoses séborrhéiques : plaques épaisses, papillomateuses et hyperkératosiques roses, violettes ou brunes. Des macules, plus ou moins squameuses et atrophiques, achromiques avec juste une bordure pigmentée ou complètement pigmentées, très proches cliniquement du pityriasis versicolor, peuvent être observées au niveau du tronc. La transformation en maladie de Bowen et en carcinome épidermoïde invasif est l'étape ultime survenant pour une ou plusieurs lésions chez 30 % à 60 % des cas rapportés à partir de l'âge de 30 ans (Jablonska, 1991; Orth, 1987). L'âge auquel apparaissent les premières lésions conditionne l'âge de survenue des carcinomes. La localisation quasi exclusive des cancers cutanés chez les patients

atteints d'EV au niveau des sites photo-exposés suggère que les radiations ultraviolettes sont un important cofacteur carcinogène. Les carcinomes épidermoïdes de l'EV évoluent lentement, ils ont certes un potentiel destructif local mais ne métastasent que très rarement (Gross *et al.*, 1988; Jablonska, 1991). Les carcinomes basocellulaires (CBC) y sont également plus fréquents que dans la population générale, mais cependant 16 fois moins fréquents que les carcinomes épidermoïdes (Tanigaki *et al.*, 1986). Les patients atteints d'EV sont sélectivement infectés par certains types d'HPV, nommés EV-HPV qui appartiennent au genre bêta. Mais le pronostic de cette affection est lié au potentiel oncogène de certains types d'HPV, et c'est dans les espèces 1 et 2 que l'on retrouve ces HPV, notamment les HPV 5 et HPV 8 dont l'ADN est retrouvé dans 90 % des carcinomes de patients souffrant d'EV (Orth, 1987), fréquence similaire à celle des HPV-HR associés au cancer du col utérin. A ce jour, au moins 19 types de bêta-papillomavirus ont été retrouvés chez les patients souffrant d'EV et l'infection est souvent multiple, avec plus de 10 génotypes différents. En revanche, seuls quelques génotypes sont liés à la transformation maligne, principalement l'HPV 5 et les HPV 8, 14, 17, 20, et 47 (Orth, 2006). Ces virus, lorsqu'ils sont présents sur la peau de sujets normaux, n'entraînent pas de lésions dans la population générale (Berkhout *et al.*, 1995), suggérant l'existence de facteurs génétiques prédisposant à une infection productive chez les patients atteints d'EV (Majewski and Jablonska, 2002). Deux locus de susceptibilité ont été identifiés chez ces patients, EV1 sur le chromosome 17q25 (Ramos *et al.*, 1999) et EV2 sur la région chromosomique 2p21-p24 (Ramos *et al.*, 2000). Ramos *et al.* ont identifié dans le locus EV1, deux nouveaux gènes, EVER1 et EVER2, dont les mutations sont associées à la maladie (Ramos *et al.*, 2002). Les mutations au sein de ces gènes pourraient constituer un déficit de l'immunité cellulaire vis-à-vis des HPV de type EV, dont la prévalence serait augmentée au cours des déficits immunitaires, et qui sous l'influence d'autres facteurs carcinogènes (en particuliers les radiations UV) favoriserait le développement de cancers cutanés (Majewski *et al.*, 1990).

✓ *Patients greffés d'organes*

Les carcinomes cutanés représentent les cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez les patients greffés. La majorité des travaux s'intéressant au risque de survenue de cancers cutanés chez ces patients a été réalisée chez les transplantés rénaux. L'association HPV et cancers cutanés chez ces patients a permis de montrer que le risque cumulatif de développer un cancer de la peau est de 30 à 60 %, 20 ans après la transplantation (Bouwes Bavinck *et al.*, 1996). Plus de 90 % des lésions épithéliales bénignes et près de 70 % des tumeurs épithéliales malignes de ces patients abritent de l'ADN d'HPV (Bouwes Bavinck *et al.*, 1996). Plusieurs études ont aussi montré une recrudescence des cancers de la peau chez des patients transplantés cardiaque ou hépatique (Euvrard *et al.*, 1995b; Veness *et al.*, 1999). L'importance de la dose de traitements immunosuppresseurs prescrite est aussi impliquée (Euvrard *et al.*, 1995a; Jensen *et al.*, 1999). Le déficit immunitaire explique la forte prévalence (supérieure à 90 %) de l'ADN d'HPV de type EV chez les sujets immunodéprimés après greffe d'organe, aussi bien en peau saine qu'au sein des lésions cutanées bénignes ou malignes (Bouwes Bavinck *et al.*, 2007). Cependant, la charge virale chez ces patients est extrêmement faible et ne diffère pas selon le type de lésion cutanée bénigne ou maligne

(Harwood *et al.*, 2000). L'ensemble des données de la littérature suggère que le délai d'apparition d'une tumeur dépend de plusieurs facteurs, dont l'âge au moment de la transplantation, le type de peau, les phototypes clairs étant plus sensibles, l'exposition solaire et l'immunosuppression. La diversité des génomes viraux est plus importante chez les sujets immunodéprimés que chez les sujets immunocompétents, et il n'est pas rare de détecter plusieurs types d'HPV au sein d'une même lésion (Bouwes Bavinck *et al.*, 2007; Euvrard *et al.*, 1993). Une étude menée dans notre laboratoire a permis de retrouver de l'ADN d'HPV dans 64 % des carcinomes épidermoïdes de patients greffés rénaux (24.5 % d'HPV bêta, 58.5 % d'HPV alpha et 19 % de co-infections) et dans seulement 37 % (12 % d'HPV bêta, 29 % d'HPV alpha et 4 % de co-infections) des carcinomes épidermoïdes de sujets immunocompétents (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002). En revanche, 79 % des lésions épithéliales bénignes provenant de sujets greffés rénaux présentaient de l'ADN d'HPV, fréquence similaire à celle observée dans les carcinomes épidermoïdes des mêmes patients. Ces résultats suggèrent donc encore une fois l'implication d'autres cofacteurs tels que l'exposition aux UV ou des facteurs génétiques dans la carcinogenèse épithéliale. Enfin, la fréquence de détection des HPV cutanés de type EV dans les follicules pileux atteint 90 % chez les greffés rénaux (Bouwes Bavinck *et al.*, 2007; Boxman *et al.*, 1997). Dans plus de 90 % des cas, les cancers cutanés chez ces patients apparaissent sur les zones photo-exposées (Harwood and Proby, 2002)(Proby *et al.*, 1996). De Jong-Tieben *et al.* ont confirmé le rôle des UV dans l'évolution des lésions à HPV sur une série de 75 transplantés rénaux (de Jong-Tieben *et al.*, 2000). En effet, les auteurs ont montré que 60 % des patients présentaient des HPV de type EV au niveau de lésions bénignes, que ces patients aient développé (41 cas) ou non (34 cas) un cancer cutané. De façon intéressante, il se trouve que les 34 patients qui n'ont pas développé de cancers ont été significativement moins exposés au soleil (de Jong-Tieben *et al.*, 2000). Par ailleurs, chez les individus qui ont développé un cancer, la prévalence des HPV de type EV est plus élevée au niveau des lésions bénignes et des lésions malignes qui ont été exposées au soleil par rapport aux lésions non photo-exposées.

✓ *Patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine*

En ce qui concerne les lésions cutanées des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), plusieurs études ont montré que la prévalence des verrues cutanées était plus importante en comparaison aux individus séronégatifs (Rodrigues *et al.*, 2001). Plusieurs observations chez des patients infectés par le VIH, rapportent des manifestations cutanées caractérisées par une éruption extensive de verrues planes et pigmentées ressemblant aux lésions de l'EV, associées à la présence de certains HPV spécifiques de type 5 et 8, considérés comme des virus à haut potentiel oncogène (Prose *et al.*, 1990). Une grande multiplicité de types d'HPV est retrouvée dans les lésions cutanées verruqueuses chez les patients séropositifs pour le VIH (Harwood and Proby, 2001).

Les patients séropositifs pour le VIH et les patients transplantés d'organe présentent un risque augmenté de développement de nombreux cancers, et dans une méta-analyse récente, Grulich *et al.* ont comparé, pour de nombreux cancers, l'augmentation de risque entre ces deux populations (Grulich *et al.*, 2007). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'augmentation du risque de

développement des différents cancers était similaire dans les deux populations. De plus, la plupart des cancers présentant un risque accru de survenue dans ces populations est associée à un agent infectieux. Ces observations suggèrent que le déficit immunitaire est principal facteur de risque pour ces deux populations (Grulich *et al.*, 2007).

✓ *Patients immunocompétents*

Bien que les différentes études aient montré une variabilité dans la détection d'ADN d'HPV au niveau de la peau saine chez les sujets immunocompétents, il est établi que c'est une zone de fréquente détection d'HPV et que les différences observées s'expliquent par la variété des sondes et des amorces utilisées pour les techniques de biologie moléculaire. Au niveau cutané, ce sont les follicules pileux qui constituent les plus importants réservoirs d'HPV. En effet, Boxman *et al.* ont montré que 45 % des volontaires sains (10/22) présentaient de l'ADN d'HPV de type EV dans ces sites (Boxman *et al.*, 1999). Dans ce travail, les auteurs n'ont pas retrouvé d'association significative entre la présence d'ADN d'HPV de type EV et le développement de cancers cutanés épithéliaux chez des sujets immunocompétents. En effet, si le spectre des HPV associés aux carcinomes épidermoïdes est beaucoup plus étendu, la prévalence des HPV n'est pas plus élevée que dans les tissus sains (Harwood *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2001; Pfister and Ter Schegget, 1997). En 2002, Cairey-Remonnay *et al.* ont retrouvé de l'ADN d'HPV bêta dans 6 cancers épidermoïdes cutanés sur un total de 51 (12 %) chez des sujets immunocompétents, et 29 % des tumeurs présentaient de l'ADN d'HPV muqueux, principalement des HPV-HR 16 et 18 (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002). Derancourt *et al.* ont, quant à eux, retrouvé la présence d'ADN des HPV alpha oncogènes 16 et 18 dans 28,6 % d'une série de 28 maladies de Bowen extra-génitales de sujets immunocompétents (Derancourt *et al.*, 2001). Plus récemment, sur une cohorte de 67 patients transplantés rénaux et 57 patients immunocompétents, Harwood *et al.* ont montré que la présence d'ADN d'HPV de type EV présentait un risque accru de développement de cancers cutanés non mélaniques (NMSC) (Harwood *et al.*, 2004). Cependant, cette même étude n'a pas pu montrer de rôle significatif des HPV bêta autres que les HPV de type EV dans le développement des NMSC. En 2006, Karagas *et al.* ont procédé à la détection d'anticorps anti-HPV dans le sérum de 252 patients atteints de CE et 525 patients atteints de CBC (Karagas *et al.*, 2006). En utilisant une technique de sérologie multiplex, les auteurs ont recherché chez ces patients la présence de 16 types d'HPV des genres alpha, bêta et mu. Les anticorps anti-HPV étaient plus fréquemment retrouvés chez les patients atteints de CE que dans la population témoin (odd ratio de 1,5), ce qui n'était pas le cas chez les patients atteints de CBC. De plus, les auteurs ont mis en évidence une association entre la séropositivité pour les HPV bêta (odd ratio de 1,5) et en particulier l'HPV 5 (odd ratio de 1,8) et le risque de développer un CE. Enfin, les individus présentant des CE au niveau des sites photo-exposés présentaient plus fréquemment une séropositivité pour HPV suggérant une association entre le rayonnement UV et les HPV bêta dans le développement des CE (Karagas *et al.*, 2006). Plus récemment, Patel *et al.* n'ont pas observé de différence significative dans la prévalence en ADN d'HPV dans des CE et de CBC. Cependant, les CE étaient plus souvent infectés par des HPV bêta de l'espèce 1 (dont les HPV 5, 8 et 24) que les CBC (Patel *et al.*, 2008). Enfin, Asgari *et al.* ont comparé la prévalence en ADN d'HPV bêta entre des

patients atteints de CE et des sujets sains. La prévalence en HPV était similaire dans les deux cas, mais les HPV bêta de l'espèce 2 étaient plus fréquemment retrouvés au sein des tumeurs que dans la peau saine avoisinante (Asgari *et al.*, 2008).

Si la présence d'HPV n'est donc pas le plus souvent associée à des lésions bénignes ou malignes, l'implication de ces virus dans la carcinogenèse épithéliale des sujets immunocompétents ou immunodéprimés peut être suggérée. Cependant de nombreux autres paramètres semblent primordiaux, comme la charge virale, l'infection par plusieurs types d'HPV, mais d'autres cofacteurs, tels que les UV ou la réponse immunitaire, jouent vraisemblablement un rôle fondamental (Meyer *et al.*, 2001; Storey, 2002).

2. Carcinogénèse induite par les rayonnements ultraviolets (UV)

2.1. Généralités sur les UV

Bien que les UV présentent certains aspects bénéfiques pour la santé de par leur implication dans la synthèse de la vitamine D ou leur utilisation en photothérapie, ils sont responsables de nombreuses altérations de la peau, allant du simple érythème aux cancers cutanés (Melnikova and Ananthaswamy, 2005).

Découvert en 1801 par le physicien allemand Johann Wilhelm Ritter, le rayonnement UV correspond à un rayonnement électromagnétique intermédiaire entre la lumière visible et les rayons X (Barth, 1987). Ce rayonnement est partagé en trois domaines de longueurs d'ondes différentes : les UVC de 200 à 280 nm, les UVB de 280 à 320 nm et les UVA de 320 à 400 nm (on distingue les UVA de courtes longueurs d'ondes, UVA2 entre 320 et 340nm, de ceux de longueurs d'ondes plus élevées, UVA1 entre 340 et 400 nm). La couche d'ozone absorbe efficacement les rayonnements UV de longueurs d'ondes inférieures à 310 nm, par conséquent, les UVC sont totalement absorbés ainsi que la majorité des UVB. Cependant, la dégradation de la couche d'ozone entraîne une augmentation de la quantité d'UVB atteignant la surface de la Terre et fait des UVA et des UVB les principaux agents impliqués dans la carcinogénèse cutanée. Il est à noter que si presque 100 fois plus d'UVA que d'UVB atteignent la surface de la Terre, l'efficacité biologique (érythème, mutations) des UVB est 1 000 fois plus importante (Svobodova *et al.*, 2006).

2.2. Relation entre cancers cutanés et exposition aux UV

La responsabilité des UV dans la carcinogénèse cutanée est suspectée depuis très longtemps en raison des observations suivantes :

- les cancers cutanés sont plus fréquents dans les pays de fort ensoleillement ;
- ils sont dans la majorité des cas situés sur les zones photo-exposées ;
- leur incidence est plus importante chez les individus de phototype clair, plus photosensibles ;
- il existe souvent une relation entre le degré de l'exposition solaire et le risque de survenue de cancer chez un même individu.

Depuis ces premières observations, de nombreuses études ont permis d'affirmer le caractère carcinogène des UV (Armstrong and Krickler, 2001; Elwood and Jopson, 1997; Rigel, 2008).

La contribution relative des différents types de radiations ultraviolettes dans les effets photo-dermatologiques comme le photo-vieillessement et la photo-carcinogénèse, de même que les mécanismes d'actions des UVB et des UVA demeurent débattus. Les événements impliqués dans la photo-carcinogénèse impliquent la formation de dommages à l'ADN, l'apparition de mutations

génomiques au niveau des sites endommagés et, suite à l'accumulation d'un nombre suffisant de mutations, la transformation maligne (Runger, 2007). Le rôle des UVB de la carcinogenèse cutanée est documenté depuis de nombreuses années (Rosenstein and Mitchell, 1987) alors que l'effet des UVA a longtemps été ignoré. Cependant, différentes études ont impliqué de façon certaine les UVA dans le développement tumoral (Agar *et al.*, 2004; Garland *et al.*, 2003).

2.3. Dommages cellulaires induits par les UV

Le maintien de l'intégrité génomique est essentiel à la transmission fidèle du patrimoine génétique. Il existe cependant de nombreux agents environnementaux capables de modifier le génome, parmi lesquels figure le rayonnement UV, principal facteur responsable de l'apparition des dommages à l'ADN de cellules cutanées.

2.3.1 Mutations génomiques induites par les UV

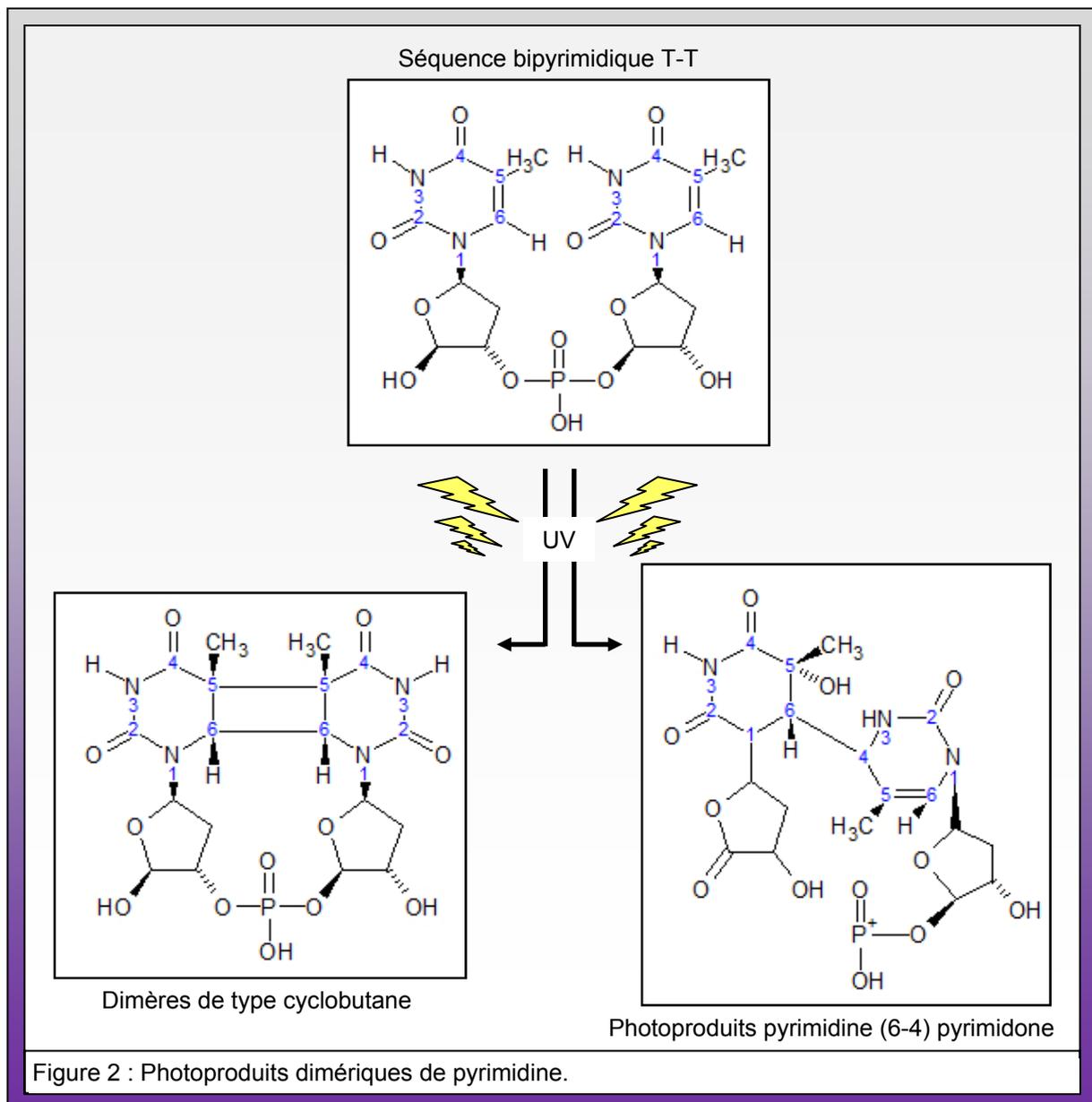
Les réactions induites par les UV au niveau de l'ADN impliquent essentiellement l'excitation des bases. Les cibles principales sont les pyrimidines (thymine et cytosine) et l'action des UVB sur l'ADN va principalement induire la formation de photoproduits dimériques entre deux pyrimidines adjacentes (Douki and Cadet, 1995). L'observation d'une relation entre l'apparition de photoproduits et le développement de carcinomes épidermoïdes (CE) chez la souris dans le spectre des UVB et des UVA2 a suggéré la forte implication des photoproduits dans la carcinogenèse cutanée (de Gruijl *et al.*, 1993). Parmi ces photoproduits dimériques, on trouve le plus fréquemment les dimères de type cyclobutane ou CPDs et les photoproduits pyrimidine(6-4)pyrimidone ou (6-4)pp. Les CPDs, considérés comme une signature du rayonnement UV (Dumaz *et al.*, 1993), sont formés par cyclo-addition des doubles liaisons C5-C6 de deux pyrimidines adjacentes, alors que les (6-4)pp sont issus d'une cyclo-addition entre la double liaison C5-C6 de la pyrimidine en 5' et le groupement carbonyle de la thymine situé en position 4 de la base en 3' (Figure 2) (Mitchell, 1988). A titre indicatif, le nombre de (6-4)pp est cinq à dix fois moindre que celui des CPDs (Eveno *et al.*, 1995). De plus, les photoproduits de type (6-4)pp sont réparés plus efficacement que les photoproduits de type CPDs. Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase incorporera préférentiellement une adénine (« règle du A ») en regard d'une base qu'elle ne saura pas interpréter. Dès lors les mutations CC vers TT et CT vers TT engendreront des mutations au sein du génome cellulaire. Ces mutations sont souvent trouvées au niveau des cancers cutanés (CE et CBC), notamment au sein du gène TP53 (Daya-Grosjean *et al.*, 1995), mais très rarement dans les cancers touchant les organes internes, confortant le rôle majeur des photoproduits de l'ADN dans la photo-carcinogenèse. Ces mutations ont d'ailleurs été nommées « mutations signatures des UV » (Wikonkal and Brash, 1999).

Récemment, Mouret *et al.* ont montré que des dimères de thymine étaient induits par les UVA à la fois dans des cellules humaines en culture et dans de la peau humaine (Mouret *et al.*, 2006). Ces auteurs ont aussi observé un taux supérieur de ces mutations directement induites par les UVA à celui induit par le stress oxydant (Mouret *et al.*, 2006). De même, il a été montré dans des cultures

primaires de fibroblastes humains (Kappes *et al.*, 2006) ainsi que chez la souris (Ikehata *et al.*, 2008), une prédominance de transitions C-T à la fois pour les UVA et les UVB. Ces mutations se répartissent dans les séquences pyrimidiques des domaines préférentiels de lésions induites par les UV (hot-spots), confirmant que les photoproduits de l'ADN sont les lésions prémutagènes suite à l'irradiation par des UVA comme par des UVB. Cependant, comparativement aux UVB, les UVA n'entraînent la formation que d'un faible nombre de photoproduits (Enninga *et al.*, 1986). L'absence d'une réponse cellulaire efficace lors de l'irradiation par les UVA a été proposée afin d'expliquer comment un faible nombre de lésions pouvait aboutir à un nombre substantiel de mutations. En utilisant des doses équimutagènes d'UVA et d'UVB, Kappes *et al.* ont confirmé cette hypothèse en démontrant que les lésions induites par les UVA ont un potentiel mutagène supérieur à celles générées par les UVB, en partie en raison d'une plus faible activation de la protéine p53 suite à l'exposition à des UVA (Kappes *et al.*, 2006). De plus, Ibuki *et al.* ont montré que l'apoptose induite par les UVB pouvait être inhibée par une irradiation conjointe par des UVA, et ce de façon dépendante de la dose d'UVA utilisée (Ibuki *et al.*, 2007). Il semblerait que lors d'une exposition à des UVA, l'inhibition de l'apoptose, mécanisme cellulaire de réponse anti-mutagène et anti-carcinogène, entraînerait un taux de mutations plus important et donc un risque carcinogène plus important.

En résumé, les lésions signatures des UVB sur l'ADN (transitions C-T) sont aussi induites par les UVA et les effets mutagènes des UVB et UVA passent principalement par la formation de photoproduits.

Sous l'effet des UV, la photochimie des purines est quantitativement bien moindre que celle des pyrimidines, mais elle présente quelques spécificités intéressantes. Une première classe de produits implique l'adénine qui, sous l'effet des UVB peut se dimériser ou réagir avec une thymine adjacente (Koning *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 1987). Toujours sous l'effet des UVB, la guanine peut s'oxyder en 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) (Wei *et al.*, 1997). La 8-oxoGua est une lésion qui entraîne un changement G vers T lors de la réplication de l'ADN. Mais la guanine reste plus sensible aux UVA (par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène) qu'aux UVB.



2.3.2 Effet des UV sur le stress oxydant

Une autre voie d'induction de lésions prémutagènes est représentée par les dommages oxydatifs causés à l'ADN suite à l'irradiation par les UV. Des réactions de photosensibilisation génèrent des radicaux libres, dont les espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxy ($\bullet OH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Pathak and Stratton 1968; Black 1987)(Hakozaki *et al.*, 2008). Si les ERO ont longtemps été considérées comme induites par les UVA, les UVB possèdent aussi la capacité d'induire leur formation (Kunisada *et al.*, 2005).

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques dont une oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides. Ces radicaux libres engendrent aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides.

Les lipides membranaires et principalement les acides gras poly-insaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique entraîne une cascade réactionnelle. En effet, le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer *et al.*, 1992). Cette attaque des phospholipides va entraîner une modification de la fluidité membranaire et du fonctionnement de nombreux récepteurs.

L'ADN est aussi une molécule très sensible à l'attaque par les ERO (Kikugawa and Beppu, 1987; Vaca *et al.*, 1988). Il existe au moins cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH[•]. Parmi elles, on peut citer les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intracaténaux, les cassures de brins et les pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002). En effet, les bases des acides nucléiques, et principalement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner leur oxydation générant entre autres la 8-oxoGua aux propriétés mutagènes (voir ci-dessus). Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique ou une coupure de chaîne simple brin. De plus, l'attaque radicalaire des protéines associées à l'ADN comme les histones ou les facteurs de transcription peuvent entraîner des pontages protéiques sur les bases des acides nucléiques. *In fine*, ces modifications de l'ADN peuvent induire des mutations GC vers TA souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. Cependant, ces lésions oxydatives de l'ADN sont minoritaires (8 % de l'ensemble des mutations induites par les UVA) par rapport aux lésions C-T induites directement par les UVA.

Par l'intermédiaire des ERO, les UV peuvent aussi activer la prolifération cellulaire. Devary *et al.* ont montré que l'irradiation de cellules par des UVC était capable d'entraîner une activation de protéines AP-1 dont c-Jun, *via* une cascade impliquant des tyrosines kinases de la famille Src, l'activation de Ha-Ras et la phosphorylation de Raf-1 (Devary *et al.*, 1992). De plus, l'irradiation par des UVB entraîne la phosphorylation du récepteur à l'EGF *via* H₂O₂ et l'activation de ERK1/2 et p38 (Peus *et al.*, 1999a; Peus *et al.*, 1999b). Il en résulte un effet de promotion tumorale des UV *via* les ERO.

2.3.3 Rôle des UV dans l'immunosuppression

Les effets des UV sur le système immunitaire sont connus depuis plus de 30 ans et sont responsables de l'aggravation de certaines maladies infectieuses mais aussi du développement de cancers cutanés (Ullrich, 2007).

Bien que la plupart des travaux sur les effets immunologiques des UV concernent les UVB, plusieurs études ont aussi montré l'importance des UVA en terme d'immunosuppression, en particulier chez l'Homme (Moyal and Fourtanier, 2008).

La découverte d'un rôle possible des UV sur le système immunitaire et les premières expériences de photo-immunologie datent de 1974, avec les travaux de Margaret Kripke sur la photo-carcinogenèse chez la souris (Aubin, 2003; Kripke, 1974). Dans cette étude, des tumeurs cutanées

ont été induites chez les animaux par une exposition chronique aux UV. Ces tumeurs ont ensuite été excisées et greffées sur des souris syngéniques receveuses. Contre toute attente, aucune croissance tumorale n'a pu être observée après la greffe. En revanche, lorsque ces tumeurs étaient greffées chez des souris receveuses immunodéprimées, la croissance tumorale était possible. Cette observation prouve la forte immunogénicité des tumeurs induites par les UV. Il restait à savoir comment ces tumeurs cutanées avaient pu se développer chez les souris donneuses. L'explication de ce phénomène est l'exposition chronique aux UV qui a deux effets : l'induction de cancers cutanés et l'immunosuppression. La même équipe en a fourni la preuve expérimentale. En traitant les souris receveuses par des doses d'UV infra-carcinogéniques avant la greffe, la croissance tumorale pouvait cette fois s'effectuer (Kripke, 1974). Dans des études suivantes, il a été montré que l'effet immunosuppresseur des UV pouvait être transféré à des souris syngéniques avec les lymphocytes T provenant d'animaux syngéniques préalablement exposés aux UVB (Daynes and Spellman, 1977; Fisher and Kripke, 1977, 1978; Ullrich and Kripke, 1984).

Depuis, les mécanismes cellulaires (induction de lymphocytes T régulateurs producteurs de cytokines immunosuppressives, IL-10) et moléculaires ont été élucidés (Aubin and Saas, 2007; Maeda *et al.*, 2008; Schwarz, 2008; Ullrich, 2005).

Les résultats observés chez l'Homme confirment aussi le rôle critique de l'immunosuppression dans la carcinogenèse cutanée induite par les UV. En effet, chez les patients transplantés d'organe et donc immunodéprimés, le risque de développer un cancer cutané au niveau des zones photo-exposées pendant la période post-greffe est fortement augmenté par rapport à la population non-immunodéprimée (Caforio *et al.*, 2000; Fortina *et al.*, 2000; Naldi *et al.*, 2000; Penn, 2000). Cette relation entre UV et immunité est renforcée par l'observation d'une diminution de la réponse immunitaire cellulaire chez des volontaires sains exposés aux UV (Cooper *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1998; Tie *et al.*, 1995) et par la relation entre immunosuppression et carcinogenèse cutanée (Yoshikawa *et al.*, 1990). En effet, si seulement 40 % des volontaires présentent une inhibition de l'immunité après une sensibilisation par les UV, la quasi-totalité des patients atteints d'un cancer cutané non mélanique présentent cet effet immunosuppresseur des UV (Yoshikawa *et al.*, 1990). Ceci a aussi été montré chez des patients souffrant de cancers multiples (Czarnecki *et al.*, 1995). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'immunosuppression induite par les UV est impliquée dans la carcinogenèse cutanée induite par les UV (Ullrich, 2007).

2.4. Mécanismes de défense cellulaire contre les lésions induites par les UV

2.4.1 Mécanismes de défense anti-oxydants

Pour lutter contre la surproduction d'ERO et ses conséquences, la cellule possède plusieurs systèmes de défense. On peut regrouper les mécanismes anti-oxydatifs en 3 grandes classes :

- la protection par les systèmes enzymatiques ;
- la protection par les petites molécules ;
- la protection contre l'activation des peroxydes (piégeage des ions métalliques).

En ce qui concerne la protection par des enzymes, elle est assurée par les superoxydes dismutases, la catalase et la glutathion peroxydase (Leccia *et al.*, 1993; Moysan *et al.*, 1993).

Les petites molécules, anti-oxydants cellulaires, sont essentiellement la vitamine E, la vitamine C et les caroténoïdes. Le rôle protecteur des caroténoïdes et de la vitamine E dans les stress oxydatif induit par les UVA est bien admis (Krinsky, 1993; Niki, 1987; Sies and Krinsky, 1995).

Les ions métalliques ont un rôle activateur dans l'activation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion radical superoxyde. Ainsi toute molécule susceptible de séquestrer les ions métalliques constitue une protection. La ferritine assure le stockage du fer (Vile and Tyrrell, 1993) ; le stockage du cuivre et d'autres métaux lourds étant assuré par la métallothionine (Kobayashi *et al.*, 1994).

2.4.2 Mécanismes de lutte contre les dommages causés à l'ADN

Le cycle cellulaire correspond à une succession de phases G1 (Gap 1), S (Synthèse), G2 (Gap 2) et M (Mitose), entrecoupées de points de contrôle (pour revue voir Pietenpol and Stewart, 2002). L'identification des points de contrôle du cycle cellulaire dans différents modèles a valu à Leland H. Hartwell, Paul M. Nurse et R. Timothy Hunt le Prix Nobel de physiologie et de médecine 2001. Zhou et Elledge ont confirmé que ces points de contrôle assurent la surveillance du cycle cellulaire et en particulier la fidélité de réplication du matériel génétique (Zhou and Elledge, 2000). Les cellules peuvent marquer un temps d'arrêt à ces points de contrôle pour permettre la réparation des dommages de l'ADN.

✓ Arrêt du cycle cellulaire

Le gène TP53 code une phosphoprotéine de 53 kDa (p53) qui contribue au maintien de l'intégrité génomique en modulant l'expression de protéines régulatrices du cycle cellulaire (Levine *et al.*, 1991; Vogelstein and Kinzler, 1992). La présence des dommages à l'ADN va provoquer une augmentation du taux de p53 intracellulaire aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire, permettant ainsi la réparation des lésions génomiques (Kuerbitz *et al.*, 1992). Lorsque ces lésions sont trop nombreuses, p53 peut induire l'apoptose des cellules endommagées (Harris, 1996). De plus, p53 module de façon directe ou indirecte la réparation de l'ADN (Li *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1995). L'activation de la protéine p53 par les UV a été montrée dans des cellules en culture (Decraene *et al.*, 2001), dans le tissu épidermique murin (Maltzman and Czyzyk, 1984) et dans la peau humaine (Decraene *et al.*, 2001).

En conditions physiologiques, la protéine p53 est faiblement exprimée dans les cellules grâce à un renouvellement rapide médié par son principal régulateur négatif, la protéine MDM2 (mouse double minute 2) (Yang *et al.*, 2004). La protéine MDM2 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53, permet l'exportation de p53 vers le cytoplasme (Alarcon-Vargas and Ronai, 2002) et favorise sa dégradation par le protéasome (Haupt *et al.*, 1997). Les modifications post-traductionnelles de p53 sont essentielles à son activation (Jin and Levine, 2001).

Ainsi, après des dommages à l'ADN, les membres de la famille des kinases apparentées aux kinases dépendantes des phosphatidyl-inositols (phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases ou PIKKs) sont activés. Trois de ces kinases, la DNA-PK (DNA-dépendant protein kinase), l'ATM kinase (Ataxia-

Telangectasia Mutated) et l'ATR kinase (ATM-Rad3-related) (pour revue Canman and Lim, 1998), peuvent activer des protéines effectrices comme les kinases Chk1 et Chk2 (Human Checkpoint Kinase 1 et 2), p53 et MDM-2. La kinase Chk1 est principalement activée par ATR et la kinase Chk2 par ATM. La voie ATR/Chk1 est mise en jeu lors de lésions génomiques induites par les UV alors que la voie ATM/Chk2 est surtout impliquée lors de cassures double brin de l'ADN. Certains substrats de Chk1 et Chk2 sont communs comme les protéines de la famille CDC25 et la protéine p53 qui jouent un rôle central dans la régulation des points de contrôle au cours des phases G1 et G2 du cycle cellulaire (Figure 3).

L'arrêt du cycle en phase G1 se fait par régulation négative des complexes cycline/CDK qui sont impliqués dans la progression G1/S, *via* la phosphorylation des protéines à poches comme p105^{Rb} (le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome). Les CDK sont elles-mêmes régulées positivement par la phosphatase CDC25A. La phosphorylation de CDC25A par les complexes ATR/Chk1 et ATM/Chk2 favorise sa dégradation et son inactivation (Figure 3). La protéine p53 est elle aussi phosphorylée par les kinases ATM, ATR, Chk1 et Chk2, favorisant sa stabilisation et l'induction d'expression de ses protéines cibles dont la protéine inhibitrice de CDK (CKI pour cyclin-dependent kinase inhibitor) p21^{WAF1/CIP1}. En réponse à un stress génotoxique, la protéine p21^{WAF1/CIP1} est surexprimée suite à une transactivation dépendante de p53 et se trouve alors capable de fixer et d'inactiver les complexes cycline D/CDK4, 6 et cycline E/CDK2, normalement responsables de la phosphorylation la protéine p105^{Rb}. L'accumulation de la forme hypophosphorylée de p105^{Rb} conduit à la séquestration des facteurs de transcription E2F/DP, bloquant ainsi l'expression de leurs gènes cibles, avec pour conséquence l'inhibition de transition G1/S. La protéine p21^{WAF1/CIP1} a toutefois une spécificité plus large puisqu'elle peut bloquer les complexes cycline A/CDK2 et cycline B/CDK1 et l'activité de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui est une sous-unité régulatrice de l'ADN polymérase δ , essentielle dans l'étape de réplication de l'ADN (Waga *et al.*, 1994). Il est à noter que le gène PCNA est aussi une cible des facteurs de transcription E2F.

L'arrêt du cycle en phase G2 et par conséquent la transition G2/M sont contrôlés par l'état de phosphorylation des protéines CDC25C et p53. La p53 active protéine 14-3-3 σ qui se lie à la phosphatase CDC25C phosphorylée induisant l'exportation et la séquestration de la protéine CDC25C dans le cytoplasme (Matsuoka *et al.*, 1998), ce qui inhibe son activité phosphatase nécessaire à l'activation de CDK1 (Lopez-Girona *et al.*, 1999). La surveillance de la phase G2 par la protéine p53 s'exerce aussi *via* les protéines p21^{WAF1/CIP1} et GADD45 inhibant directement CDK1 (Bunz *et al.*, 1998; Vairapandi *et al.*, 2002), et la protéine 14-3-3 σ séquestrant dans le cytoplasme non seulement CDC25C mais aussi la cycline B et la CDK1 (Hwang and Muschel, 1998). Enfin, p53 peut réprimer l'expression de CDK1 et de la cycline B ; les promoteurs des gènes qui codent ces 2 protéines contiennent un site de fixation pour p53 (Flatt and Pietsenpol, 2000). L'arrêt du cycle cellulaire au cours des phases G1 et G2 permet la mise en place de multiples mécanismes de réparation de l'ADN minimisant les conséquences d'une exposition aux agents mutagènes comme les UV.

Les mécanismes de réparation de l'ADN se distinguent en fonction de leur capacité à prendre en charge des lésions plus ou moins complexes et par leur degré de fidélité. Les principaux systèmes de réparation de l'ADN sont les systèmes par excision de bases (BER : Base Excision Repair) et par excision de nucléotides (NER : Nucleotide Excision Repair).

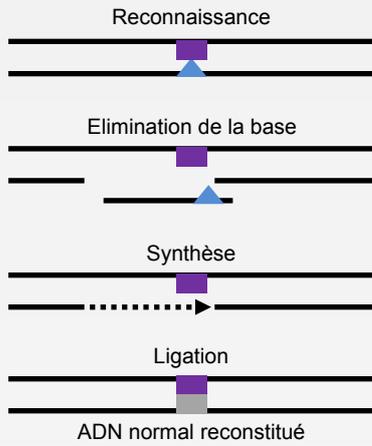
La réparation par excision de bases (BER) est très importante et s'applique à plusieurs types de lésions de l'ADN (Lindahl, 2000). Ce mécanisme de réparation de l'ADN est capable de prendre en charge la plupart des dommages causés à l'ADN par le métabolisme interne de la cellule, mais aussi par les dommages oxydatifs causés par les UV comme la 8-oxoGua (Krokan *et al.*, 1997). Ce système fait intervenir une glycosylase qui génère un site abasique. Ce site apurique ou apyrimidique (AP) sera clivé par l'AP endonucléase (APurique ou APyrimique endonucléase) pour permettre la synthèse d'ADN au niveau de la cassure (Wood, 1996) (Figure 4).

La réparation par excision de nucléotides (NER) joue un rôle central dans la cellule en raison de son large spectre d'action et représente la principale défense contre les effets des UV. Ce processus de réparation est multi-enzymatique, ubiquitaire et très conservé au cours de l'évolution. Les patients atteints de *xeroderma pigmentosum* présentent des mutations au niveau des gènes codant les protéines impliquées dans ce processus. Il en résulte une forte photosensibilité, une pigmentation anormale de la peau et un risque 1 000 fois plus élevé de développer un cancer cutané dès l'enfance. Ce système implique 20 à 30 protéines et se déroule selon le schéma suivant : reconnaissance de la lésion, ouverture de la double hélice d'ADN, double incision de chaque côté de la lésion, remplissage de la brèche simple brin puis ligation du brin d'ADN (Figure 4).

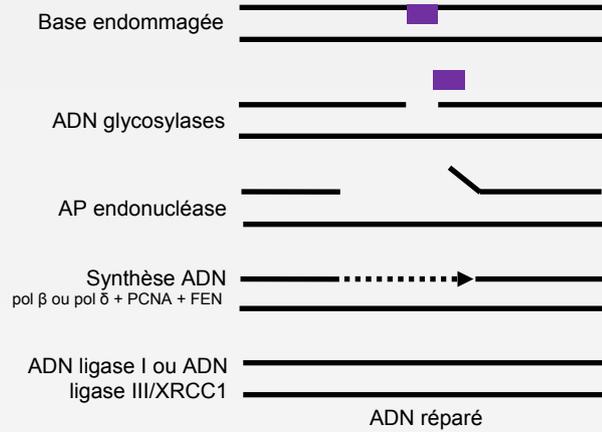
Un lien direct a été établi entre la protéine p53 et la réparation par le système NER. L'induction du gène TP53 permet la production d'une sous-unité protéique de la ribonucléotide réductase, chargée de fournir les nucléotides nécessaires à la réparation de l'ADN (Lozano and Elledge, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). De plus, la protéine p53 transactive deux gènes associés au *xeroderma pigmentosum* qui code deux protéines qui reconnaissent les lésions de l'ADN et s'y fixent (Amundson *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 1999). Enfin, la protéine p53 peut activer la protéine GADD45 qui peut se fixer à l'ADN et entraîner un remodelage de la chromatine favorisant l'accessibilité aux lésions induites par les UV (Carrier *et al.*, 1999).

Par ailleurs, il existe d'autres mécanismes de réparation de l'ADN : la réparation des mésappariements de bases qui corrige les erreurs lors de la réplication de l'ADN, la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue ou par religation non homologue (Figure 4). Ces systèmes ne sont cependant pas ou peu mis en jeu suite aux dommages de l'ADN induits par les UV (Ikehata *et al.*, 2008; Runger, 2007; Runger and Kappes, 2008).

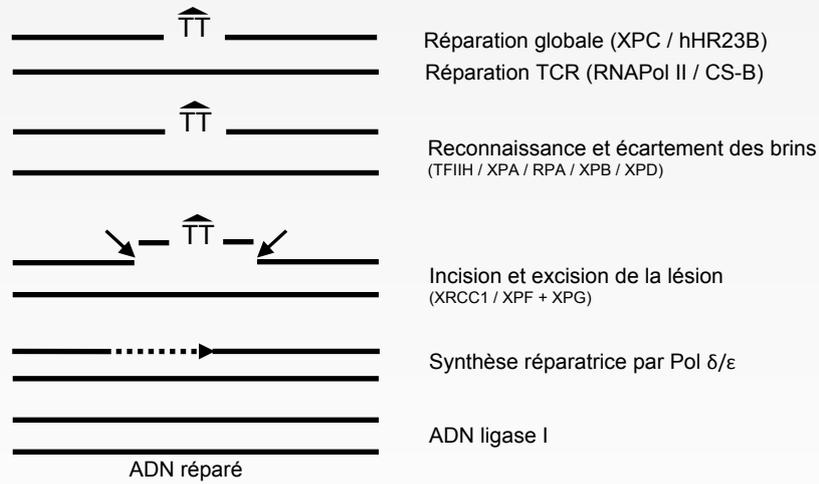
Réparation des mésappariements de base



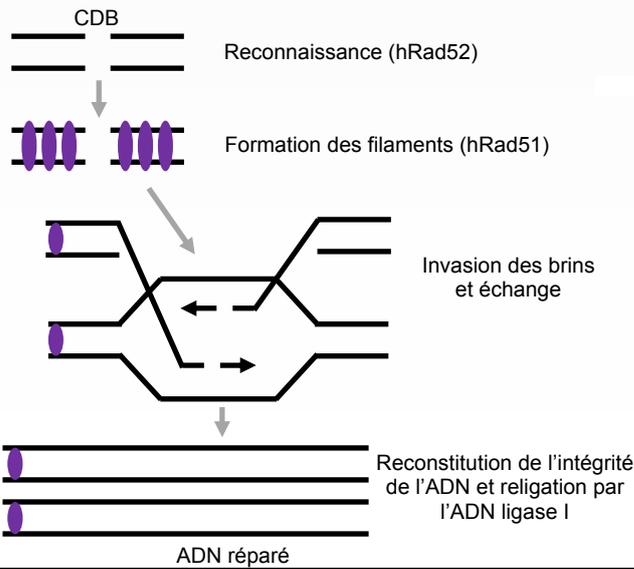
Excision de bases (BER)



Excision de nucléotides (NER)



Recombinaison homologue



Réparation non homologue

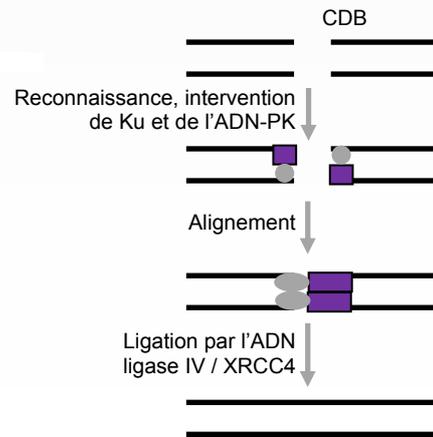


Figure 4 : Mécanismes de réparation de l'ADN (d'après Averbeck, 2001).

2.4.3 Elimination des cellules endommagées par les UV

La mort cellulaire par apoptose est cruciale pour compenser la prolifération kératinocytaire et la formation du *stratum corneum*. L'apoptose représente aussi un important mécanisme contre le développement de cancer, puisque les kératinocytes ayant accumulé des mutations suite à l'irradiation par des UV sont éliminés par apoptose.

✓ Voies apoptotiques déclenchées par les UV

Les cellules répondent aux signaux de mort environnementaux, extracellulaires et intracellulaires par de nombreux senseurs qui coordonnent et intègrent la réponse apoptotique. Deux voies apoptotiques majeures ont été décrites : (i) la voie apoptotique extrinsèque médiée par les récepteurs à domaine de mort de la membrane plasmique et (ii) la voie intrinsèque, principalement induite en réponse aux dommages à l'ADN et impliquant la mitochondrie. Les UV peuvent induire ces deux voies apoptotiques.

La voie apoptotique extrinsèque (Figure 5), ou voie des récepteurs de mort, implique les récepteurs membranaires de la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF, pour tumor necrosis factor). Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (CD95 ou Apo-1) activé par son ligand FasL (CD95L ou Apo-1L) (Oehm *et al.*, 1992), le récepteur TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor 1) qui lie le TNF et la lymphotoxine α (Loetscher *et al.*, 1990), et TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5, Apo2, TRICK2 ou Killer) qui sont les récepteurs de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire de liaison au ligand, riche en cystéines et dans leur région cytoplasmique, un domaine de mort (DD pour death domain) (Ashkenazi and Dixit, 1998). Le DD de ces récepteurs permet le recrutement d'autres protéines possédant aussi un DD et assurant la propagation du signal de mort. (Chaudhary *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997). La plupart des ligands de ces récepteurs sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires. Des métalloprotéases membranaires vont cliver les domaines extracellulaires de ces précurseurs pour générer des formes solubles trimériques. Ainsi l'initiation de l'apoptose nécessite la trimérisation des récepteurs. Trois autres récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de TRAIL ont été identifiés : TRAIL-R3 (DcR1, TRID ou LIT), TRAIL-R4 (DcR2 ou TRUNDD) et l'ostéoprotégérine (OPG). Aussi nommés récepteurs leurres, DcR1 et 2 (DcR pour decoy receptors) et l'OPG fonctionnent comme modulateurs interférant avec l'activité des récepteurs de mort car ils ne possèdent pas de domaine propre intracytoplasmique. Pour cette raison, ils sont considérés comme étant non apoptotiques et représentent un mécanisme de contrôle de l'apoptose induite par TRAIL (Clancy *et al.*, 2005; Emery *et al.*, 1998).

Une fois le ligand fixé, le récepteur de mort activé va recruter la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated protein with death domain). Le récepteur Fas recrute directement FADD *via* son DD alors que le récepteur TNF-R1 va recruter la protéine adaptatrice TRADD (TNF-R associated death domain) qui possède un DD qui va permettre de recruter la protéine FADD. Les récepteurs de TRAIL vont recruter FADD ou TRADD. En plus de son domaine DD, la protéine FADD possède un domaine effecteur de mort (DED pour death effector domain) qui va permettre le recrutement de la procaspase-8. Le complexe ainsi formé, nommé DISC (death-inducing signaling complex) va permettre le clivage

de la procaspase-8 en caspase-8 active (Kischkel *et al.*, 1995). Cette caspase initiateur active va permettre l'activation des caspases effectrices 3 et 7. Il s'ensuit une cascade protéolytique aboutissant au clivage d'une centaine de substrats cellulaires (dont la PARP, poly (ADP-ribose) polymérase), à la fragmentation de l'ADN (caractérisée par une population en phase Sub-G1) et à la mort de la cellule. Il existe différents régulateurs protéiques capables de moduler l'apoptose induite par les récepteurs de mort dont les récepteurs leurres et la protéine inhibitrice de la caspase 8, cFLIP (cellular-flice like inhibitory protein). La protéine cFLIP est une isoforme de la caspase-8 ne possédant pas de site protéolytique qui entre en compétition avec la caspase-8 dans le formation du DISC (Krueger *et al.*, 2001).

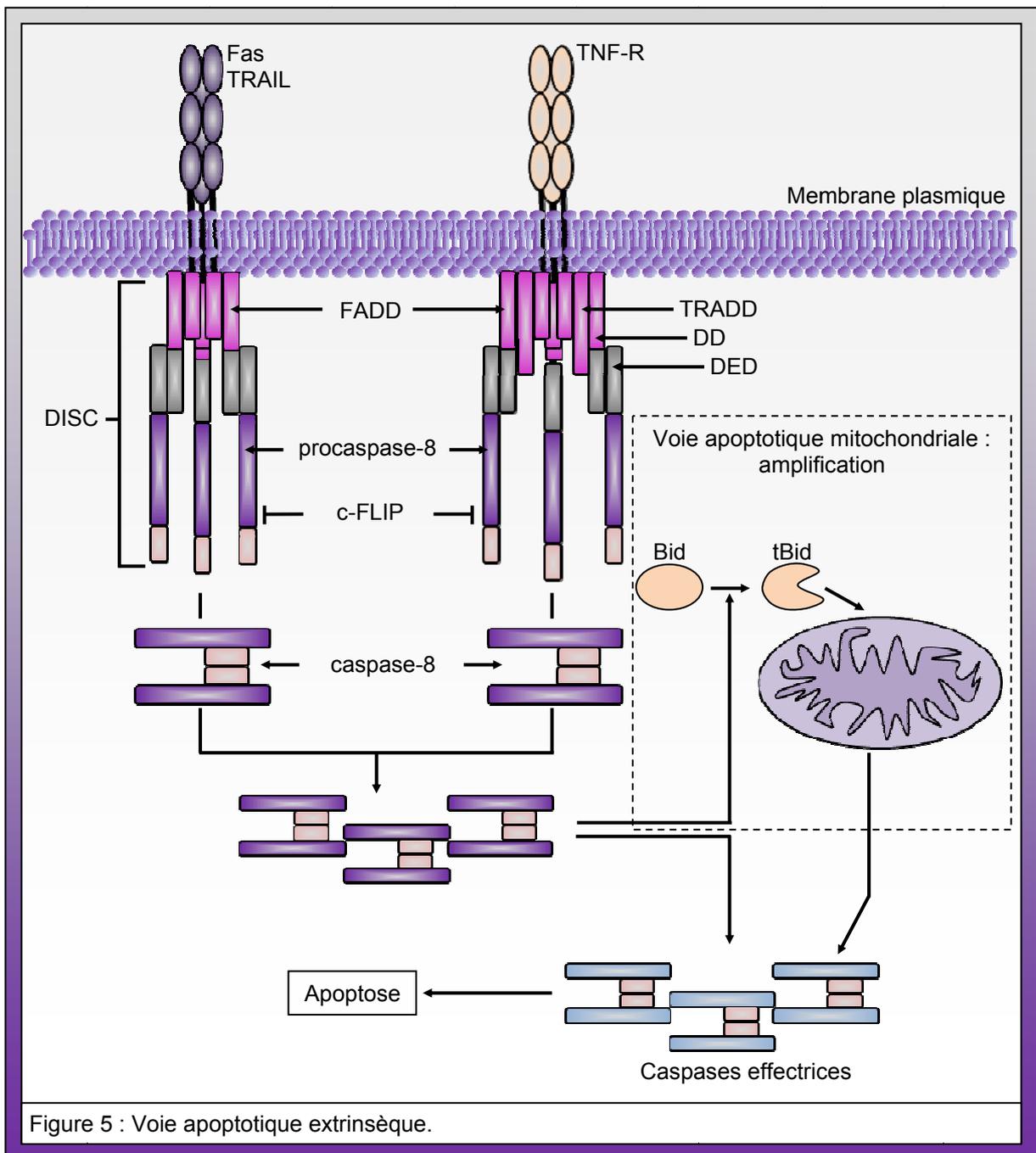
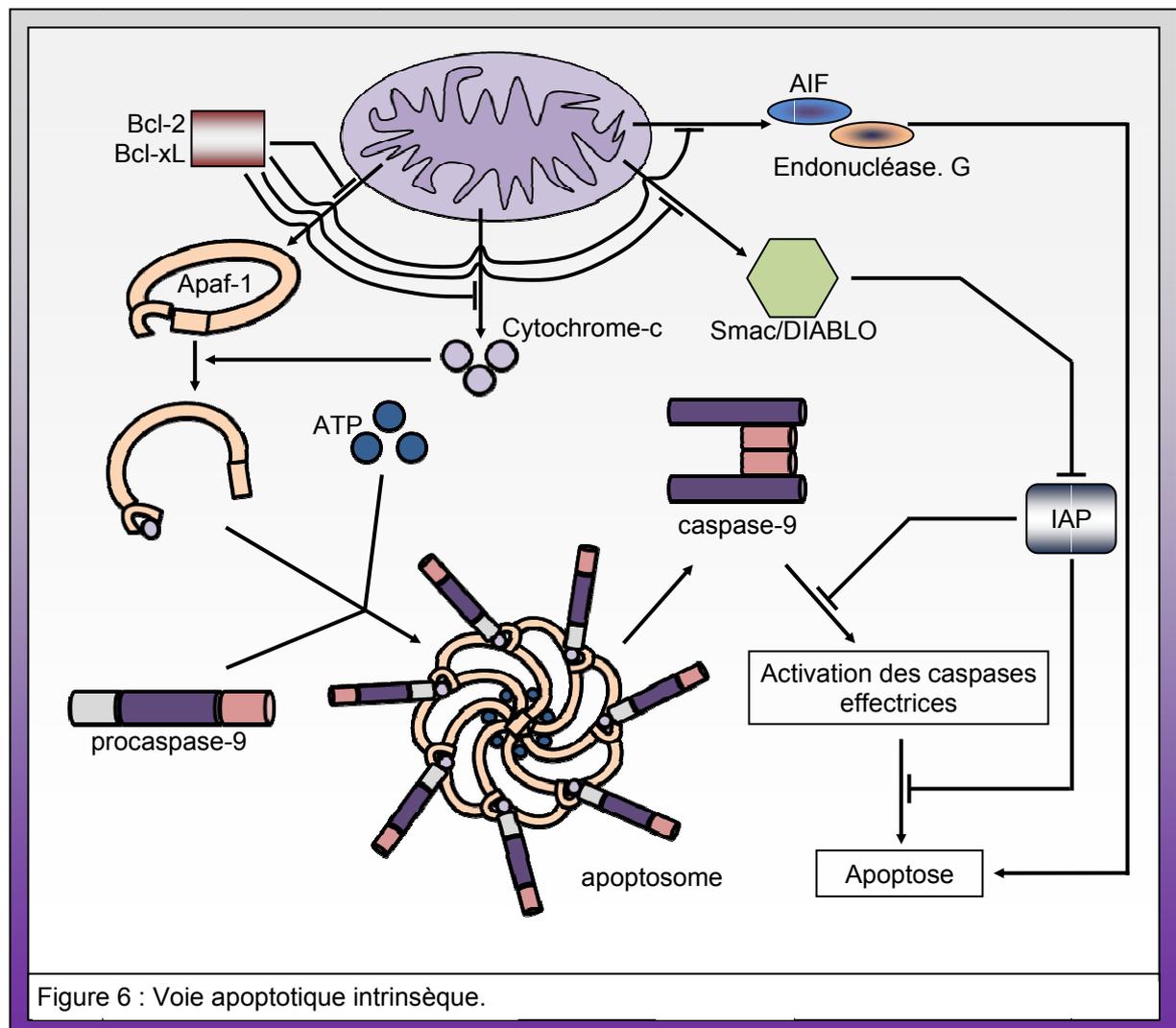


Figure 5 : Voie apoptotique extrinsèque.

La voie apoptotique intrinsèque (Figure 6) est définie par la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe qui aboutit à la libération dans le cytoplasme de molécules apoptogènes contenues dans l'espace intermembranaire (le cytochrome c, certaines pro-caspases, les protéines Smac/DIABLO, l'AIF et l'endonucléase G) (Green and Kroemer, 2004; Zhivotovsky *et al.*, 1998). Cette perméabilisation de la membrane mitochondriale, accompagnée d'une chute du potentiel membranaire mitochondrial, est régulée par les membres de la famille Bcl-2 qui comporte des membres pro-apoptotiques (dont Bax, Bak et Bid) et des membres anti-apoptotiques (dont Bcl-2 et Bcl-xL).

La libération de cytochrome c va permettre la formation de l'apoptosome, complexe formé d'ATP, de cytochrome c, de la protéine Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1) et de la procaspase-9. L'apoptosome va permettre l'activation de la caspase-9 initiateur (Li *et al.*, 1997) et l'exécution de l'apoptose. Les protéines Smac/DIABLO vont bloquer des protéines capables d'inhiber les caspases nommées protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) (Shiozaki and Shi, 2004). L'AIF (apoptosis-inducing factor) et l'endonucléase G vont être transloquées dans le noyau et induire une apoptose indépendante des caspases (Kalinowska *et al.*, 2005; Susin *et al.*, 1999; Vahsen *et al.*, 2006).



Les deux voies apoptotiques pré-citées sont impliquées dans l'apoptose de kératinocytes induite par les UV et sont reliées par la protéine pro-apoptotique Bid. En effet la caspase-8, activée par la voie apoptotique extrinsèque, va cliver la protéine Bid en tBid (truncated Bid) et induire la relocalisation de tBid à la mitochondrie aboutissant à la libération de cytochrome c par la voie intrinsèque (Li *et al.*, 1998).

Dans les kératinocytes, l'expression du récepteur Fas est augmentée suite à l'irradiation par les UV. De plus, l'exposition aux UV va entraîner une trimérisation et une activation des récepteurs Fas et TNF-R1, indépendamment de la présence de ligand, capables d'induire l'activation de la caspase-8 (Aragane *et al.*, 1998; Kulms *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001; Takasawa *et al.*, 2005; Wehrli *et al.*, 2000). Bien que certaines études aient montré que l'inhibition de la voie apoptotique extrinsèque diminue la réponse apoptotique kératinocytaire (Li *et al.*, 2006), d'autres travaux ont montré un rôle mineur de cette voie d'apoptose (Assefa *et al.*, 2003; Sitailo *et al.*, 2002). Il apparaît donc que la voie apoptotique extrinsèque est activée par les UVB, mais son implication relative dans l'apoptose globale serait minoritaire en comparaison de la voie apoptotique intrinsèque. Les différentes voies apoptotiques induites par les UV sont récapitulées dans la figure 7.

Suite à l'irradiation par des UV, la formation de lésions génomiques va conduire à l'activation de la voie apoptotique intrinsèque. En effet, nous avons vu que la protéine p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN. Cependant, lorsque le nombre de lésions est trop important, cette même protéine va orienter la cellule vers l'apoptose afin d'éviter la prolifération de cellules anormales (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Le rôle de la protéine p53 dans l'induction de l'apoptose s'exerce *via* ses activités transcriptionnelles et mitochondriales. L'activité transcriptionnelle de la protéine p53 conduit à une modulation d'expression de nombreux gènes cibles. Ainsi, certains gènes cibles de la protéine p53 sont activés en réponse à l'irradiation par des UV, tels que Bax, Fas, DR4, DR5, ou Apaf-1, et d'autres sont réprimés comme Bcl-2, Bcl-xL ou la survivine, protéine de la famille des IAP. Les produits des gènes cibles de p53 incluent des protéines intervenant dans la transduction du signal apoptotique au niveau membranaire (Fas, DR4, DR5) ainsi que des protéines impliquées dans la voie mitochondriale (Bax, Apaf-1, Bcl-2, Bcl-xL). L'activité mitochondriale de p53 se traduit par sa relocalisation au niveau de la membrane mitochondriale externe (Charlot *et al.*, 2004; Marchenko *et al.*, 2000) où elle va se lier à Bcl-xL et Bcl-2 *via* son domaine de liaison à l'ADN (Mihara *et al.*, 2003). La formation de tels complexes inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl-xL et de Bcl-2, facilitant ainsi la perméabilisation mitochondriale *via* les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax, et conduisant à la libération de cytochrome c. De façon intéressante, l'équipe de Dumont a montré l'existence de deux variants alléliques de p53 au niveau de l'acide aminé en position 72 (Arg ou Pro) qui conduisent à des relocalisations distinctes de p53 à la membrane mitochondriale (Dumont *et al.*, 2003). La présence d'un résidu arginine en position 72 confère à la protéine p53 une capacité de relocalisation mitochondriale beaucoup plus importante qu'avec un résidu proline. Cette protéine p53^{Arg} présente une plus grande capacité d'induction de l'apoptose. Le domaine N-terminal riche en proline de p53 (acides aminés 60 à 90), contenant le polymorphisme génétique Arg/Pro au codon 72 de la protéine p53, est déterminant dans l'activité apoptotique de la

protéine, indépendamment de son activité transcriptionnelle (Baptiste *et al.*, 2002; Chipuk and Green, 2003).

Les ERO induites par le rayonnement UV ont aussi été décrites comme des inducteurs d'apoptose dans les kératinocytes. En effet, la peroxydation de la membrane mitochondriale va permettre une diminution du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) aboutissant à la libération des facteurs pro-apoptotiques. De plus, les ERO vont activer la phosphorylation et la stabilisation de la protéine p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Eckert *et al.*, 2002; Peus *et al.*, 1999b). L'activation de la protéine p38 MAPK permet la stabilisation et la relocalisation de la protéine Bax à la mitochondrie, de façon similaire à l'action de la protéine p53 (Hildesheim *et al.*, 2002). Cette translocation de Bax à la mitochondrie est amplifiée par la PKC δ (protéine kinase C delta). Parmi les substrats de la caspase-3, figure la PKC δ . Une fois clivée par la caspase-3, la PKC δ est activée et va exercer un rétrocontrôle positif sur Bax (Sitailo *et al.*, 2004).

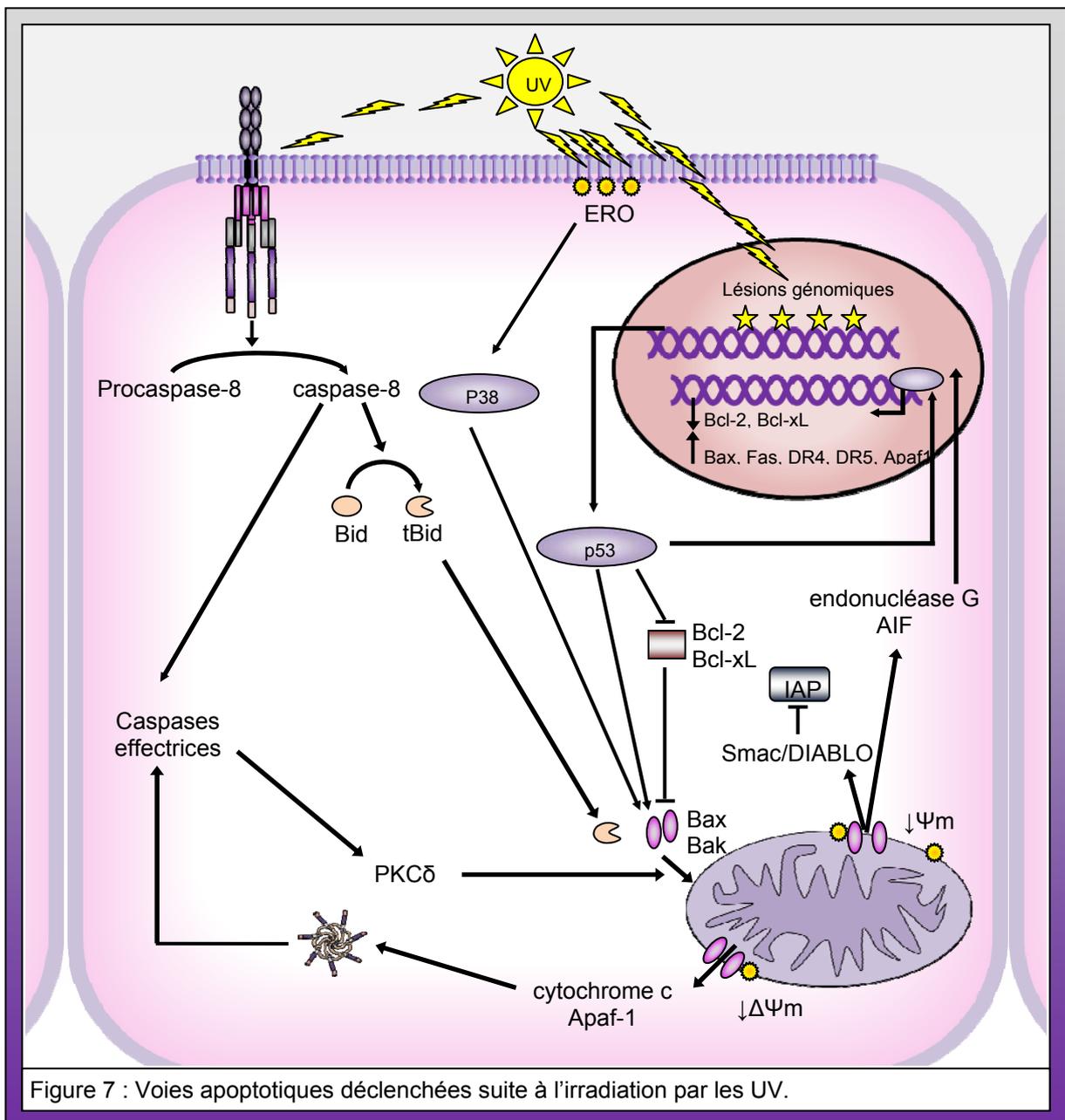


Figure 7 : Voies apoptotiques déclenchées suite à l'irradiation par les UV.

2.5. Mécanismes carcinogènes induits par les UV

L'élimination par apoptose des cellules ayant acquis de trop sévères lésions suite à l'irradiation est l'ultime mécanisme de protection contre le développement tumoral. Le développement des cancers cutanés résulte de l'accumulation de mutations induites par les UV et d'un déficit d'élimination des cellules endommagées. La figure 8 schématise les différents mécanismes carcinogènes induits par les UV.

2.5.1 Mutations génomiques induites par les UV

Nous avons vu que la protéine p53 tient une place centrale dans la réponse cellulaire aux différents dommages induits par les UV. A ce titre, des mutations au sein du gène TP53 apparaissent comme un évènement précoce de la photo-carcinogénèse. De nombreuses études ont montré une forte proportion de clones cellulaires présentant des mutations du gène TP53 au niveau des sites photo-exposés de la peau normale (Jonason *et al.*, 1996; Nakazawa *et al.*, 1994; Ziegler *et al.*, 1994). De plus, Ziegler *et al.* ont retrouvé des mutations au sein du gène TP53 dans 66 % des kératoses actiniques, lésions précancéreuses des carcinomes épidermoïdes cutanés (Ziegler *et al.*, 1994). En analysant les CE (carcinomes épidermoïdes) ou les CBC (carcinomes baso-cellulaires) de 342 patients, Bolshakov *et al.* ont retrouvé des mutations au sein du gène TP53 dans 66 % des CBC agressifs, dans 38 % des CBC non agressifs, dans 35 % des CE agressifs et dans 50 % des CE non agressifs. De plus, 71 % de ces mutations ont été identifiées comme mutations signatures des UV.

Les mutations au sein du gène TP53 ne suffisent pas à expliquer la progression des tumeurs cutanées, et des mutations ont été observées au sein de proto-oncogènes comme ras et de gènes suppresseurs de tumeurs comme les gènes PTCH (gène codant le récepteur patched hedgehog), et le locus INK4a/ARF.

La famille d'oncogènes Ras comporte les membres H-Ras, K-Ras et N-Ras. Ces protéines participent à la transduction du signal provenant des récepteurs de surface aux facteurs de croissance. La plupart des mutations retrouvées dans les gènes codant les protéines de la famille Ras sont responsables d'une suractivation de ces protéines, même en l'absence de facteurs de croissance cellulaire (Bos, 1989). Une étude de Peirceall *et al.* a montré que sur 40 tumeurs cutanées analysées (24 CE et 16 CBC), 16 tumeurs (40 %) contenaient une mutation de type G vers T au niveau du codon 12 du gène *H-ras* (Pierceall *et al.*, 1991).

La voie de signalisation hedgehog est fondamentale dans le développement embryonnaire, et est réprimée dans la plupart des tissus adultes (Ming *et al.*, 1998). Cette voie implique les protéines sonic hedgehog (Shh), indian hedgehog et desert hedgehog dont chacune a des rôles différents dans l'embryogenèse. La voie impliquant la protéine Shh est la mieux caractérisée, et au niveau de la peau adulte, elle est nécessaire au maintien de la population de cellules souches ainsi qu'au développement des follicules pileux et des glandes sébacées. Le récepteur de protéines de la famille hedgehog est le récepteur PTCH. A l'état libre, ce récepteur inhibe la voie hedgehog, et la fixation de la protéine Shh lève cette inhibition. Le récepteur PTCH forme un complexe avec la protéine smoothed (Smo) aboutissant à l'activation des facteurs de transcription Gli (Kalderon, 2005). Ces

derniers vont activer l'expression du récepteur PTCH, de la protéine Shh et de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Fan *et al.*, 1997).

Au sein des CE et des CBC, on retrouve des mutations du locus INK4a/ARF. Ce locus code deux protéines inhibitrices de la croissance cellulaire, les protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF}. La protéine p16^{INK4a} inhibe la progression G1/S en liant et inactivant les kinases dépendantes de cyclines (CDK) 4 et 6, aboutissant à la séquestration du facteur de croissance E2F par la protéine p105^{Rb} (Figure 3) (Serrano *et al.*, 1993). La protéine p14^{ARF} est impliquée dans l'arrêt de cycle en phase G1 et G2 en liant la protéine MDM2, levant l'inhibition transcriptionnelle et la dégradation de la protéine p53 (Pomerantz *et al.*, 1998). Selon les études, les mutations du locus INK4a/ARF sont retrouvées dans 14 à 76 % des CE (Brown *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 1998). De plus, 70 % de ces mutations sont des mutations signatures des UV (Kubo *et al.*, 1998; Soufir *et al.*, 1999).

Il est intéressant de noter que les mutations du gène PTCH sont préférentiellement retrouvées dans les CBC et celles du locus INK4a/ARF dans les CE suggérant des mécanismes divers dans la formation de ces cancers (Kubo *et al.*, 1998; Soufir *et al.*, 1999).

2.5.2 Activation de la prolifération cellulaire par les UV

Les UV sont aussi responsables de l'activation des voies de signalisation impliquées dans la progression du cycle cellulaire par l'intermédiaire des récepteurs au facteur de croissance épidermique (EGF-R : epidermal growth factor receptor). Sous l'effet des UV, par la production d'ERO, une activation rapide et indépendante de ligand de l'EGF-R va conduire à la cascade de signalisation des ERKs (extracellular signal-regulated kinases) et de la voie PI3K/Akt (Peus *et al.*, 2000). L'activation de la voie ERK va réguler l'expression de la cycline D1 impliquée dans la progression G1/S (Balmanno and Cook, 1999) et activer l'expression de la protéine Bcl-2 (Balmanno and Cook, 2008). La protéine kinase Akt va être activée par la PI3K (phosphatidil inositol 3 kinase), et va directement phosphoryler et inhiber la protéine pro-apoptotique Bad et les caspases-3, -8 et -9 (Datta *et al.*, 1999). La protéine Bad phosphorylée est séquestrée par la protéine 14-3-3 et ne peut plus se relocaliser à la mitochondrie, où elle inhibe la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. De plus, la protéine Akt va activer le facteur de transcription NF- κ B qui va permettre une surexpression des IAP (Nickoloff *et al.*, 2002) et de TRAF (TNF receptor associated factor), molécule adaptatrice impliquée dans la transduction du signal de survie cellulaire induite par les récepteurs au TNF (Nickoloff *et al.*, 2002).

2.5.3 Inhibition de l'apoptose par les UV

L'étude de la modulation spatio-temporelle des récepteurs de mort et de leurs ligands a permis d'impliquer ces molécules dans le processus de carcinogenèse cutanée. Dans des kératinocytes normaux, l'irradiation par les UV, active l'expression des récepteurs Fas, alors que l'expression du ligand FasL peut être inhibée (Bachmann *et al.*, 2001). En revanche, les cellules tumorales expriment fortement les ligands FasL et TRAIL mais n'expriment plus les récepteurs TRAIL-R et Fas (Bachmann *et al.*, 2001). Les ligands TRAIL et FasL vont alors avoir un rôle de protection

des cellules tumorales envers le système immunitaire. Dans les CE et les CBC, on retrouve une forte population de lymphocytes T apoptotiques en périphérie des tumeurs (Buechner *et al.*, 1997; Gutierrez-Steil *et al.*, 1998). La forte expression des ligands TRAIL et FasL par les cellules tumorales permet la destruction des cellules effectrices du système immunitaire qui expriment les récepteurs de mort correspondants, alors que l'absence des récepteurs de mort à la surface des cellules tumorales les rend résistantes à l'apoptose. L'injection intra-tumorale d'interféron alpha induit l'expression du récepteur Fas à la surface des cellules tumorales, l'apoptose de ces cellules et la régression tumorale (Buechner *et al.*, 2002; Buechner *et al.*, 1997). Il semble donc que les ligands FasL et TRAIL participent à l'échappement immunitaire des CE et des CBC.

La survivine, protéine de la famille des IAP est surexprimée suite à l'irradiation par les UV (Grossman *et al.*, 2001a; Grossman *et al.*, 2001b). La surexpression de la survivine inhibe la caspase-9 et la réponse apoptotique aux UV (Grossman *et al.*, 2001a).

Ainsi, l'exposition au rayonnement ultraviolet induit de nombreux signaux de vie et de mort dans la cellule. Le défaut de régulation de l'ensemble de ces signaux conduit à l'inhibition de l'apoptose et à la carcinogenèse cutanée.

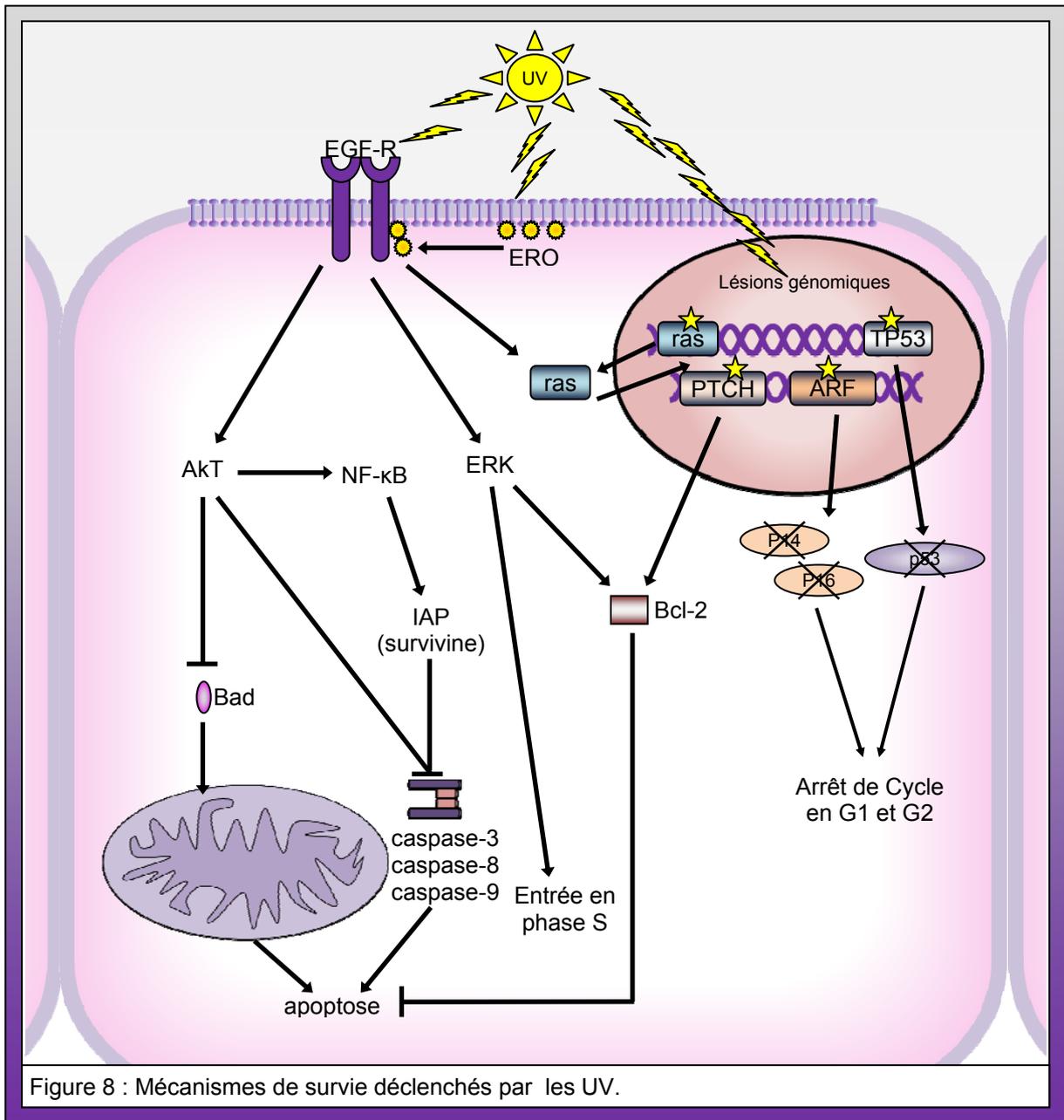


Figure 8 : Mécanismes de survie déclenchés par les UV.

3. Carcinogénèse associée aux HPV

Alors que les Grecs et les Romains avaient déjà attribué un mode de transmission naturelle aux verrues génitales, ce n'est qu'à partir du 19^{ème} siècle que l'origine virale des verrues a été suspectée. Ce fut finalement G. Ciuffo qui, en 1907, démontra la nature virale des verrues à l'aide de filtrats verruqueux dépourvus de cellules. Les papillomavirus (PV) ont alors été retrouvés présents chez de nombreuses espèces animales et chez l'Homme (Lancaster and Olson, 1982).

Les papillomavirus humains (HPV) constituent un groupe de petits virus à ADN qui infectent spécifiquement les épithéliums pluristratifiés muqueux et cutanés. Bien que les HPV induisent généralement des lésions hyperprolifératives bénignes telles que verrues, papillomes ou condylomes, le plus souvent l'infection reste asymptomatique. Dès 1977, les travaux de H. zur Hausen en Allemagne et, indépendamment, ceux de G. Orth en France démontrent l'existence de différents types de papillomavirus humains (Orth *et al.*, 1977; zur Hausen, 1977). L'association entre les papillomavirus humains et le cancer du col de l'utérus a été démontrée pour la première fois par Harald zur Hausen, lui valant le Prix Nobel de médecine en 2008. Les nombreux travaux qui ont suivi ont montré la diversité des HPV, leur pouvoir pathogène et l'association de certains d'entre eux à des néoplasies intra-épithéliales et à des cancers (pour revue de Villiers, 1989). On distingue d'une part les HPV dits à haut risque oncogène (HPV-HR), comme les HPV 5 et 8 associés à l'épidermodysplasie verruqueuse, et les HPV 16 et 18 associés aux lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus, et d'autre part les HPV dits à bas risque oncogène (HPV-BR), comme les HPV 1 et 2, responsables de l'apparition de verrues bénignes (Van Ranst *et al.*, 1992) ou les HPV 6 et 11, retrouvés dans près de 90 % des condylomes (Aubin *et al.*, 2008). Les HPV-BR ne sont jamais retrouvés seuls dans les lésions cancéreuses.

Facteur étiologique des cancers du col de l'utérus, les HPV-HR sont aussi impliqués dans d'autres cancers du tractus ano-génital (vagin, vulve, pénis, canal anal) et leur rôle est suggéré dans des cancers situés au niveau d'autres sites anatomiques, comme la tête et le cou, les voies aérodigestives supérieures, l'œil et la peau.

3.1. Structure des HPV

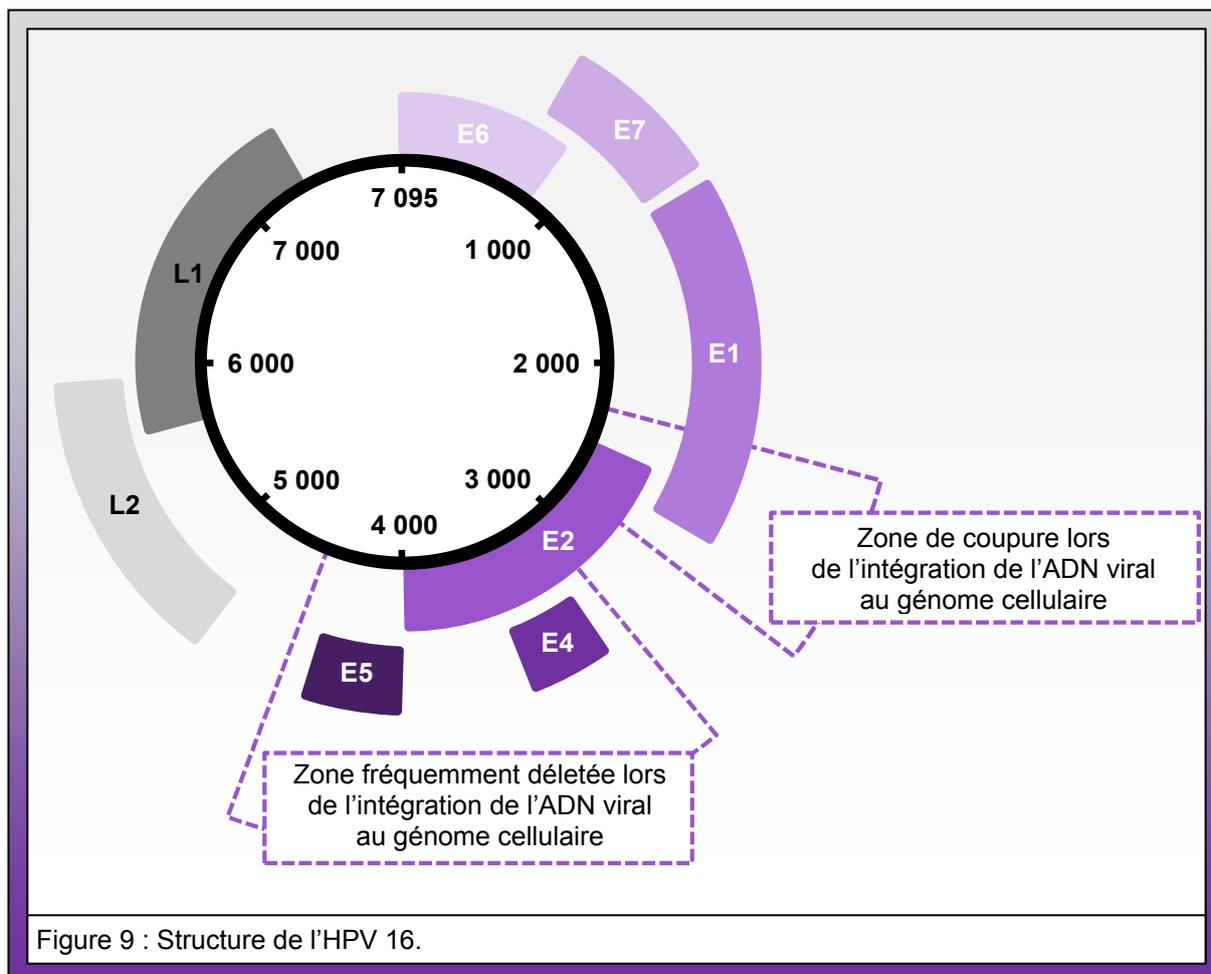
Les PV sont de petits virus nus (de 45 à 55 nm de diamètre), non enveloppés dont la capsidie à symétrie icosaédrique est constituée de 72 capsomères. Le génome viral est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire d'environ 8000 paires de bases dont un seul des brins est codant, avec des phases ouvertes de lecture (POL) qui se chevauchent. Ce génome est organisé en trois régions : la région non codante (LCR pour long control region), la région E (Early) et la région L (Late) (Figure 9).

La LCR, très variable, contient les promoteurs des gènes précoces ainsi que des séquences de régulation de la transcription.

La région E code des protéines non structurales dites de fonction. Ce sont les protéines précoces E1 à E8. La protéine E1 est impliquée dans la réplication extra-chromosomique du génome viral (Ustav *et al.*, 1991). La protéine E2 est un facteur de transcription qui joue un rôle fondamental dans le cycle viral : elle active la réplication du génome viral et régule la transcription des oncogènes viraux E6 et E7 (Desaintes and Demeret, 1996). La protéine E3 n'est présente que dans de très rares PV et sa fonction n'est pas encore connue. Le produit du gène E4 apparaît plus tardivement que les autres protéines précoces et intervient dans la maturation des particules virales et la désorganisation du cytosquelette (Doorbar *et al.*, 1986). La protéine E5 correspond à un oncogène chez le papillomavirus bovin 1 (Schlegel *et al.*, 1986). Cette protéine E5 pourrait être impliquée dans la carcinogenèse induite par certains HPV, mais est absente chez les HPV-BR et chez les HPV du genre bêta. Ses fonctions sont mal connues, mais la protéine E5 d'HPV 16 est capable d'augmenter le recyclage membranaire et l'activité du récepteur au facteur de croissance épidermique (Disbrow *et al.*, 2005) et de réduire l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (Ashrafi *et al.*, 2006).

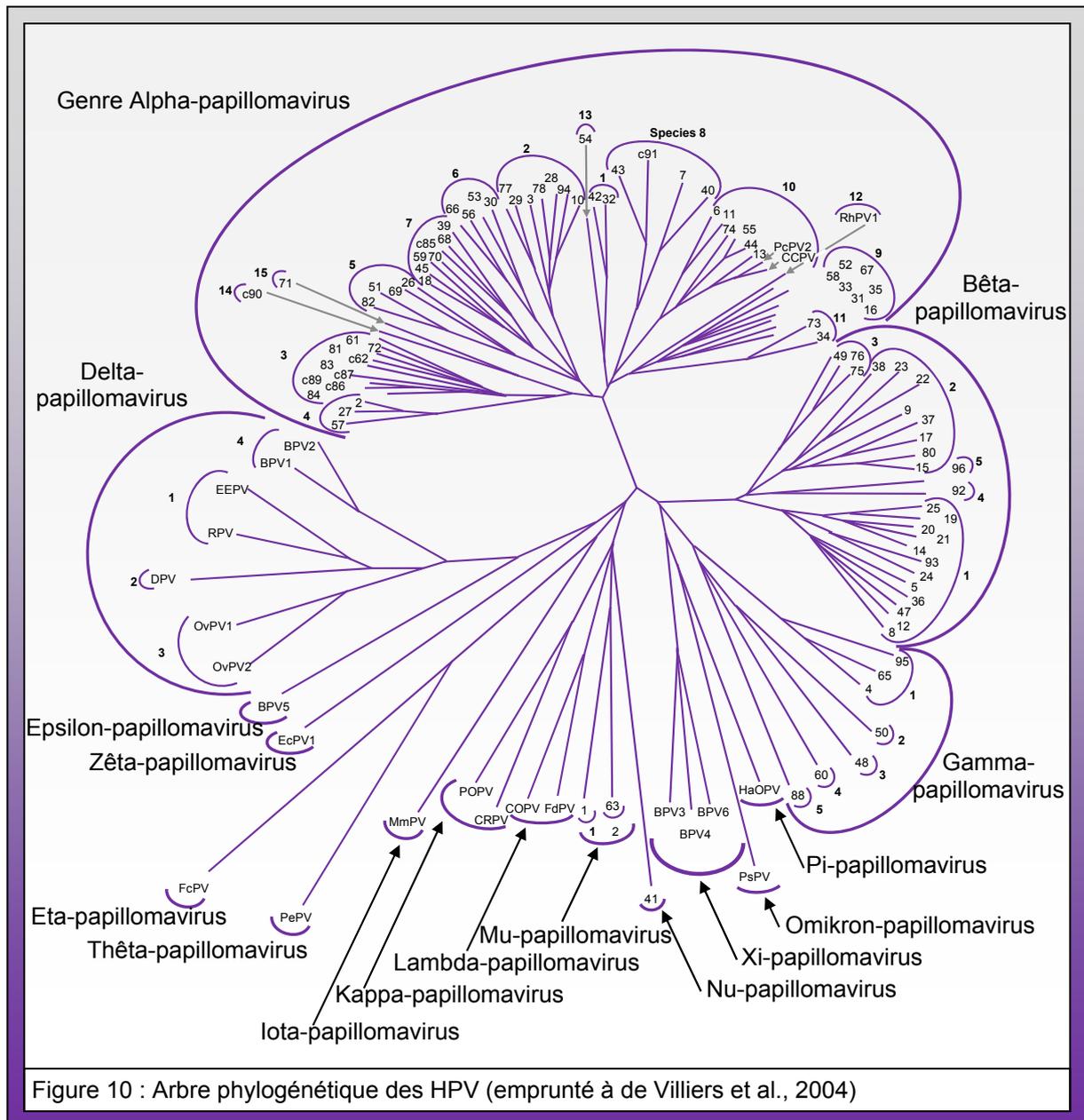
Les protéines E6 et E7 des HPV-HR sont responsables de l'immortalisation et la transformation cellulaire, et sont impliquées dans le maintien du phénotype tumoral. La protéine E6 facilite la dégradation de l'anti-oncogène p53 par le protéasome *via* l'ubiquitine ligase cellulaire E6AP (E6 associated protein). Cette protéine virale peut aussi activer la télomérase, et chez les HPV-HR, elle est capable de lier les protéines à domaines PDZ telles que les protéines MAGI-1, 2 et 3 (l'abréviation PDZ provient des trois premières protéines dans lesquelles a été trouvé ce domaine : PSD-95, une protéine de signalisation, DLG, la protéine Disc large de la drosophile et ZO1, la protéine *Zonula occludens 1* qui entre dans la constitution de jonctions serrées, responsables de la polarité cellulaire) (Munger *et al.*, 2004). Le rôle de la protéine E7 est principalement lié à sa capacité d'interaction avec les protéines à poche p107, p130 et surtout p105^{Rb} (Munger *et al.*, 2004). Enfin, alors que le rôle de la protéine E8 n'est pas connu, des travaux ont montré que la protéine de fusion E2^{E8} serait, par son domaine E8, impliquée dans la latence virale au sein des cellules épithéliales basales (Stubenrauch *et al.*, 2001).

La région L code les protéines de capsid L1 (protéine majeure de capsid) et L2 (protéine mineure de capsid) exprimées seulement dans les cellules bien différenciées lors d'infections productives. Ces protéines dites tardives vont permettre l'assemblage final du virus et la stabilisation de la capsid.



3.2. Phylogénie des papillomavirus

A l'origine regroupés avec les polyomavirus dans la famille des *Papovaviridae*, les papillomavirus forment aujourd'hui la famille des *Papillomaviridae*. Plus de 120 génotypes sont actuellement connus et une centaine d'entre eux a été complètement séquencée. Le gène L1, codant la protéine de capsid L1, est le plus conservé entre les différents génomes de PV. Ce sont les homologues de séquences de ce gène qui ont servi à établir la classification des PV. Ainsi, la famille des *Papillomaviridae* est composée de 16 genres (nommés alpha à pi et possédant moins de 60 % d'identité). Chaque genre regroupe une à plusieurs espèces d'HPV désignées par un chiffre arabe et possédant moins de 60 à 70 % d'identité. Chaque espèce contient différents types (71 à 89 % d'identité). Enfin, chaque type peut être subdivisé en sous-types (différents de seulement 2 à 10 % par rapport au type) et variants (moins de 2 % de différence). Parmi les 16 genres de PV, 5 genres correspondent aux HPV, ce sont les genres alpha, bêta, gamma mu et nu (Figure 10) (de Villiers *et al.*, 2004).



3.3. Cycle viral

Les infections génitales à HPV sont les infections sexuellement transmissibles les plus fréquentes et le comportement sexuel (nombre de partenaires, âge au premier rapport, changement de partenaires) est le principal facteur de risque pour la contamination par des HPV génitaux. En ce qui concerne les lésions cutanées associées aux HPV, elles sont transmises d'un individu à l'autre par contact direct de la peau ou par l'intermédiaire d'objets souillés.

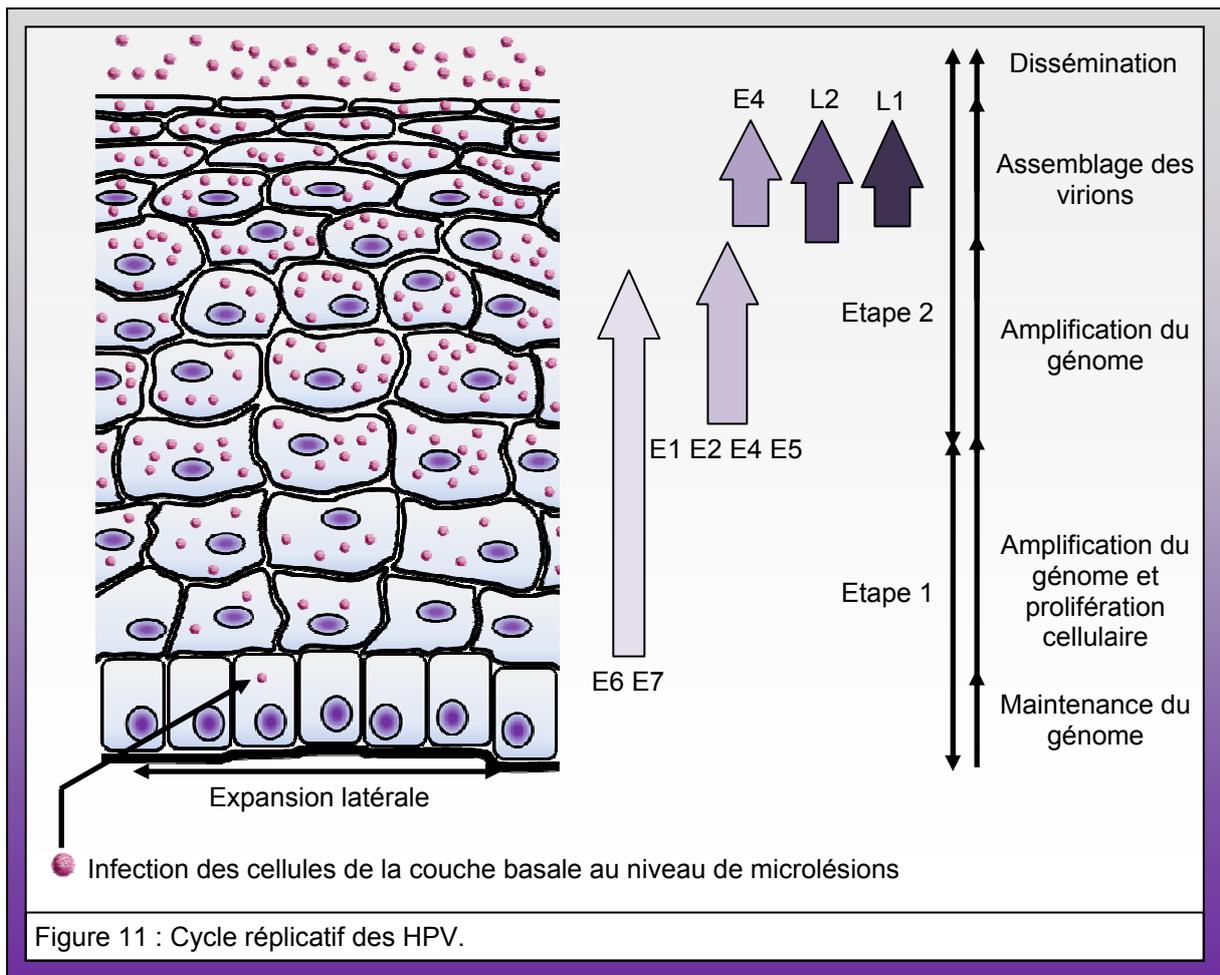
Le cycle répliatif des HPV est étroitement lié à la différenciation kératinocytaire (Figure 11). L'infection se fait au niveau des cellules basales de l'épithélium suite à la pénétration du virus au niveau de micro-lésions. Les virus sont adsorbés à la surface cellulaire grâce à des héparanes sulfates (Giroglou *et al.*, 2001) et leur entrée dans la cellule est favorisée par des récepteurs comme la sous-unité α -6 des intégrines (Yoon *et al.*, 2001) ou des composants de la matrice extracellulaire

comme la laminine 5 (Culp *et al.*, 2006). Les HPV rejoignent ensuite le noyau de la cellule infectée par l'intermédiaire du cytosquelette (Selinka *et al.*, 2002). Le génome viral est décapsidé avant d'entrer dans le noyau et les HPV se multiplient alors au rythme des divisions de la cellule hôte.

Le cycle viral peut être schématiquement divisé en deux étapes en fonction du niveau de différenciation des kératinocytes.

La première étape est un cycle non productif, au cours duquel le génome viral est amplifié de façon limitée. A ce stade, les protéines virales E1, E2, E6 et E7 sont faiblement exprimées. Les protéines E1 et E2, nécessaires à la réplication virale, se fixent sur des séquences spécifiques E1BS (E1 Binding Site) et E2BS (E2 Binding Site) localisées dans la LCR qui contient le site d'origine de la réplication (ori) (Hartley and Alexander, 2002). La réplication de l'ADN viral s'effectue au cours de la phase S dans les cellules basales et suprabasales, et nécessite des protéines cellulaires. Dès qu'ils ont quitté la couche basale, les kératinocytes normaux quittent le cycle cellulaire et amorcent le processus de différenciation. Cependant, l'expression de la protéine E7 va permettre aux kératinocytes des couches suprabasales de poursuivre le cycle cellulaire afin de répliquer l'ADN viral. En effet, la liaison de E7 aux protéines à poche p105^{Rb}, p107 et p130 induit la libération du complexe E2F/DP. Les facteurs de transcription E2F permettent ainsi l'entrée et la progression de la phase S, favorisant le cycle viral productif.

La deuxième étape est le cycle productif qui débute lorsque les kératinocytes sont en phase terminale de différenciation et va permettre une forte réplication virale et la production de virus matures. En effet, la différenciation cellulaire provoque l'activation du promoteur tardif et l'augmentation d'expression des protéines de capsid L1 et L2. La production de E4 favorise la libération des virus *via* la désorganisation de la lamina nucléaire. La réplication du génome viral permet une amplification importante (1 à 2 log). Une fois l'ADN viral empaqueté au sein de la capsid formée par les protéines L1 et L2, les virions complets sont libérés et disséminés au rythme de la desquamation épithéliale (Doorbar, 2005). Cette infection virale productive, responsable de lésions condylomateuses, se traduit par un effet cytopathogène, caractérisé par des koïlocytes, cellules à cytoplasme clair et à noyau irrégulier ou binucléé (Koss and Durfee, 1956). Les lésions bénignes peuvent persister pendant 3 à 6 mois, durée nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. L'ADN viral peut aussi s'intégrer au sein du génome cellulaire, aboutissant à un cycle viral abortif, caractérisé par l'absence de production de particules virales. Lors de cette intégration, le génome viral se linéarise au niveau de la POL E2 entraînant la production d'une protéine E2 mutée n'inhibant plus l'expression des protéines E6 et E7. La conséquence de cette intégration est l'apparition de tumeurs malignes. Les gènes E6 et E7 sont toujours exprimés dans les cancers du col de l'utérus, témoignant de leur rôle dans les différentes étapes de la carcinogenèse.



3.4. Le cancer du col utérin, un modèle de carcinogénèse induite par les HPV

Les HPV sont le facteur étiologique de développement des cancers du col de l'utérus. Ce sont les types 16 et 18 du genre alpha qui sont responsables de plus de 70 % de ces cancers dans le monde. L'incidence élevée du cancer du col utérin et son origine exclusivement virale en ont fait le modèle d'étude de la carcinogénèse viro-induite et les HPV-HR ont été impliqués dans les étapes d'initiation, de promotion et de progression tumorale. En France, avec 3387 nouveaux cas estimés en 2000 (taux d'incidence standardisé de 8 pour 100 000), le cancer du col est au 8^{ème} rang des cancers féminins. Responsable de 1000 décès estimés en 2000, ce cancer se situe au 5^{ème} rang si l'on ne considère que les décès féminins. La fréquence de ce cancer croît à partir de 20 ans avec un pic chez les femmes de 40 ans, suivi d'une diminution jusqu'à 50 ans. L'âge médian lors du diagnostic est de 51 ans (Remontet *et al.*, 2003). Le cancer du col de l'utérus est un véritable problème de santé publique à l'échelle mondiale : près de 4 millions de femmes au monde en sont atteintes; chaque année, environ 500 000 nouveaux cas sont diagnostiqués dont 80 % dans les pays en voie de développement (Parkin, 2001).

3.4.1 Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

Le cancer du col utérin se développe à partir de la jonction squamo-cylindrique et de la zone de transformation du col. Il existe des tumeurs rares comme les mélanomes et les schwannomes du col mais deux formes histologiques majeures sont décrites : les carcinomes épidermoïdes qui représentent 80 à 95 % des tumeurs malignes du col utérin, et les adénocarcinomes, moins fréquents, qui prennent naissance au niveau de la muqueuse cylindrique endocervicale. Le cancer invasif épidermoïde du col de l'utérus est précédé de lésions précancéreuses, qui sont le plus souvent asymptomatiques (figure 12). Caractérisées par une désorganisation architecturale de l'épithélium et une prolifération de cellules atypiques plus ou moins différenciées, ces lésions précancéreuses sont dénommées dysplasies ou lésions intra-épithéliales (CIN). La dysplasie est qualifiée de légère (CIN1), modérée (CIN2) et sévère (CIN3) selon le degré d'atypie cellulaire et l'intensité des modifications de l'architecture épithéliale (respectivement le tiers inférieur, les 2/3 inférieurs, et toute la hauteur de l'épithélium) (Richart, 1973). A la fin des années 60, la théorie concernant le développement du cancer du col utérin supposait qu'il résultait d'une progression chronologique d'une CIN1 vers un cancer en passant par les stades CIN2 et CIN3 (Barron and Richart, 1968) (Figure 12). Les risques de progression et d'évolution vers l'invasion augmentent avec la sévérité des anomalies. Ainsi, une dysplasie légère ou CIN1 a un fort potentiel de régression (57 % des CIN1 régressent) alors qu'une dysplasie sévère (CIN3) évoluera préférentiellement vers un cancer (plus de 12 % de ces lésions) (Ostor, 1993).

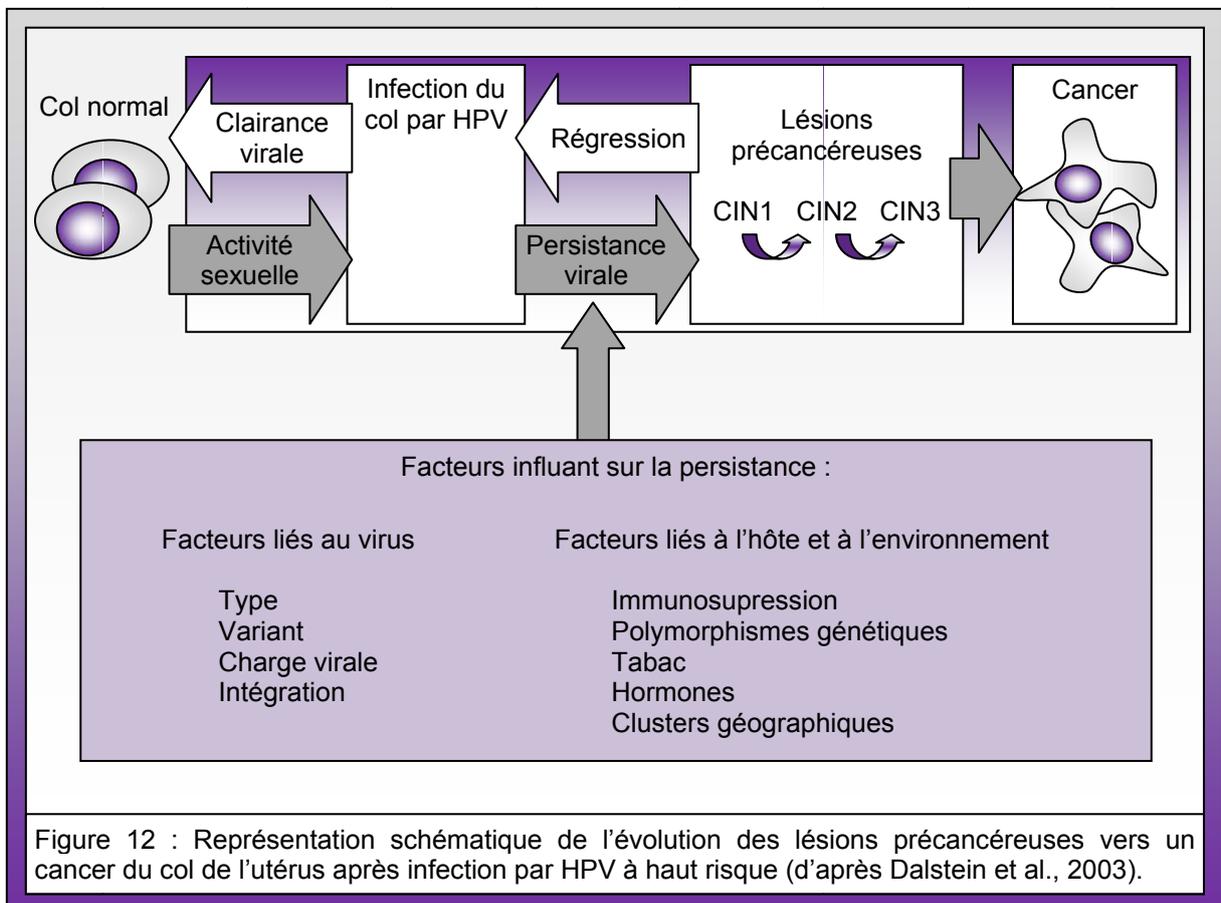


Figure 12 : Représentation schématique de l'évolution des lésions précancéreuses vers un cancer du col de l'utérus après infection par HPV à haut risque (d'après Dalstein et al., 2003).

Cependant les CIN1 peuvent aussi persister, voire progresser vers un cancer infiltrant (1 % d'entre elles) et une proportion significative de CIN3 peut régresser (32 % des CIN3). Les dysplasies modérées (CIN2) ont un comportement intermédiaire (Ostor, 1993).

Les adénocarcinomes infiltrants du col sont précédés d'atypies glandulaires où les cellules possèdent des anomalies nucléaires qui ne sont pas assez marquées pour que l'on puisse retenir le diagnostic d'adénocarcinome. Il est difficile de distinguer différents stades dans ces lésions précurseurs, mais la notion d'adénocarcinome *in situ* est acceptée.

La diminution de l'incidence du cancer du col utérin au cours des dernières années s'est accompagnée d'une augmentation de l'incidence des lésions précancéreuses (Weidmann *et al.*, 1998) qui sont devenues la cible du dépistage. L'évolution de ces lésions vers des stades plus agressifs dépend essentiellement de la persistance de l'infection à HPV à haut risque, laquelle dépend de cofacteurs pouvant être liés au virus (type, variant, charge virale, intégration), à l'hôte (système immunitaire, polymorphisme génétique) et/ou à l'environnement (tabac, hormones, clusters géographiques) (figure 12). Aujourd'hui, il existe deux vaccins prophylactiques anti-HPV offrant une protection contre les types majoritairement retrouvés dans cette pathologie (Davidson *et al.*, 2003; van der Burg *et al.*, 2001).

3.4.2 Mécanismes de la carcinogenèse muqueuse

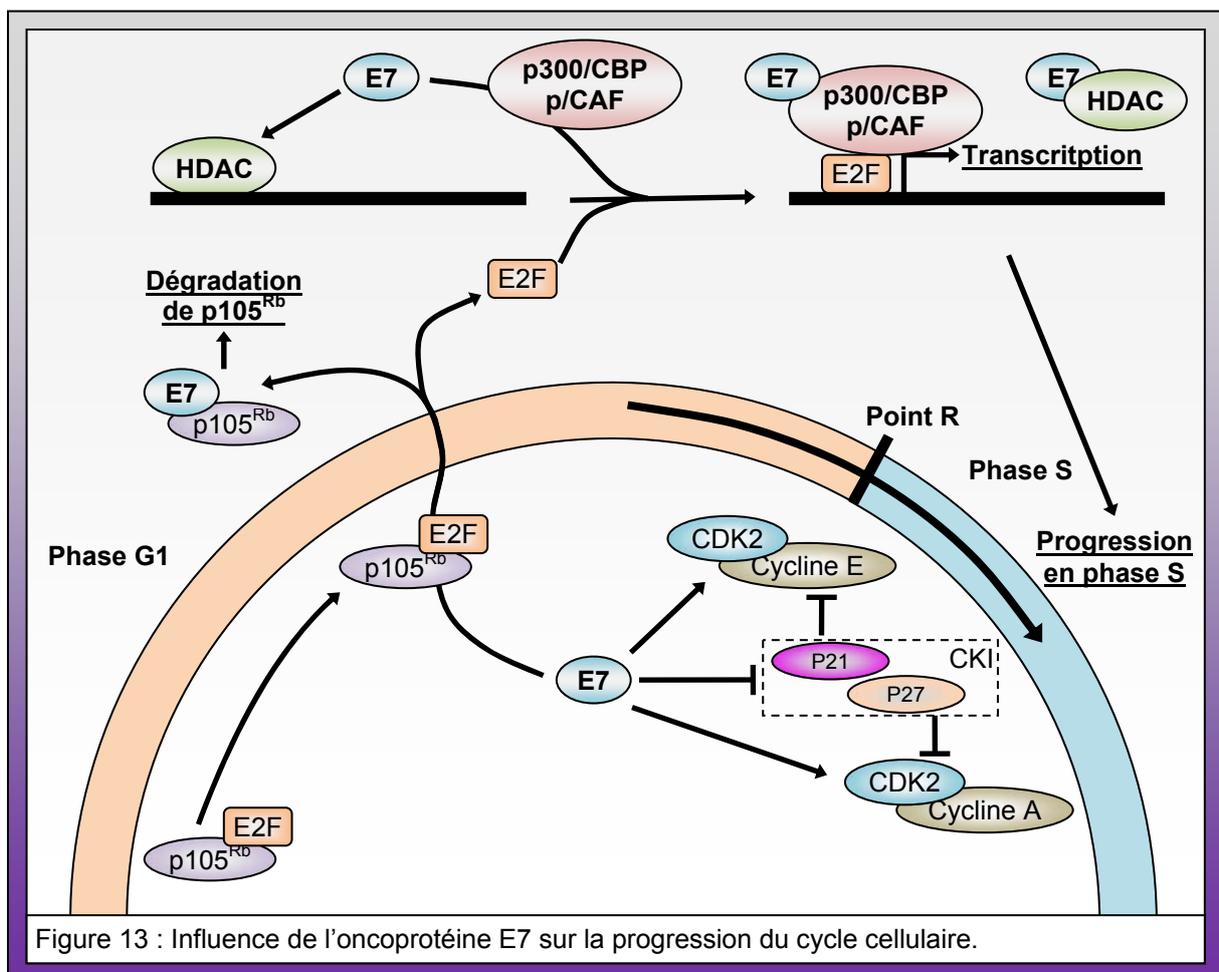
Les HPV sont dépendants de la machinerie cellulaire pour la réplication et l'expression de leur génome, mais les particules virales ne sont produites que dans des cellules épithéliales en cours de différenciation, donc présentant des activités de synthèse génomique et de prolifération réduites. Le potentiel oncogénique acquis par les HPV-HR dérive clairement de cette stratégie complexe de maintenance dans un contexte cellulaire hostile. Toutefois, le délai existant entre l'infection par le virus et l'apparition d'un cancer, pouvant atteindre plusieurs décennies, témoigne d'une progression multi-étapes des cancers induits par HPV (Steenbergen *et al.*, 2004).

Il a été démontré que la majorité des cancers invasifs du col de l'utérus comporte des séquences d'ADN d'HPV-HR intégrées au génome de la cellule hôte conduisant à une surexpression des protéines E6 et E7 et à une augmentation des capacités d'immortalisation des HPV (Romanczuk and Howley, 1992). Plusieurs études confirment que l'inactivation mutationnelle des gènes E1 et E2 est aussi corrélée à l'augmentation du pouvoir transformant de différents types d'HPV-HR, dont l'HPV 16 (Jeon *et al.*, 1995; Jeon and Lambert, 1995; Romanczuk and Howley, 1992). Le processus d'intégration induit aussi la stabilisation des messagers viraux de E6 et E7 (Jeon and Lambert, 1995). L'expression dérégulée de E6 et E7 entraîne une instabilité génomique qui se manifeste par des aberrations dans la duplication des centrosomes ainsi que par des translocations chromosomiques (Duensing *et al.*, 2001; Duensing and Munger, 2002a).

✓ *Dérégulation de la prolifération cellulaire*

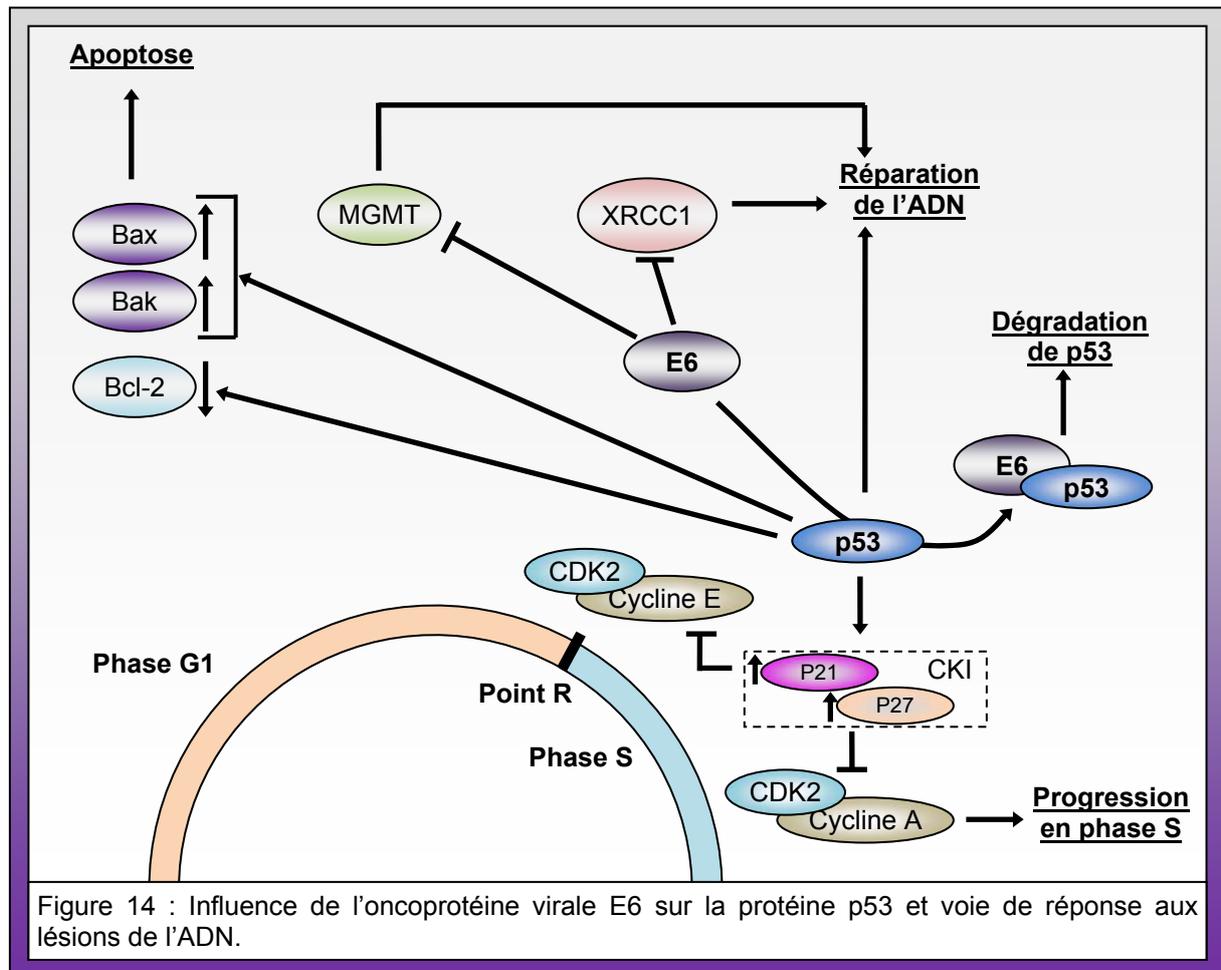
La protéine E7 des HPV-HR est capable d'interagir avec les protéines à poche p105^{Rb}, p107 et p130. Si peu de données sont disponibles quand à son interaction avec p130, la protéine E7 est

capable d'induire la dégradation de p105^{Rb} via le protéasome et de séquestrer p107 (Berezutskaya *et al.*, 1997; Munger *et al.*, 2004). Ces protéines à poche interagissent avec le domaine transactivateur du facteur de transcription hétérodimérique E2F/DP à différentes étapes du cycle cellulaire. Ainsi la dégradation de p105^{Rb} libère le complexe E2F/DP aboutissant à une entrée en phase S du cycle cellulaire. La protéine E7 est aussi capable d'activer les complexes cycline E/CDK2 et cycline A/CDK2 permettant le franchissement de la transition G1/S et la progression en phase S. Ces complexes cycline/CDK sont normalement inhibés par les inhibiteurs de CDK (CKI) p21^{Cip1} et p27^{Kip1}, mais ces derniers peuvent être inactivés par la protéine E7 (Funk *et al.*, 1997). Une autre propriété de la protéine E7 est l'inactivation des protéines HDAC (histones déacétylase) (Brehm *et al.*, 1999). Normalement liées à p105^{Rb}, leur séquestration par la protéine E7 va résulter en une acétylation des histones, une déstabilisation de la structure nucléosomale et un remaniement de la chromatine permettant la transcription génique (Figure 13). Enfin, la protéine E7 d'HPV 16 peut s'associer aux co-activateurs transcriptionnels p300, CBP (CREB binding protein) et p/CAF (facteur associé à p300/CBP). Ces facteurs participent à l'activation de transcription médiée par E2F, et leur association avec la protéine E7 conduit à une prolifération aberrante (Frolov and Dyson, 2004) (Figure 13).



La fonction de la protéine E6 renforce l'effet de la protéine E7. En effet, suite au stress causé par la réactivation aberrante de la réplication de l'ADN, la cellule tente d'activer l'apoptose via l'induction de la protéine p53. Cependant, la protéine E6 des HPV-HR est capable de lier p53 et

d'entraîner sa dégradation par le protéasome (Talis *et al.*, 1998). Ainsi, la division cellulaire ne sera pas inhibée car l'expression des protéines cibles de p53 impliquées dans l'arrêt du cycle en G1 (comme p21^{Cip1}) ou dans l'apoptose (comme Bax et Bak) n'est pas induite (Figure 14). Plus récemment, il a été montré que E6 est capable de lier et entraîner la dégradation de la protéine adaptatrice FADD impliquée dans la transduction du signal par le récepteur Fas de la voie apoptotique extrinsèque (Filippova *et al.*, 2004). Indépendamment de la protéine E7, la protéine E6 joue aussi un rôle dans la prolifération cellulaire *via* son domaine de liaison aux protéines à domaine PDZ (Thomas *et al.*, 2002). Cette interaction médie la prolifération cellulaire suprabasale (Nguyen *et al.*, 2003).



✓ *Immortalisation cellulaire*

Outre l'inactivation de la protéine p53, plusieurs interactions impliquant E6 conduisent à une inhibition de l'apoptose et de la sénescence. Dans les conditions physiologiques, l'absence d'activité télomérase dans les cellules somatiques conduit les télomères, situés aux extrémités chromosomiques, à être raccourcis à chaque division cellulaire, aboutissant à la sénescence répliquative. L'activité télomérase est détectée dans 90 % des cellules cancéreuses. En association avec E6AP, la protéine E6 des HPV-HR active la transcription de la sous-unité catalytique hTERT (human telomerase reverse transcriptase) de la télomérase (Van Ranst *et al.*, 1992). L'activation transcriptionnelle de hTERT est réalisée *via* des "E-Box" présentes dans le promoteur minimal de

hTERT, et est médiée par la protéine E6 vraisemblablement liée au facteur de transcription cellulaire c-Myc (Veldman *et al.*, 2003). Cette étape d'activation de la télomérase qui rend la cellule immortelle prédispose à l'infection chronique à HPV et à la transformation cellulaire.

✓ *Transformation cellulaire*

La protéine E6 des HPV-HR peut lier et déstabiliser la MGMT (O(6)-méthylguanine méthyltransférase) et la protéine XRCC1, deux enzymes impliquées respectivement dans la réparation de l'ADN par excision de base et dans la réparation des cassures simple brin (Figure 14). L'inhibition de réparation de l'ADN va favoriser l'instabilité génique. De plus, le nombre accru de cassures double brin faciliterait l'intégration du génome du HPV observée lors de la progression tumorale (Munger *et al.*, 2004).

La protéine E7 serait directement à l'origine de la duplication anormale des centrosomes (Duensing *et al.*, 2000), indépendamment de son action sur p105^{Rb}. Des travaux récents suggèrent que l'action de E7 sur les centrosomes serait à relier à un effet sur les complexes cycline/CDK2 (Duensing and Munger, 2004). Il en résulte un nombre anormal de centrosomes engendrant des faisceaux mitotiques aberrants à l'origine d'anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdie) (Duensing and Munger, 2002b).

Le domaine de liaison de la protéine E6 aux protéines à domaine PDZ est déterminant pour son activité transformante. Les protéines à domaine PDZ sont impliquées dans plusieurs fonctions dont la formation de canaux ioniques, la signalisation et l'adhérence cellulaire. La protéine E6 cible notamment, en vue de leur dégradation, les protéines à domaine PDZ MAGI-1, 2 et 3, guanylate kinases impliquées dans la formation des jonctions serrées (Glaunsinger *et al.*, 2000), (Thomas *et al.*, 2002). La protéine hDLG à domaine PDZ habituellement colocalisée avec la protéine E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes des cellules épithéliales, est une autre cible de la protéine E6 (Kiyono *et al.*, 1997). La protéine hDLG interagit avec de nombreuses autres protéines telles que des canaux potassiques, la protéine du cytosquelette 4.1 et la protéine suppresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli) (Matsumine *et al.*, 1996). Ainsi, le complexe hDLG/APC est connu pour sa capacité à bloquer la progression du cycle cellulaire. L'interaction E6/hDLG, engendrant la dégradation de cette dernière *via* E6AP, influencerait aussi sur la rupture des jonctions cellulaires. De plus, la protéine E6 est capable de dégrader une autre protéine à domaine PDZ, hScrib (homologue humain de la protéine Scribble de la drosophile) (Nakagawa and Huibregtse, 2000). Globalement, la protéine E6 va entraîner une perte de la polarité cellulaire. La rupture des jonctions adhérentes pourra favoriser la dissémination métastatique.

Enfin, l'adhérence à la matrice extracellulaire est aussi perturbée. La paxilline, protéine adaptatrice de la transduction du signal entre les points de contact focaux et le cytosquelette d'actine, est une cible de la protéine E6 des HPV-HR. La dégradation de la paxilline favorisée par la protéine E6 va perturber l'architecture cellulaire. De plus, la FAK (focal adhesion kinase) est activée dans les cellules immortalisées par E6/E7 d'HPV 18. Cette activation se traduit par une forte augmentation de la phosphorylation de la paxilline, substrat de la FAK, suggérant un rôle de la voie de signalisation FAK dans la carcinogénèse du col utérin (McCormack *et al.*, 1997).

✓ Croissance tumorale et dissémination métastatique

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux capillaires sanguins. C'est un phénomène finement régulé, indispensable à la croissance tumorale et à l'envahissement métastatique. Les cellules tumorales sont capables de produire des facteurs angiogéniques comme le VEGF (vascular endothelium growth factor). La protéine E6 d'HPV 16 transactive directement le promoteur du VEGF (Lopez-Ocejo *et al.*, 2000). En retour, le VEGF induit une surexpression de la protéine E6, de l'EGF-R et de l'IGF-2 (Insulin-like Growth Factor 2). De plus, la surexpression de VEGF inhibe l'expression de la protéine anti-proliférative IGF-BP3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3) (Mathur and Mathur, 2005). Il a été démontré dans notre laboratoire que l'inhibition de la protéine E6 d'HPV 18 par siRNA entraîne une inhibition d'expression du VEGF. A l'opposé, l'inhibition de p53 entraîne une augmentation du VEGF. Ceci suggère que l'action de la protéine E6 sur le VEGF peut être à la fois directe *via* la transactivation du promoteur et indirecte *via* l'inhibition de l'un des répresseurs du VEGF, p53 (Clere *et al.*, 2007).

En 2008, Martinez *et al.* ont montré une inhibition de micro-ARN-218 dans des lésions et des cancers du col de l'utérus infectés par HPV 16 (Martinez *et al.*, 2008). Ces micro-ARN (miARN) sont de petits ARN non codants, transcrits dans le noyau, capables de lier des séquences complémentaires situées sur les extrémités 3'UTR des ARN messagers, favorisant ainsi leur dégradation. Dans des cellules SiHa (cellules dérivées de cancer du col de l'utérus, infectées par HPV 16), l'introduction de miARN-218 régule négativement le taux de la protéine LAMB3, chaîne bêta-3 de la laminine-5 (Martinez *et al.*, 2008). LAMB3 est un marqueur d'invasion des cellules tumorales, responsable de la migration des cellules cancéreuses de prostate (Calaluce *et al.*, 2004). L'inhibition des miARN-218 par la protéine E6 d'HPV 16 conduisant à la surexpression de LAMB3 semble contribuer au processus métastatique.

Les cellules tumorales doivent traverser la membrane basale afin de pouvoir se disséminer dans l'organisme et amorcer le processus métastatique. Cette migration est possible en raison de la perte d'adhérence intercellulaire et à la matrice extracellulaire. Cependant, la dégradation de la matrice extracellulaire est à ce jour peu documentée. Deux métalloprotéases de la matrice (MMP) sont exprimées par les cellules cancéreuses du col de l'utérus, ce sont les MMP-2 et MMP-9 (Nuovo *et al.*, 1995) qui jouent vraisemblablement un rôle dans le processus métastatique.

3.4.3 Rôle de la protéine E5 dans le processus tumoral

Les propriétés transformantes de la protéine E5 sont principalement liées à sa capacité de perturber la voie de dégradation du récepteur à l'EGF. La protéine E5 d'HPV 16 interagit d'une part avec l'EGF-R pour retarder son endocytose, et d'autre part avec une ubiquitine ligase cellulaire, c-Cbl, afin de limiter la dégradation de l'EGF-R et augmenter son recyclage à la membrane plasmique. La combinaison de ces processus aboutit à une augmentation de l'activité de l'EGF-R et une prolongation du signal mitotique (Zhang *et al.*, 2005).

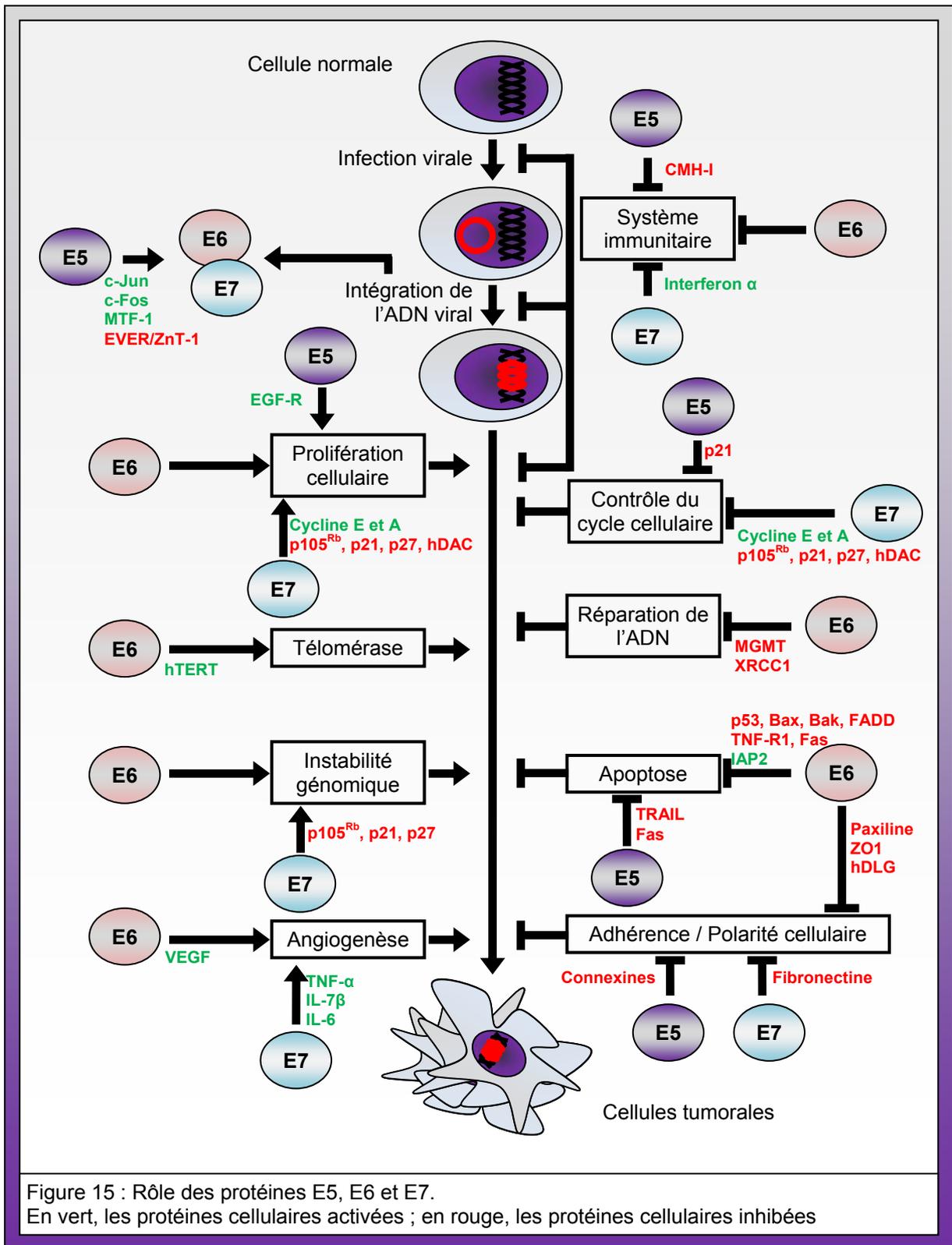
Indépendamment de la protéine E6, la protéine E5 peut inhiber les voies extrinsèques de l'apoptose. Cible de la protéine E5, les récepteurs de TRAIL et FasL sont incapables d'induire l'apoptose après liaison avec leur ligand ou sous l'action des UV (Kabsch and Alonso, 2002).

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

Il a également été rapporté que la protéine E5 est capable, par la voie PKC et les voies de signalisation dépendantes de ras, de stimuler la synthèse des facteurs de transcription c-Jun et c-Fos (Tsai and Chen, 2003). Étant donné que plusieurs sites de fixation de ces facteurs sont localisés dans la LCR des HPV, on peut penser que la protéine E5 d'HPV 16 joue un rôle essentiel dans l'activation de la transcription des gènes viraux, en particulier les oncogènes E6 et E7 et les gènes impliqués dans la réplication virale E1 et E2. Une autre voie d'activation de la réplication du génome viral sous l'influence de la protéine E5 a récemment été décrite (Lazarczyk and Favre, 2008). La protéine E5 est capable de se lier aux protéines EVER1 et EVER2 (epidermodysplasia verruciform gene). Ces protéines EVER forment un complexe avec ZnT-1, une protéine transporteuse de zinc. Ce complexe réprime l'activité du facteur de transcription MTF-1 (metal-responsive transcription factor-1), dont la synthèse dépend du zinc, ainsi que les voies de signalisation des MAPK conduisant à la synthèse de facteurs de transcription c-Jun et c-Fos de la famille AP-1 (Lazarczyk and Favre, 2008). La protéine E5 d'HPV 16 est capable de lier les protéines EVER, et de lever l'inhibition exercée par le complexe EVER/ZnT-1 sur les facteurs de transcription MTF-1 ou de la famille AP-1, aboutissant à une réplication virale accrue (Lazarczyk and Favre, 2008). Il est à noter qu'un rôle similaire à la protéine E5 a été décrit pour la protéine E8 du papillomavirus du lapin cottontail (Nonnenmacher *et al.*, 2006).

Enfin, la protéine E5 est impliquée dans le défaut d'apprêtement des oncogènes viraux observé dans les lésions associées aux HPV haut risque (Ashrafi *et al.*, 2006). E5 diminue l'expression de la calnexine, impliquée dans la formation du complexe CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité I), et de la protéine TAP1 (Transporter Associated Protein 1) qui assure la migration du complexe jusqu'à la membrane plasmique (Leykauf *et al.*, 2004). Ainsi, E5 entraîne la rétention du complexe CMH-I dans l'appareil de Golgi et inhibe sa localisation à la membrane plasmique (Ashrafi *et al.*, 2006). Cette inhibition de présentation de l'antigène favorise l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par HPV qui ne sont plus reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques.

Les différents rôles des protéines E5, E6 et E7 sont schématisés dans la figure 15.



3.5. Cancers péniens et infections par HPV

Le cancer pévien est une maladie rare et potentiellement mutilante dont les facteurs de risque sont nombreux et parmi lesquels figurent une mauvaise hygiène, la rétention de smegma, le phimosis, l'inflammation, l'érythème pévien, la PUVA (psoralen plus UVA) thérapie, le nombre de partenaires

sexuels, les antécédents d'infections sexuellement transmissibles et l'infection par des HPV. Puisque les infections génitales à HPV représentent les infections sexuellement transmissibles les plus fréquentes (Dillner *et al.*, 2000; Walboomers *et al.*, 1999), il n'est pas étonnant de détecter la présence d'ADN viral dans les lésions péniennes. Graham *et al.* furent parmi les premiers à démontrer que les femmes de patients présentant un carcinome pénien étaient davantage susceptibles de développer un cancer du col de l'utérus et inversement (Graham *et al.*, 1979). Contrairement aux carcinomes du col, les carcinomes péniens sont très rares avec une incidence de 1 pour 100 000 dans les pays industrialisés et un taux de mortalité estimé de 1 à 2 % (Jemal *et al.*, 2007; Narayana *et al.*, 1982). En revanche, dans les pays en voie de développement, l'incidence atteint 10 à 20 % de l'ensemble des cancers masculins (Persky and deKernion, 1986). Cette forte variation de l'incidence mondiale est principalement liée aux différences religieuses et socio-économiques (Barnholtz-Sloan *et al.*, 2007). Ainsi, en Inde et au Nigéria, pays dans lesquels la circoncision est pratiquée précocement, les cancers péniens sont rares (Dillner *et al.*, 2000). L'étiologie des carcinomes péniens est mal comprise et il existe peu de données permettant de mettre en évidence un mécanisme carcinogène particulier (Aubin *et al.*, 2001; Dillner *et al.*, 2000).

L'infection par des HPV-HR reste la piste la plus étudiée pour comprendre le développement de cette pathologie puisque la plupart des HPV-HR détectés dans les cancers du col utérin le sont aussi dans près de 40 % des cancers péniens (Rubin *et al.*, 2001). Les cancers péniens associés à une infection par des HPV-HR dérivent de lésions précurseurs (Penile Intraepithelial Neoplasia : PIN, de grade 1 à 3) et les carcinomes épidermoïdes représentent 95 % des cancers péniens. La prévalence des HPV dans les carcinomes péniens est très variable, de 10 à 100 %, dépendant essentiellement de la technique de détection utilisée et du type histologique des tumeurs sélectionnées (Chan *et al.*, 1994; Cupp *et al.*, 1996; Pascual *et al.*, 2007; Tornesello *et al.*, 2008). En effet, les carcinomes péniens comprennent plusieurs sous-types histologiques différents (Dillner *et al.*, 2000), associés de façon différente avec l'infection par HPV. Les lésions péniennes intra-épithéliales associées à HPV sont le plus souvent peu visibles sur le plan clinique, tandis que sur le plan histologique, elles se manifestent par une dysplasie légère, modérée ou sévère. La similarité des sous-types histologiques péniens avec ceux déjà décrits au niveau vulvaire, pourrait impliquer des mécanismes physiopathogéniques communs à ceux de la transformation de l'épithélium vulvaire, plutôt qu'à ceux de l'épithélium cervical (Rubin *et al.*, 2001). En effet, la prévalence d'ADN viral dans les cancers épidermoïdes basaloïdes est plus importante (80 à 100 %) que dans le sous-groupe des cancers kératinisants et verruqueux (30 %) (Rubin *et al.*, 2001). Il semble donc qu'il existe deux types de cancers péniens se développant selon différents mécanismes impliquant probablement un effet de la différenciation kératinocytaire sur l'infection HPV (Dillner *et al.*, 2000). Et si de nombreuses études rapportent une association notable entre la présence d'ADN d'HPV et le développement de carcinomes péniens dans des cohortes incluant des séries de cancers péniens non identifiés (carcinomes épidermoïdes, verruqueux, basaloïdes), il semble que le virus ne soit impliqué que dans certains cas. Ainsi Rubin *et al.* ont observé une forte association entre la présence d'ADN d'HPV et le développement de cancers péniens de type basaloïde ou verruqueux avec une prévalence de 80 % et 100 % respectivement, alors que cette association HPV/cancer était beaucoup plus faible dans un

sous-groupe de cancers kératinisants et verruqueux (34,9 % et 33,3 % respectivement) (Rubin *et al.*, 2001). Une étude récente de Heideman *et al.* sur 83 carcinomes épidermoïdes péniens a montré que 55 % des carcinomes contenaient de l'ADN d'HPV et que 52 % de ces lésions positives en HPV l'étaient pour l'HPV de type 16, un type fortement associé au cancer du col utérin (Heideman *et al.*, 2007). De plus, les auteurs ont montré que 75 % des lésions positives pour l'HPV 16 présentaient une charge virale élevée, et une protéine E6 active (Heideman *et al.*, 2007).

La détection d'une surexpression de l'inhibiteur de kinase dépendante de cycline, p16^{INK4A}, a été proposée pour identifier les cellules épithéliales dysplasiques ano-génitales (Klaes *et al.*, 2001). Or, Ferreux *et al.* ont démontré que cette expression accrue de la protéine p16^{INK4A} serait corrélée à la présence d'HPV 16, et plus particulièrement à l'expression des oncogènes viraux E6 et E7, indiquant une éventuelle voie carcinogène des HPV dans les tissus péniens (Ferreux *et al.*, 2003).

3.6. Patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine

La prévalence des infections ano-génitales à HPV chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est supérieure à celle observée dans la population générale. L'immunodépression favorise à la fois la prévalence des infections à HPV, la sévérité et la progression des néoplasies. La transmission sexuelle, principale voie d'infection par le VIH et les HPV, ainsi qu'une forte incidence des cancers ano-génitaux chez les patients VIH positifs (Melbye *et al.*, 1994) ont orienté la majorité des études à s'intéresser au rôle du VIH dans ces cancers. Ainsi, de nombreuses données épidémiologiques montrent que les patients VIH positifs ont un risque plus important d'infection par HPV et de lésions dysplasiques anales susceptibles d'évoluer vers des stades plus agressifs (Lacey *et al.*, 1999). De plus, ces patients présentent un taux de rechute plus fréquent après traitement de façon corrélée avec une charge virale élevée du VIH (Sobhani *et al.*, 2001). Ce risque est similaire pour l'infection à HPV cervicale. Chez les femmes séropositives pour le VIH, l'infection par des HPV est significativement plus élevée (37 à 53 %) que chez les femmes séronégatives pour le VIH (8 à 24 %) (Ho *et al.*, 1994; Vermund *et al.*, 1991). De plus, le taux d'infection persistante est 6 fois plus élevé chez les femmes séropositives, en particulier lors d'infection par un HPV-HR (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 58) (Sun *et al.*, 1997). Pour un même facteur de risque à l'infection par des HPV, les femmes séropositives pour le VIH présentent une prévalence des néoplasies intra-épithéliales variant de 24 à 41 % versus 1 à 24 % chez les femmes séronégatives (Klein *et al.*, 1994; Maiman *et al.*, 1993; Schafer *et al.*, 1991).

De la même façon, le risque relatif d'une contamination ano-génitale par un HPV est 2 à 6 fois supérieure chez les patients séropositifs pour le VIH, indépendamment des pratiques sexuelles. Cette co-infection fréquente soulève le problème d'interactions épidémiologiques et moléculaires entre les virus. L'infection de types cellulaires distincts par les virus VIH et HPV, a conduit certains auteurs à suggérer des interactions indirectes entre les deux virus. Mais l'existence d'interactions directes a aussi été avancée, avec comme conséquence une augmentation de la transmissibilité de chaque agent pathogène, facilitée par l'immunosuppression au niveau de la muqueuse génitale de la femme. Ainsi, il a été montré que la protéine Tat, qui est une protéine accessoire du VIH pouvant être sécrétée dans les liquides physiologiques, était capable de se fixer aux intégrines de cellules

épithéliales, et d'activer des promoteurs cellulaires. Des études *in vitro* ont montré une augmentation de l'expression des gènes viraux E1 et L1 (Dolei *et al.*, 1999) ainsi que l'activation du promoteur P97 d'HPV 16 (Vernon *et al.*, 1993). De plus, Tornesello *et al.* ont observé une augmentation de l'expression de E7 d'HPV 18 après transfection de Tat dans des cellules HeLa dérivées d'un adénocarcinome du col utérin (Tornesello *et al.*, 1993). Une étude récente a montré que cette protéine Tat est capable d'activer la prolifération de kératinocytes infectés par HPV 16 (Kim *et al.*, 2008). Il a aussi été montré *in vitro* que l'expression de la protéine Rev du VIH favorisait la production de protéines de capsid L1 dans des cellules épithéliales basales indifférenciées (Tan and Schwartz, 1995). En parallèle, les HPV pourraient augmenter la susceptibilité de la muqueuse à une infection par le VIH, et également favoriser la progression de cette infection. L'infection à HPV est aujourd'hui considérée comme une infection opportuniste chez les patients séropositifs pour le VIH.

3.7. Carcinogénèse cutanée associée aux HPV et aux UV

Les mécanismes moléculaires par lesquels les HPV bêta participent à la photo-carcinogénèse restent mal compris. Les HPV bêta ne possèdent pas de phase ouverte de lecture permettant l'expression des protéines E5 et E8 (Bravo and Alonso, 2004), et à la différence des oncoprotéines virales E6 et E7 des HPV alpha, les protéines virales E6 et E7 des HPV bêta n'induisent pas la dégradation des protéines p53 et p105^{Rb}. L'activité des oncogènes viraux E6 et E7 n'est pas clairement élucidée et apparaît différente d'un type viral à l'autre. Malgré ces différences, la présence d'HPV bêta entraîne la modulation de nombreuses activités cellulaires suggérant un rôle co-carcinogène de ces virus en synergie avec les UV.

3.7.1 Modèles murins de carcinogénèse cutanée associée aux HPV bêta

Plusieurs modèles murins ont permis de mettre en évidence l'apparition de tumeurs cutanées chez des souris exprimant un ou plusieurs gènes d'HPV bêta. Ainsi, Schaper *et al.* ont montré que des souris transgéniques exprimant, au niveau cutané, les gènes précoces E2, E6 et E7 de l'HPV de type 8, développent des cancers cutanés non mélaniques en l'absence d'exposition à des agents carcinogènes et sans mutations au niveau du gène TP53 (Schaper *et al.*, 2005). Des travaux conduits par Michel *et al.* ont montré que l'exposition chronique aux UVB de souris transgéniques exprimant les protéines E6 et E7 des HPV de type 20 ou 27 induit une prolifération accrue et une diminution de la différenciation kératinocytaire (Michel *et al.*, 2006). Des souris exprimant E6 et E7 de l'HPV de type 38 présentent une prolifération kératinocytaire accrue, et une perte d'expression de la protéine p21 après irradiation par des UVB (Dong *et al.*, 2005). De plus, l'exposition à deux carcinogènes chimiques, le DMBA (diméthylbenzantracène) et le TPA (triphénylamine) entraîne le développement de carcinomes épidermoïdes cutanés chez les souris exprimant E6 et E7 de l'HPV de type 38 (Dong *et al.*, 2005). Enfin, plus récemment, Pfefferle *et al.* ont montré que des souris exprimant la protéine E2 de l'HPV de type 8 développent des tumeurs cutanées de façon spontanée ou suite à l'irradiation par des UV (Pfefferle *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats obtenus sur des modèles murins suggère que certains HPV bêta sont capables d'induire l'apparition de tumeurs cutanées de façon spontanée ou en synergie avec d'autres agents carcinogènes, comme illustré dans le tableau 3.

	Absence d'agent carcinogène	Absence d'agent carcinogène	
		DMBA/TPA	UV
E2/E6/E7 d'HPV 8	Hyperprolifération cutanée Différenciation cutanée réduite Développement de CE	nd	nd
E2 d'HPV 8	Développement de CE	nd	Développement de CE
E6/E7 d'HPV 20	nd	nd	Hyperprolifération cutanée Différenciation cutanée réduite
E6/E7d'HPV 27	nd	nd	Hyperprolifération cutanée Différenciation cutanée réduite
E6/E7d'HPV 38	Hyperprolifération cutanée	Développement de CE	nd

Tableau 3 : Effet des protéines virales de différents HPV sur le tissu cutané murin.
nd : non démontré

Certains types d'HPV sont sensibles à l'expression de p53. Ainsi Purdie *et al.* ont montré que l'expression des protéines virales d'HPV 77 (HPV alpha, retrouvé uniquement au niveau de lésions cutanées malignes chez des patients transplantés rénaux) peut être stimulée par les UV, *via* l'activation de p53 (Purdie *et al.*, 1999). En effet, certains HPV présentent dans leur région non codante un élément de réponse à p53 et l'induction de la protéine p53 suite à l'exposition aux UV entraîne une activation du promoteur viral (Purdie *et al.*, 1999). Cependant, Ruhland et De Villiers ont démontré que les UV exercent également des régulations positives ou négatives sur le promoteur viral en fonction du type d'HPV étudié (Ruhland and de Villiers, 2001). Ainsi, alors que l'irradiation par des UV peut induire une activation des promoteurs viraux des HPV 5, 8, 20, 23, elle peut inhiber les promoteurs des HPV 27 et 38 (Akgul *et al.*, 2005b; de Villiers *et al.*, 1999). De plus, Ruhland et de Villiers ont montré que des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les kératinocytes exposés aux UV sont capables d'activer le promoteur de l'HPV 20 et d'inhiber celui de l'HPV 27 (Ruhland and de Villiers, 2001). Ces résultats suggèrent qu'il existe plusieurs mécanismes permettant de réguler le promoteur viral suite à l'exposition aux UV, indépendamment du statut haut risque ou bas risque, et

soulignent la complexité des mécanismes impliqués au sein de tumeurs cutanées, particulièrement dans le cas de co-infections par plusieurs types d'HPV (Ruhland and de Villiers, 2001).

3.7.3 Dérégulation de la prolifération cellulaire

Les protéines E6 et E7 des HPV bêta, à l'inverse des HPV alpha, ne sont pas capables d'entraîner la dégradation des protéines p53 et p105^{Rb} (Steger and Pfister, 1992). Cependant, la protéine E7 de l'HPV 38 a été montrée comme capable d'inhiber l'activité de p105^{Rb} (Caldeira *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 1993). Caldeira *et al.* ont ainsi montré que la liaison de la protéine E7 de l'HPV 38 à la protéine p105^{Rb} a pour conséquence d'inhiber l'activité des CKI p16^{INK4a}, p21^{Cip1} et p27^{Kip1}, entraînant une perte de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et la progression en phase S (Caldeira *et al.*, 2003). De plus, Mouret *et al.* ont montré dans la lignée kératinocytaire SKv infecté par l'HPV 16 une relation entre le niveau d'expression de la protéine E6* (forme tronquée de la protéine E6, associée à un fort potentiel carcinogène) et la protection contre le stress oxydatif. Dans ce modèle, les auteurs ont observé que l'activité de l'enzyme glutathion peroxydase, impliquée dans la réduction du peroxyde d'hydrogène, est corrélée au taux d'expression de la protéine E6*. Les cellules SKv exprimant un fort taux de protéine E6* sont alors plus résistantes aux UV et présentent moins de dommages oxydatifs de l'ADN. Ce mécanisme de protection contre les UV pourrait constituer une voie de persistance virale.

Après irradiation de kératinocytes par des UV, le gène TP53 est normalement activé, permettant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Jackson and Storey, 2000; Qin *et al.*, 2002). Cependant, sans entraîner la dégradation de la protéine p53, l'oncoprotéine E6 d'HPV 77 est capable de moduler son activité de facteur de transcription. En effet, Giampieri *et al.* ont montré que l'expression dépendante de la protéine p53 des gènes pro-apoptotiques Fas, PUMA, Apaf-1 et PIG3, est inhibée en présence de la protéine E6 d'HPV 77 (Giampieri *et al.*, 2004). Plus récemment, Accardi *et al.* ont montré qu'en présence des protéines E6 et E7 d'HPV 38, la protéine p53 est stabilisée et phosphorylée (Accardi *et al.*, 2006). Il en résulte une expression accrue de la protéine Δ Np73 α , isoforme de p73, dont l'extrémité N-terminale contenant le domaine de transactivation est tronquée. A l'inverse de la protéine p73 qui est un suppresseur de tumeurs, la protéine Δ Np73 α est considérée comme une oncoprotéine. Cette oncoprotéine, qui agit en dominant négatif de p53 et p73 et présente une activité transformante *in vitro* (Petrenko *et al.*, 2003), est surexprimée dans de nombreux cancers dont ceux du sein et du tractus génital (Zaika *et al.*, 2002). Cette surexpression de Δ Np73 α aboutit à l'inhibition d'expression des gènes impliqués dans l'arrêt de cycle et l'apoptose (Accardi *et al.*, 2006). Il apparaît donc, malgré l'absence d'interaction entre les protéines E6 des HPV bêta et p53, que ces oncoprotéines virales sont capables de perturber l'arrêt de cycle et l'apoptose dépendants de p53. Il arrive qu'en cas de mutations constitutionnelles ou acquises, la perte partielle ou totale des fonctions de p53 influence la carcinogenèse cutanée. Cependant, les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni qui présentent une mutation constitutionnelle du gène TP53, ne sont pas prédisposés aux cancers cutanés induits par les UV. De plus, les oncoprotéines E6 de certains HPV inhibent aussi l'apoptose induite par les UV dans des cellules génétiquement déficientes pour le gène TP53. Ces

résultats suggèrent qu'il existe d'autres voies apoptotiques, indépendantes de p53, induites par les UV, et qui peuvent être inhibées par la protéine E6 (Jackson and Storey, 2000). Les mécanismes moléculaires de l'inhibition de l'apoptose par les protéines E6 des HPV cutanés ne sont pas encore clairement élucidés, mais ils pourraient impliquer les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2. Jackson *al.* ont ainsi montré que les UVB stimulent l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak favorisant l'élimination par apoptose des kératinocytes irradiés (Jackson *et al.*, 2000). Il a été montré que la protéine E6 de différents HPV bêta permet la dégradation de la protéine Bak, inhibant ainsi l'apoptose induite par les UV (Jackson *et al.*, 2000; Underbrink *et al.*, 2008). Le mécanisme reste mal connu mais certains auteurs suggèrent une dégradation indépendante de l'ubiquitine ligase cellulaire E6AP (Jackson *et al.*, 2000), alors que d'autres impliquent une voie de dégradation dépendante de cette protéine (Underbrink *et al.*, 2008). L'absence d'expression de la protéine Bak dans les tumeurs cutanées infectées par des HPV bêta renforce l'hypothèse d'une synergie entre les UV et les HPV bêta dans le développement de ces cancers cutanés (Jackson *et al.*, 2002). Outre la perte d'expression de Bak dans les tumeurs cutanées, une modification du ratio Bcl-2/Bax a été observée dans des lésions bénignes infectées par des HPV de bas risque, ce qui pourrait constituer une des voies utilisées par les HPV dans la suppression du processus apoptotique (Erkek *et al.*, 2004). Zhang *et al.* ont aussi montré que la protéine virale E5 de l'HPV de type 16, qui n'est pas exprimée par les HPV bêta, protège les kératinocytes de l'apoptose induite par les UVB (Zhang *et al.*, 2002). Enfin, dans des kératinocytes humains normaux, Struijk *et al.* ont démontré que l'expression des oncoprotéines E6 et E7 des HPV de type 8 et 20 inhibent la réponse apoptotique de ces cellules aux UVB (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2002). Ainsi, ces virus possèdent bien des propriétés oncogéniques dans la mesure où ils permettent aux cellules de poursuivre leur cycle cellulaire, y compris après irradiation par les UV.

3.7.4 Immortalisation cellulaire

Caldeira *et al.* ont montré que l'expression des protéines E6 et E7 de l'HPV de type 38 induit une augmentation très significative de la durée de vie de kératinocytes primaires (Caldeira *et al.*, 2003). Dans ces cellules, les protéines E6 et E7 activent la transcription de la sous-unité catalytique hTERT de la télomérase (Gabet *et al.*, 2008). Cependant, l'activation transcriptionnelle de hTERT peut être partiellement inhibée par la transfection avec un oligonucléotide antisens de la protéine Δ Np73. Ceci, suggère que la protéine Δ Np73 est un effecteur de la surexpression de la sous-unité hTERT médiée par les protéines E6 et E7 de l'HPV 38 (Gabet *et al.*, 2008). Cette étape d'activation de la télomérase prédispose à l'infection chronique à HPV et à la transformation cellulaire.

3.7.5 Transformation cellulaire

Bien que la présence du génome d'HPV au sein d'une cellule ne modifie pas les capacités mutagènes des UV vis-à-vis du gène TP53, il a été montré *in vitro*, que les mécanismes de réparation de l'ADN dépendants de la protéine p53 (réparation par excision) sont altérés par la présence de l'HPV alpha de type 16, voire par la simple présence du gène E6 de cet HPV (El-Mahdy *et al.*, 2000; Ford *et al.*, 1998; Rey *et al.*, 1999). De plus, Giampieri et Storey ont montré que l'expression des

oncoprotéines E6 de l'HPV 5 peut minimiser la réparation de l'ADN permettant ainsi le maintien des dimères de thymine et favorisant le processus carcinogène (Giampieri and Storey, 2004). Selon la littérature également, la protéine E6 de l'HPV de type 8 est capable de lier l'enzyme de réparation de l'ADN XRCC1 (Iftner *et al.*, 2002). Ces données prouvent que l'action transformante des HPV n'est pas due uniquement à une perte de contrôle du cycle cellulaire, mais aussi à la déficience des systèmes de réparation de l'ADN suite à l'exposition aux UV.

De plus, Gabet *et al.* ont montré que l'infection de kératinocytes primaires par les protéines E6 et E7 de l'HPV 38 aboutit, au fur et à mesure des doublements de population, à l'érosion des télomères (Gabet *et al.*, 2008). Cet événement entraîne l'apparition de télomères courts et instables à l'origine de mitoses aberrantes. En synergie avec la perte de régulation du cycle cellulaire, ces anomalies mitotiques aboutissent à une instabilité génomique donnant lieu à des aberrations chromosomiques et à une population polyploïde (Gabet *et al.*, 2008). Dans ce contexte, certains réarrangements chromosomiques peuvent permettre l'apparition de clones cellulaires transformés, confirmant bien le rôle des HPV dans la carcinogenèse cutanée, au moins en tant que cofacteurs carcinogènes.

3.7.6 Croissance tumorale et dissémination métastatique

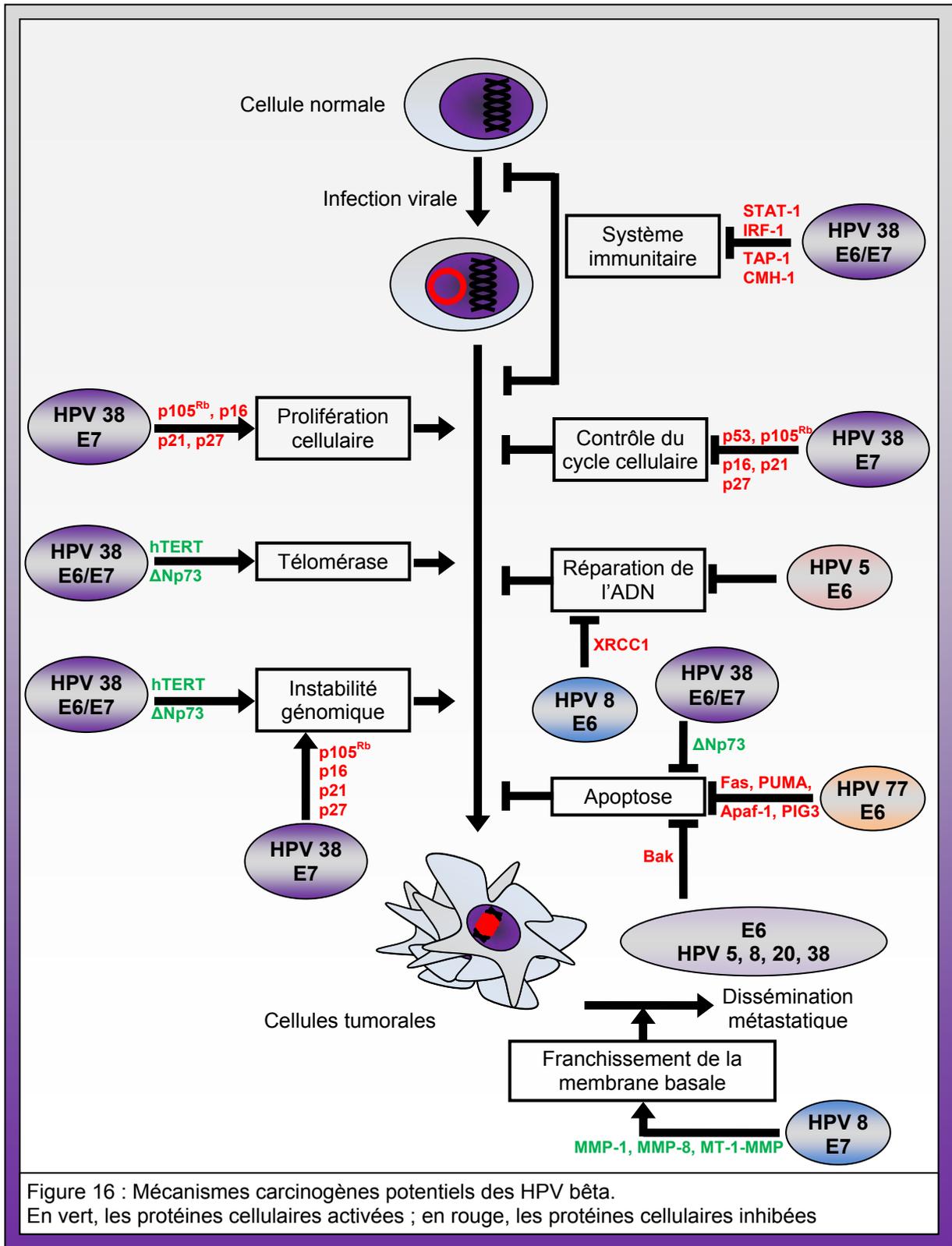
L'étape initiale du processus métastatique est le franchissement de la membrane basale par les cellules tumorales. Dans un modèle de peau équivalente reconstituée avec des kératinocytes exprimant E7 de l'HPV 8, Akgül *et al.* ont montré une surexpression des métalloprotéases de la matrice (MMP) MMP-1, MMP-8 et MT-1-MMP (Akgul *et al.*, 2005a). Ces métalloprotéases jouent vraisemblablement un rôle dans l'invasion du derme par les cellules tumorales et le processus métastatique.

3.7.7 Rôle du système immunitaire au cours de la carcinogenèse cutanée liée aux HPV et aux UV

Il est à présent bien établi que des épisodes d'irradiation par les UVB diminuent fortement les réponses immunitaires systémiques et locales (Aubin, 2002). Ainsi, un défaut de mise en place d'une réponse immunitaire, accompagné de la perte de fonctions immunitaires, favoriseront le développement de niches écologiques propices à la colonisation et au développement des HPV. On constate également que l'infection de kératinocytes par les HPV ne s'accompagne que d'une très faible, voire inexistante réaction inflammatoire. En l'absence de cytokines inflammatoires, la présentation des antigènes viraux par les cellules dendritiques épidermiques (cellules de Langerhans) aux lymphocytes est donc compromise. De plus, les kératinocytes infectés par les HPV semblent résistants vis à vis des lymphocytes T cytotoxiques. Les kératinocytes infectés par les HPV pourraient ainsi représenter un sanctuaire protégé sur le plan immunologique. Stockfleth *et al.* ont montré que l'application d'un immunomodulateur, l'imiquimod, entraîne la guérison clinique, histologique et virologique de lésions épithéliales cutanées infectées par HPV (Stockfleth *et al.*, 2002). Cet effet

bénéfique s'expliquerait par la reconstitution locale d'une réponse immunitaire normale préalablement altérée par les HPV. Ces résultats suggèrent un effet immunosuppresseur induit par les protéines virales qui favoriserait la persistance épidermique de l'infection virale et éventuellement des cellules tumorales, y compris chez les sujets immunocompétents (Frazer *et al.*, 1999). Cordano *et al.* ont récemment montré que l'expression des protéines E6 et E7 de l'HPV 38 diminue l'expression du CMH-I à la surface de kératinocytes primaires (Cordano *et al.*, 2008). Les mêmes auteurs ont décrit une inhibition de la transcription des protéines STAT-1, IRF-1 et TAP-1, impliquées dans la voie de signalisation des interférons, et nécessaires à l'assemblage du CMH-I (Cordano *et al.*, 2008). Ainsi, il semblerait que les HPV permettent un échappement au système immunitaire conjointement avec les UV, ceci pourrait favoriser l'expansion clonale de cellules ayant acquis des mutations.

Les mécanismes par lesquels les HPV bêta pourraient être impliqués dans la carcinogenèse sont schématisés dans la figure 16.



Travaux personnels

Contexte et objectifs :

Si le rôle des HPV bêta dans la carcinogenèse cutanée des patients immunodéprimés est reconnu, il n'en n'est pas de même en ce qui concerne les sujets immunocompétents. L'apoptose induite par les UV constitue le mécanisme ultime de protection cellulaire contre l'effet carcinogène de ces rayonnements. La capacité des HPV à inhiber ce mécanisme de protection pourrait constituer une preuve de leur rôle en tant que cofacteurs de la carcinogenèse photo-induite. Ainsi dès 2000, Jackson *et al.* ont été les premiers à montrer que certains HPV retrouvés dans des carcinomes cutanés possédaient la capacité d'inhiber l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak (Jackson *et al.*, 2000). Ainsi, de nombreuses études ont cherché à montrer que les HPV bêta sont capables d'inhiber l'apoptose, et qu'ils participeraient ainsi à la promotion tumorale.

Nous nous sommes alors intéressés à la capacité des protéines virales de certains HPV bêta à inhiber l'apoptose induite par les UVB, dans des kératinocytes humains.

De plus, l'identification de facteurs de susceptibilité au développement de cancers est important pour la prise en charge thérapeutique et constitue une préoccupation pour les médecins impliqués dans le suivi clinique des patients. Aussi, suite à la mise en évidence par Storey *et al.* d'une étroite corrélation entre le risque de développer un cancer cutanéomuqueux associé à des HPV à haut risque oncogène, et l'existence d'un polymorphisme génétique commun du gène suppresseur de tumeur TP53 (Storey *et al.*, 1998), notre équipe a cherché à mettre en évidence l'incidence de ce polymorphisme, en relation avec l'infection à HPV, dans différentes lésions précancéreuses et cancéreuses épithéliales.

Le but de notre travail fut d'identifier la présence d'un gène de susceptibilité (arginine en position 72 de p53) chez les patients développant des tumeurs associées ou non à l'infection par HPV. Après avoir rassemblé l'une des plus importantes cohortes d'Europe, nous avons analysé les génotypes de TP53 et des HPV infectant dans des carcinomes épidermoïdes pénien *versus* des lésions péniennes bénignes de type phimosis ou balanites.

Enfin, le suivi, au service de dermatologie de Besançon, d'une patiente séropositive qui a développé un syndrome de restauration immunitaire sous forme de nombreuses lésions cutanées nous a conduits à nous intéresser à l'infection par HPV au sein de ces lésions.

Le but de notre travail fut d'étudier différents facteurs susceptibles d'attribuer un rôle des HPV bêta dans la carcinogenèse cutanéomuqueuse, et de s'attacher à comprendre comment ces virus, retrouvés de façon ubiquitaires au niveau du tissu cutané peuvent participer à la carcinogenèse cutanée.

Publication n°1

E6 and E7 proteins from multiple/different beta papillomaviruses types do not interfere in UVB-induced apoptosis of HaCaT cells/keratinocytes

J.S. Guerrini, V. Bouvard, E. Oswald, A. Alonso, M. Tommasino, C. Mougin and F. Aubin

(Soumise pour publication)

Ce travail a été présenté sous forme orale à :

- 4th International Meeting on HPV and Skin Cancer, Besançon, France; 28-30 Juin 2007; "E6 and E7 from different beta-HPV do not interfere in HaCat cells UVB-induced apoptosis". Guerrini JS, Bouvard V, Oswald E, Alonso A, Tommasino M, Mougin C, Aubin F. Résumé dans : Bulletin du Cancer. Volume 94, Numéro 6, 613-23, Juin 2007.
- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, Lyon, France ; 22-23 Juin 2007. "Les protéines E6 et E7 des HPV de genre bêta n'interfèrent pas dans l'apoptose induite par les rayonnements ultraviolets de cellules HaCat". Guerrini JS, Bouvard V, Oswald E, Alonso A, Tommasino M, Aubin F. Résumé dans : J Invest Dermatol 2007 ; 127 : 2477.
- Journée Annuelle de Dermatologie Besançon-Lausanne, Lausanne, Suisse ; 21 Juin 2007 ; "Les protéines E6 et E7 de différents papillomavirus de genre bêta n'interfèrent pas dans l'apoptose de kératinocytes HaCat induite par les UVB". Guerrini JS, Bouvard V, Oswald E, Alonso A, Tommasino M, Aubin F.

Ce travail a été présenté sous forme de poster à :

- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, Toulouse , France ; 11-13 Septembre 2008 ; "Les protéines E6 et E7 de différents HPV bêta ne modulent pas l'apoptose de cellules HaCaT irradiées par des UVB". Guerrini JS, Bouvard V, Oswald E, Alonso A, Tommasino M, Aubin F.

Introduction à la publication n°1 :

Dans ce travail, notre but était de déterminer si les protéines virales E6 et E7 de différents HPV bêta étaient capables de moduler l'apoptose induite par les UV dans une lignée de kératinocytes. Pour cela, nous avons d'abord évalué la capacité de la lignée cellulaire HaCaT à entrer en apoptose suite à l'irradiation par des UVB. Les cellules ont été irradiées par différentes doses d'UVB et le pourcentage de cellules en Sub-G1, c'est-à-dire avec une quantité d'ADN inférieure à N, a été mesuré. Nous avons confirmé que la sous-population de cellules en phase Sub-G1 est caractéristique de cellules apoptotiques. Ensuite, les kératinocytes HaCaT ont été transduits par les gènes E6 et E7 des HPV 5, 8, 14, 24, 36, 38 et 49 ; HPV fréquemment retrouvés au niveau cutané et supposés à haut risque oncogène. Les protéines E6 et E7 de l'HPV alpha HR de type 16 ont été utilisées comme contrôle positif, alors que celles de l'HPV alpha de type 10 ont servi de témoin négatif. La présence des protéines virales dans les kératinocytes HaCaT n'a pas entraîné de modification de la réponse apoptotique de ces cellules aux UVB.

Bien que les protéines virales des HPV bêta n'entraînent pas la dégradation de la protéine p53, Dong *et al.* ont montré que l'expression des protéines E6 et E7 de l'HPV 38 dans l'épiderme murin est capable d'inhiber la réponse apoptotique aux UV, et que cette inhibition est dépendante de la présence de la protéine p53 (Dong *et al.*, 2008). Puisque les cellules HaCaT présentent une protéine p53 mutée, nous avons traité ces cellules avec la molécule PRIMA-1 (p53 Reactivation and induction of massive apoptosis). Ce composé permet de restaurer l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 dans des cellules présentant une p53 mutée (Bykov *et al.*, 2002; Bykov *et al.*, 2003; Charlot *et al.*, 2006). Le traitement par la molécule PRIMA-1 n'a pas induit de diminution de l'apoptose par les UVB dans les kératinocytes transduits par E6 et E7, suggérant, d'une part que l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 n'est pas affectée par les mutations qu'elle porte, et d'autre part que l'effet de protéines E6 et E7 observé par Dong *et al.* pourrait être indépendante de l'activité transcriptionnelle de p53.

Ce travail montre l'importance du modèle cellulaire employé pour l'étude des mécanismes d'action des protéines virales E6 et E7. Alors que dans ce modèle cellulaire les protéines E6 et E7 des HPV bêta n'exercent pas d'effets activateurs ou inhibiteurs sur l'apoptose induite par les UVB, il serait intéressant d'étudier la réparation de l'ADN suite à l'irradiation par les UVB. En effet, si les protéines virales n'influencent pas la réponse apoptotique de ces cellules aux UVB, elles pourraient diminuer la réparation de l'ADN permettant le maintien de cellules ayant acquis des mutations génomiques. De plus, la réintroduction dans ces cellules d'une protéine p53 sauvage pourrait permettre de mettre en évidence un effet des protéines virales sur l'apoptose induite par les UVB, dépendant de la présence d'une protéine p53 sauvage.

Dans ce travail, j'ai réalisé la totalité des expérimentations en collaboration avec les équipes lyonnaises de Dr. Massimo Tommasino et Allemande du Pr. Angel Alonso.

E6 and E7 proteins from different beta papillomaviruses types do not interfere in UVB-induced apoptosis of HaCaT keratinocytes

Jean-Sébastien Guerrini¹, Véronique Bouvard², Evelyne Oswald³, Angel Alonso³, Massimo Tommasino², Christiane Mougin^{1,4} and François Aubin^{1,5}

¹EA 3181, IFR 133, Université de Franche-Comté, Besançon, France; ²International Agency for Research on Cancer, Lyon, France; ³Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany; ⁴Service de Biologie Cellulaire, Hôpital Jean Minjoz, 25000 Besançon, France; ⁵Service de Dermatologie, Hôpital Saint-Jacques, 25000 Besançon, France.

Corresponding author : Pr. François Aubin, Service de Dermatologie, Hôpital Saint-Jacques, 2 Place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex. francois.aubin@ufc-chu.univ-fcomte.fr

Keywords : beta-HPV, E6, E7, UV, apoptosis, NMSC

Abstract

Ultraviolet (UV) irradiation is the most important factor involved in the development of non melanoma skin cancer (NMSC). Apoptotic elimination of UV-damaged cells from the epidermis is the major step in preventing both emergence and expansion of cells with carcinogenic potential. Although epidemiological studies suggest the role of beta-human papillomaviruses (HPV) in UV-induced skin cancer, the functional role of UV irradiation in combination with E6 and E7, the two major viral oncoproteins proteins, from beta-HPV types still remains unclear. Here, we investigated the role of E6 and E7 from different beta-HPV on UVB-induced apoptosis in HaCaT keratinocytes. HaCaT cells were transduced with E6/E7 using a retroviral system and then exposed to UVB. P53 activity was restored in the p53-mutated HaCaT cells with PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) or transduction with a wild-type p53. Apoptosis was investigated using cytometry analysis. We did not observe any difference in apoptosis, even after restoration of p53 activity between cells expressing E6 and E7 and control cells according to the dose of UVB or the time after exposure, In conclusion, our data suggest that the two viral oncoproteins E6 and E7 from b-HPV have no effect on UVB-induced apoptosis of HaCaT cells. This lack of effect may be due to the presence of multiple genetic alterations that occurred during the spontaneous immortalization of HaCat cells.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are small DNA viruses that infect cutaneous and mucosal epithelia. They are responsible for a large spectrum of human disorders ranging from benign epithelial proliferations to epithelial cancers (zur Hausen, 2000)(zur Hausen, 2002). Over 100 different types have so far been identified, characterized on the basis of DNA sequence analysis and classified in different genres (de Villiers *et al.*, 2004). Only a small number of HPVs, the high-risk types, are associated with cancer. The genus *beta* (beta-HPVs), which cause cutaneous lesions in humans, have been linked to the development of skin cancers (Pfister, 1992). The first evidence that HPV infection is associated with non-melanoma skin cancer (NMSC) was found in patients with the rare inherited disease *epidermodysplasia verruciformis* (EV) ((Lutzner *et al.*, 1984)..Then, beta-HPV DNA was also detected in high levels (up to 80%) within SCC that arise in both solid organ transplant immunosuppressed recipients (Berkhout *et al.*, 1995; Bouwes Bavinck *et al.*, 2001; de Jong-Tieben *et al.*, 1995; de Villiers *et al.*, 1997; Humbey *et al.*, 2003) and immunocompetent individuals (Harwood and Proby, 2002). However, improved methods for detecting HPV DNA demonstrated an ubiquitous and persistence presence of beta-HPV in normal human skin and hair follicles from healthy individuals (Antonsson *et al.*, 2003; Asgari *et al.*, 2008; Astori *et al.*, 1998; Boxman *et al.*, 1997; de Koning *et al.*, 2007; Hazard *et al.*, 2007). In addition, the prevalence of HPV DNA increases at the sun-exposed sites, and sun exposure has been shown to be associated with multiple HPV type infections (Asgari *et al.*, 2008; Forslund *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2008). The primarily localization of SCC and viral skin warts on chronically sun-exposed areas suggest the co-carcinogenic role of genus beta-HPVs and sunlight in the early development of NMSC (Pfister, 1992). Altogether these data raise the question of the relevance of HPV infection in the development of UV-induced skin cancer (Orth, 2005).

UV is recognized as the main physical carcinogen in the environment for the development of skin cancer (Brash *et al.*, 1991). UV radiations are highly mutagenic and accumulation of sufficient numbers of mutations in critical genes such as p53 leads to malignant transformation (Runger, 2007). Besides DNA repair, an important protective mechanism for the removal of UV irreversibly damaged cells is the induction of apoptosis (Ichihashi *et al.*, 2003). An important mechanistic finding was that similarly to alpha-HPV, beta-HPV E6 proteins can associate with and induce the degradation of the proapoptotic Bcl2 family member Bak (Jackson and Storey, 2000; Underbrink *et al.*, 2008). On the basis of these studies, it was suggested that beta-HPV infections would blunt the apoptotic response to UV irradiation and allow UV-damaged cells that may have accumulated genomic alterations to survive and form the seeds of a tumor. Such a model is consistent with epidemiologic studies, as well as the original observations with EV patients and renal transplant patients that have demonstrated cooperation of b-HPV infection with UV exposure. Infection with certain b-HPV would represent a cofactor for UV-induced skin cancer (Jackson 2000).

In our study, we wished to investigate the effect of different beta HPV E6 and E7 proteins on UV-induced apoptosis of HaCat keratinocytes. We demonstrated that the transfection/expression of E6 and E7 proteins from the beta-HPVs 5, 8, 14, 24, 36, 38 and 49 did not inhibit UV-induced apoptosis of HaCat keratinocytes, even after reactivation of p53 by PRIMA-1.

Material and methods

Cell culture

Epidermal immortalized HaCat cell line was kindly supplied by Pr. L. Nicod (UFR de Medicine et Pharmacie, Besançon, France). HaCaT cells were grown in DMEM medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Lonza), 2 mM L-Glutamine (Lonza), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Lonza) in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. C33A cells were cultured in EMEM medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Lonza), 5% (v/v) sodium pyruvate (Lonza), 2 mM L-Glutamine (Lonza), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Lonza) in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C.

Vectors and Retroviral infections

HaCaT cells transduced with E6/E7 from HPVs 10, 14, 24, 36, 38 and 49 were a generous gift of Dr M. Tommasino (IARC, Lyon, France). HaCaT cells expressing E6/E7 from HPV 5, 8 and 16 were generated using retroviral infections as previously described (Caldeira *et al.*, 2003). pLXSN 8E6/E7 and pLXSN 16E6/E7 vectors were respectively kindly supplied by Pr A. Alonso (DKFZ, Heidelberg, Germany) and Dr M. Tommasino. E6/E7 ORF was amplified by PCR using the following primers: 5E6/E7 BamHI forward, 5'-tattagatccatggctgaggagccgaa-3' and 5E6/E7 XhoI reverse, 5'-tattactcgagttaccaatcatgataaaaatgc-3' and cloned in BamHI/XhoI digested pLXSN (Clontech, BD, Le Pont Claix, France).

Cell Treatments

For UV irradiation experiments, the cells were split at the density of 6,000 cells per cm² and cultured on 6 well dishes for 24 hours. Cells were irradiated with an UVP CL-1000M ultraviolet cross-linker (UVP, Cambridge, United Kingdom) with F8T5 bulbs giving a spectral peak at 312 nm. After two washes with phosphate-buffered saline (PBS), cells were exposed to 0 to 80mJ/cm² UVB without media and with the dish lids removed. Immediately following UVB-irradiation, pre-heated media was added and cells were cultured for 0 to 48 hours.

PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) (Tebu Bio, Le Perray en Yvelines, France) was used from stock solution diluted in water and 125µM was added to media immediately following UVB irradiation. These cells were cultured during 24 hours.

RT-PCR analysis

E6 and E7 gene expression of the HaCat cell lines was confirmed by RT-PCR analysis with the same primers used for cloning the different E6 or E7 genes. Total RNA was extracted from cells using Trizol Reagent (Invitrogen life Technology, Paisley, UK) and then treated with DNase I in order to prevent cellular DNA contamination in the PCR amplification. CDNA was synthesized with the First Strand

cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, St Rémy Les Chevreuse, France) with a random hexamer primer and the moloney murine leukemia virus reverse transcriptase.

Hoechst staining

HaCaT cells (supernatant plus attached cells) were harvested 24 hours following UVB irradiation with 10mJ/cm². Cells were incubated with 3µg/ml Hoechst 3342 diluted in PBS (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) during 30 min at room temperature in the dark. After 2 washes with PBS, cells and apoptotic bodies were cytocentrifuged at 300g 20min at RT on microscope slides and observed by fluorescent microscopy.

Western blotting

HaCaT cells were irradiated with 20 mJ/cm² of UVB and harvested 24 h later. Attached cells collected with trypsin/EDTA (Lonza) and the supernatant were pooled before centrifugation at 300 g for 10 min at 4°C. The cells were washed once with ice cold PBS and lysed on ice for 10 min in RIPA buffer (1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% bovine hemoglobin, 1 mM iodoacetamide, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 140 mM NaCl, 0.025% NaN₃) supplemented with 1x cocktail protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). The resulting extracts were sonicated and protein concentration was determined by the Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A total of 20 µg of total proteins was diluted in 2x Laemmli buffer and then heated at 95°C for 5 min. Protein were separated on 15% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane according to standard procedures. The membranes were immunoblotted with specific monoclonal antibodies used at the following dilutions in 0.5% powdered milk in PBS-Tween 0,1%: anti-HA (clone 3F10, Roche Diagnostics), anti-p53 1:1000 (clone DO-1; PharMingen, San Diego, CA), anti-caspase3 1:1,000 (9662, Cell Signaling technology, Danver, MA, USA) and anti-actin 1:1000 (clone Ac15; Sigma, St. Louis, MI, USA) as a loading control. The secondary antibody was a horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse used at 1:10,000 dilution and luminescent signal was generated using the chemiluminescence plus reagent system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) according to manufacturer's instructions.

Flow cytometry assay

At indicated time periods, pool attached cells and supernatant were washed with PBS. Each sample was split in two batches of cell for analysis of mitochondrial membrane potential and Sub-G1 population and centrifuged at 300g for 10 min at 4°C.

To measure mitochondrial membrane depolarization, one batch of cells was resuspended in 200 nM MitoTrackerRed CMXRos (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) diluted in DMEM and incubated at 37°C for 30 min. Cells were then washed with PBS, centrifuged and resuspended in 400 µl of PBS for flow cytometry analysis. The percentage of cells with depolarized mitochondria was then calculated.

To determine the DNA fragmentation, Sub-G1 DNA content was analyzed; the second batch of cells was resuspended and fixed overnight with 70% (v/v) cold ethanol. Fixed cells were washed 3 times with cold PBS before the addition of 1 mg/ml RNaseA DNase-free (Sigma) for 10 min and 10µg/ml propidium iodide (Sigma) for 30 min. The percentage of cells with Sub-G1 DNA was calculated.

For Terminal deoxy transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling (TUNEL) analysis, cells and supernatant were collected and washed twice with PBS. Cells were labeled with TUNEL Assay kit from Roche Diagnostics according to the instructions of the manufacturer.

Cells were analyzed on a FACScan EpicsR Altra flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). A minimum of 10 000 events was collected for each sample. The analyses performed on a gated cell population in order to discard cellular debris, were conducted using the expo-32 software (Beckman Coulter).

Results

Induction of apoptosis by UVB irradiation in HaCaT cells

We first tested the ability of HaCaT cells to undergo apoptosis following different dose of UVB (Figure 1A, left panel). Apoptosis was evaluated at different time periods of incubation following UVB irradiation (Figure 1A, right panel). We observed that Sub-G1 population increased in a dose and time dependent manner after UVB irradiation.

To ensure that Sub-G1 population was representative of apoptotic cells, we analyzed DNA fragmentation. HaCaT cells were irradiated with 10mJ/cm² and harvested at different time periods. Hoechst staining and TUNEL assays showed an increase nuclear condensation and DNA fragmentation in a time dependent manner (Figure 1B and 1C). Moreover, the percentage of cells with fragmented DNA observed by TUNEL assay was similar to the one observed in Sub-G1 phase (Figure 1C). As shown by immunoblotting in Figure 1D, procaspase 3 and PARP were cleaved following UVB irradiation. The cleaved fragment level increased in a time dependant manner.

E6/E7 did not modulate apoptosis of HaCaT cells following UVB exposure

To investigate the effect of E6 and E7 on UVB-induced apoptosis, HaCaT cells were transduced with pLXSN vector expressing E6 and E7 from the beta-HPVs 5, 8, 14, 24, 36, 38 and 49. HaCaT transduced with E6 and E7 from low-risk alpha-HPV 10 and high-risk alpha-HPV 16 were used as controls.

RT-PCR were conducted on RNA from HaCaT-transduced cells to confirmed transduction efficiency for E6/E7. E6/E7 proteins were expressed in HaCaT cells transduced for HPV 5, 8 and 16 (Figure 2A) and 14, 24, 36, 38, 49 and 10 (data not shown)

Transduced and control cells were then irradiated with 5, 10, 20, 40 or 80 mJ UVB/cm² and Sub-G1 content was analyzed 24 hours after irradiation. The results on Figure 2B show that induction of apoptosis was not modified in E6/E7-transduced cells when compared with control cells. Similar results were obtained at 6, 12 and 48 hours after UVB irradiation (data not shown).

We then performed mitochondrial membrane depolarization analyses. As shown in Figure 2C, whatever the dose of UVB or the oncoproteins tested, no difference was observed in mitochondrial membrane depolarization 24 hours after UV irradiation.

Treatment by PRIMA-1 did not alter UVB-induced apoptosis of E6/E7 transduced- HaCaT cells

HaCaT cells contain several genetic alterations that occur during the spontaneous immortalization of the cells. We hypothesized that the mutated form of p53 of HaCaT cells (Lehman *et al.*, 1993), may prevent E6 and E7 effects on UVB-induced apoptosis. To investigate the role of p53 status, we used PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) to restore the sequence specific DNA binding and induce a conformational change of mutant p53 leading to transactivation of p53 target genes and apoptosis (Bykov *et al.*, 2002; Bykov *et al.*, 2003; Charlot *et al.*, 2006).

First, we tested PRIMA-1 activity using the p53-mutated C33A cell line. C33A were treated with 125 μ M PRIMA-1 immediately after UVB-irradiation. As shown in figure 3A, PRIMA-1 increased mitochondrial membrane depolarization and DNA fragmentation of C33A cells following UVB irradiation, according to previous data obtained with staurosporine as apoptotic inducer (Charlot *et al.*, 2006).

In HaCaT cells expressing E6 and E7, PRIMA-1 did not induce any modulation of apoptosis following UVB irradiation. Neither mitochondrial membrane depolarization, nor DNA fragmentation were modified (Figure 3B and 3C).

Discussion

Previous studies have determined that E6 from several beta HPV types confers protection from UVB-induced apoptosis (Jackson *et al.*, 2000; Jackson and Storey, 2000; Leverrier *et al.*, 2007). In HT1080 cell line derived from fibrosarcoma, E6 from HPV 5, 10 and 77 inhibits cell death following UVB exposure (Jackson and Storey, 2000). The authors showed that inhibition of apoptosis by E6 was dependant of Bak degradation and independent of E6-AP (Jackson *et al.*, 2000). More recently, Underbrink *et al.* showed that E6 from HPVs 5, 8, 20, 22, 38, 76, 92, 96 are able to induce Bak degradation in human foreskin kératinocytes following UVB exposure (Underbrink *et al.*, 2008). On the basis of these data, it was suggested that beta-HPV infections would blunt the apoptotic response to UV irradiation and allow UV-damaged cells that may have accumulated genomic alterations to survive and form the seeds of a skin cancer (McLaughlin-Drubin and Munger).

Herein, we investigated the ability of several representatives HPV from the genus beta to inhibit UVB-induced apoptosis in HaCaT cells. We did not observe any modulation of apoptosis in E6 and E7 expressing HaCaT cells following UVB exposure (Figure 2B). Our results raise several hypotheses. First, we may discuss the efficacy of E6/E7 transduction. However, despite the fact that no antibodies are available to detect E6 and E7 protein, mRNA expression strongly suggest that transduction procedure was efficient (Figure 2A). Second, HaCaT cells bear a mutant form of p53 that has an extend half-life than wild-type p53 (Lehman *et al.*, 1993). This mutations in the p53-DNA binding domain of HaCaT cells has no effect on UVB-induced apoptosis (Henseleit *et al.*, 1997) but may interfere with E6 from HPV. Studies showing an inhibition of apoptosis *via* Bak degradation were performed on cells harboring a wild-type p53 (Jackson *et al.*, 2000; Jackson and Storey, 2000; Leverrier *et al.*, 2007; Underbrink *et al.*, 2008). Using the p53 null cell line Saos-2 derived from osteosarcoma, Jackson *et al.* also suggest that this inhibition of apoptosis was independent of p53 (Jackson and Storey, 2000). Recently, Fei *et al.* showed that wild type p53 is able to degrade E6 from HPV 20 and they failed to induce expression of HPV 20 E6 in human primary kératinocytes (Fei and de Villiers, 2008). Altogether these data suggest that a wild-type p53 may be an important target for E6 activity in infected cells.

Furthermore, it has also been showed that HPV 38 stabilized p53 in phosphorylated form which in turn activated the transcription of the N-terminal truncated form of p73 (Accardi *et al.*, 2006). Previous studies have showed that Δ Np73 has *in vitro* transforming activities (Petrenko *et al.*, 2003) and is upregulated in many human cancers (Zaika *et al.*, 2002). Interestingly, loss of p53 gene or p73 gene partially restored the apoptotic pathway following UVB irradiation (Dong *et al.*, 2008). As p53 seems to play a critical role in E6/E7 inhibition of UVB-induced apoptosis, we stimulated p53 activity in HaCaT cells using PRIMA-1. PRIMA-1 did not induce any modulation of apoptosis in cells expressing E6 and E7 when compared with control cells, suggesting that transcriptional activity of mutated-p53 in HaCat cells was sufficient to induce a full apoptotic response to UVB.

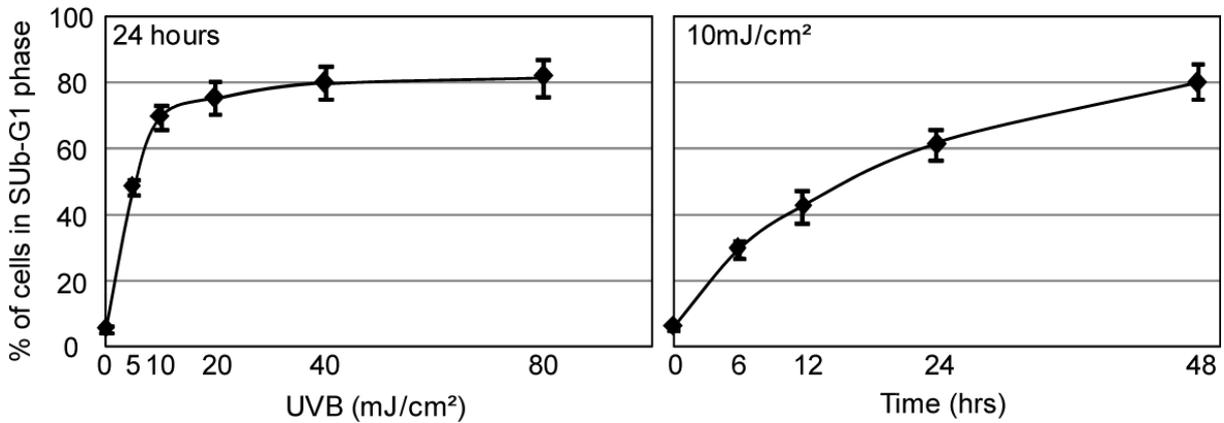
In contrast to previous studies (Jackson *et al.*, 2000; Jackson and Storey, 2000; Leverrier *et al.*, 2007; Struijk *et al.*, 2008; Underbrink *et al.*, 2008) which investigated only E6 involvement in UV-induced apoptosis, we used cells transduced with both E6 and E7 proteins. Severino *et al.* showed that HPV

16 E7 protein inhibited UVB-induced apoptosis through interaction with the pro-apoptotic protein Siva-1 (Severino *et al.*, 2007). In contrast, Lee *et al.* showed that apoptotic rate in UV-irradiated astrocytes was increased by E7 from HPV 16 (Lee *et al.*, 2002).

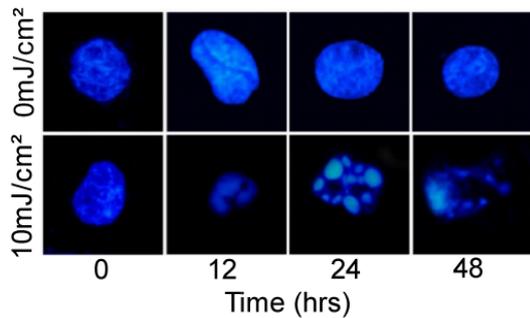
More recently E6 and E7 from HPV 8 and 20 have been showed to inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes (Struijk *et al.*, 2008). However, it was remarkable to notice that as in our study, E6 and E7 from HPV5, 24 and 38 did not inhibit UVB-induced apoptosis (Struijk *et al.*, 2008), despite the fact the ability of E6 from HPV5 to degrade Bak and to inhibit both DNA repair (Giampieri and Storey, 2004; Jackson *et al.*, 2000; Jackson and Storey, 2000). All these data suggest that the interaction of E6 and E7 may modulate their own biologic activity. It is possible that the effect of E6 on UVB-induced apoptosis may be counteracted by the expression of E7 protein. In addition, the ability to inhibit UVB-induced apoptosis is not shared by all beta HPV types. Further studies comparing the effects of differences in E6 and E7 expression on UVB-induced apoptosis are required to clarify the role of their interaction.

Figure 1

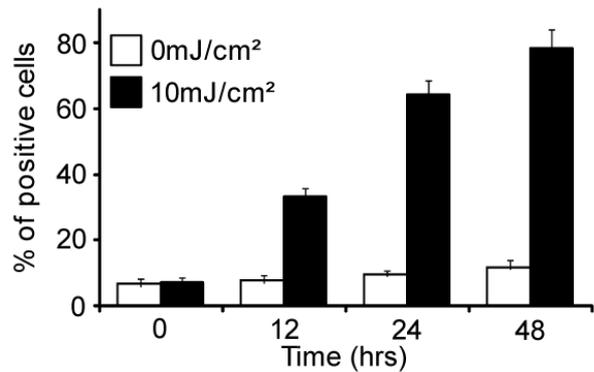
A



B



C



D

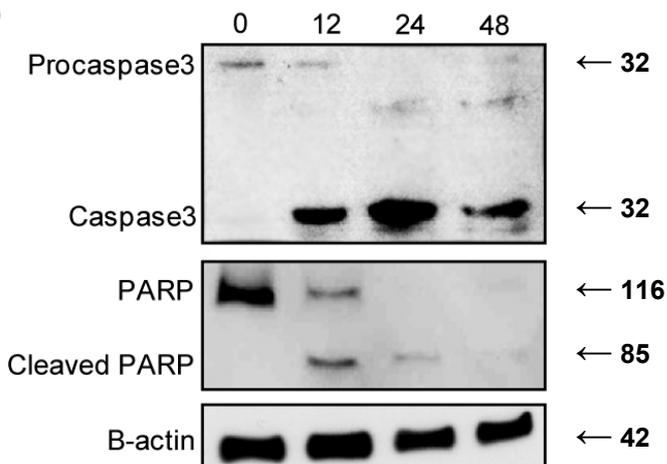
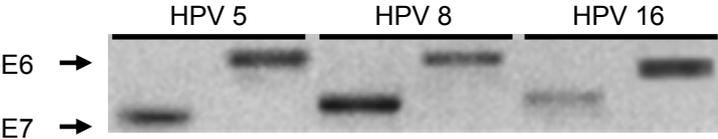


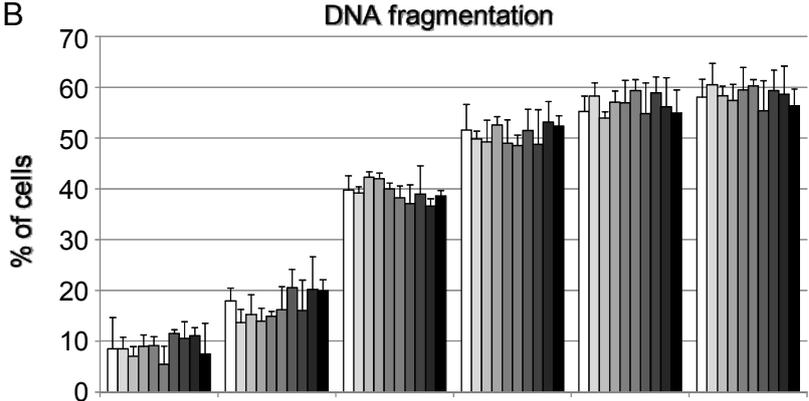
Figure 1: UVB induce apoptosis of HaCaT cells. **A:** HaCaT cells were irradiated with indicated dose of UVB and harvested 24 hours after irradiation (left), or irradiated with 10mJ/cm² and harvested at indicated time points. Cells were then stained by propidium iodide and analyzed by flow cytometry. **B, C and D:** HaCaT cells were irradiated with 10mJ/cm² and harvested at indicated time periods. **B:** cells were stained with Hoechst 3342 and observed by fluorescent microscopy. **C:** HaCaT cells were labeled by TUNEL technique (as described in Material and methods) and analyzed by flow cytometry. **D:** Total protein cell extracts were analyzed by immunoblotting for the presence of procaspase-3, and PARP and their cleaved fragments. Immunoblotting for β -actin was used as protein loading control. Numbers on the right indicate molecular weight in kDa. Each panel shows the results of at least 3 independent experiments.

Figure 2

A



B



C

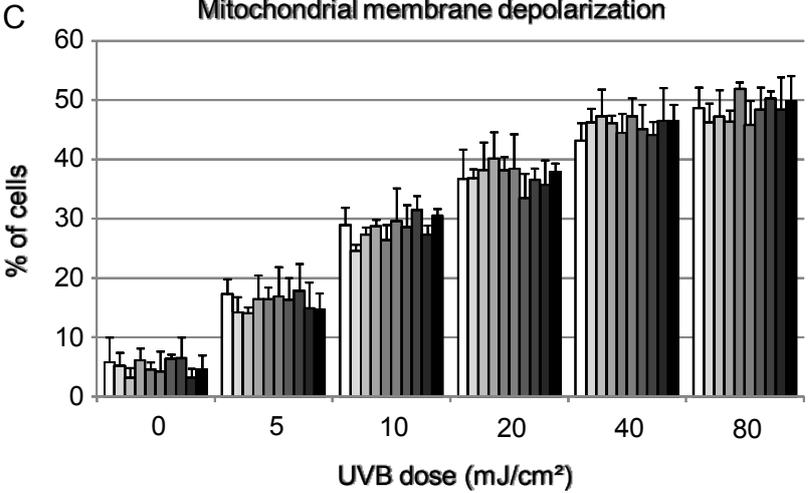


Figure 2: E6 and E7 do not modulate UVB-induced apoptosis of HaCaT cells. **A:** transduction efficiency was confirmed by RT-PCR analysis on total RNA extracted from HaCaT cells transduced with HPV 5, 8 and 16 E6/E7. **B** and **C:** HaCaT cells transduced by vector control or E6/E7 from different HPV were irradiated with the indicated doses of UVB (0 to 80mJ/cm²) and harvested 24 hours after irradiation. Then cells were resuspended in propidium iodide or MitoTrackerRed for analysis by flow cytometry to appreciate the percentage of cells with fragmented DNA (C) and with depolarized mitochondria (D). Errors bars represent the standard deviation of the mean (n=3).

Figure 3

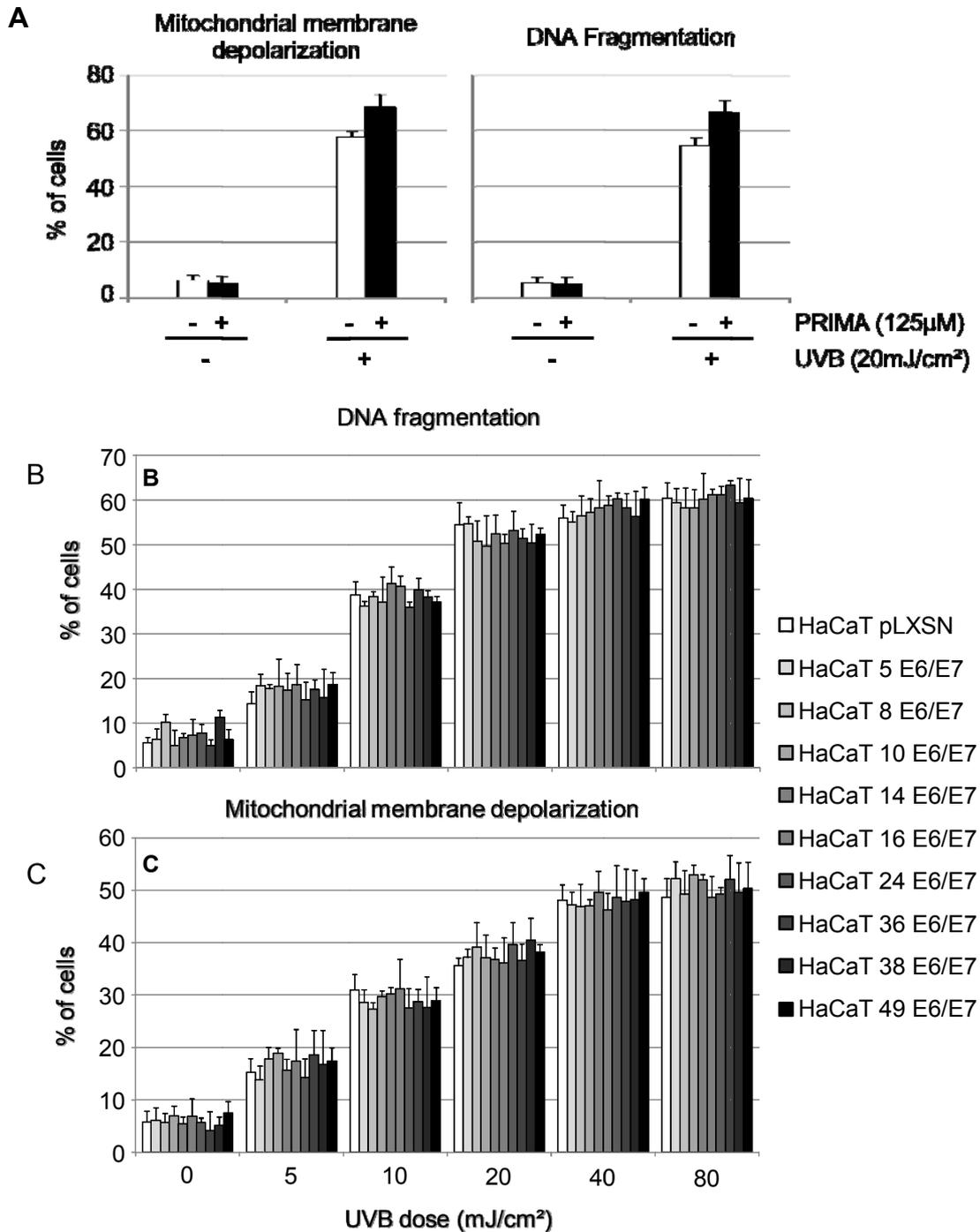


Figure 3: PRIMA-1 treatment failed to modulate UVB-induced apoptosis in E6/E7 HaCaT cells. **A:** PRIMA-1 efficiency was confirmed on the p53 mutated C33A cell line. C33A cells were treated (black columns) or (white columns) by 125 μ M PRIMA-1 and then irradiated or not by 20mJ/cm² UVB. Cells were resuspended in propidium iodide or MitoTrackerRed for analysis by flow cytometry to appreciate the percentage of cells with depolarized mitochondria (left panel) and with fragmented DNA (right panel). **B** and **C:** HaCaT cells transduced by vector control or E6/E7 from different HPV were irradiated with the indicated doses of UVB (0 to 80mJ/cm²) and treated with 125 μ M PRIMA-1. 24

hours after irradiation cells were resuspended in propidium iodide or MitoTrackerRed for analysis by flow cytometry to appreciate the percentage of cells with fragmented DNA (C) and with depolarized mitochondria (D). Errors bars represents the standard deviation of the mean (n=3).

References

- Accardi R, Dong W, Smet A, Cui R, Hautefeuille A, Gabet AS, *et al.* (2006) Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73. *EMBO Rep* 7:334-340.
- Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, Holmgren V, Simon M, Kataoka A, *et al.* (2003) Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 84:1881-1886.
- Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, Stern JE, Argenyi ZB, Raugi GJ, *et al.* (2008) Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 128:1409-1417.
- Astori G, Lavergne D, Benton C, Hockmayr B, Egawa K, Garbe C, *et al.* (1998) Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest Dermatol* 110:752-755.
- Berkhout RJ, Tieben LM, Smits HL, Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J (1995) Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 33:690-695.
- Bouwes Bavinck JN, Feltkamp M, Struijk L, ter Schegget J (2001) Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6:207-211.
- Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, *et al.* (1997) Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 108:712-715.
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, *et al.* (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10124-10128.
- Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, *et al.* (2002) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 8:282-288.
- Bykov VJ, Selivanova G, Wiman KG (2003) Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* 39:1828-1834.
- Caldeira S, Zehbe I, Accardi R, Malanchi I, Dong W, Giarre M, *et al.* (2003) The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol* 77:2195-2206.
- Charlot JF, Nicolier M, Pretet JL, Mouglin C (2006) Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 11:813-827.
- Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F (2005) Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol* 6:204.
- de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, Smits HL, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, van der Woude FJ, *et al.* (1995) High frequency of detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in biopsies from malignant and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Invest Dermatol* 105:367-371.
- de Koning MN, Struijk L, Bavinck JN, Kleter B, ter Schegget J, Quint WG, *et al.* (2007) Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J Gen Virol* 88:1489-1495.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.

- de Villiers EM, Lavergne D, McLaren K, Benton EC (1997) Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 73:356-361.
- Dong W, Arpin C, Accardi R, Gissmann L, Sylla BS, Marvel J, *et al.* (2008) Loss of p53 or p73 in human papillomavirus type 38 E6 and E7 transgenic mice partially restores the UV-activated cell cycle checkpoints. *Oncogene* 27:2923-2928.
- Fei JW, de Villiers EM (2008) Degradation of HPV20E6 by p53: Delta Np63 alpha and mutant p53R248W protect the wild type p53 mediated caspase-degradation. *Int J Cancer* 123:108-116.
- Forslund O, Iftner T, Andersson K, Lindelof B, Hradil E, Nordin P, *et al.* (2007) Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis* 196:876-883.
- Giampieri S, Storey A (2004) Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer* 90:2203-2209.
- Harwood CA, Proby CM (2002) Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 15:101-114.
- Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, Forslund O (2007) Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol* 127:116-119.
- Henseleit U, Zhang J, Wanner R, Haase I, Kolde G, Rosenbach T (1997) Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109:722-727.
- Humbey O, Cairey-Remonnay S, Guerrini JS, Algros MP, Mouglin C, Bittard H, *et al.* (2003) Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* 39:684-690.
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, *et al.* (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* 189:21-39.
- Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A (2000) Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 14:3065-3073.
- Jackson S, Storey A (2000) E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 19:592-598.
- Lee WT, Lee SH, Carriedo SG, Giffard RG, Yoon YJ, Kim JH, *et al.* (2002) UV-vulnerability of human papilloma virus type-16 E7-expressing astrocytes is associated with mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation. *Mol Cells* 14:288-294.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, *et al.* (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14:833-839.
- Leverrier S, Bergamaschi D, Ghali L, Ola A, Warnes G, Akgul B, *et al.* (2007) Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. *Apoptosis* 12:549-560.
- Lutzner MA, Blanchet-Bardon C, Orth G (1984) Clinical observations, virologic studies, and treatment trials in patients with epidermodysplasia verruciformis, a disease induced by specific human papillomaviruses. *J Invest Dermatol* 83:18s-25s.
- McLaughlin-Drubin M, Munger K The Human Papillomavirus Type 8 E2 Gene Encodes a Transforming Activity Sufficient for Skin Tumor Formation in Transgenic Mice. *J Invest Dermatol* 128:2142-2144.

- Orth G (2005) Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis in non-melanoma skin cancers: guilty or innocent? *J Invest Dermatol* 125:xii-xiii.
- Patel AS, Karagas MR, Perry AE, Nelson HH (2008) Exposure Profiles and Human Papillomavirus Infection in Skin Cancer: An Analysis of 25 Genus beta-Types in a Population-Based Study. *J Invest Dermatol*.
- Petrenko O, Zaika A, Moll UM (2003) deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol Cell Biol* 23:5540-5555.
- Pfister H (1992) Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin Cancer Biol* 3:263-271.
- Runger TM (2007) How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: the role of cellular damage responses. *J Invest Dermatol* 127:2103-2105.
- Severino A, Abbruzzese C, Manente L, Valderas AA, Mattarocci S, Federico A, et al. (2007) Human papillomavirus-16 E7 interacts with Siva-1 and modulates apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. *J Cell Physiol* 212:118-125.
- Struijk L, van der Meijden E, Kazem S, ter Schegget J, de Gruijl FR, Steenbergen RD, et al. (2008) Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes. *J Gen Virol* 89:2303-2314.
- Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA (2008) The E6 proteins from multiple beta HPV types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*.
- Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, et al. (2002) DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* 196:765-780.
- zur Hausen H (1999) Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 111:581-587.
- zur Hausen H (2000) Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92:690-698.
- zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350.

Publication n°2

Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas

O. Humbey, S. Cairey-Remonnay, J.S. Guerrini, M.P. Algros, C. Mougin, H. Bittard, F. Aubin

Eur J Cancer, 2003 (39):684 .690

Ce travail a été présenté sous forme de communication orale à :

- 20th World Congress of Dermatology, Paris, France; 30 juin-5 juillet 2002; "Distribution of TP53 codon 72 polymorphism in penile squamous cell carcinoma". Humbey O, Algros MP, Cairey-Remonnay S, Carbillet JP, Mougin C, Bittard H, Aubin F.

Ce travail a été présenté sous forme de poster à :

- 19th International Papillomavirus Conference, Florianopolis, Brésil; 1-7 Septembre 2001; "Distribution of TP53 codon 72 polymorphism in penile squamous cell carcinoma". Humbey O, Mougin C, Algros MP, Carbillet JP, Aubin F.

Introduction à la publication n°2 :

Le polymorphisme du gène TP53 a été proposé comme facteur de risque pour le développement de lésions du col de l'utérus associées à HPV par Storey et al. (Storey *et al.*, 1998).

Une étude réalisée dans notre laboratoire n'a pas permis de confirmer cette association et nous a conduits à nous intéresser à un autre modèle de cancer associé à HPV, le cancer pénien. Nous avons ainsi réalisé les mêmes types d'analyses que précédemment, à partir de 45 biopsies de carcinomes péniens fixées et incluses en paraffine comparées à 22 biopsies de lésions épithéliales bénignes de type phimosis ou balanite.

L'utilisation additionnelle du couple d'amorce consensus FAP59/FAP64, permettant de détecter de nombreux HPV bêta (Forsslund *et al.*, 1999), a permis de révéler une forte prévalence d'HPV au sein des lésions analysées. Ainsi, malgré quelques difficultés résultant de la qualité de l'ADN analysé, 67 % des carcinomes péniens ont été retrouvés infectés par HPV contre 32 % dans le cas des lésions bénignes. Parmi ces HPV, les HPV alpha ont été retrouvés dans 36 % des cancers contre 32 % dans les lésions bénignes, alors que les HPV cutanés ont été détectés dans 31 % des cancers et 0 % des lésions témoins. Le génotypage des HPV alpha a révélé la présence de l'HPV alpha haut risque de type 16 dans 69 % des tumeurs infectées, alors que l'HPV haut risque cutané de type 5 a été retrouvé dans 18 % des tumeurs positives en HPV cutané. Tous les HPV détectés dans les lésions bénignes témoins ont été génotypés en tant que bas risque de type 6 et 11.

L'analyse des génotypes de TP53 a, quant à elle, permis de montrer une distribution des génotypes homozygotes Arg/Arg et hétérozygotes Arg/Pro significativement non différente entre les patients présentant un carcinome pénien et ceux développant une lésion bénigne (61 % et 39 % contre 68 % et 32 % respectivement). De façon intéressante, l'analyse du génotype de TP53 réalisée à partir de prélèvements sanguins de 6 patients issus du groupe développant un cancer, a permis d'écarter l'existence d'une perte d'hétérozygotie, fréquemment retrouvée dans les tumeurs.

Au cours de ce travail, nous avons donc pu confirmer l'importance des HPV alpha haut risque, et de façon plus inattendue celle des HPV bêta, dans la carcinogenèse du pénis, acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique. En revanche, nous démontrons une absence de corrélation entre un génotype particulier de TP53 et le risque de développer un cancer pénien associé à HPV.

Dans ce travail, ma contribution a consisté à apporter une aide à olivier Humbey. J'ai participé à l'ensemble des travaux expérimentaux.



Detection of the human papillomavirus and analysis of the *TP53* polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas

O. Humbey^a, S. Cairey-Remonnay^{a,b}, J.S. Guérrini^a, M.P. Algros^c, C. Mougin^a,
H. Bittard^d, F. Aubin^{a,b,*}

^aDepartment of Cell Biology-EA 3181-Institut d'Etude et de Transfert de Gènes, University Hospital, 25030 Besançon Cedex, France

^bDepartment of Dermatology, University Hospital, 25030 Besançon Cedex, France

^cDepartment of Pathology, University Hospital, 25030 Besançon Cedex, France

^dDepartment of Urology, University Hospital, 25030 Besançon Cedex, France

Received 10 April 2002; received in revised form 14 October 2002; accepted 4 December 2002

Abstract

Human papillomaviruses (HPV) are thought to be involved in penile squamous cell carcinomas (SCC). A common polymorphism at codon 72 of exon 4 encoding either arginine (Arg) or proline (Pro) has been shown to affect HPV-mediated degradation of p53 *in vitro*, and may represent a risk factor for HPV-induced carcinogenesis. The presence of HPV DNA as well as the *TP53* polymorphism at codon 72 of exon 4 were investigated in a series of 45 penile SCC. HPV detection and typing were carried out by polymerase chain reaction (PCR) with generic primers (MY09-MY11 and FAP59-FAP64), and type-specific DNA probes. *TP53* polymorphism was further investigated using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). HPV DNA was detected in 67% of penile SCC and 32% of benign lesions (BL) ($P < 0.05$). Among the *TP53* amplified samples, the rate of Arg homozygosity in penile SCC was 61% compared with 68% in BL (non-significant (NS)). Our results demonstrate a strong association between penile SCC and the presence of HPV DNA. The *TP53* Arg/Arg genotype does not appear to represent a risk factor for the development of genital SCC in men, and no correlation was found between the *TP53* polymorphism at codon 72 and the presence of HPV DNA. © 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Penile squamous cell carcinoma; Human papillomavirus; *TP53* polymorphism

1. Introduction

An increasing number of epidemiological studies demonstrate that human papillomaviruses (HPV) represent an important aetiological factor in a large proportion of human cancers. A particular association of HPV with the development of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix has been established. Graham and colleagues [1] had even demonstrated that the wives of men with penile carcinomas were more prone to cervical neoplasia and *vice-versa*. It is generally accepted that oncogenic HPV types are the sexually transmitted agents common to both neoplasia.

Unfortunately, very few studies have investigated penile squamous cell carcinomas (SCC) because of its rare occurrence. In contrast to European and North American countries (1/100 000), South America, Africa and Asia exhibit a high incidence of penile carcinoma (10–20/100 000), which also occur in communities with high rates of cervical neoplasia [2]. The frequencies of HPV DNA in carcinomas of the penis varies from 10% [3] to 100% [4] depending on the viral detection method used and on the ethnic origin of the population analysed. Moreover, recent data have supported a role for HPV in the pathogenesis of penile SCC [5–8]. The carcinogenic effect of HPV may be explained, in part, by the transforming viral protein E6 which binds to and induces the degradation of p53 through the ubiquitin pathway [9]. It has been proposed that the existence of a common polymorphism of the tumour suppressor gene,

* Corresponding author. Tel.: +33-3-8121-8102; fax: +33-3-8121-8163.

E-mail address: francois.aubin@ufc-chu.univ-fcomte.fr (F. Aubin).

TP53, that results in either a Proline (Pro) or an Arginine (Arg) could play a critical role in the development of mucous and cutaneous SCC [10]. Indeed, the 72 Arg form of the p53 protein appears to be particularly susceptible to HPV16, HPV18 and HPV11-E6 associated degradation *in vitro*, and could facilitate the oncogenic effect of HPV infection [10]. However, these results and the importance of the *TP53* polymorphism in HPV-associated SCC are still a matter of controversy [11–13]. The aim of the present study was to evaluate the prevalence of HPV in SCC of the penis and its correlation with the *TP53* polymorphism at codon 72.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Fifty-four samples from adult patients with penile SCC, living in Eastern France, undergoing surgical resection from 1978 to 2000, were identified from our tumour registry database [14]. A subset of 45 biopsy specimens, fixed with formalin or Bouin and paraffin-embedded was finally processed for the study. Haematoxylin-eosin-stained slides were reviewed and were all confirmed as SCC. Twenty-two paraffin-embedded tissues from 22 adult patients with penile benign lesions (BL) (phimosis or Balanitis) were selected as controls.

2.2. DNA isolation

Microdissection was used to separate the tumoral cells from the normal surrounding tissues. For this study, 5–10 serial 5- μ m paraffin-embedded sections were transferred to microfuge tubes. Paraffin was removed with 1 ml xylene (2 \times 10 min) and sections were rehydrated with 1 ml ethanol 99% (2 \times 1 min). Between each wash, tubes were centrifuged for 5 min at 1900g to avoid loss of material. The sections were processed for cell lysis and proteolytic digestion, overnight at 60 °C with 0.1 mg proteinase K diluted in 200 μ l buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂ and 0.45% (v/v) Tween 20. The lysate was extracted twice with phenol, and with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (1:1, v/v). DNA was finally precipitated with one-tenth volume of 8 M sodium acetate and 2.5 volumes of absolute ethanol using an incubation at –20 °C for 1 h. The precipitated DNA was centrifuged, and the dried pellet was resuspended in 50 μ l of water.

2.3. HPV genotyping

The DNA quality was tested by amplification of a 268-bp fragment of the β -globin gene using GH20/PCO4 primers [15]. Negative samples for the β -globin

fragment were considered inadequate and excluded from the study. The presence of HPV DNA was carried out using two different sets of L1 open reading frame consensus primers. MY09/MY11 primers allowed the detection of a broad spectrum of mucosal HPV by production of a 450-bp amplicon [16]. The PCR products were then typed using the Hybridowell kit[®], as we previously described in Ref. [17]. To genotype the most common HPV, the amplicons were hybridised with internal 5' biotinylated probes for low-risk HPV6, 11, or for high-risk HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 and 68. The FAP59/FAP64 primers described by Forslund and colleagues in Ref. [18] by generating amplicons of 480-bp allowed the detection of a broad range of cutaneous HPV, including epidermodysplasia verruciformis (EV) associated HPV types, but also mucosal HPV types. Four specific primer sets MY5 1/2, MY5 3/4, MY8 and MY8 3/4 were also used to genotype HPV5 and 8, respectively, as described by Meyer and colleagues in Ref. [19]. DNA from CaSki cells harbouring HPV16 (ATCC CRL 1550, American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA) was used as a positive control, while DNA from negative HPV C33A cells served as a negative control (ATCC HTB31, Rockville, MB, USA). A negative template control (water instead of DNA) was also used as a contamination control.

2.4. PCR of *TP53* exon 4 and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

For DGGE analysis, *TP53* exon 4 was amplified with consensus 40nGC-clamped primers *TP53* 4.1F-R that allowed the production of 203-bp fragment [20]. The primer sequences were as follows; *TP53*.4.1F: 5'-[40GC]CCTGGTCCTCTGACTGCTCT-3' *TP53*.4.1R: 5'-GTGTAGGAGCTGCTGGTGCA-3'. The amplification was carried out in a 100- μ l volume containing 1 \times polymerase chain reaction (PCR) buffer (Perkin), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphates (dNTP), 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Ampli *Taq* Perkin-Elmer), 25 pmol of each primer and 1 μ g of template DNA. After DNA denaturation, 35 cycles consisting of 30 s at 94 °C, 15 s at 60 °C, 20 s at 72 °C were performed, followed by a 7-min final extension at 72 °C. The PCR products were then analysed by DGGE in the following conditions. A 16 \times 18 cm, 1 mm thick, 8% acrylamide/Bis (37.5:1) gel with a parallel denaturing gradient range of 35–75% in 1 \times TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)) was used. The gradient gel was cast using Bio-Rad's Model 475 Gradient Delivery System. Forty microlitres of PCR products were mixed with 5 μ l of 2 \times gel loading and electrophoresed on the Dcode system. The gel was then stained with ethidium bromide in 1 \times TAE buffer for 5 min and visualised under ultraviolet (UV) transillumination.

2.5. Sequencing analysis

In order to confirm the results obtained by DGGE, bands were cut out from the gel and put in water in order to allow DNA elution. Then, 2 µl of product were amplified with identical primers to those used in the prior PCR under the same conditions. Finally, the amplicons were subjected to cycle sequencing with the forward primer TP53 4.1F without the 40nGC-clamped using the CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing kit[®] (Beckman Coulter) following the cycling conditions: 20 sec at 96 °C, 20 s at 50 °C and 4 min at 60 °C for 30 cycles followed by a hold at 4 °C. Our test was validated on CaSki cells (Arg/Pro) and C33A cells (Arg/Arg).

2.6. TP53 codon 72 loss Of heterozygosity (LOH)

To test the risk of LOH in our tumour samples, we collected paraffin-embedded tissues from non-tumorous areas in our patient group. Allele-specific PCR for the codon 72 polymorphism was then carried out using two sets of primer. TP53 codon 72 Proline sequences were detected using the primer pair TP53 Pro+/p53– (p53 Pro+: 5'GCCAGAGGCTGCTCCCC3', TP53–: 5'CGTGCAAGTCACAGACTT3') and p53 codon 72 Arginine using the primer pair TP53+/Arg– (p53+: 5'TCCCCCTTGCCGTCCCAA3', Arg–: 5'CTGGTGCAGGGGCCACGC3') as previously described in Ref. [10]. The results were then compared with the genotype in the tumour samples obtained from the same patient.

2.7. Statistical analysis

Pearson Chi-square test with Yates' correction when necessary was carried out using Systat* software to test of polymorphic differences according to the virological results. Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. HPV detection

Forty-five fixed and paraffin-embedded tissues from adult patients with penile SCC were examined, and

compared with 22 paraffin-embedded tissues from patients presenting BL of the penis. Mucosal and cutaneous HPV DNA were detected by PCR using the MY09/MY11 (Fig. 1) and FAP59/FAP64 primers, respectively. The overall prevalence of HPV is shown in Table 1. We were able to amplify the β -globin gene in 36 out of 45 SCC (80%) and in 22 of 22 controls (100%) fixed tissues submitted to PCR. Lack of β -globin DNA detection in the nine SCC samples probably resulted from DNA disintegration likely linked to the Bouin fixation procedure, rather than a failure of the PCR (as a positive PCR control was always obtained). Of samples found to be adequate, HPV DNA was detected in 24 of 36 penile SCC samples (67%) and in seven of 22 penile BL (32%, $P < 0.05$). Mucosal HPV were found in 13 of 36 SCC (36%) and in seven of 22 penile BL (32%), while cutaneous HPV were detected in SCC in 31%. Among the mucosal HPV detected in the penile carcinomas, HPV16 was found in 9/13 samples (69%), while among the cutaneous HPV tested, HPV5 was found in 2/11 samples (18%). All mucosal HPV detected in our control samples corresponded to low-risk types HPV6 and/or 11. Four mucosal HPV and nine cutaneous HPV detected in penile SCC remained undetermined, possibly due to the limited number of HPV type probes.

3.2. Genotypic distribution of TP53 gene

TP53 genotype at codon 72 of exon 4 was investigated by DGGE after a PCR amplification using the TP53 4.1 primers [20]. Single bands corresponded to homozygous TP53 codon 72 genotypes either Arg/Arg or Pro/Pro, whereas four bands were observed for the heterozygous genotype. After sequencing analysis of the single bands, we confirmed that the upper band corresponded to a

Table 1
HPV distribution in penile squamous cell carcinoma

	Total HPV (%)	HR mucosal HPV (%)	LR mucosal HPV (%)	UT mucosal HPV (%)	Cutaneous HPV (%)
SCC (n=36)	24 (67)	9 (25)	0	4 (11)	11 (31)
BL (n=22)	7 (32)	0	7 (32)	0	0

SCC, squamous cell carcinoma; BL, benign lesion; HR, high-risk; LR, low-risk; UT, untyped.

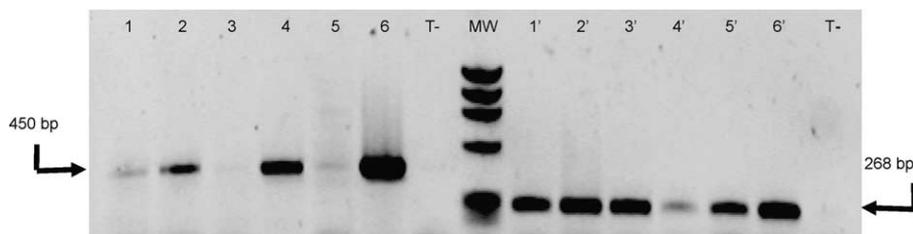


Fig. 1. Electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products from different penile squamous cell carcinomas using MY09-MY11 and GH20-PCO4 consensus primers: lanes 1–5: HPV DNA samples; lane 6: HPV DNA-positive control (CaSki cells) (MW, molecular weight (ϕ 174); lanes 1'–5': β -globin sequence samples; lane 6': β -globin DNA positive control (CaSki cells); lane T–: contamination controls (water).

Pro genotype and the lower one to an Arg genotype (data not shown). CaSki and C33A cell lines were used as Arg/Pro heterozygous and Arg/Arg homozygous controls, respectively. Representative results are shown in Fig. 2. We were able to analyse 31 SCC out of 36 that were PCR-positive for β -globin and 22 of 22 controls. The proportion of *TP53* codon 72 genotypes found were 61% Arg homozygous, 0% Pro homozygous and 39% Arg/Pro heterozygous in patients with penile SCC, compared with 68% Arg homozygous, 0% Pro homozygous and 32% Arg/Pro heterozygous in patients with penile BL (Table 2). Statistical analysis showed no difference between the genotypic distribution of subjects presenting penile SCC compared with controls (non significant ((NS)). In addition, we analysed the LOH in our patients: blood samples (leucocyte DNA) from 2 patients with penile SC and in normal tissue surrounding the penile SCC from 15 patients. Altogether LOH was studied in only 6 patients of the 45 patients with penile SCC because most of them were dead while the remaining tissue samples were too small or of too poor a quality (lack of β -globulin detection or insufficient peritumoral tissue). In all cases, the *TP53* genotype was similar both in penile SCC and in blood or matched normal tissue confirming the absence of LOH.

3.3. Correlation between the presence of HPV and the *TP53* codon 72 Arg polymorphism

The distribution of codon 72 *TP53* genotype with respect to HPV status demonstrated a similar prevalence

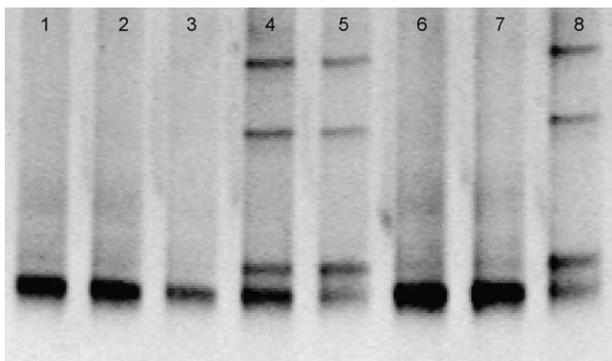


Fig. 2. Analysis of *TP53* polymorphism by parallel denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): lanes 1, 2, 3, 6: Arg/Arg homozygous samples; lanes 4, 5: Arg/Pro heterozygous samples; lane 7: Arg/Arg homozygous control (DNA from C33A cells); lane 8: Arg/Pro heterozygous control (DNA from CaSki cells).

Table 2
TP53 genotype distribution in penile squamous cell carcinoma

	Arg/Arg (%)	Pro/Pro (%)	Arg/Pro (%)
SCC ($n=31$)	19 (61)	0	12 (39)
BL ($n=22$)	15 (68)	0	7 (32)

SCC, squamous cell carcinoma; BL, benign lesion.

of Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro in HPV negative samples and in the HPV-infected patients. The statistical analysis did not indicate any significant association between HPV status and *TP53* polymorphism (NS).

4. Discussion

Genital SCC in men are thought to be the male counterpart of cervical carcinomas and similar risk factors have been demonstrated including smoking habits, the number of sexual partners, history of condyloma, and the presence of HPV DNA [21]. Our report represents the first study investigating the presence of HPV DNA correlated to the *TP53* polymorphism status at codon 72 of exon 4 in a large series of penile SCC. A reference population of 13 samples of benign lesions of the penis (Balanitis or phimosis) was used as controls. HPV DNA detection was investigated by PCR using two sets of consensus primers, MY09/MY11 and FAP59/FAP64 allowing the detection of a broad spectrum of mucosal and cutaneous HPV. Despite the preservation problems related to the tissue source (fixed and paraffin-embedded biopsies), we could detect a high rate of viral DNA in our penile SCC population (67%) with a statistical significant difference ($P < 0.05$) from those found in our control group (32%). Among these samples with HPV, mucosal HPV were predominant compared with cutaneous ones in penile SCC (54% versus 46%, NS) as in the penile BL (100% versus 0%). Among the mucosal HPV, high-risk HPV16 was the most prevalent in the genital SCC, while BL exhibited no high risk mucosal or cutaneous HPV. However, we can suppose that the HPV DNA detection in our samples is underestimated. Indeed, beside the geographical origin, the frequencies of HPV DNA in carcinoma of the penis vary depending on the sample processing and the method used for viral detection. The prevalence of HPV DNA can range from 10% [3] to 100% [4]. Levi and colleagues [6] have recently shown the difficulties encountered when evaluating the presence of HPV DNA in a series of 84 paraffin-embedded penile carcinoma. Twenty samples (18 Bouin- and two formalin-fixed tissues) out of 84 (24%) were found to be inadequate. HPV DNA was found in 28% of the remaining samples compared with 56% in 50 frozen samples tested. It is well recognised that the DNA quality from paraffin-embedded tissue is lower than DNA from fresh tissues. In our study, we could amplify β -globin gene sequence by PCR using the PC04/GH20 primers in 36 samples from the 45 collected (80%). In a more recent study carried out on 34 primary penile SCC, Picconi and colleagues [5] found 24 samples (71%) were positive for HPV DNA. All tissues were formaldehyde-fixed and paraffin-embedded and all DNA were amplifiable as shown by β -globin gene amplification.

Among the HPV detected, the high prevalence of mucosal high-risk HPV in our series agree with most reports [5,6,8,22–25]. As observed by previous authors [6,25,26], we found predominance (69%) of HPV16, but no HPV18. In contrast, previous results from Brazil [7] and from Argentina [5] indicated a high prevalence of HPV18. The differences observed between the studies could be attributed to the geographical distribution of HPV or to the lack of a representative sample. However, our study involves all penile SCC collected by the Cancer Registry of Doubs during the 1978–2000 time period in a well-defined administrative area (population 485 000) located in Eastern France [14]. The Cancer Registry of Doubs was established in 1976 and has received international recognition as demonstrated by its inclusion in the International Agency for Research on Cancer series entitled Cancer Incidence in Five Continents. In the ‘département’ of Doubs, cancer registration is virtually complete, and therefore technical deficiencies did not bias our results. We think that our SSC population is a representative sample of a homogenous more general population.

Among the 7 patients of our control group, 100% were infected by low-risk HPV6 and/or 11. Although there is evidence to suggest a lack of carcinogenicity of HPV6 and 11 [27], these types have previously been reported in preneoplastic and neoplastic penile lesions [4,5,7,8,28]. On the other hand, it has been pointed out that up to 10% of the penile cancer lesions have developed in association with benign lesions, that frequently contain HPV6 or 11 [2].

No previous study has investigated the presence of cutaneous HPV in penile carcinoma. We detected 31% of cutaneous HPV in penile SCC versus 0% in our control series using the FAP59–FAP64 primers as recently described by Forslund and colleagues in Ref. [18]. Such a method allows the detection of a large HPV spectrum, including epidermodysplasia verruciformis-related HPV, other HPV types (3, 10, 25, 27, 28, 29, 77, ...), which are phylogenetically grouped with the mucosal HPV types, and also low-risk (6, 11, 42) or high-risk (16, 18, 31, 52, 58, 68) mucosal HPV types [29]. Specific HPV5 and HPV8 primers [19] were used to genotype cutaneous HPV, allowing us to detect two of 11 (18%) HPV5, while no HPV8 was found. But the involvement of specific HPV types in promoting penile carcinogenesis cannot be ruled out, since amplicons generated by that PCR have not been sequenced in our study. Nevertheless, our results indicate a potential role of HPV detected by FAP59–FAP64 primers in the development of penile carcinomas.

Beside the viral type, other risk factors should be considered, like the immunological status, exposure to chemical or physical carcinogens and, genetic background. In a previous study on the same SCC population [14], we showed that over the 22-year period

studied, only one male among 48 with genital SCC had been treated with high doses of psoralen plus UVA radiation. This is why we decided to study the genetic susceptibility linked to the *TP53* polymorphism, since it has been suggested that polymorphism at codon 72 of the *TP53* tumour suppressor gene might be a risk factor in the development of HPV-associated cancers [10]. Indeed, a common polymorphism of the tumour suppressor gene *TP53* that results in either a proline (Pro) or arginine (Arg) at residue 72 of exon 4 has been described [30]. The 72 Arg form of the p53 protein appears to be particularly susceptible to HPV16, HPV18, and HPV11 E6-associated degradation *in vitro* [10], and could facilitate the oncogenic effect of HPV infection. However, this finding was not confirmed by recent reports and the importance of *TP53* polymorphism in HPV-associated tumours is still a matter of controversy [11–13,31]. To our knowledge, the relationship between the *TP53* status at codon 72 and the presence of HPV in SCC of the penis has never been studied. In our study, the proportion of *TP53* codon 72 genotypes found were 61% Arg homozygous, 0% Pro homozygous, and 39% Arg/Pro heterozygous in the penile SCC, compared with 68% Arg homozygous, 0% Pro homozygous, and 32% Arg/Pro heterozygous in the penile BL. Thus, our results indicate that the *TP53* polymorphism does not seem to be associated with the development of penile SCC.

It may be argued that our results merely reflect the distribution of the *TP53* genotype of a specific geographical area, since it has been proven that *TP53* polymorphism varies according to the geographical origin, and the prevalence of *TP53* Pro allele is closely related with latitude and increases when approaching the Equator [32]. However, in two previous studies [33,34] conducted in the same geographical area, but in different groups of patients, we observed a different distribution of the *TP53* genotype using a similar DGGE analysis of exon 4 of *TP53*. Indeed, while frequencies of codon 72 *TP53* polymorphism on DNA obtained from 138 cervical smears were not significantly different between women with normal smears and women with dyskaryosis smears [33], we demonstrated that the rate of Arg homozygosity in SCC from renal transplant recipients was significantly higher than in immunocompetent patients with or without SCC [34]. The discrepancies between these studies emphasize the significance of our data and the bias of genetic variation and molecular analysis of *TP53* polymorphism could be considered as negligible. In addition, LOH may interfere with our results. Indeed, LOH is frequently observed in skin cancers on chromosome 17p, where *TP53* is located [35]. Although Storey and colleagues [10] demonstrated that LOH was not an important mechanism for overrepresentation of the *TP53* Arg genotype in cervical HPV-related cancer, our study can

not eliminate such a bias. However, we analysed LOH in 6 out of the 45 patients with penile SCC, and in all of these cases the *TP53* genotype was similar in both penile SCC and in blood or matched normal tissue, confirming the absence of LOH. Furthermore, we recently found a similar genotype after testing for *TP53* polymorphism on DNA from nine tumour specimens from renal transplant recipients compared with leucocyte DNA in the same patients [34]. The analysis of LOH was not critical in our study since we did not observe any overrepresentation of *TP53* Arg/Arg genotype. The analysis of LOH would have been critical if an overrepresentation of the *TP53* Arg/Arg genotype had been found. In addition, it has been recently demonstrated that LOH occurred more frequently in *TP53* Arg/Pro than in Arg/Arg skin tumours obtained from renal transplant recipients [36].

In summary, our results demonstrate a strong association between penile SCC and the presence of HPV DNA. However, the *TP53* Arg/Arg genotype does not appear to represent a risk factor for the development of genital SCC in men, and no correlation was found between the *TP53* polymorphism at codon 72 and the presence of HPV DNA.

Acknowledgements

O. Humbey acknowledges the supports from the Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et Technologique (ARERS), and the Ligue Nationale contre le Cancer (Comités du Doubs et de la Haute Saône).

References

- Graham S, Priore R, Graham M, Browne R, Burnett W, West D. Genital cancer in wives of penile cancer patients. *Cancer* 1979, **44**, 1870–1874.
- Malek RS, Goellner JR, Smith TF, Espy MJ, Cupp MR. Human papillomavirus infection and intraepithelial, in situ, and invasive carcinoma of penis. *Urology* 1993, **42**, 159–170.
- Chan KW, Lam KY, Chan AC, Lau P, Srivastava G. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in penile carcinoma: a study of 41 cases using PCR. *J Clin Pathol* 1994, **47**, 823–826.
- Tornesello ML, Buonaguro FM, Beth-Giraldo E, Kyalwazi SK, Giraldo G. Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas and in two cell lines from high-incidence areas for genital cancers in Africa. *Int J Cancer* 1992, **51**, 587–592.
- Picconi MA, Eijan AM, Distefano AL, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: analysis of primary tumors and lymph nodes. *J Med Virol* 2000, **61**, 65–69.
- Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, Villa L. Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. *Int J Cancer* 1998, **76**, 779–783.
- Villa LL, Lopes A. Human papillomavirus DNA sequences in penile carcinomas in Brazil. *Int J Cancer* 1986, **37**, 853–855.
- Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, Haas GP, Lancaster WD. Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995, **87**, 1705–1709.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990, **63**, 1129–1136.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998, **393**, 229–234.
- O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Atkins GJ, Murphy GM, Mabruk MJ. p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J Clin Pathol* 2001, **54**, 539–542.
- Bastiaens MT, Struyk L, Tjong-A-Hung SP, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma and p53 codon 72 polymorphism: a need for screening? *Mol Carcinog* 2001, **30**, 56–61.
- Dokianakis DN, Koumantaki E, Billiri K, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Int J Mol Med* 2000, **5**, 405–409.
- Aubin F, Puzenat E, Arveux P, Louvat P, Quencez E, Humbert P. Genital squamous cell carcinoma in men treated by photochemotherapy. A cancer registry-based study from 1978 to 1998. *Br J Dermatol* 2001, **144**, 1204–1206.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986, **324**, 163–166.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989, **7**, 209–214.
- Riethmuller D, Gay C, Bertrand X, et al. Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1999, **8**, 157–164.
- Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 1999, **80**, 2437–2443.
- Meyer T, Arndt R, Christophers E, Stockfleth E. Frequency and spectrum of HPV types detected in cutaneous squamous-cell carcinomas depend on the HPV detection system: a comparison of four PCR assays. *Dermatology* 2000, **201**, 204–211.
- Hayes VM, Hofstra RM, Buys CH, Hollema H, van der Zee AG. Homozygous arginine-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. *Lancet* 1998, **352**, 1756.
- Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000, **205**, 189–193.
- Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. *J Urol* 1992, **47**, 389–392.
- Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993, **85**, 19–24.
- Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, Yu L, Liu ET, Walther PJ. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a retrospective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1992, **50**, 694–701.
- Suzuki H, Sato N, Kodama T, et al. Detection of human papillomavirus DNA and state of p53 gene in Japanese penile cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1994, **24**, 1–6.
- Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer* 2001, **91**, 2315–2321.

27. IARC. *Human Papillomaviruses. IARC edition, Vol. 64*. Lyon, IARC, 1995.
28. Barraso R, Jablonska S. Clinical, colposcopic and histologic spectrum of male human papillomavirus-associated genital lesions. *Clin Pract Gynecol* 1989, **2**, 73–102.
29. de Villiers EM. Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother* 1998, **52**, 26–33.
30. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987, **7**, 961–963.
31. Marshall SE, Bordea C, Haldar NA, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and skin cancer after renal transplantation. *Kidney Int* 2000, **58**, 2186–2193.
32. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994, **44**, 266–270.
33. Humbey, O., Aubin, F., Cairey-Remonnay, S., et al. TP53 polymorphism at exon 4 in caucasian women from Eastern France: lack of correlation with HPV status and grade of cervical precancerous lesions. *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol* (in press).
34. Cairey-Remonnay S, Humbey O, Mougin C, et al. TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in cutaneous squamous cell carcinoma and benign epithelial lesions of renal transplant recipients and immunocompetent individuals: lack of correlation with HPV status. *J Invest Dermatol* (in press).
35. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss. *Cancer Res* 1994, **54**, 4756–4759.
36. McGregor JM, Harwood CA, Brooks L, et al. Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. *J Invest Dermatol* 2002, **119**, 84–90.

Publication n°3

Cervical intraepithelial neoplasia associated with epidermodysplasia verruciformis HPV in an HIV-infected patient: a manifestation of immune restoration syndrome

J.S. Guerrini, I. Mermet, S. Cairey-Remonnay, C. Drobacheff, B. Faivre, M. Gaillard, B. Kantelip, J.L. Prétet, D. Riethmuller, F. Aubin.

Eur J Dermatol, 2007 ; 17 (2) : 149.152

Ce travail a été présenté sous forme de communication orale à :

- Réunion de DES-CHU Nancy, Nancy, France ; octobre 2004; “Une éruption de type épidermodysplasie verruciforme chez une patiente VIH”. I. Mermet, J.S. Guerrini, S. Cairey-Remonnay, C. Drobacheff, B. Faivre, M. Gaillard, B. Kantelip, J.L. Prétet, D. Riethmuller, F. Aubin.
- Réunion de la Société de Médecine de Franche Comté, Besançon, France ; février 2005; “De drôles de verrues”. I. Mermet, J.S. Guerrini, S. Cairey-Remonnay, C. Drobacheff, B. Faivre, M. Gaillard, B. Kantelip, J.L. Prétet, D. Riethmuller, F. Aubin.

Ce travail a été présenté sous forme de poster à :

- 3rd HPV and skin cancer meeting, Turin, Italia; 9-11 Septembre 2006; “Cervical intraepithelial neoplasia associated with *epidermodysplasia verruciformis* human papillomavirus type 5 and human papillomavirus type 16 in a human immunodeficiency virus-infected patient: a manifestation of immune restoration syndrome”. I. Mermet, , S. Cairey-Remonnay, J.S. Guerrini, J.F. Faucher, C. Drobacheff, D. Riethmuller, C. Mougin, R. Laurent, F. Aubin.

Introduction à la publication n°3:

Le rôle de la carcinogenèse cutanée associée aux HPV est bien décrit chez les patients immunodéprimés. Cependant, les mécanismes d'action des protéines virales restent mal connus. De plus, la détection d'HPV de type 16 au niveau cutané, en particulier chez les patients immunodéprimés, a conduit la communauté scientifique à revoir la notion de tropisme et a abouti en 2004 à une nouvelle classification de ces virus en fonction des homologies de séquences de la protéine de capsid L1 (de Villiers *et al.*, 2004).

Le service de Dermatologie du centre hospitalier de Besançon a traité une patiente séropositive pour le VIH qui présentait un syndrome de restauration immunitaire sous forme d'infection cutanéomuqueuse à HPV. En effet, cette patiente fortement immunodéprimée (avec un taux de lymphocytes T CD4+ à 196 cellules/mm³ et une charge virale pour le VIH de 11000 copies par ml) avait été mise sous thérapie antirétrovirale hautement active (HAART, pour highly active antiretroviral therapy). Alors que cette patiente présentait des antécédents de lésions bowénoïdes cutanées et de CIN3, le traitement par HAART a induit l'apparition de nombreuses lésions cutanées sur un grand nombre de zones corporelles (visage, cou, épaules, poitrine, mains, et zone génitale). De plus, l'examen gynécologique de cette patiente a permis la détection d'une CIN1. Des biopsies réalisées à partir de différentes lésions verruqueuses du cou, des mains et du pubis ont montré la présence de koïocytes, cellules caractéristiques d'une infection par HPV. Le génotypage de ces lésions a révélé la présence d'HPV 16 au niveau pubien ainsi qu'au niveau de la CIN1, En revanche, l'HPV 5 était présent au niveau des lésions cutanées, mais, de façon surprenante, également au niveau de la CIN1.

Alors que la présence d'HPV 16 a déjà été décrite au niveau de lésions cutanées de patients immunodéprimés, il n'y a qu'un seul cas décrit dans la littérature rapportant une infection par des HPV de type EV dans le tractus génital d'une patiente atteinte d'épidermodysplasie verruciforme. Cette étude montre donc, la possibilité de co-infections par des HPV des genres alpha et bêta et souligne la limite de la notion de tropisme cutané ou muqueux, en particulier lors de périodes d'immunodépression.

Dans ce travail, j'ai réalisé les expérimentations sur les échantillons issues de la patiente, la partie clinique ayant été assurée par le Dr. Isabelle Mermet.

Isabelle MERMET^{1*}
 Jean Sébastien GUERRINI^{2*}
 Sandrine CAIREY-REMONNAY¹
 Christine DROBACHEFF¹
 Brigitte FAIVRE¹
 Marie GAILLARD³
 Bernadette KANTELIP⁴
 Jean Luc PRETET²
 Didier RIETHMULLER³
 François AUBIN^{1,2}

¹ Dpt of Dermatology Medical School and University Hospital, IFR 133, 25000 Besançon, France

² Dpt of Cell and Molecular Biology, EA 3181, Medical School and University Hospital, IFR 133, 25000 Besançon, France

³ Dpt of Obstetrics and Gynecology, Medical School and University Hospital, IFR 133, 25000 Besançon, France

⁴ Dpt of Pathology IFR 133, 25000 Besançon

Cervical intraepithelial neoplasia associated with epidermodysplasia verruciformis HPV in an HIV-infected patient: a manifestation of immune restoration syndrome

We report a case of a cervical intraepithelial neoplasia associated with epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus (HPV) type 5 and HPV type 16 in a human immunodeficiency virus-infected patient. Furthermore, epidermodysplasia verruciformis-like cutaneous eruptions after initiation of highly active antiretroviral therapy has never been described as a manifestation of an immune restoration syndrome.

Key words: human papillomavirus, epidermodysplasia verruciformis, immune restoration syndrome, immune reconstitution inflammatory syndrome, human immunodeficiency virus, cervical intraepithelial neoplasia

Reprints: F. Aubin
 Fax: (+33) 381218482
 <francois.aubin@univ-fcomte.fr>
 Article accepted on 13/9/2006

Human papillomaviruses (HPV) are increasingly recognized as human carcinogens. According to tissue tropism and DNA sequence homology, three broad taxonomic groups, including the genus alpha-papillomavirus (old mucosal (group A), cutaneous (group B2), and epidermodysplasia verruciformis (EV)-associated (group B1) are distinguished [1]. High risk (HR) mucosal HPV infection is associated with an increased incidence and severity of HPV-related cervical dysplasia and cervical cancer in women with human immunodeficiency virus (HIV) infection [2]. The presence of mucosal HPV types has been already well documented in non-melanoma skin cancer (NMSC) and extragenital Bowen's disease of non-immunosuppressed patients [3, 4]. However, to our knowledge, there is only one report demonstrating EV HPV in the female genital area of an EV woman [5]. Herein, we report a case of a cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with EV HPV type 5 and HPV type 16 in a HIV-infected patient, as a manifestation of an immune restoration syndrome (IRS).

Case report

A 38-year-old Italian woman was known to be at stage B3 of HIV infection since 1986. She refused any antiretroviral

therapy and her CD4 cell count was less than 300/mm³ with a viral load of 17,900 HIV copies/ml. Her past medical history included intravenous drug abuse and hepatitis B. There was no known family history of skin problems nor any history of consanguinity. During the observation period, the patient developed a CIN 3 treated in Italy by conization in 1994, followed in 1996, 2000 and 2002 by the excision of four consecutive cutaneous Bowen's lesions located on the neck and shoulders. In December 2003, while her immunological status decreased (196 CD4 cells/mm³ and viral load of 11,000 copies/ml), 3 new cutaneous Bowen's lesions along with one microinvasive squamous cell carcinoma occurred on the same areas. All these lesions were removed and presented with a typical histological aspect of HPV-induced koilocytosis (large keratinocytes with a pale stained and finely granular cytoplasm and voluminous vacuolated nuclei). Then, the patient accepted treatment by highly active antiretroviral therapy (HAART: stavudine, lamivudine, lopinavir, ritonavir). Three months later, along with a continuous increase of CD4 T cell numbers to 259/mm³ and a decreasing viral load up to 42 copies/ml, our patient developed an asymptomatic, cosmetically disturbing, skin eruption, progressing slowly on her face, neck, chest, extremities and genital area. Examination showed about 50 disseminated lesions on sun-exposed skin (*figure 1*). There were either flat, warty, slightly keratotic papules or whitish, sharply bordered

* I. Mermet, J.S. Guerrini contributed equally to this study.



Figure 1. Warty papules developed on the sun-exposed hand.

macules. Lesions measured 2 to 8 mm in diameter and were round or irregular in shape. Biopsies from warty lesions of the neck, dorsal side of the hand and pubis showed characteristic histological features of EV HPV infection with koilocytosis (figure 2). Topical treatment with imiquimod was then introduced without evident improvement. Cervix examination (cytology, colposcopy and biopsy) revealed a CIN 1 which was treated by loop electrosurgical excision procedure. Several pathological specimens were obtained and HPV analysis was performed following DNA extraction from paraffin-embedded biopsies. Cutaneous and cervix biopsies were taken at different times, in different rooms, and by different physicians to prevent cross-contamination between skin and cervix. The DNA quality was tested by amplification of a 268-bp fragment of the β -globin gene using GH20/PCO4 primers. A negative template control (water instead of DNA) was also used as a non-contamination control. Two different microtomes were used skin and cervix sample to reduce the risk of cross-contamination. The presence of HPV DNA was carried out using MY09/MY11 primers which allowed the detection of a broad spectrum of mucosal HPV by production of a 450-bp amplicon. The amplicons were then typed with internal 5' biotinylated probes for low risk HPV6, 11, or for high risk HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 68 using the

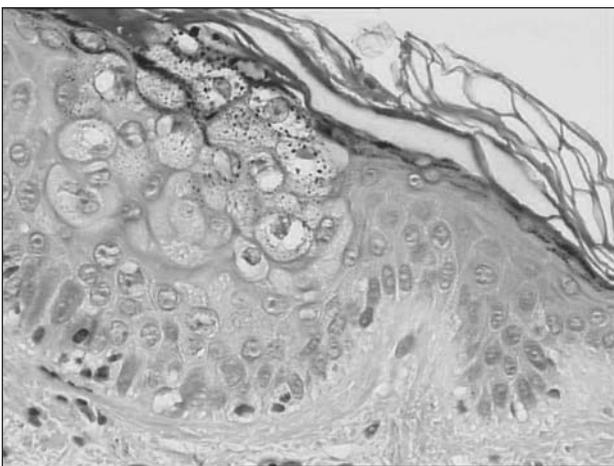


Figure 2. Histological features of EV HPV infection with koilocytosis (HES, $\times 200$) from a warty lesion of the dorsal side of the hand.

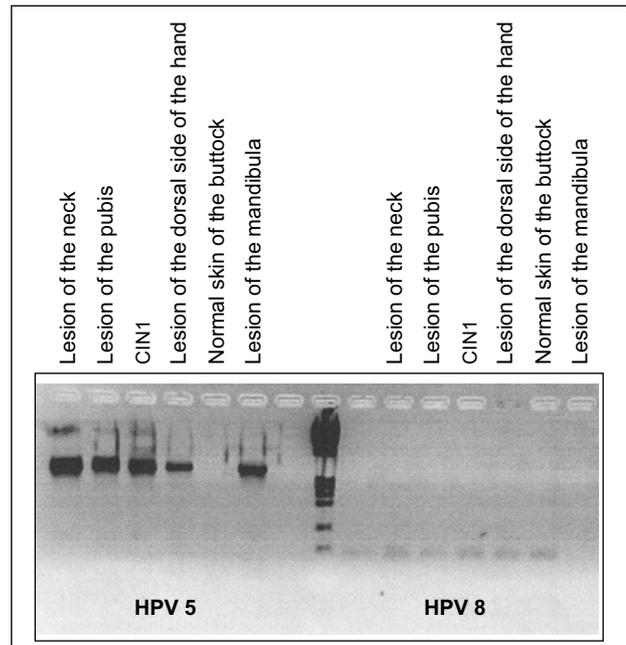


Figure 3. Electrophoresis of PCR products from different cutaneous and cervical lesion (CIN1) using specific primer sets MY5 1/2, MY5 3/4, and MY8 1/2, MY8 3/4 to identify HPV5 and 8 respectively.

Hybridowell kit[®]. The FAP59/FAP64 primers by generating amplicons of 480-bp allowed the detection of a broad range of cutaneous HPV, including EV-associated HPV types but also mucosal HPV types. Four specific primer sets MY5 1/2, MY5 3/4, and MY8 1/2, MY8 3/4 were also used to identify HPV5 and 8 respectively. EV HPV5 DNA was detected in cutaneous warty lesions located on the neck and dorsal side of the hands and on the pubis. HR genital HPV16 DNA was detected on cutaneous lesion of pubis and on CIN1. Unexpectedly, CIN1 was also positive for EV HPV5 DNA. None of the pathological specimens contained HPV DNA of EV HPV8 (figure 3 and table 1). Unfortunately, the patient moved to Italy and no additional tissue was available for more detailed virological analysis.

Table 1.

Clinical lesion	Pathology	HPV16	HPV5	HPV8
1994: Cervix (Italy)	CIN3	NA	NA	NA
1996: Cutaneous (neck)	Bowen's disease with koilocytosis	+	-	-
2000: Cutaneous (shoulders)	Bowen's disease with koilocytosis	+	-	-
2002: Cutaneous (shoulders)	Bowen's disease with koilocytosis	+	-	-
2003: Cutaneous (neck)	Bowen's disease with koilocytosis	+	-	-
2004: Cervix	CIN1	+	+	-
2004: Cutaneous				
- pubis	EV-like	+	+	-
- V of chest	EV-like	+	+	-

Discussion

It is well known that HIV infection is accompanied by a wide variety of infectious muco-cutaneous diseases, including viral infections. However, only few cases of widespread warty lesions associated with EV HPV5 have been reported in the literature [5-8]. EV is a rare genodermatosis characterized by the development of multiples papules, resembling flat warts and macular skin lesions that with time give rise to squamous cell carcinoma in up to 60% of patients in ultraviolet-exposed skin. EV patients present a genetically determined unusual susceptibility to infection with EV-specific HPV [9]. The EV HPV group has also been detected at high prevalence in inflammatory skin diseases such as psoriasis, in the epidermal repair process and in NMSC both in immunocompetent and immunosuppressed organ transplant recipients [10]. EV-associated HPV genotypes appear to cause widespread silent infection in the general population, suggesting the commensal nature of these viruses and the role of host immune response that inhibits the development of overt clinical disease. Indeed, a much higher incidence of EV-associated HPV infection has been reported in immunosuppressed patients, especially in renal transplant recipients [10], but also in patients with Hodgkin's disease, systemic lupus erythematosus or malignant neoplasms associated with severe immunodeficiency. There is intuitive concern that immunosuppression linked to the HIV infection might hasten the development of clinical lesions induced by EV-associated HPV. It is thus conceivable that cellular immunodeficiency induced by HIV infection predisposes to cutaneous HPV infection. In addition, remission of EV-like skin eruptions has been reported in a HIV-positive patient after introduction of HAART [11] highlighting the role of host immune reconstitution. However, the incidence of EV during HIV infection is still very low, suggesting a major role for the genetic background and innate immunity.

It is remarkable that our patient developed EV-like cutaneous eruptions after initiation of HAART, suggesting an immune restoration syndrome (IRS). IRS was recognized after the introduction of HAART in the mid-1990s and several names have been applied to these situations including immune restoration disease and immune reconstitution inflammatory syndrome. While HAART induces protective immune responses against a variety of pathogens, for a subset of patients, immune reconstitution is associated with a pathological inflammatory response. Risk factors for IRS include a low CD4 count, the presence of latent infection(s), and a robust virologic and immunologic response to HAART [12-14]. IRS is characterized by worsening clinical, laboratory, or radiological findings despite improvements in the HIV RNA level and CD4 count after the introduction of antiretroviral therapy. IRS may occur during or shortly after the treatment of an opportunistic infection as a "new" clinical syndrome ranging from worsening of a treated opportunistic infection, or the atypical appearance of a previously unrecognized occult infection or even autoimmune or malignancy-related conditions. During the initial months of HAART, immune reconstitution is complicated by adverse clinical phenomena in which either previously subclinical infections are "unmasked" or pre-existing partly treated opportunistic infections clinically deteriorate [12-14]. However, to our knowledge, HPV-associated lesions have never been reported as a manifesta-

tion of IRS and our observation may thus reflect the progression of a quiescent EV HPV infection.

We cannot explain why infection with other more common HPV types is not a more common event after introduction of HAART. In an unpublished report, French *et al* described patients with disseminated warts occurring after >3 years of therapy in absence of cutaneous DTH responses despite substantial increases of CD4 T cell counts [15]. IRS is supposed to be the result of an excessive response by the recovering immune system to a high antigen burden [13]. The low viral DNA load and the low level of proteins expression associated with cutaneous HPV-infected lesions [16] may account for the lack of local inflammatory response and the poor immune response [17] even after introduction of HAART. Together, these mechanisms may explain the persistence of these lesions even in immunocompetent hosts and the rarity of IRS after HAART introduction.

IRS is not a new phenomenon, nor is it specific to HIV-infected individuals receiving HAART. Indeed, the potential for IRS exists whenever patients who have been severely immunocompromised have rapid restoration of their immune function. Thus, similar phenomena are recognized following a steroid reduction or withdrawal, and among patients in whom the absolute neutrophil count recovers in the blood following either cytotoxic chemotherapy or bone marrow transplantation [18]. The pathogenesis of these reactions has not yet been clearly defined, but increase of memory cells (CD4+CD45RO+) and CD8+ T lymphocytes after HAART may explain their development. Studies have shown that recovery of lost responses to specific infectious antigens may occur as soon as 2 weeks after HAART [13]. Pathogenesis may also involve exacerbated production of pro-inflammatory cytokines or a lack of immune regulation [15, 19]. Disease susceptibility genes for specific subsets of IRS have also been identified [20, 21].

In addition, we demonstrate the presence of cutaneous EV HPV in the mucosal genital area. We do not have any clear explanation for this loss of tissue tropism. An atypical appearance of an unrecognized clinically silent infection has been previously described during IRS [13, 14] and there is one report demonstrating EV HPV in the female genital area of an EV woman [5]. Furthermore, genital HPV infection is associated with a higher antigen burden than cutaneous infection [16] and may thus favour IRS in susceptible patients. Furthermore, our observation demonstrates that the historical grouping into mucosal and cutaneous HPV types should no longer be upheld as supported by modern taxonomy [1]. Indeed, in the new classification of HPV based on taxonomy rather than on phenotypic characteristics, the clinically most important genus is referred to as the alpha-papillomavirus and contains all HPV types associated with mucosal and genital lesions but also cutaneous HPV associated with most common warts and "butcher's warts". The pathogenic role of co-infection by HR-HPV16 and EV-HPV5 in the development of CIN1 is not clear. The carcinogenic role of oncoproteins E6 and E7 of mucosal HR-HPV is now well established [22]. The transforming potential of EV-HPV *in vitro* is low, and it is currently believed that EV-HPV may act only as co-carcinogen with an absolute requirement of ultraviolet light [10]. Although it may be conceivable that EV-HPV5 infection plays no role in HR-HPV16 associated-CIN1 and is only coincidental,

we can not exclude a synergy between oncoproteins E6 and E7 of each virus [23].

In conclusion, our observation raises two interesting points: first, the occurrence of a cutaneo-mucosal infection by HPV as a manifestation of IRS after HAART and secondly, the unexpected presence of cutaneous EV-HPV in the uterine cervix. ■

Acknowledgements. We thank Sylviane Coumes-Marquet and Elisabeth Homacell for their excellent technical assistance. Financial support: None. Conflict of interest: None.

References

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, *et al.* Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
2. Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, *et al.* Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 121: 226-32.
3. Clavel CE, Huu VP, Durlach AP, *et al.* Mucosal oncogenic human papillomaviruses and extragenital Bowen disease. *Cancer* 1999; 86: 282-7.
4. Ifner A, Klug SJ, Garbe C, *et al.* The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res* 2003; 63: 7515-9.
5. Favre M, Majewski S, De Jesus N, Malejczyk M, Orth G, Jablonska S. A possible vertical transmission of human papillomavirus genotypes associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 333-6.
6. Prose NS, von Knebel-Doeberitz C, Miller S, *et al.* Widespread flat warts associated with human papillomavirus type 5: a cutaneous manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 978-81.
7. Berger TG, Sawchuk WS, Leonardi C, *et al.* Epidermodysplasia verruciformis-associated papillomavirus infection complicating human immunodeficiency virus disease. *Br J Dermatol* 1991; 124: 79-83.
8. Barzegar C, Paul C, Saiag P, *et al.* Epidermodysplasia verruciformis-like eruption complicating human immunodeficiency virus infection. *Br J Dermatol* 1998; 139: 122-7.
9. Davison SC, Francis N, McLean K, Bunker CB. Epidermodysplasia verruciformis-like eruption associated with HIV infection. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 311-2.
10. Majewski S, Jablonska S. Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations? *Arch Dermatol* 2002; 138: 649-54.
11. Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, *et al.* Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol* 2004; 150: 949-57.
12. Haas N, Fuchs PG, Hermes B, Henz BM. Remission of epidermodysplasia verruciformis-like skin eruption after highly active antiretroviral therapy in a human immunodeficiency virus-positive patient. *Br J Dermatol* 2001; 145: 669-70.
13. Jevtovic DJ, Salemovic D, Ranin J, *et al.* The prevalence and risk of immune restoration disease in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2005; 6: 140-3.
14. Shelburne SA, Montes M, Hamill RJ. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 167-70.
15. Crum-Cianflone NF. Immune reconstitution inflammatory syndromes: what's new? *AIDS Read* 2006; 16: 199-206; (213, 216-7).
16. Price P, Mathiot N, Krueger R, Stone S, Keane NM, French MA. Immune dysfunction and immune restoration disease in HIV patients given highly active antiretroviral therapy. *J Clin Virol* 2001; 22: 279-87.
17. Pfister H. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 52-6.
18. Frazer IH, Thomas R, Zhou J, *et al.* Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev* 1999; 168: 131-42.
19. Cheng VC, Yuen KY, Wong SS, *et al.* Immunorestitution diseases in patients not infected with HIV. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 402-6.
20. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, *et al.* Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* 2005; 174: 4407-14.
21. Price P, Keane NM, Stone SF, Cheong KY, French MA. MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. *Hum Immunol* 2001; 62: 157-64.
22. Price P, Morahan G, Huang D, *et al.* Polymorphisms in cytokine genes define subpopulations of HIV-1 patients who experienced immune restoration diseases. *AIDS* 2002; 16: 2043-7.
23. Song S, Liem A, Miller JA, Lambert PF. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology* 2000; 267: 141-50.

Discussion et perspectives

Virus ubiquitaires à tropisme épithélial, les HPV sont associés à près de 10 % des cancers humains et leur implication dans la carcinogenèse du col utérin, dont ils sont l'agent étiologique, est clairement établie. Cependant, la responsabilité de ces virus dans la survenue d'autres cancers épithéliaux reste discutée puisque tous les patients infectés ne vont pas développer de cancers et que l'implication d'autres facteurs carcinogènes est souvent nécessaire. Parmi ces autres facteurs, certains sont bien déterminés, comme les rayonnements ultraviolets et le statut immunitaire impliqués dans la survenue des carcinomes épidermoïdes cutanés, alors que d'autres, comme certains déterminismes génétiques, doivent encore être identifiés.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'infection par un HPV à haut risque est nécessaire mais pas suffisante, pour induire le développement d'un cancer du col de l'utérus. La persistance de virus au sein de la cellule semble jouer un rôle majeur dans le processus de développement d'une tumeur. Cette persistance est modulée par différents facteurs, principalement liés au virus et à la réponse immunitaire. Ainsi, l'identification de certains de ces facteurs pouvant influencer la progression des lésions associées à HPV vers des grades plus sévères représente un intérêt certain pour les cliniciens impliqués dans le suivi des patients.

En se basant sur différents modèles, mon travail de thèse a permis d'explorer le rôle des HPV, et plus particulièrement des HPV bêta, dans la carcinogenèse cutanéomuqueuse en fonction de différents facteurs environnementaux et génétiques. Nous allons discuter de la façon dont ces facteurs peuvent influencer l'évolution de l'infection par ces HPV afin de mieux comprendre leur rôle dans la carcinogenèse cutanée des sujets immunocompétents.

Alors que l'implication des HPV bêta dans le développement de tumeurs cutanées des sujets immunocompétents reste débattue, leur rôle en tant que cofacteurs de la carcinogenèse cutanée des patients immunodéficients est bien établi. Plusieurs études ont effectivement démontré qu'un déficit immunitaire favorise la réplication des HPV latents et la promotion tumorale, tant au niveau cutané *via* l'action des UV (Rust *et al.*, 2001; Weinstock *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 2004), de la présence d'une coinfection de type VIH (Cuesta *et al.*, 1998) ou suite à une greffe (Ducloux *et al.*, 1998), qu'au niveau de la muqueuse ano-génitale chez les patientes infectées par le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) (Levi *et al.*, 2002; Palefsky *et al.*, 2001; Palefsky *et al.*, 1999). L'étude d'une maladie génétique, l'épidermodysplasie verruciforme (EV), liée à une prédisposition immuno-génétique à l'infection cutanée par HPV 5 et/ou 8, comme modèle de la carcinogenèse cutanée induite par HPV, confirme encore l'implication du système immunitaire comme facteur clé de l'infection par HPV. L'EV est une entité clinique bien caractérisée dont l'étiologie virale a été clairement démontrée (Jablonska and Majewski, 1994). Ainsi, par analogie aux modèles de carcinogenèse à HPV dans les lésions génitales, la plupart des recherches portant sur les tumeurs cutanées s'intéressent à la détection des HPV oncogènes de type EV (qui appartiennent au genre bêta).

Toutefois, la prévalence élevée d'HPV en peau saine chez les sujets immunocompétents ne permet pas d'incriminer directement les HPV dans le développement de tumeurs cutanées (Boxman *et al.*, 1999). De plus, chez ces patients, cette prévalence est aussi élevée dans les tissus sains que dans les lésions cancéreuses (Harwood *et al.*, 2000; Shamanin *et al.*, 1996) et serait même plus

élevée dans les lésions précancéreuses, dans les lésions épithéliales bénignes ou dans le psoriasis (pour revue voir Puzenat *et al.*, 2003). De plus, Boxman *et al.* n'ont pas retrouvé d'association significative entre la présence d'ADN d'HPV de type EV et le développement de cancers cutanés épithéliaux (Boxman *et al.*, 2000). Cependant, il faut noter que le spectre des HPV fréquemment détectés dans les carcinomes épidermoïdes est très étendu (de Villiers, 1998). L'utilisation des méthodes récentes de génotypage des HPV bêta, a permis de montrer que si la prévalence des HPV bêta est similaire entre les lésions cancéreuses et la peau saine des mêmes patients, les types d'HPV retrouvés sont différents. Ainsi, Asgari *et al.* ont comparé la prévalence de l'ADN d'HPV bêta chez des patients atteints de CE et des sujets sains. La prévalence était similaire dans les deux cas, mais les HPV bêta de l'espèce 2 étaient plus fréquemment retrouvés au sein des tumeurs que dans la peau saine avoisinante (Asgari *et al.*, 2008). Dans une autre étude, Patel *et al.* ont comparé la prévalence de l'ADN d'HPV dans des CE et des CBC (Patel *et al.*, 2008). Si aucune différence dans la prévalence en HPV bêta n'a pu être mise en évidence, les auteurs ont retrouvé de façon plus fréquente des HPV bêta de l'espèce 1 (dont les HPV 5, 8 et 24) dans les CE que dans les CBC (Patel *et al.*, 2008). Alors que ces deux études suggèrent que les HPV infectant les tumeurs cutanées seraient différents de ceux retrouvés en peau saine, ils ne parviennent pas à mettre en évidence de génotype spécifique.

Dans ce contexte, et devant la difficulté d'incriminer certains génotypes d'HPV particuliers, l'importance d'autres facteurs, environnementaux ou liés à l'hôte, semble déterminante dans le développement de la carcinogenèse cutanée.

En ce qui concerne le statut immunitaire, le modèle de l'épidermodysplasie verruciforme a permis de mettre en évidence deux locus de susceptibilité, EV1 sur le chromosome 17q25 (Ramos *et al.*, 1999) et EV2 sur la région chromosomique 2p21-p24 (Ramos *et al.*, 2000). Ramos *et al.* ont identifié dans le locus EV1, deux nouveaux gènes, EVER1 et EVER2, dont les mutations sont associées à la maladie (Ramos *et al.*, 2002). Les protéines EVER1 et EVER2 codées par ces gènes appartiennent à la famille de protéines membranaires TMC (transmembrane channel-like) (Keresztes *et al.*, 2003). Récemment, Lazarczyk *et al.* ont montré que les protéines EVER1 et EVER2 interagissent avec la protéine ZnT-1 (zinc transporter 1) modifiant la distribution intracellulaire du zinc et inhibant l'efflux de zinc vers le noyau (Lazarczyk *et al.*, 2008). De plus, des kératinocytes présentant une protéine EVER2 mutée étaient capables de proliférer plus rapidement (Lazarczyk *et al.*, 2008). L'étude des interactions entre la protéine virale E5 de l'HPV 16 et le complexe EVER/ZnT-1 a montré que cette protéine virale se lie au complexe EVER/ZnT-1 et inhibe sa régulation négative sur la croissance cellulaire (Lazarczyk *et al.*, 2008). Les mutations observées dans l'EV au niveau des protéines EVER1 et EVER2 permettent de compenser l'absence d'une protéine E5 fonctionnelle codée par le génome d'HPV 5. L'absence de protéines EVER fonctionnelles chez les patients atteints d'EV pourrait constituer un déficit de l'immunité cellulaire vis-à-vis de l'HPV 5 et des HPV de type EV. De plus, les protéines EVER sont fortement exprimées dans de nombreuses cellules du système immunitaire comme les lymphocytes CD4+, CD8+, les lymphocytes B et les cellules NK (Su *et al.*, 2004). Les mutations des gènes EVER pourraient affecter différentes étapes de la réponse immunitaire vis-à-vis des HPV de type EV, aboutissant à une très longue persistance de l'infection.

Il existerait donc une infection latente des kératinocytes par les HPV de type EV dont la prévalence serait augmentée au cours des déficits immunitaires, et qui, sous l'influence d'autres facteurs carcinogènes (en particulier les radiations UV), favoriserait le développement de cancers cutanés. En effet, le développement précoce de carcinomes associés à l'EV au niveau des zones photo-exposées est en faveur d'un mécanisme carcinogène synergique entre l'HPV 5 et les UV (pour revue, Orth, 2006). Il a été montré *in vitro* que la protéine E6 de l'HPV 5 inhibe la voie de signalisation du facteur de croissance tumoral bêta (TGF- β pour tumor growth factor beta), ce qui pourrait constituer un mécanisme impliqué dans la carcinogenèse cutanée (Mendoza *et al.*, 2006).

Alors que le statut immunitaire des patients semble jouer un rôle central vis-à-vis de l'infection par HPV dans la carcinogenèse cutanée, l'importance du tropisme viral et des co-infections doit également être pris en compte. Ainsi, nous avons rapporté le cas d'une patiente présentant une CIN1 associée aux HPV 16 et 5 (Mermet *et al.*, 2007). Cette patiente, séropositive pour le VIH et présentant des antécédents de CIN3 et de lésions bowénoïdes situées en zones photo-exposées, a développé simultanément et au niveau de la même zone, 3 nouvelles lésions bowénoïdes et un carcinome épidermoïde micro-invasif. L'analyse de ces lésions après excision a révélé un aspect histologique koldiocytaire typique d'une infection par HPV. La patiente, fortement immunodéprimée (196 lymphocytes T CD4⁺/mm³ avec une charge virale pour le VIH de 11000 copies/ml) a été placée sous thérapie antirétrovirale hautement active (HAART pour highly active antiretroviral therapy). Au bout de 3 mois, alors que la charge virale avait chuté à 42 copies/ml avec un taux de lymphocytes T CD4⁺ de 259/mm³, la patiente a développé cette éruption cutanée progressant sur le visage, le cou, la poitrine et l'aire génitale. Il s'agissait d'une cinquantaine de lésions cutanées localisées en zones photo-exposées. Des biopsies réalisées au niveau de lésions verruqueuses du cou, des mains et du pubis présentaient un aspect koldiocytaire caractéristique de l'infection par HPV. Nous avons procédé à la détection d'HPV dans plusieurs de ces biopsies. Nous avons détecté chez cette patiente de l'ADN d'HPV 16 au niveau de la CIN1, mais aussi dans les lésions cutanées du torse et du pubis. De l'ADN de l'HPV bêta 5 a été retrouvé au niveau des lésions cutanées, et de façon surprenante au niveau de la CIN1. Alors que les infections cutanées à HPV 16 ont déjà été décrites dans la littérature, seul un cas d'infection génitale par des HPV de type EV a été rapporté chez une patiente atteinte d'EV. Ces résultats montrent d'une part l'apparition d'une infection cutanéomuqueuse par HPV dans un syndrome de restauration immunitaire, et d'autre part la présence d'HPV de type EV au niveau de lésions du col utérin. Le rôle de cette co-infection par les HPV 5 et 16 dans le développement d'une lésion intra-épithéliale du col utérin n'est pas élucidé, et si les mécanismes carcinogènes des protéines E6 et E7 d'HPV 16 sont bien connus, il est admis que les HPV de type EV n'agiraient qu'en tant que cofacteurs de la carcinogenèse induite par les UV (Majewski and Jablonska, 2002). Dans ce contexte, on peut supposer que l'infection par HPV 5 n'ait aucun rôle dans le développement d'une CIN1 associée à HPV 16. Cependant, une action synergique des protéines E6 et E7 de chaque virus ne peut être exclue. Malheureusement, la patiente concernée a quitté la France, et nous n'avons pu obtenir de biopsies supplémentaires pour la poursuite de recherches.

Nous nous sommes aussi intéressés à la co-infection entre HPV alpha et bêta dans les lésions péniennes associées à HPV (Humbey *et al.*, 2003). L'utilisation d'amorces consensus

MY09/MY11, détectant un large spectre d'HPV alpha, nous a permis de confirmer la corrélation entre la présence d'HPV et le développement de tumeurs péniennes. Le génotypage systématique des produits de PCR démontre une détection particulièrement élevée de l'HPV haut risque de type 16, retrouvé dans 69 % des carcinomes péniens. Ces résultats concordent avec la plupart des études épidémiologiques et fondamentales, qui ont permis d'incriminer certains HPV alpha à haut risque comme étant les principaux facteurs étiologiques du cancer du col de l'utérus, avec une prépondérance particulière pour les HPV 16 et 18 (Bosch and Munoz, 2002; Munoz *et al.*, 2003).

L'utilisation supplémentaire du couple d'amorce FAP59/FAP64 détectant un grand nombre d'HPV cutanés, a permis de mettre en évidence une forte prévalence d'HPV dans notre série de carcinomes péniens (Forslund *et al.*, 1999). En effet, l'ADN viral a été détecté dans 67 % des lésions cancéreuses péniennes, contre 32 % dans les phimosis ou balanites témoins (Humbey *et al.*, 2003). Parmi les HPV trouvés, nous avons identifié 31 % d'HPV bêta dans les carcinomes contre 0 % dans les lésions témoins de bas grade. A notre connaissance, ce travail a été le premier à étudier la présence d'HPV bêta dans des lésions péniennes. Nous nous sommes principalement intéressés au typage des HPV bêta de type 5 et 8, reconnus comme de potentiels facteurs oncogènes dans la peau, en utilisant des couples d'amorces spécifiques (MY5 1/2 MY5 3/4 et MY8 1/2, MY8 3/4) décrites par Meyer *et al.* (Meyer *et al.*, 2000). Alors que l'ADN d'HPV 8 n'a pas été détecté, la présence du génome d'HPV 5 a été retrouvée dans 2 cancers sur 11 analysés. Mais l'implication d'un type viral particulier n'a pu être établie, les produits de la PCR, obtenus avec les amorces consensus FAP59/FAP64, n'ayant pas été séquencés, faute de matériel génomique de bonne qualité. Nos résultats confirment cependant l'implication des HPV dans la carcinogenèse pénienne généralement acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique (Castellsague *et al.*, 2002; Castellsague and Munoz, 2003; Gregoire *et al.*, 1995; Heideman *et al.*, 2007; Levi *et al.*, 1998; Picconi *et al.*, 2000). De plus, la majorité des HPV muqueux détectés par hybridation à l'aide de sondes spécifiques correspondent à ceux fréquemment retrouvés dans le cancer du col chez la femme, en particulier l'HPV 16, ce qui conforte la plupart des données de la littérature (Dillner *et al.*, 2000; Gregoire *et al.*, 1995; Heideman *et al.*, 2007; Levi *et al.*, 1998; Maden *et al.*, 1993; Parkin and Bray, 2006; Picconi *et al.*, 2000). Il semble donc que l'importance des HPV dans les tumeurs du pénis puisse être rapprochée de celle déjà connue dans les cancers du col de l'utérus (Svare *et al.*, 2002). L'existence d'une corrélation entre le risque de développer un cancer cervical et un cancer pénien et *vice versa* retrouvée chez plusieurs couples, suggère en effet l'implication d'un agent étiologique commun (Baken *et al.*, 1995; Castellsague *et al.*, 2002; Castellsague and Munoz, 2003; Graham *et al.*, 1979). Cependant, malgré l'importance de la contamination sexuelle des HPV, peu de données sont disponibles quant au rôle exact du virus au niveau génital chez l'homme. Pour certains auteurs, en plus d'être porteur d'HPV oncogènes, le partenaire mâle représente le vecteur qui contribue au risque de développer un cancer du col de l'utérus chez leur partenaire féminine (Castellsague and Munoz, 2003). L'existence de facteurs de risque, tels que l'absence de circoncision et le nombre de partenaires sexuels, conforte cette hypothèse (Sanchez-Aleman *et al.*, 2002). D'autres facteurs du cancer pénien ont aussi été incriminés ; ils incluent le tabac, une mauvaise hygiène, des inflammations chroniques (lichen scléro-atrophique), ainsi que des antécédents de maladies

sexuellement transmissibles (pour revue voir Dillner *et al.*, 2000). Cependant, contrairement au cancer du col de l'utérus, seules quelques études se sont intéressées à l'étiologie des carcinomes péniens, qui reste encore mal connue. La très faible incidence de ce cancer permet sans doute d'expliquer le manque d'intérêt et de données le concernant. Les co-infections virales sont donc un facteur important à prendre en compte dans la carcinogenèse cutanéomuqueuse associée à HPV, et si l'HPV 5 peut agir en synergie avec l'HPV 16, au niveau muqueux, sans photo-exposition, il est d'autant plus plausible qu'une co-infection cutanée avec des HPV-HR alpha et bêta renforce l'action carcinogène des UV. Ainsi, une étude menée dans notre équipe a montré la présence d'ADN d'HPV 16 dans 51,6 % des carcinomes épidermoïdes cutanés chez des patients greffés rénaux (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002). La détection d'HPV 16 dans la peau, retrouvée de plus en plus fréquemment par l'ensemble des équipes travaillant sur la mise en évidence du rôle des HPV dans la carcinogenèse cutanée, a conduit la communauté scientifique à réactualiser le concept de tropisme spécifique de certains types viraux (de Villiers *et al.*, 2004). Il apparaît donc que la présence d'HPV 16 au niveau cutané, seul ou associé à des HPV bêta pourrait constituer un facteur de risque supplémentaire concernant la carcinogenèse induite par les UV.

A l'heure actuelle, les mécanismes de carcinogenèse impliquant les HPV bêta ne permettent pas d'expliquer pourquoi certains individus ont plus de risques de développer un cancer associé à HPV, comparés à d'autres. Ainsi, en parallèle à la détection d'HPV, nous avons choisi d'utiliser la technique de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pour analyser le génotype au codon 72 du gène suppresseur de tumeur TP53 chez des patients développant ou non des lésions péniennes associées à HPV. Cette méthode, très fiable et sensible est hautement reproductible et nous a permis de comparer la distribution du polymorphisme du codon 72 de TP53 dans nos différentes séries d'échantillons. A l'instar de la majorité des travaux infirmant les résultats de Storey *et al.* (Storey *et al.*, 1998), nous n'avons pas trouvé de corrélation entre ce polymorphisme et le risque de développer des lésions précancéreuses du pénis associées à HPV (Humbey *et al.*, 2003). De plus, aucune corrélation entre l'un des génotypes HPV et un polymorphisme particulier (Arg/Arg, Pro/Pro ou Arg/Pro) n'a été mise en évidence. Récemment, une étude de Tornesello *et al.* a confirmé nos résultats, mais jusqu'à aujourd'hui, ce sont les deux seules études ayant étudié le polymorphisme de TP53 dans les cancers épidermoïdes péniens (Tornesello *et al.*, 2008). Dans une méta-analyse s'appuyant sur 45 publications parues entre 1998 et 2002, d'autres auteurs confirment l'absence de corrélation entre le polymorphisme de TP53 et le développement de lésions cervicales pré-invasives (Koushik *et al.*, 2004). Cependant, les résultats de cette étude, basée sur l'utilisation d'une méthode de régression permettant d'analyser l'ensemble des données rassemblées, n'excluent pas un risque légèrement augmenté de développer des adénocarcinomes et des cancers épidermoïdes dans le cas d'un génotype Arg/Arg. Les auteurs concluent en suggérant qu'il n'est pas impossible que le polymorphisme Arg/Arg de TP53 puisse jouer un rôle lors des étapes tardives du cancer cervical. D'après cette étude, les facteurs les plus importants contribuant à l'hétérogénéité des résultats publiés à ce jour concernent le choix du groupe témoin, non représentatif de la population étudiée, ainsi qu'une méthodologie pouvant faire varier les résultats. Makni *et al.* ont ainsi démontré des « variations

inter-laboratoires » dans les résultats du génotypage du codon 72 de TP53 au sein d'échantillons issus de la même cohorte (Iftner *et al.*, 2003). D'après les auteurs, l'utilisation de protocoles différents, des erreurs de classification des échantillons ou des résultats, le choix des populations étudiées, l'état de conservation des échantillons, ou l'expérimentateur lui-même, sont autant de facteurs pouvant influencer les résultats finaux (Tableau 4).

Auteurs	CSC	Témoin	Matériel CS	Matériel témoin	Analyse HPV	% TP53 Arg/Arg
Storey 1998	12 PTR	Non	tumeur	non	oui	75
Marshall 2000	55 PTR	167 PTR	sang	sang	non	53 vs 53
Dokianakis 2000	29 ICP	61 ICP	tumeur	sang	oui	65 vs 20
Hamel 2000	163 ICP	163 ICP	sang	sang	non	54 vs 58
Bastiaens 2001	86 ICP	168 ICP	sang	sang	oui	47 vs 48
O'Connor 2001	55 PTR + ICP	115 ICP	sang	sang	oui	78 vs 79
Cairey-Remonnay 2001	55 PTR	50 PTR	tumeur/sang	tumeur/sang	oui	85 vs 59

Tableau 4 : Distribution du polymorphisme du codon 72 de l'exon 4 de TP53 dans des tumeurs cutanées. ICP : patients immunocompétents ; PTR : patients transplantés rénaux

Afin de limiter au maximum ce type de biais, nous avons travaillé avec des populations homogènes, en ne sélectionnant que des échantillons issus de patients caucasiens habitant l'Est de la France pour les trois études réalisées dans notre laboratoire (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002; Humbey *et al.*, 2002; Humbey *et al.*, 2003). L'ensemble des expérimentations a été standardisé en établissant des protocoles reproductibles d'extraction d'ADN génomique, de détection du génome d'HPV et de génotypage de l'ADN viral ainsi que du polymorphisme de TP53. Toutes les techniques ont aussi été réalisées par le même expérimentateur. Ainsi, les différences de résultats obtenus quant au rôle du

polymorphisme de TP53 dans les cancers associés à HPV, représentent un intérêt non négligeable. En effet, dans notre laboratoire, une analyse du polymorphisme de TP53, au sein de 35 tumeurs épidermoïdes cutanées issues de patients transplantés rénaux originaires de l'Est de la France, a permis de trouver 83 % d'individus Arg/Arg comparé à 14 % et 3 % d'individus Arg/Pro et Pro/Pro respectivement. En revanche, le pourcentage d'individus homozygotes Arg/Arg immunocompétents avec ou sans tumeur n'est pas différent (60 % vs 59 % respectivement) (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002).

Ces résultats confirment donc l'étude de Storey *et al.* suggérant l'existence d'une relation entre le génotype p53-Arg/Arg et le risque de survenue d'un cancer cutané chez les patients greffés (Storey *et al.*, 1998). Cette susceptibilité génétique pourrait ainsi représenter un facteur de risque dans le développement de certains types de cancers et expliquer les différences inter-individuelles face à la maladie. Une méta-analyse incluant 37 études indépendantes, travaillant à partir d'échantillons biologiques issus de cancer du col de l'utérus, confirme cette hypothèse et montre que les risques sont variables suivant la localisation géographique, le type de cancer analysé et le type d'HPV infectant (Jee *et al.*, 2004). Les auteurs montrent que le polymorphisme du codon 72 de TP53 peut représenter un facteur de risque dans le développement d'adénocarcinomes cervicaux alors qu'il ne semble pas impliqué dans les carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus.

Certaines équipes ont aussi associé l'isoforme Arginine de p53 avec le risque de développer d'autres cancers épithéliaux : gastriques (Shen *et al.*, 2004), du sein (Buyru *et al.*, 2003), des ovaires (Pegoraro *et al.*, 2003), de l'oesophage (Kawaguchi *et al.*, 2000), cutanés non mélaniques (Bastiaens *et al.*, 2001), cutanés mélaniques (Shen *et al.*, 2004), du poumon (Wu *et al.*, 2002), de la prostate (Henner *et al.*, 2001), de la vessie (Soulitzis *et al.*, 2002) et laryngés (Sourvinos *et al.*, 2001). Pour d'autres auteurs, c'est le polymorphisme p53-Pro/Pro qui représente un facteur de risque dans le développement des cancers de la thyroïde (Granja *et al.*, 2004), nasopharyngés (Tiwawech *et al.*, 2003), de la prostate (Suzuki *et al.*, 2003), de la peau (Chen *et al.*, 2003), urogénitaux (Kuroda *et al.*, 2003) et du poumon (Zhang *et al.*, 2003). Cependant, si des diversités ethniques peuvent expliquer des différences de distribution génotypique (Beckman *et al.*, 1994; Inserra *et al.*, 2003), les résultats divergeants de nombreux groupes au sein de populations homogènes continuent à remettre en cause l'implication de p53-Arg/Arg ou p53 Pro/Pro dans le développement des cancers.

Le modèle de la carcinogenèse du col utérin a permis de mettre en évidence les mécanismes d'action des HPV, et un évènement important lors de développement tumoral est l'inhibition de l'apoptose par les oncoprotéines E6 et E7 des HPV alpha HR. Le rôle des HPV bêta en tant que cofacteurs dans la carcinogenèse cutanée pourrait s'expliquer par une dérégulation du cycle cellulaire et une inhibition des voies apoptotiques induites par les UV. En effet, l'apoptose constitue le mécanisme ultime d'élimination de cellules dont les lésions génomiques sont trop importantes, et son inhibition pourrait permettre le maintien et la prolifération de cellules ayant acquis des mutations. Il n'est donc pas surprenant que de nombreuses équipes se soient intéressées à l'effet des protéines E6 et E7 sur l'apoptose induite par les UV. L'absence de dégradation de la protéine p53 par les protéines E6 des HPV bêta constitue une différence majeure dans la capacité de ces virus à inhiber

l'apoptose, et Jackson *et al.* sont les premiers auteurs à avoir proposé un mécanisme d'action des HPV dans le développement des tumeurs cutanées (Jackson *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2000). Dans leurs travaux, ces auteurs ont montré que les protéines E6 des HPV 5, 8, 18 et 77 sont capables d'induire la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bak. Les résultats qu'ils ont observés *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par immunomarquages sur des coupes de biopsies de cancers épidermoïdes cutanés. La protéine Bak, normalement surexprimée après irradiation par les UV, est présente en faible quantité dans les carcinomes épidermoïdes cutanés de patients infectés par HPV, en comparaison aux carcinomes épidermoïdes ne présentant pas d'ADN d'HPV (Jackson *et al.*, 2002). Le mécanisme d'action lié à cette dégradation serait différent selon le type d'HPV. Ainsi, Jackson *et al.* ont montré que la dégradation de Bak en présence de la protéine E6 d'HPV 5 est indépendante de l'ubiquitine ligase E6AP, alors que Underbrink *et al.* ont associé cette dégradation à E6AP pour la protéine E6 d'HPV 8. Plus récemment, les travaux de Accardi *et al.* et Dong *et al.* ont permis d'identifier une nouvelle voie d'inhibition de l'apoptose induite par les UV (Accardi *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2008). En effet, ces auteurs ont montré que la protéine E6 de l'HPV 38 stabilise la protéine p53 et favorise l'expression de l'antagoniste de p53, $\Delta Np73$, aboutissant à une inhibition de l'apoptose (Accardi *et al.*, 2006). En revanche, en l'absence de p53 ou p73, cette inhibition d'apoptose est partiellement levée, suggérant que l'action de la protéine E6 de l'HPV 38 est dépendante des protéines p53 et p73.

Dans des cellules HaCaT, lignée cellulaire de kératinocytes immortalisés et présentant une p53 mutée, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'inhibition de l'apoptose par les protéines E6 et E7 des HPV bêta 5, 8, 14, 24, 36, 38 et 49. Dans notre étude, nous avons induit l'expression des protéines virales E6 et E7 à l'aide de vecteurs rétroviraux. Bien qu'il n'existe pas d'anticorps dirigés contre ces protéines, l'expression des messages E6 et E7 détectée par RT-PCR suggère fortement l'expression des protéines virales. En accord avec les résultats décrits dans la littérature, nous avons montré la capacité des cellules HaCaT à entrer en apoptose suite à l'irradiation par des UVB malgré une protéine p53 présentant des mutations au niveau des sites fréquemment mutés suite à l'exposition aux UV (hot-spots) (Henseleit *et al.*, 1996; Henseleit *et al.*, 1997). En revanche, l'expression des protéines E6 et E7 dans ces cellules n'a conduit à aucune modification de la réponse apoptotique aux UV, et ce quelque soit la dose d'UV utilisée (5, 10, 20, 40 et 80 mJ/cm²), le temps post-irradiation (6, 12, 24 et 48 h) ou le type viral. Cette absence d'effet des protéines virales sur l'apoptose induite par les UV est en désaccord avec les résultats récemment publiés dans la littérature. En effet, Dong *et al.* ont montré dans des souris transgéniques que les protéines E6 et E7 de l'HPV 38 inhibent l'apoptose induite par les UV (Dong *et al.*, 2008). Une autre étude a montré une inhibition de l'apoptose par la protéine E6 et E7 des HPV 5, 8, 20, 22, 38, 76, 92, 96 (Underbrink *et al.*, 2008). En revanche, ces derniers résultats divergent de ceux obtenus par Struijk *et al.*, à savoir une inhibition de l'apoptose induite par les UV dans des kératinocytes primaires exprimant les protéines E6 et E7 des HPV 8 et 20 (Struijk *et al.*, 2008) mais pas dans ceux exprimant les protéines E6 et E7 des HPV 5 et 38. Dans ce contexte, nous avons traité nos cellules avec le molécule PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) qui est capable de restaurer l'activité transcriptionnelle des protéines p53 mutées (Bykov *et al.*, 2002; Bykov *et al.*, 2003). En effet, nous

avons voulu vérifier si les mutations présentes au sein de la protéine p53 n'interféraient pas dans la capacité des protéines virales à moduler l'activité apoptotique cellulaire. Le traitement par PRIMA-1 n'a pas permis d'observer de différences dans la réponse apoptotique aux UV entre les cellules transduites par E6 et E7 et les cellules témoins. Il serait intéressant de transfecter ces cellules avec une protéine p53 sauvage afin de vérifier si, comme le suggère les travaux de Dong *et al.*, l'activité des protéines virales est dépendante du statut de p53 (Dong *et al.*, 2008). L'utilisation de cellules déficientes pour p53 pourrait également être envisagée. De plus, les altérations cellulaires ayant conduit à l'immortalisation de ces cellules pourraient concerner d'autres protéines cellulaires nécessaires à l'activité des protéines virales, comme la protéine p73.

L'absence d'adéquation entre les différentes études sur l'effet des protéines E6 et E7 dans l'apoptose induite par les UV souligne la complexité des mécanismes impliqués. Le modèle cellulaire (modèle murin, kératinocytes humains primaires, lignées kératinocytaires), le type d'HPV, le statut de p53, le génotype de p53, l'expression de la protéine E6 seule ou des protéines E6 et E7 ainsi que leur niveau d'expression sont autant de paramètres qui divergent dans ces différentes études et qui pourraient influencer de façon notable les résultats observés. De plus, dans ces travaux, comme dans notre étude, les gènes E6 et E7 sont sous la dépendance de promoteurs puissants, conduisant à une expression protéique probablement supérieure à celle présente dans la réalité d'une cellule infectée par un génome viral complet, et possédant un promoteur beaucoup plus faible.

En dehors de l'inhibition possible de l'apoptose kératinocytaire induite par les UV, plusieurs auteurs ont suggéré d'autres hypothèses physiopathogéniques sur le rôle carcinogène des HPV bêta. Ainsi, la protection contre le stress oxydant généré par les UV pourra permettre la persistance virale au sein de kératinocytes (Mouret *et al.*, 2005). Les protéines virales E6 et E7 sont capables de perturber la régulation du cycle cellulaire conduisant à une prolifération cellulaire accrue (Caldeira *et al.*, 2003). De plus, ces protéines peuvent inhiber la réparation de l'ADN (Giampieri and Storey, 2004; Iftner *et al.*, 2002) et activer la télomérase (Gabet *et al.*, 2008), aboutissant à la transformation cellulaire. Enfin, la capacité de dégradation de la membrane peut permettre la dissémination métastatique (Akgul *et al.*, 2005a). Ainsi, bien que le rôle carcinogène des HPV bêta semble probable pour certains types viraux (HPV 8, 20, 27 et 38) comme l'ont suggéré les études réalisées sur les modèles animaux, leur implication dans la carcinogène cutanée demeure encore très mal connue (Tableau 3). Ainsi, l'absence de différence dans la prévalence de l'infection entre les cancers cutanés et la peau saine, la multiplicité des types viraux présents, l'incapacité des HPV bêta à exprimer l'oncoprotéine E5, la fréquente détection d'HPV 16 dans les lésions cutanées et la faible charge virale détectée dans les carcinomes sont autant d'arguments en faveur d'une infection ubiquitaire non pathogène. En revanche, il est possible que l'infection cutanée par HPV bêta joue aussi un rôle bénéfique pour l'Homme. Ainsi, les HPV seraient impliqués dans les phénomènes de régénération tissulaire (Favre *et al.*, 2000). Dans cette hypothèse, les effets immunosuppresseurs des UV permettraient la formation d'une niche écologique favorable à l'infection, la réplication et la dissémination de ces virus dont les propriétés oncogéniques ne se révéleraient que lors de désordres cutanés tels qu'une immunosuppression sévère (cf dégâts collatéraux).

Le développement de nouveaux modèles d'études pourrait permettre de mieux caractériser le rôle des HPV dans la carcinogenèse cutanée. Des travaux sont actuellement conduits afin de générer des pseudo-virions infectants, capable d'encapsider un génome viral complet. La perspective d'un tel système constituerait une avancée notable, permettant de se rapprocher des conditions physiologiques de l'infection par HPV.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, portant sur plusieurs modèles d'infection épithéliale par des HPV, nous nous sommes intéressés à différents facteurs de risque de la carcinogenèse épithéliale associée à HPV.

L'analyse du polymorphisme du codon 72 de l'exon 4 de p53 au sein de tumeurs péniennes ne nous a pas permis de confirmer les travaux de Storey *et al.* (Storey *et al.*, 1998). L'absence de corrélation entre ce polymorphisme et le développement de carcinomes épidermoïdes péniens, suggère l'existence d'autres cofacteurs intervenant dans la carcinogenèse associée à l'infection par HPV. Les radiations UV, puissants facteurs mutagènes, pourraient représenter le cofacteur impliqué dans la carcinogenèse cutanée. Les nombreuses études fondamentales menées ces dernières années ont permis de mettre en évidence différents mécanismes d'inhibition de l'apoptose induite par les UVB (Dong *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2000; Jackson and Storey, 2000; Struijk *et al.*, 2008; Underbrink *et al.*, 2008). Nous n'avons pas pu confirmer ces résultats dans notre modèle cellulaire, mais les différences entre ce modèle cellulaire et les conditions physiologiques d'une infection par HPV pourraient expliquer les difficultés à mettre en évidence un mécanisme carcinogène pour les HPV bêta.

Le rôle des HPV bêta, en particulier de l'HPV 5, dans la carcinogenèse cutanée reste à démontrer, mais la présence de ce virus au sein des tumeurs cutanées des patients immunodéprimés suggère que ce virus pourrait, dans certaines conditions particulières, participer au développement tumoral cutané.

Les progrès des techniques de biologie moléculaire ont permis ces dernières années de confirmer le caractère commensal et ubiquitaire de l'infection cutanée par HPV. Si un petit nombre d'HPV bêta sont sans doute capables de jouer un rôle de cofacteurs dans la carcinogenèse cutanée, d'autres facteurs de risque comme le statut immunitaire de l'hôte ou certains polymorphismes génétiques sont probablement indispensables pour permettre l'action de ces virus. Enfin, il ne faut pas oublier que le plus souvent, l'infection cutanée à HPV reste asymptomatique, voire bénigne suggérant de nombreuses questions, en particulier sur les raisons physiologiques de la tolérance et la persistance de cette infection commune au cours de l'évolution humaine. A la différence de l'infection muqueuse par HPV alpha qui bénéficie depuis 2 ans d'une vaccination préventive, de nombreux aspects de l'infection cutanée par HPV bêta restent encore inexplicables et devront être éclaircis afin de mieux préciser les futures stratégies thérapeutiques.

De plus, le fait que les HPV bêta soient des virus défectifs pour les gènes E5 et E8 joue probablement un rôle dans le faible pouvoir carcinogène de ces virus.

Références bibliographiques

A

- Accardi R, Dong W, Smet A, Cui R, Hautefeuille A, Gabet AS, *et al.* (2006) Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73. *EMBO Rep* 7:334-340.
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM (2004) The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4954-4959.
- Akgul B, Garcia-Escudero R, Ghali L, Pfister HJ, Fuchs PG, Navsaria H, *et al.* (2005a) The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res* 65:2216-2223.
- Akgul B, Lemme W, Garcia-Escudero R, Storey A, Pfister HJ (2005b) UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch Virol* 150:145-151.
- Alamartine E, Berthoux P, Mariat C, Cambazard F, Berthoux F (2003) Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation. *J Invest Dermatol* 120:99-103.
- Alarcon-Vargas D, Ronai Z (2002) p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23:541-547.
- Amella CA, Lofgren LA, Ronn AM, Nouri M, Shikowitz MJ, Steinberg BM (1994) Latent infection induced with cottontail rabbit papillomavirus. A model for human papillomavirus latency. *Am J Pathol* 144:1167-1171.
- Amundson SA, Patterson A, Do KT, Fornace AJ, Jr. (2002) A nucleotide excision repair master-switch: p53 regulated coordinate induction of global genomic repair genes. *Cancer Biol Ther* 1:145-149.
- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG (2000) The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 74:11636-11641.
- Applebaum KM, Karagas MR, Hunter DJ, Catalano PJ, Byler SH, Morris S, *et al.* (2007) Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, arsenic exposure, and non-melanoma skin cancer in New Hampshire. *Environ Health Perspect* 115:1231-1236.
- Aragane Y, Kulms D, Metzke D, Wilkes G, Poppelmann B, Luger TA, *et al.* (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140:171-182.
- Armstrong BK, Kricger A (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63:8-18.
- Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, Stern JE, Argenyi ZB, Raugi GJ, *et al.* (2008) Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 128:1409-1417.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
- Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS (2006) Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res* 120:208-211.
- Assefa Z, Garmyn M, Vantieghem A, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, *et al.* (2003) Ultraviolet B radiation-induced apoptosis in human keratinocytes: cytosolic activation of procaspase-8 and the role of Bcl-2. *FEBS Lett* 540:125-132.
- Aubin F (2003) Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *Eur J Dermatol* 13:515-523.
- Aubin F, Pretet JL, Jacquard AC, Saunier M, Carcopino X, Jaroud F, *et al.* (2008) Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: a Large French National Study (EDiTH IV). *Clin Infect Dis* 47:610-615.
- Aubin F, Puzenat E, Arveux P, Louvat P, Quencez E, Humbert P (2001) Genital squamous cell carcinoma in men treated by photochemotherapy. A cancer registry-based study from 1978 to 1998. *Br J Dermatol* 144:1204-1206.
- Aubin F, Saas P (2007) [Regulatory T cells]. *Ann Dermatol Venereol* 134:167-172.
- Aubin F (2002) Photoimmunologie. *Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris) Dermatologie* 98-780-A-10, 7 p.

B

- Bachmann F, Buechner SA, Wernli M, Strebel S, Erb P (2001) Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and TRAIL receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *J Invest Dermatol* 117:59-66.
- Baken LA, Koutsky LA, Kuypers J, Kosorok MR, Lee SK, Kiviat NB, *et al.* (1995) Genital human papillomavirus infection among male and female sex partners: prevalence and type-specific concordance. *J Infect Dis* 171:429-432.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, *et al.* (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:3635-3648.
- Balmanno K, Cook SJ (1999) Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* 18:3085-3097.
- Balmanno K, Cook SJ (2008) Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.*
- Baptiste N, Friedlander P, Chen X, Prives C (2002) The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene* 21:9-21.
- Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-sang J, Giuliano AR (2007) Incidence trends in primary malignant penile cancer. *Urol Oncol* 25:361-367.
- Barron BA, Richart RM (1968) A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst* 41:1343-1353.
- Barth J (1987) [Johann Wilhelm Ritter (1776-1810) and the discovery of ultraviolet irradiation 185 years ago]. *Hautarzt* 38:301-303.
- Bastiaens MT, Struyk L, Tjong AHSP, Gruis N, ter Huurne J, Westendorp RG, *et al.* (2001) Cutaneous squamous cell carcinoma and p53 codon 72 polymorphism: a need for screening? *Mol Carcinog* 30:56-61.
- Batty DP, Wood RD (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241:193-204.
- Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, *et al.* (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44:266-270.
- Bendesky A, Rosales A, Salazar AM, Sordo M, Peniche J, Ostrosky-Wegman P (2007) p53 codon 72 polymorphism, DNA damage and repair, and risk of non-melanoma skin cancer. *Mutat Res* 619:38-44.
- Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S (1997) Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* 8:1277-1286.
- Blohme I, Brynner H (1985) Malignant disease in renal transplant patients. *Transplantation* 39:23-25.
- Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682-4689.
- Bosch FX, Munoz N (2002) The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 89:183-190.
- Bouwes Bavinck JN, Euvrard S, Naldi L, Nindl I, Proby CM, Neale R, *et al.* (2007) Keratotic skin lesions and other risk factors are associated with skin cancer in organ-transplant recipients: a case-control study in The Netherlands, United Kingdom, Germany, France, and Italy. *J Invest Dermatol* 127:1647-1656.
- Bouwes Bavinck JN, Hardie DR, Green A, Cutmore S, MacNaught A, O'Sullivan B, *et al.* (1996) The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* 61:715-721.
- Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, *et al.* (1997) Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 108:712-715.
- Boxman IL, Mulder LH, Russell A, Bouwes Bavinck JN, Green A, Ter Schegget J (1999) Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol* 141:246-249.
- Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, Green A (2000) Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and

- epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer* 86:118-121.
- Bravo IG, Alonso A (2004) Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J Virol* 78:13613-13626.
- Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, *et al.* (1999) The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 18:2449-2458.
- Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DP, Proby CM (2004) p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 122:1284-1292.
- Buechner S, Wernli M, Bachmann F, Harr T, Erb P (2002) Intralesional interferon in basal cell carcinoma: how does it work? *Recent Results Cancer Res* 160:246-250.
- Buechner SA, Wernli M, Harr T, Hahn S, Itin P, Erb P (1997) Regression of basal cell carcinoma by intralesional interferon-alpha treatment is mediated by CD95 (Apo-1/Fas)-CD95 ligand-induced suicide. *J Clin Invest* 100:2691-2696.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, *et al.* (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501.
- Buyru N, Tigli H, Dalay N (2003) P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep* 10:711-714.
- Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, *et al.* (2002) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 8:282-288.
- Bykov VJ, Selivanova G, Wiman KG (2003) Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* 39:1828-1834.

C

- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, *et al.* (2002) Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* 383:933-943.
- Caforio AL, Fortina AB, Piaserico S, Alaibac M, Tona F, Feltrin G, *et al.* (2000) Skin cancer in heart transplant recipients: risk factor analysis and relevance of immunosuppressive therapy. *Circulation* 102:III222-227.
- Cairey-Remonnay S, Humbey O, Mouglin C, Algros MP, Mauny F, Kanitakis J, *et al.* (2002) TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in cutaneous squamous cell carcinoma and benign epithelial lesions of renal transplant recipients and immunocompetent individuals: lack of correlation with human papillomavirus status. *J Invest Dermatol* 118:1026-1031.
- Calaluce R, Bearss DJ, Barrera J, Zhao Y, Han H, Beck SK, *et al.* (2004) Laminin-5 beta3A expression in LNCaP human prostate carcinoma cells increases cell migration and tumorigenicity. *Neoplasia* 6:468-479.
- Caldeira S, Zehbe I, Accardi R, Malanchi I, Dong W, Giarre M, *et al.* (2003) The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol* 77:2195-2206.
- Canman CE, Lim DS (1998) The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* 17:3301-3308.
- Carr J, Gyorfí T (2000) Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med* 20:235-255.
- Carrier F, Georgel PT, Pourquier P, Blake M, Kontny HU, Antinore MJ, *et al.* (1999) Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 19:1673-1685.
- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, *et al.* (2002) Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* 346:1105-1112.
- Castellsague X, Munoz N (2003) Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*:20-28.

- Cenci M, French D, Pisani T, Alderisio M, Lombardi AM, Marchese R, *et al.* (2003) p53 polymorphism at codon 72 is not a risk factor for cervical carcinogenesis in central Italy. *Anticancer Res* 23:1385-1387.
- Chan KW, Lam KY, Chan AC, Lau P, Srivastava G (1994) Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in penile carcinoma: a study of 41 cases using PCR. *J Clin Pathol* 47:823-826.
- Charleson FC, Norval M, Benton EC, Hunter JA (1992) Lymphoproliferative responses to human papillomaviruses in patients with cutaneous warts. *Br J Dermatol* 127:551-559.
- Charlot JF, Nicolier M, Pretet JL, Mouglin C (2006) Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 11:813-827.
- Charlot JF, Pretet JL, Haughey C, Mouglin C (2004) Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 9:333-343.
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. *Immunity* 7:821-830.
- Chen YC, Xu L, Guo YL, Su HJ, Hsueh YM, Smith TJ, *et al.* (2003) Genetic polymorphism in p53 codon 72 and skin cancer in southwestern Taiwan. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 38:201-211.
- Chipuk JE, Green DR (2003) p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J Clin Immunol* 23:355-361.
- Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, *et al.* (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18099-18104.
- Clere N, Bermont L, Fauconnet S, Lascombe I, Saunier M, Vettoretti L, *et al.* (2007) The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp Cell Res* 313:3239-3250.
- Cooper KD, Oberhelman L, Hamilton TA, Baadsgaard O, Terhune M, LeVee G, *et al.* (1992) UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR+ epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8497-8501.
- Cordano P, Gillan V, Bratlie S, Bouvard V, Banks L, Tommasino M, *et al.* (2008) The E6E7 oncoproteins of cutaneous human papillomavirus type 38 interfere with the interferon pathway. *Virology* 377:408-418.
- Cuesta KH, Palazzo JP, Mittal KR (1998) Detection of human papillomavirus in verrucous carcinoma from HIV-seropositive patients. *J Cutan Pathol* 25:165-170.
- Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND (2006) Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* 80:8940-8950.
- Cupp MR, Malek RS, Goellner JR, Espy MJ, Smith TF (1996) Detection of human papillomavirus DNA in primary squamous cell carcinoma of the male urethra. *Urology* 48:551-555.
- Czarnecki D, Zalberg J, Kulinskaya E, Kay T (1995) Impaired cell-mediated immunity of apparently normal patients who had multiple skin cancers. *Cancer* 76:228-231.

D

- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905-2927.
- Davidson EJ, Boswell CM, Sehr P, Pawlita M, Tomlinson AE, McVey RJ, *et al.* (2003) Immunological and clinical responses in women with vulval intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins. *Cancer Res* 63:6032-6041.
- Daya-Grosjean L, Dumaz N, Sarasin A (1995) The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol B* 28:115-124.

- Daynes RA, Spellman CW (1977) Evidence for the generation of suppressor cells by ultraviolet radiation. *Cell Immunol* 31:182-187.
- de Gruijl FR, Sterenborg HJ, Forbes PD, Davies RE, Cole C, Kelfkens G, *et al.* (1993) Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice. *Cancer Res* 53:53-60.
- de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, ter Schegget J, Vermeer BJ, de Fijter JW, Bruijn JA, *et al.* (2000) The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer. *Transplantation* 69:44-49.
- de Koning MN, Struijk L, Bavinck JN, Kleter B, ter Schegget J, Quint WG, *et al.* (2007) Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J Gen Virol* 88:1489-1495.
- de Villiers EM (1989) Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 63:4898-4903.
- de Villiers EM (1998) Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother* 52:26-33.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- de Villiers EM, Ruhland A, Sekaric P (1999) Human papillomaviruses in non-melanoma skin cancer. *Semin Cancer Biol* 9:413-422.
- Decraene D, Agostinis P, Pupe A, de Haes P, Garmyn M (2001) Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein. *J Photochem Photobiol B* 63:78-83.
- Derancourt C, Mougin C, Chopard Lallier M, Coumes-Marquet S, Drobacheff C, Laurent R (2001) [Oncogenic human papillomaviruses in extra-genital Bowen disease revealed by in situ hybridization]. *Ann Dermatol Venereol* 128:715-718.
- Desaintes C, Demeret C (1996) Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* 7:339-347.
- Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M (1992) The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71:1081-1091.
- Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ (2000) Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*:189-193.
- Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R (2005) Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol* 79:5839-5846.
- Dolei A, Curreli S, Marongiu P, Pierangeli A, Gomes E, Bucci M, *et al.* (1999) Human immunodeficiency virus infection in vitro activates naturally integrated human papillomavirus type 18 and induces synthesis of the L1 capsid protein. *J Gen Virol* 80 (Pt 11):2937-2944.
- Dong W, Arpin C, Accardi R, Gissmann L, Sylla BS, Marvel J, *et al.* (2008) Loss of p53 or p73 in human papillomavirus type 38 E6 and E7 transgenic mice partially restores the UV-activated cell cycle checkpoints. *Oncogene* 27:2923-2928.
- Dong W, Kloz U, Accardi R, Caldeira S, Tong WM, Wang ZQ, *et al.* (2005) Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. *J Virol* 79:14899-14908.
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S7-15.
- Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH (1986) Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J* 5:355-362.
- Douki T, Cadet J (1995) UV and nucleic acids. *EXS* 73:173-197.
- Ducloux D, Carron PL, Racadot E, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Saint-Hillier Y, *et al.* (1998) CD4 lymphocytopenia in long-term renal transplant recipients. *Transplant Proc* 30:2859-2860.
- Duensing S, Duensing A, Flores ER, Do A, Lambert PF, Munger K (2001) Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol* 75:7712-7716.
- Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonnayom S, Gonzalez S, *et al.* (2000) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10002-10007.

- Duensing S, Munger K (2002a) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 62:7075-7082.
- Duensing S, Munger K (2002b) Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 21:6241-6248.
- Duensing S, Munger K (2004) Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 109:157-162.
- Dumaz N, Drougard C, Sarasin A, Daya-Grosjean L (1993) Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10529-10533.
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357-365.

E

- Eckert RL, Efimova T, Dashti SR, Balasubramanian S, Deucher A, Crish JF, *et al.* (2002) Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J Invest Dermatol Symp Proc* 7:36-40.
- EI-Mahdy MA, Hamada FM, Wani MA, Zhu Q, Wani AA (2000) p53-degradation by HPV-16 E6 preferentially affects the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and sensitizes mammary epithelial cells to UV-irradiation. *Mutat Res* 459:135-145.
- Elwood JM, Jopson J (1997) Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 73:198-203.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, *et al.* (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273:14363-14367.
- Enninga IC, Groenendijk RT, Filon AR, van Zeeland AA, Simons JW (1986) The wavelength dependence of u.v.-induced pyrimidine dimer formation, cell killing and mutation induction in human diploid skin fibroblasts. *Carcinogenesis* 7:1829-1836.
- Erkek E, Bozdogan O, Atasoy P, Birol A, Kocak M (2004) BCL-2-related apoptosis markers in cutaneous human papillomavirus-associated lesions. *Am J Dermatopathol* 26:113-118.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13:341-390.
- Euvrard S, Chardonnet Y, Pouteil-Noble CP, Kanitakis J, Thivolet J, Touraine JL (1993) Skin malignancies and human papillomaviruses in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 25:1392-1393.
- Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Disant F, Dureau G, Finaz de Villaine J, *et al.* (1995a) Aggressive squamous cell carcinomas in organ transplant recipients. *Transplant Proc* 27:1767-1768.
- Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Dureau G, Touraine JL, Faure M, *et al.* (1995b) Comparative epidemiologic study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol* 33:222-229.
- Eveno E, Bourre F, Quilliet X, Chevallier-Lagente O, Roza L, Eker AP, *et al.* (1995) Different removal of ultraviolet photoproducts in genetically related xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy diseases. *Cancer Res* 55:4325-4332.

F

- Fan H, Oro AE, Scott MP, Khavari PA (1997) Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nat Med* 3:788-792.
- Favre M, Majewski S, Noszczyk B, Maienfisch F, Pura A, Orth G, *et al.* (2000) Antibodies to human papillomavirus type 5 are generated in epidermal repair processes. *J Invest Dermatol* 114:403-407.
- Fazel N, Wilczynski S, Lowe L, Su LD (1999) Clinical, histopathologic, and molecular aspects of cutaneous human papillomavirus infections. *Dermatol Clin* 17:521-536, viii.
- Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM (2007) Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 25:1606-1620.

- Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, Gallee MP, Raaphorst FM, von Knebel Doeberitz M, *et al.* (2003) Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. *J Pathol* 201:109-118.
- Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279:25729-25744.
- Fisher MS, Kripke ML (1977) Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1688-1692.
- Fisher MS, Kripke ML (1978) Further studies on the tumor-specific suppressor cells induced by ultraviolet radiation. *J Immunol* 121:1139-1144.
- Flatt PM, Pietsenpol JA (2000) Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug Metab Rev* 32:283-305.
- Ford JM, Baron EL, Hanawalt PC (1998) Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* 58:599-603.
- Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG (1999) A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 80 (Pt 9):2437-2443.
- Fortina AB, Caforio AL, Piaserico S, Alaibac M, Tona F, Feltrin G, *et al.* (2000) Skin cancer in heart transplant recipients: frequency and risk factor analysis. *J Heart Lung Transplant* 19:249-255.
- Frazer IH, Thomas R, Zhou J, Leggatt GR, Dunn L, McMillan N, *et al.* (1999) Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev* 168:131-142.
- Frolov MV, Dyson NJ (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 117:2173-2181.
- Fryer AA, Ramsay HM, Lovatt TJ, Jones PW, Hawley CM, Nicol DL, *et al.* (2005) Polymorphisms in glutathione S-transferases and non-melanoma skin cancer risk in Australian renal transplant recipients. *Carcinogenesis* 26:185-191.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 11:2090-2100.

G

- Gabet AS, Accardi R, Bellopede A, Popp S, Boukamp P, Sylla BS, *et al.* (2008) Impairment of the telomere/telomerase system and genomic instability are associated with keratinocyte immortalization induced by the skin human papillomavirus type 38. *FASEB J* 22:622-632.
- Garland CF, Garland FC, Gorham ED (2003) Epidemiologic evidence for different roles of ultraviolet A and B radiation in melanoma mortality rates. *Ann Epidemiol* 13:395-404.
- Giampieri S, Garcia-Escudero R, Green J, Storey A (2004) Human papillomavirus type 77 E6 protein selectively inhibits p53-dependent transcription of proapoptotic genes following UV-B irradiation. *Oncogene* 23:5864-5870.
- Giampieri S, Storey A (2004) Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer* 90:2203-2209.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565-1570.
- Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R (2000) Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 19:5270-5280.
- Graham S, Priore R, Graham M, Browne R, Burnett W, West D (1979) Genital cancer in wives of penile cancer patients. *Cancer* 44:1870-1874.
- Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS (2004) Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 210:151-157.

- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445:851-857.
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, Haas GP, Lancaster WD (1995) Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87:1705-1709.
- Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, Brash DE, Tognin S, Marchisio PC, *et al.* (2001a) Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest* 108:991-999.
- Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC (2001b) Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:635-640.
- Grossman L, Wei Q (1995) DNA repair and epidemiology of basal cell carcinoma. *Clin Chem* 41:1854-1863.
- Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM (2007) Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 370:59-67.
- Gutierrez-Steil C, Wrone-Smith T, Sun X, Krueger JG, Coven T, Nickoloff BJ (1998) Sunlight-induced basal cell carcinoma tumor cells and ultraviolet-B-irradiated psoriatic plaques express Fas ligand (CD95L). *J Clin Invest* 101:33-39.

H

- Hakozaki T, Date A, Yoshii T, Toyokuni S, Yasui H, Sakurai H (2008) Visualization and characterization of UVB-induced reactive oxygen species in a human skin equivalent model. *Arch Dermatol Res* 300 Suppl 1:S51-56.
- Harris CC (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88:1442-1455.
- Hartley KA, Alexander KA (2002) Human TATA binding protein inhibits human papillomavirus type 11 DNA replication by antagonizing E1-E2 protein complex formation on the viral origin of replication. *J Virol* 76:5014-5023.
- Harwood CA, Proby CM (2002) Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 15:101-114.
- Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, Leigh IM, Hawke JL, Proby CM, *et al.* (1998) Detection of human papillomavirus DNA in PUVA-associated non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 111:123-127.
- Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, *et al.* (2000) Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 61:289-297.
- Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, Proby CM, Bordea C, Leigh IM, *et al.* (2004) Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br J Dermatol* 150:949-957.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296-299.
- Hazard K, Karlsson A, Andersson K, Ekberg H, Dillner J, Forslund O (2007) Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. *J Invest Dermatol* 127:116-119.
- Heideman DA, Waterboer T, Pawlita M, Delis-van Diemen P, Nindl I, Leijte JA, *et al.* (2007) Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 25:4550-4556.
- Henner WD, Evans AJ, Hough KM, Harris EL, Lowe BA, Beer TM (2001) Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *Prostate* 49:263-266.
- Henseleit U, Rosenbach T, Kolde G (1996) Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 288:676-683.
- Henseleit U, Zhang J, Wanner R, Haase I, Kolde G, Rosenbach T (1997) Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109:722-727.

- Hildesheim J, Bulavin DV, Anver MR, Alvord WG, Hollander MC, Vardanian L, *et al.* (2002) Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res* 62:7305-7315.
- Ho GY, Burk RD, Fleming I, Klein RS (1994) Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56:788-792.
- Humbey O, Aubin F, Cairey-Remonnay S, Riethmuller D, Pretet JL, Fest T, *et al.* (2002) TP53 polymorphism at exon 4 in caucasian women from eastern France: lack of correlation with HPV status and grade of cervical precancerous lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 103:60-64.
- Humbey O, Cairey-Remonnay S, Guerrini JS, Algros MP, Mouglin C, Bittard H, *et al.* (2003) Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* 39:684-690.
- Hwang A, Muschel RJ (1998) Radiation and the G2 phase of the cell cycle. *Radiat Res* 150:S52-59.
- Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G (1999) Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:424-428.

I

- Ibuki Y, Allanson M, Dixon KM, Reeve VE (2007) Radiation sources providing increased UVA/UVB ratios attenuate the apoptotic effects of the UVB waveband UVA-dose-dependently in hairless mouse skin. *J Invest Dermatol* 127:2236-2244.
- Iftner A, Klug SJ, Garbe C, Blum A, Stancu A, Wilczynski SP, *et al.* (2003) The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res* 63:7515-7519.
- Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, *et al.* (2002) Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J* 21:4741-4748.
- Ikehata H, Kawai K, Komura J, Sakatsume K, Wang L, Imai M, *et al.* (2008) UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. *J Invest Dermatol* 128:2289-2296.
- Inserra P, Abrahamsen M, Papenfuss M, Giuliano AR (2003) Ethnic variation of the P53 codon 72 polymorphism, HPV persistence, and cervical cancer risk. *Int J STD AIDS* 14:800-804.

J

- Jablonska S, Majewski S (1994) Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:157-175.
- Jablonska S, Majewski S, Obalek S, Orth G (1997) Cutaneous warts. *Clin Dermatol* 15:309-319.
- Jackson S, Ghali L, Harwood C, Storey A (2002) Reduced apoptotic levels in squamous but not basal cell carcinomas correlates with detection of cutaneous human papillomavirus. *Br J Cancer* 87:319-323.
- Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A (2000) Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 14:3065-3073.
- Jackson S, Storey A (2000) E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 19:592-598.
- Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS (2004) Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet* 85:301-308.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007) Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57:43-66.
- Jensen P, Hansen S, Moller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O, *et al.* (1999) Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* 40:177-186.
- Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69:2989-2997.

Jeon S, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1654-1658.

Jin S, Levine AJ (2001) The p53 functional circuit. *J Cell Sci* 114:4139-4140.

Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, *et al.* (1996) Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14025-14029.

K

Kabsch K, Alonso A (2002) The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* 76:12162-12172.

Kalderon D (2005) The mechanism of hedgehog signal transduction. *Biochem Soc Trans* 33:1509-1512.

Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, Garrard WT, Widlak P (2005) Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis* 10:821-830.

Kang HY, Song J, Im S (2000) Verruca vulgaris following treatment of vitiligo with epidermal grafting. *Br J Dermatol* 143:645-646.

Kappes UP, Luo D, Potter M, Schulmeister K, Runger TM (2006) Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J Invest Dermatol* 126:667-675.

Karagas MR, Nelson HH, Sehr P, Waterboer T, Stukel TA, Andrew A, *et al.* (2006) Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst* 98:389-395.

Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, *et al.* (2000) p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res* 60:2753-2755.

Kelly DA, Walker SL, McGregor JM, Young AR (1998) A single exposure of solar simulated radiation suppresses contact hypersensitivity responses both locally and systemically in humans: quantitative studies with high-frequency ultrasound. *J Photochem Photobiol B* 44:130-142.

Keresztes G, Mutai H, Heller S (2003) TMC and EVER genes belong to a larger novel family, the TMC gene family encoding transmembrane proteins. *BMC Genomics* 4:24.

Kikugawa K, Beppu M (1987) Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross-linked proteins. *Chem Phys Lipids* 44:277-296.

Kilkenny M, Marks R (1996) The descriptive epidemiology of warts in the community. *Australas J Dermatol* 37:80-86.

Kilkenny M, Merlin K, Plunkett A, Marks R (1998) The prevalence of common skin conditions in Australian school students: 3. acne vulgaris. *Br J Dermatol* 139:840-845.

Kim RH, Yochim JM, Kang MK, Shin KH, Christensen R, Park NH (2008) HIV-1 Tat enhances replicative potential of human oral keratinocytes harboring HPV-16 genome. *Int J Oncol* 33:777-782.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, *et al.* (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579-5588.

Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E (2008) Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27:2532-2541.

Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M (1997) Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11612-11616.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, *et al.* (2001) Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92:276-284.

Klein RS, Ho GY, Vermund SH, Fleming I, Burk RD (1994) Risk factors for squamous intraepithelial lesions on Pap smear in women at risk for human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 170:1404-1409.

Kobayashi S, Hirota Y, Sayato-Suzuki J, Takehana M, Nishimura H, Nishimura N, *et al.* (1994) Possible role of metallothionein in the cellular defense mechanism against UVB irradiation in neonatal human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* 59:650-656.

- Koning TM, Davies RJ, Kaptein R (1990) The solution structure of the intramolecular photoproduct of d(TpA) derived with the use of NMR and a combination of distance geometry and molecular dynamics. *Nucleic Acids Res* 18:277-284.
- Koss LG, Durfee GR (1956) Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 63:1245-1261.
- Koushik A, Platt RW, Franco EL (2004) p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:11-22.
- Krinsky NI (1993) Actions of carotenoids in biological systems. *Annu Rev Nutr* 13:561-587.
- Kripke ML (1974) Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* 53:1333-1336.
- Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325 (Pt 1):1-16.
- Kubo Y, Urano Y, Fukuhara K, Matsumoto K, Arase S (1998) Lack of mutation in the INK4a locus in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 139:340-341.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7491-7495.
- Kulms D, Poppelmann B, Yarosh D, Luger TA, Krutmann J, Schwarz T (1999) Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7974-7979.
- Kumar S, Sharma ND, Davies RJ, Phillipson DW, McCloskey JA (1987) The isolation and characterisation of a new type of dimeric adenine photoproduct in UV-irradiated deoxyadenylates. *Nucleic Acids Res* 15:1199-1216.
- Kunisada M, Sakumi K, Tominaga Y, Budiyanto A, Ueda M, Ichihashi M, *et al.* (2005) 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 65:6006-6010.
- Kuroda Y, Tsukino H, Nakao H, Imai H, Kato T (2003) p53 Codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk. *Cancer Lett* 189:77-83.

L

- Lacey HB, Wilson GE, Tilston P, Wilkins EG, Bailey AS, Corbitt G, *et al.* (1999) A study of anal intraepithelial neoplasia in HIV positive homosexual men. *Sex Transm Infect* 75:172-177.
- Lancaster WD, Olson C (1982) Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev* 46:191-207.
- Larsson PA, Liden S (1980) Prevalence of skin diseases among adolescents 12--16 years of age. *Acta Derm Venereol* 60:415-423.
- Laurent R, Kienzler JL (1985) Epidemiology of HPV infections. *Clin Dermatol* 3:64-70.
- Lazarczyk M, Pons C, Mendoza JA, Cassonnet P, Jacob Y, Favre M (2008) Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *J Exp Med* 205:35-42.
- Lazarczyk M, Favre M (2008) The role of Zn²⁺ ions in host-virus interactions. *J Virol*.
- Lear W, Dahlke E, Murray CA (2007) Basal cell carcinoma: review of epidemiology, pathogenesis, and associated risk factors. *J Cutan Med Surg* 11:19-30.
- Leccia MT, Richard MJ, Beani JC, Faure H, Monjo AM, Cadet J, *et al.* (1993) Protective effect of selenium and zinc on UV-A damage in human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* 58:548-553.
- Levi JE, Kleter B, Quint WG, Fink MC, Canto CL, Matsubara R, *et al.* (2002) High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 40:3341-3345.
- Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, Villa L (1998) Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. *Int J Cancer* 76:779-783.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453-456.
- Leykauf K, Salek M, Schluter H, Lehmann WD, Alonso A (2004) Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol* 85:1427-1431.

- Lewandowsky F, Lutz W (1922) Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen haterkrankung (epidermodysplasia verruciformis). *Arch Dermatol syphilol* 141: 193-203.
- Li G, Ho VC, Mitchell DL, Trotter MJ, Tron VA (1997) Differentiation-dependent p53 regulation of nucleotide excision repair in keratinocytes. *Am J Pathol* 150:1457-1464.
- Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J (1998) Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li LH, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Uchiumi F, Ikejima T (2006) Silibinin Prevents UV-Induced HaCaT Cell Apoptosis Partly through Inhibition of Caspase-8 Pathway. *Biol Pharm Bull* 29:1096-1101.
- Lindahl T (2000) Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res* 462:129-135.
- Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, *et al.* (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61:351-359.
- Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397:172-175.
- Lopez-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS (2000) Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* 19:4611-4620.
- Lozano G, Elledge SJ (2000) p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature* 404:24-25.

M

- Maden C, Sherman KJ, Beckmann AM, Hislop TG, Teh CZ, Ashley RL, *et al.* (1993) History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:19-24.
- Maeda A, Beissert S, Schwarz T, Schwarz A (2008) Phenotypic and functional characterization of ultraviolet radiation-induced regulatory T cells. *J Immunol* 180:3065-3071.
- Maiman M, Fruchter RG, Guy L, Cuthill S, Levine P, Serur E (1993) Human immunodeficiency virus infection and invasive cervical carcinoma. *Cancer* 71:402-406.
- Majewski S, Jablonska S (1995) Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 131:1312-1318.
- Majewski S, Jablonska S (2002) Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations? *Arch Dermatol* 138:649-654.
- Majewski S, Malejczyk J, Jablonska S, Misiewicz J, Rudnicka L, Obalek S, *et al.* (1990) Natural cell-mediated cytotoxicity against various target cells in patients with epidermodysplasia verruciformis. *J Am Acad Dermatol* 22:423-427.
- Mallory SB, Baugh LS, Parker RK (1991) Warts in blacks versus whites. *Pediatr Dermatol* 8:91.
- Maltzman W, Czyzyk L (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4:1689-1694.
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275:16202-16212.
- Marte B, Finkelstein J, Anson L (2007) Skin Biology. *Nature* 445:833-833.
- Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA (2008) Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 27:2575-2582.
- Mathur RS, Mathur SP (2005) Vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action is mediated through HPV-E6 in HPV-positive cancers. *Gynecol Oncol* 97:206-213.
- Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Satoh K, Baeg GH, *et al.* (1996) Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Science* 272:1020-1023.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282:1893-1897.

- McCormack SJ, Brazinski SE, Moore JL, Jr., Werness BA, Goldstein DJ (1997) Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carcinoma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18. *Oncogene* 15:265-274.
- McGregor JM, Harwood CA, Brooks L, Fisher SA, Kelly DA, O'Nions J, *et al.* (2002) Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. *J Invest Dermatol* 119:84-90.
- Melbye M, Cote TR, Kessler L, Gail M, Biggar RJ (1994) High incidence of anal cancer among AIDS patients. The AIDS/Cancer Working Group. *Lancet* 343:636-639.
- Melnikova VO, Ananthaswamy HN (2005) Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res* 571:91-106.
- Mendoza JA, Jacob Y, Cassonnet P, Favre M (2006) Human papillomavirus type 5 E6 oncoprotein represses the transforming growth factor beta signaling pathway by binding to SMAD3. *J Virol* 80:12420-12424.
- Mermet I, Guerrini JS, Cairey-Remonnay S, Drobacheff C, Faivre B, Gaillard M, *et al.* (2007) Cervical intraepithelial neoplasia associated with epidermodysplasia verruciformis HPV in an HIV-infected patient: a manifestation of immune restoration syndrome. *Eur J Dermatol* 17:149-152.
- Meyer T, Arndt R, Christophers E, Nindl I, Stockfleth E (2001) Importance of human papillomaviruses for the development of skin cancer. *Cancer Detect Prev* 25:533-547.
- Meyer T, Arndt R, Christophers E, Stockfleth E (2000) Frequency and spectrum of HPV types detected in cutaneous squamous-cell carcinomas depend on the HPV detection system: a comparison of four PCR assays. *Dermatology* 201:204-211.
- Michel A, Kopp-Schneider A, Zentgraf H, Gruber AD, de Villiers EM (2006) E6/E7 expression of human papillomavirus type 20 (HPV-20) and HPV-27 influences proliferation and differentiation of the skin in UV-irradiated SKH-hr1 transgenic mice. *J Virol* 80:11153-11164.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, *et al.* (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11:577-590.
- Miller AJ, Mihm MC, Jr. (2006) Melanoma. *N Engl J Med* 355:51-65.
- Ming JE, Roessler E, Muenke M (1998) Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today* 4:343-349.
- Mitchell DL (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol* 48:51-57.
- Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2006) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13765-13770.
- Mouret S, Sauvaigo S, Peinnequin A, Favier A, Beani JC, Leccia MT (2005) E6* oncoprotein expression of human papillomavirus type-16 determines different ultraviolet sensitivity related to glutathione and glutathione peroxidase antioxidant defence. *Exp Dermatol* 14:401-410.
- Moyal DD, Fourtanier AM (2008) Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet-simulated radiation and natural sunlight-induced immunosuppression in human beings. *J Am Acad Dermatol* 58:S149-154.
- Moysan A, Marquis I, Gaboriau F, Santus R, Dubertret L, Morliere P (1993) Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 100:692-698.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, *et al.* (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78:11451-11460.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, *et al.* (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-527.

N

- Nagano T, Kunisada M, Yu X, Masaki T, Nishigori C (2008) Involvement of interleukin-10 promoter polymorphisms in nonmelanoma skin cancers—a case study in non-Caucasian skin cancer patients. *Photochem Photobiol* 84:63-66.

- Nakagawa S, Huibregtse JM (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 20:8244-8253.
- Nakazawa H, English D, Randell PL, Nakazawa K, Martel N, Armstrong BK, *et al.* (1994) UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:360-364.
- Naldi L, Fortina AB, Lovati S, Barba A, Gotti E, Tessari G, *et al.* (2000) Risk of nonmelanoma skin cancer in Italian organ transplant recipients. A registry-based study. *Transplantation* 70:1479-1484.
- Narayana AS, Olney LE, Loening SA, Weimar GW, Culp DA (1982) Carcinoma of the penis: analysis of 219 cases. *Cancer* 49:2185-2191.
- Nelson HH, Kelsey KT, Mott LA, Karagas MR (2002) The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res* 62:152-155.
- Nguyen MM, Nguyen ML, Caruana G, Bernstein A, Lambert PF, Griep AE (2003) Requirement of PDZ-containing proteins for cell cycle regulation and differentiation in the mouse lens epithelium. *Mol Cell Biol* 23:8970-8981.
- Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Bacon P, Panella J, Denning MF (2002) Life and death signaling pathways contributing to skin cancer. *J Investig Dermatol Symp Proc* 7:27-35.
- Niki E (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44:227-253.
- Nonnenmacher M, Salmon J, Jacob Y, Orth G, Breitburd F (2006) Cottontail rabbit papillomavirus E8 protein is essential for wart formation and provides new insights into viral pathogenesis. *J Virol* 80:4890-4900.
- Nuovo GJ, MacConnell PB, Simsir A, Valea F, French DL (1995) Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res* 55:267-275.

O

- O'Brien JM (1995) Common skin problems of infancy, childhood, and adolescence. *Prim Care* 22:99-115.
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, *et al.* (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267:10709-10715.
- Orth G (2006) Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin Immunol* 18:362-374.
- Orth G (2008) Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. *Curr Top Microbiol Immunol* 321:59-83.
- Orth G, Favre M, Croissant O (1977) Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 24:108-120.
- Orth G, Jablonska S, Breitburd F, Favre M, Croissant O (1978) The human papillomaviruses. *Bull Cancer* 65:151-164.
- Ostor AG (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 12:186-192.

P

- Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Da Costa M, Bonner H, Jay N, *et al.* (2001) Effect of highly active antiretroviral therapy on the natural history of anal squamous intraepithelial lesions and anal human papillomavirus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 28:422-428.
- Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, *et al.* (1999) Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* 91:226-236.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, *et al.* (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111-113.

- Parkin DM (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2:533-543.
- Parkin DM, Bray F (2006) Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/11-25.
- Pascual A, Pariente M, Godinez JM, Sanchez-Prieto R, Atienzar M, Segura M, *et al.* (2007) High prevalence of human papillomavirus 16 in penile carcinoma. *Histol Histopathol* 22:177-183.
- Patel AS, Karagas MR, Perry AE, Nelson HH (2008) Exposure Profiles and Human Papillomavirus Infection in Skin Cancer: An Analysis of 25 Genus beta-Types in a Population-Based Study. *J Invest Dermatol*.
- Pegoraro RJ, Moodley M, Rom L, Chetty R, Moodley J (2003) P53 codon 72 polymorphism and BRCA 1 and 2 mutations in ovarian epithelial malignancies in black South Africans. *Int J Gynecol Cancer* 13:444-449.
- Penn I (2000) Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 23:101-113.
- Persky L, deKernion J (1986) Carcinoma of the penis. *CA Cancer J Clin* 36:258-273.
- Petrenko O, Zaika A, Moll UM (2003) deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol Cell Biol* 23:5540-5555.
- Peus D, Meves A, Vasa RA, Beyerle A, O'Brien T, Pittelkow MR (1999a) H2O2 is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. *Free Radic Biol Med* 27:1197-1202.
- Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR (1999b) UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 112:751-756.
- Peus D, Vasa RA, Meves A, Beyerle A, Pittelkow MR (2000) UVB-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation is critical for downstream signaling and keratinocyte survival. *Photochem Photobiol* 72:135-140.
- Pezeshki A, Sari-Aslani F, Ghaderi A, Doroudchi M (2006) p53 codon 72 polymorphism in basal cell carcinoma of the skin. *Pathol Oncol Res* 12:29-33.
- Pfefferle R, Marcuzzi GP, Akgul B, Kasper HU, Schulze F, Haase I, *et al.* (2008) The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol* 128:2310-2315.
- Pfister H, Ter Schegget J (1997) Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 15:335-347.
- Picconi MA, Eijan AM, Distefano AL, Pueyo S, Alonio LV, Gorostidi S, *et al.* (2000) Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas in Argentina: analysis of primary tumors and lymph nodes. *J Med Virol* 61:65-69.
- Pierceall WE, Goldberg LH, Tainsky MA, Mukhopadhyay T, Ananthaswamy HN (1991) Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog* 4:196-202.
- Pietenpol JA, Stewart ZA (2002) Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182:475-481.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, *et al.* (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92:713-723.
- Prose NS, von Knebel-Doeberitz C, Miller S, Milburn PB, Heilman E (1990) Widespread flat warts associated with human papillomavirus type 5: a cutaneous manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J Am Acad Dermatol* 23:978-981.
- Purdie KJ, Pennington J, Proby CM, Khalaf S, de Villiers EM, Leigh IM, *et al.* (1999) The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J* 18:5359-5369.
- Puzenat E, Humbert P, Laurent R, Aubin F, 2003. HPV et lésions cutanées bénignes de l'adulte. In: Papillomavirus humains: Biologie et pathologie tumorale (internationales TD-EM, ed). Londrs-Paris-New-York; 473-481.

Q

Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bacon P, Panella J, Choubey D, *et al.* (2002) Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene* 21:2991-3002.

R

Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Favre M, Orth G (1999) A susceptibility locus for epidermodysplasia verruciformis, an abnormal predisposition to infection with the oncogenic human papillomavirus type 5, maps to chromosome 17qter in a region containing a psoriasis locus. *J Invest Dermatol* 112:259-263.

Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M (2002) Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* 32:579-581.

Ramoz N, Taieb A, Rueda LA, Montoya LS, Bouadjar B, Favre M, *et al.* (2000) Evidence for a nonallelic heterogeneity of epidermodysplasia verruciformis with two susceptibility loci mapped to chromosome regions 2p21-p24 and 17q25. *J Invest Dermatol* 114:1148-1153.

Ramsay HM, Harden PN, Reece S, Smith AG, Jones PW, Strange RC, *et al.* (2001) Polymorphisms in glutathione S-transferases are associated with altered risk of nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients: a preliminary analysis. *J Invest Dermatol* 117:251-255.

Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, *et al.* (2003) Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 51:3-30.

Rey O, Lee S, Park NH (1999) Impaired nucleotide excision repair in UV-irradiated human oral keratinocytes immortalized with type 16 human papillomavirus genome. *Oncogene* 18:6997-7001.

Richart RM (1973) Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 8:301-328.

Rigel DS (2008) Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 58:S129-132.

Rodrigues LK, Baker T, Maurer T (2001) Cutaneous warts in HIV-positive patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *Arch Dermatol* 137:1103-1104.

Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H (2007) Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 157 Suppl 2:47-51.

Romanczuk H, Howley PM (1992) Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3159-3163.

Rosenstein BS, Mitchell DL (1987) Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* 45:775-780.

Rubben A, Kalka K, Spelten B, Grussendorf-Conen EI (1997) Clinical features and age distribution of patients with HPV 2/27/57-induced common warts. *Arch Dermatol Res* 289:337-340.

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, *et al.* (2001) Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 159:1211-1218.

Ruhland A, de Villiers EM (2001) Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines. *Int J Cancer* 91:828-834.

Runger TM (2007) How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: the role of cellular damage responses. *J Invest Dermatol* 127:2103-2105.

Runger TM, Kappes UP (2008) Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24:2-10.

Rust A, McGovern RM, Gostout BS, Persing DH, Pittelkow MR (2001) Human papillomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma and cervix of a patient with psoriasis and extensive ultraviolet radiation exposure. *J Am Acad Dermatol* 44:681-686.

S

- Sanchez-Aleman MA, Uribe-Salas F, Conde-Gonzalez CJ (2002) [Human papillomavirus infection, a possible biological marker of sexual behavior among university students]. *Salud Publica Mex* 44:442-447.
- Schafer A, Friedmann W, Mielke M, Schwartlander B, Koch MA (1991) The increased frequency of cervical dysplasia-neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus is related to the degree of immunosuppression. *Am J Obstet Gynecol* 164:593-599.
- Schaper ID, Marcuzzi GP, Weissenborn SJ, Kasper HU, Dries V, Smyth N, *et al.* (2005) Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* 65:1394-1400.
- Schlegel R, Wade-Glass M, Rabson MS, Yang YC (1986) The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science* 233:464-467.
- Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, *et al.* (1996) The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol* 70:1912-1922.
- Schwarz T (2008) 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells-from disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. *Photochem Photobiol* 84:10-18.
- Sekulic A, Haluska P, Jr., Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, *et al.* (2008) Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc* 83:825-846.
- Selinka HC, Giroglou T, Sapp M (2002) Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* 299:279-287.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707.
- Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, *et al.* (1996) Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst* 88:802-811.
- Shen H, Solari A, Wang X, Zhang Z, Xu Y, Wang L, *et al.* (2004) P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Rep* 11:1115-1120.
- Shiozaki EN, Shi Y (2004) Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 29:486-494.
- Sies H, Krinsky NI (1995) The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 62:1299S-1300S.
- Simbulan-Rosenthal CM, Veleno A, Veldman T, Schlegel R, Rosenthal DS (2002) HPV-16 E6/7 immortalization sensitizes human keratinocytes to ultraviolet B by altering the pathway from caspase-8 to caspase-9-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 277:24709-24716.
- Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF (2002) Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* 277:19346-19352.
- Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF (2004) Bax activation and induction of apoptosis in human keratinocytes by the protein kinase C delta catalytic domain. *J Invest Dermatol* 123:434-443.
- Smith ML, Chen IT, Zhan Q, O'Connor PM, Fornace AJ, Jr. (1995) Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10:1053-1059.
- Sobhani I, Vuagnat A, Walker F, Vissuzaine C, Mirin B, Hervatin F, *et al.* (2001) Prevalence of high-grade dysplasia and cancer in the anal canal in human papillomavirus-infected individuals. *Gastroenterology* 120:857-866.
- Soufir N, Moles JP, Vilmer C, Moch C, Verola O, Rivet J, *et al.* (1999) P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. *Oncogene* 18:5477-5481.
- Soulitzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA (2002) p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett* 179:175-183.
- Sourvinos G, Rizos E, Spandidos DA (2001) p53 Codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. *Oral Oncol* 37:572-578.
- Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, *et al.* (2004) TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 96:294-305.

- Steger G, Pfister H (1992) In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol* 125:355-360.
- Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, Salasche S, Papadopoulos L, Ulrich C, *et al.* (2002) A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol* 138:1498-1502.
- Storey A (2002) Papillomaviruses: death-defying acts in skin cancer. *Trends Mol Med* 8:417-421.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, *et al.* (1998) Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393:229-234.
- Struijk L, Bouwes Bavinck JN, Wannings P, van der Meijden E, Westendorp RG, Ter Schegget J, *et al.* (2003) Presence of human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs is associated with a history of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 121:1531-1535.
- Struijk L, van der Meijden E, Kazem S, ter Schegget J, de Gruijl FR, Steenbergen RD, *et al.* (2008) Specific betapapillomaviruses associated with squamous cell carcinoma of the skin inhibit UVB-induced apoptosis of primary human keratinocytes. *J Gen Virol* 89:2303-2314.
- Stubenrauch F, Laimins LA (1999) Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 9:379-386.
- Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T (2001) The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 75:4139-4149.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, *et al.* (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6062-6067.
- Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright TC, Jr. (1997) Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 337:1343-1349.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, *et al.* (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Suzuki K, Matsui H, Ohtake N, Nakata S, Takei T, Nakazato H, *et al.* (2003) A p53 codon 72 polymorphism associated with prostate cancer development and progression in Japanese. *J Biomed Sci* 10:430-435.
- Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Osterlind A, Meijer CJ, van den Brule AJ, 2002. Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. *Sex Transm Infect* 78:215-8.
- Svobodova A, Walterova D, Vostalova J (2006) Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150:25-38.
- Syrjanen KJ (1989) Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their associations with genital squamous cell cancer. Review article. *APMIS* 97:957-970.

I

- Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H (2001) Ultraviolet B irradiation induces apoptosis of keratinocytes by direct activation of Fas antigen. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6:64-68.
- Takasawa R, Nakamura H, Mori T, Tanuma S (2005) Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis* 10:1121-1130.
- Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM (1998) The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem* 273:6439-6445.
- Tan W, Schwartz S (1995) The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 counteracts the effect of an AU-rich negative element in the human papillomavirus type 1 late 3' untranslated region. *J Virol* 69:2932-2945.
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, *et al.* (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404:42-49.
- Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, *et al.* (2002) Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 21:5088-5096.

- Tie C, Golomb C, Taylor JR, Streilein JW (1995) Suppressive and enhancing effects of ultraviolet B radiation on expression of contact hypersensitivity in man. *J Invest Dermatol* 104:18-22.
- Tiwawech D, Srivatanakul P, Karaluk A, Ishida T (2003) The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 198:69-75.
- Tornesello ML, Buonaguro FM, Beth-Giraldo E, Giraldo G (1993) Human immunodeficiency virus type 1 tat gene enhances human papillomavirus early gene expression. *Intervirology* 36:57-64.
- Tornesello ML, Duraturo ML, Losito S, Botti G, Pilotti S, Stefanon B, *et al.* (2008) Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer* 122:132-137.
- Tsai TC, Chen SL (2003) The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 148:1445-1453.

U

- Ullrich SE (2005) Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutat Res* 571:185-205.
- Ullrich SE (2007) Sunlight and skin cancer: lessons from the immune system. *Mol Carcinog* 46:629-633.
- Ullrich SE, Kripke ML (1984) Mechanisms in the suppression of tumor rejection produced in mice by repeated UV irradiation. *J Immunol* 133:2786-2790.
- Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA (2008) The E6 proteins from multiple beta HPV types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*.
- Ustav M, Ustav E, Szymanski P, Stenlund A (1991) Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* 10:4321-4329.

V

- Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat Res* 195:137-149.
- Vahsen N, Cande C, Dupaigne P, Giordanetto F, Kroemer RT, Herker E, *et al.* (2006) Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene* 25:1763-1774.
- Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA (2002) GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 192:327-338.
- van der Burg SH, Kwappenberg KM, O'Neill T, Brandt RM, Melief CJ, Hickling JK, *et al.* (2001) Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. *Vaccine* 19:3652-3660.
- Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD (1992) Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 73 (Pt 10):2653-2660.
- Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R (2003) Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8211-8216.
- Veness MJ, Quinn DI, Ong CS, Keogh AM, Macdonald PS, Cooper SG, *et al.* (1999) Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience. *Cancer* 85:1758-1764.
- Vermund SH, Kelley KF, Klein RS, Feingold AR, Schreiber K, Munk G, *et al.* (1991) High risk of human papillomavirus infection and cervical squamous intraepithelial lesions among women with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Am J Obstet Gynecol* 165:392-400.
- Vernon SD, Hart CE, Reeves WC, Icenogle JP (1993) The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus 16 transcription. *Virus Res* 27:133-145.
- Vile GF, Tyrrell RM (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 268:14678-14681.
- Vogelstein B, Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70:523-526.

W

- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369:574-578.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, *et al.* (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
- Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE (2000) Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol* 115:141-148.
- Wei H, Cai Q, Rahn R, Zhang X (1997) Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA. *Free Radic Biol Med* 23:148-154.
- Weinstock MA, Coulter S, Bates J, Bogaars HA, Larson PL, Burmer GC (1995) Human papillomavirus and widespread cutaneous carcinoma after PUVA photochemotherapy. *Arch Dermatol* 131:701-704.
- Wikonkal NM, Brash DE (1999) Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4:6-10.
- Williams HC, Pottier A, Strachan D (1993) The descriptive epidemiology of warts in British schoolchildren. *Br J Dermatol* 128:504-511.
- Wolf P, Seidl H, Back B, Binder B, Hofler G, Quehenberger F, *et al.* (2004) Increased prevalence of human papillomavirus in hairs plucked from patients with psoriasis treated with psoralen-UV-A. *Arch Dermatol* 140:317-324.
- Wood RD (1996) DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 65:135-167.
- Wood RD (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 272:23465-23468.
- Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Makan N, Hong WK, *et al.* (2002) p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J Natl Cancer Inst* 94:681-690.

X

- Xie J (2008) Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol* 624:241-251.

Y

- Yamashita T, Segawa K, Fujinaga Y, Nishikawa T, Fujinaga K (1993) Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8. *Oncogene* 8:2433-2441.
- Yang Y, Li CC, Weissman AM (2004) Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* 23:2096-2106.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352:345-347.
- Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW (2001) alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 283:668-673.
- Yoshikawa T, Rae V, Bruins-Slot W, Van den Berg JW, Taylor JR, Streilein JW (1990) Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in humans. *J Invest Dermatol* 95:530-536.

Z

- Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, *et al.* (2002) DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* 196:765-780.
- Zhang B, Spandau DF, Roman A (2002) E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol* 76:220-231.
- Zhang B, Srirangam A, Potter DA, Roman A (2005) HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene* 24:2585-2588.
- Zhang JH, Li Y, Wang R, Wen DG, Wu ML, He M (2003) [p53 gene polymorphism with susceptibility to esophageal cancer and lung cancer in Chinese population]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 25:365-367.

- Zhivotovsky B, Hanson KP, Orrenius S (1998) Back to the future: the role of cytochrome c in cell death. *Cell Death Differ* 5:459-460.
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-439.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, *et al.* (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776.
- zur Hausen H (1977) Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 78:1-30.

Annexes

Publication n°4

Cancers cutanés non mélaniques et papillomavirus humains

Aubin F, Humbey O, Guerrini JS, Mougin C, Laurent R.

Ann Dermatol Venereol, 2003, (130):1131-8

Cancers cutanés non mélaniques et papillomavirus humains

F. AUBIN (1, 2), O. HUMBEY (1), J.-S. GUÉRRINI (1), C. MOUGIN (1), R. LAURENT (2)

Résumé

Si les radiations ultraviolettes (UV) sont considérées comme le principal agent environnemental responsable de la carcinogenèse cutanée non mélanique, d'autres co-facteurs tels que le statut immunitaire, une susceptibilité génétique ou une infection par papillomavirus humain (HPV) sont probablement impliqués. Il existe de nombreux arguments épidémiologiques, virologiques et moléculaires qui démontrent le rôle étiologique essentiel des HPV muqueux oncogènes dans le développement du cancer du col utérin. Par contre, la responsabilité des HPV dans la carcinogenèse cutanée fait toujours l'objet de controverses. L'association entre les HPV et les cancers cutanés non mélaniques a été initialement observée chez les patients souffrant d'épidermodysplasie verruciforme puis secondairement chez les patients transplantés d'organe. De plus, la majorité de ces tumeurs surviennent en peau exposée aux UV. Chez ces patients, l'ADN d'HPV muqueux et/ou cutané a été mis en évidence dans environ 60 à 90 p. 100 des tumeurs cutanées analysées, mais aussi dans les lésions cutanées pré-néoplasiques ou bénignes, et en peau saine. De même chez les sujets sains immunocompétents, la prévalence d'ADN d'HPV atteint environ 40 p. 100 que ce soit dans les tumeurs ou les lésions pré-néoplasiques cutanées ou en peau saine, en particulier dans les follicules pileux. Dans les tumeurs cutanées, aucun type viral d'HPV ne prédomine, et la charge virale est le plus souvent très faible. Bien que ces observations ne suggèrent pas un rôle direct des HPV dans la carcinogenèse cutanée non mélanique, elles n'excluent pas un effet carcinogène des oncoprotéines virales. Ainsi, les HPV muqueux oncogènes codent 2 oncoprotéines E6 et E7 qui inactivent respectivement les protéines suppresseurs de tumeurs p53 et pRb, et entraînent l'immortalisation des cellules épithéliales après transfection. De plus, l'existence d'un polymorphisme génétique de p53 sur le codon 72 serait un facteur de susceptibilité génétique pour la carcinogenèse cutanée induite par les HPV muqueux. A l'inverse, l'oncoprotéine E6 des HPV cutanés n'interagit pas avec p53, mais empêche l'apoptose induite par les UV et permet donc la survie des cellules épithéliales présentant des mutations induites par les UV. Enfin, les oncoprotéines E6 et E7 présenteraient une activité immunosuppressive locale favorisant la persistance de l'infection par HPV et l'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire. Ainsi, il existe actuellement de plus en plus d'arguments impliquant les HPV muqueux et cutanés dans la carcinogenèse cutanée non mélanique, en tant que co-facteur associé aux radiations UV et au statut immunitaire de l'hôte.

Summary

Ultraviolet radiation (UV) is considered as a key environmental risk factor of non-melanoma skin cancer (NMSC), but other factors such as immunological status, genetic predisposition and infection by human papillomavirus (HPV) may also be involved. Although there is overwhelming epidemiological and molecular evidence that indicates a direct role for specific mucosal HPV-types in anogenital cancers, in particular cervical cancer, the pathogenic role of HPV in the development of NMSC remains speculative. The association between HPV and NMSC was first identified in patients with epidermodysplasia verruciformis (EV) and later in recipients of organ transplants. All these patients develop NMSC at sun-exposed sites. Cutaneous and mucosal HPV-DNA have been detected in about 60 to 90 p. 100 of NMSC, but also in benign epithelial lesions, and even in normal skin. However and although at a lower rate (about 40 p. 100), HPV-DNA have also been detected in normal skin, in particular in hair follicles, and in premalignant lesions and in NMSC from non-EV and immunocompetent subjects. Furthermore, no particular HPV type predominates and the viral load in NMSC seems lower than in benign epithelial lesions. Although all these findings argue against a direct involvement of HPV in NMSC, they may suggest a "hit and run" mechanism which no longer requires the viral agent but the activity of HPV oncoproteins. High risk mucosal HPV-types encode two major oncoproteins, E6 and E7, which inactivate two suppressor proteins, p53 and pRb respectively, and are sufficient for host-cell immortalization. A polymorphism resulting in either a proline or an arginine at codon 72 may also be a relevant risk factor for mucosal HPV-types-associated NMSC. By contrast, E6 of skin HPV-types fails to interact with p53, but prevents infected cells from UV-induced apoptosis leading thus to the propagation of deleterious UV-induced mutations. Immunosuppressive activities of HPV E6 and E7 proteins permit persistent HPV infection and the impairment of immunologic removal of UV-damaged cells. These results support a role for HPV infection in skin carcinogenesis as a co-factor in association with UV and immunosuppression.

Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus.

F. AUBIN, O. HUMBEY, J.-S. GUÉRRINI, C. MOUGIN, R. LAURENT
Ann Dermatol Venerol 2003;130:1131-8
The full text of this article is available in English, free of charge, on the Web on: www.e2med.com/ad

Les cancers cutanés non mélaniques sont les cancers les plus fréquents dans la population caucasienne. Le rayonnement ultra-violet (UV) est reconnu comme un facteur de risque majeur pour ce type de cancers en raison, d'une part, de la localisation préférentielle des lésions sur des

(1) Laboratoire de Biologie Cellulaire, (2) Service de Dermatologie, CHU, 2, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex.

Tirés à part : F. AUBIN, à l'adresse ci-dessus.
E-mail : francois.aubin@ufc-chu.univ-fcomte.fr

zones photo-exposées et, d'autre part, de la détection très fréquente de mutations induites par les UV, en particulier sur les gènes suppresseurs de tumeur [1]. Par ailleurs, d'autres co-facteurs, d'ordre génétique (Xeroderma pigmentosum, syndrome de Gorlin...), viraux (papillomavirus humains), ou chimiques (goudrons, arsenic) peuvent intervenir. Ainsi, certains papillomavirus humains (HPV) potentiellement oncogènes sont capables d'infecter les cellules épidermiques. Parmi plus de 120 types d'HPV répertoriés à l'heure actuelle, on distingue deux grandes familles : les HPV muqueux et les HPV cutanés. Certains HPV muqueux (i.e. HPV16, HPV18) sont de puissants agents carcinogènes impliqués, entre autres, dans le développement du cancer du col de l'utérus [2, 3]. Mais ce sont les HPV cutanés qui sont le plus susceptibles d'interagir avec les UV dans le processus de carcinogénèse cutanée [4, 5], bien qu'une co-infection HPV muqueux et HPV cutané soit fréquemment retrouvée au sein des tumeurs cutanées.

Aspects épidémiologiques

CHEZ LES SUJETS IMMUNOCOMPÉTENTS

La présence d'HPV en peau saine chez les sujets immunocompétents est relativement fréquente. Les différences de prévalence de l'ADN d'HPV entre les différentes études sont expliqués par la variété des sondes et des amorces utilisées pour les techniques de biologie moléculaire. Les follicules pileux constituent d'importants réservoirs d'HPV. En effet, Boxman et al. ont montré que 45 p. 100 des volontaires sains (10/22) présentaient de l'ADN d'HPV de type épidermodysplasie verruciforme (EV) dans ces sites [6]. Toutefois, il serait intéressant de déterminer si d'autres types d'HPV sont présents dans les follicules pileux. Cependant, ces auteurs [6] n'ont pas retrouvé d'association significative entre la présence d'ADN d'HPV de type EV et le développement de cancers cutanés épithéliaux chez des sujets immunocompétents. En effet, si le spectre des HPV associés aux carcinomes épidermoïdes est beaucoup plus étendu [7-9], la prévalence des HPV n'est pas plus élevée que dans les tissus sains. Dans un travail récent, Cairey-Remonnay et al. [10] ont retrouvé de l'ADN d'HPV cutanés dans 6 cancers épidermoïdes cutanés sur un total de 51 (12 p. 100) chez des sujets immunocompétents, et 29 p. 100 des tumeurs présentaient de l'ADN d'HPV muqueux, principalement des HPV oncogènes 16 et 18. Dans une série de 28 maladies de Bowen extra-génitales de sujets immunocompétents, Derancourt et al. [11] ont aussi trouvé la présence d'ADN d'HPV muqueux oncogènes 16 et 18 dans 28,6 p. 100 des cas. La présence d'HPV n'est donc pas toujours associée à des lésions bénignes ou malignes et la responsabilité de ces virus dans la carcinogénèse épithéliale des sujets immunocompétents n'est pas établie ; d'autres cofacteurs, tels que les UV ou la réponse immunitaire, jouent vraisemblablement un rôle fondamental [4, 9, 12].

CHEZ LES PATIENTS IMMUNODÉPRIMÉS

Plusieurs études sont en faveur d'un rôle des UV dans la prévalence des HPV chez les sujets immunodéprimés. Les

patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme présentent un déficit génétique (vraisemblablement responsable d'un déficit de l'immunité cellulaire) conduisant à l'apparition de verrues sur toutes les parties du corps [13]. Un groupe particulier d'HPV (dont HPV 5 et HPV 8 qui ne sont pas à risque pour la population générale) sont retrouvés dans les lésions de ces patients [14]. Trente à 60 p. 100 des lésions cutanées chez ces patients sont à l'origine de lésions malignes et ce, exclusivement sur les zones photo-exposées. La fréquence de détection des HPV de type EV dans les lésions cancéreuses peut atteindre plus de 90 p. 100, fréquence similaire à celle des HPV à haut risque associés au cancer du col de l'utérus [2, 3].

L'association HPV et cancers cutanés chez les patients greffés rénaux a été largement étudiée et le risque cumulatif de développer un cancer de la peau est de 30 à 60 p. 100, 20 ans après la transplantation [15]. De l'ADN d'HPV est retrouvé dans plus de 90 p. 100 des lésions épithéliales bénignes de ces patients et dans près de 70 p. 100 des tumeurs épithéliales malignes [15]. Dans une étude contrôlée récente [10], nous avons retrouvé de l'ADN d'HPV (24,5 p. 100 d'HPV cutanés, 58,5 p. 100 d'HPV muqueux et 19 p. 100 de co-infection) dans 64 p. 100 des carcinomes épidermoïdes de patients greffés rénaux et dans seulement 37 p. 100 (12 p. 100 HPV cutanés, 29 p. 100 HPV muqueux et 4 p. 100 de coinfection) des carcinomes épidermoïdes de sujets immunocompétents ($p = 0,001$). Par contre, 79 p. 100 des lésions épithéliales bénignes provenant de sujets greffés rénaux présentaient de l'ADN d'HPV, de façon non statistiquement différente à la fréquence observée dans les carcinomes épidermoïdes des mêmes patients. Ces résultats suggèrent donc encore une fois l'implication d'autres co-facteurs (exposition aux UV, facteurs génétiques...) dans la carcinogénèse épithéliale. De très nombreux types d'HPV sont aussi retrouvés dans les tumeurs mais la diversité virale est accrue par rapport aux sujets immunocompétents et il n'est pas rare de détecter plusieurs types d'HPV au sein d'une même lésion [16]. Enfin, chez ces patients, la fréquence de détection des HPV de type EV dans les follicules pileux atteint plus de 90 p. 100 [17]. Dans plus de 90 p. 100 des cas, les cancers cutanés chez ces patients apparaissent sur les zones photo-exposées [4]. De Jong-Tieben et al. [18] ont confirmé le rôle des UV dans l'évolution des lésions à HPV sur une série de 75 transplantés rénaux. En effet, les auteurs ont montré que 60 p. 100 des patients présentaient des HPV de type EV au niveau de lésions bénignes, que ces patients aient développé (41 cas) ou non (34 cas) un cancer cutané. De façon intéressante, il se trouve que les 34 patients qui n'ont pas développé de cancers ont été significativement moins exposés au soleil [18]. Par ailleurs, chez les individus qui ont développé un cancer, la prévalence des HPV de type EV est plus élevée au niveau des lésions bénignes et des lésions malignes qui ont été exposées au soleil par rapport aux lésions non photo-exposées.

CHEZ LES PATIENTS TRAITÉS PAR PUVA THÉRAPIE

Si les lésions psoriasiques constituent des réservoirs d'HPV de type EV [19], on peut se poser la question de leur

contagiosité et du risque des traitements immunosuppresseurs, en particulier la photochimiothérapie, utilisés chez ces patients [20]. Nickoloff [21] ont émis l'hypothèse que le psoriasis correspondait à une réaction immunologique vis-à-vis d'un agent microbien expliquant l'absence d'infection des lésions cutanées induites. Cette réponse immunologique est cependant inefficace vis-à-vis des HPV, peut être en raison d'un déficit génétique spécifique de ces patients, par analogie aux patients atteints d'EV atteints d'un déficit immunitaire spécifique des HPV de type EV. Ceci expliquerait la non contagiosité de ces virus pour le reste de la population immunocompétente qui s'immuniserait de façon efficace. Il est aussi remarquable de constater que le locus de susceptibilité génétique de l'EV prédisposant aux infections par HPV de type EV est situé sur le chromosome 17 dans une région contenant un locus du psoriasis familial [13]. Une altération génétique de cette région pourrait expliquer ainsi la susceptibilité des patients psoriasiques aux infections par HPV de type EV. La photothérapie (UVB et PUVA) est largement utilisée pour le traitement du psoriasis en raison de ses propriétés immunosuppressives et antiprolifératives [22]. Cependant l'immunosuppression induite pourrait également favoriser la forte prévalence de l'infection à HPV chez ces patients de façon similaire au rôle favorisant des ultraviolets pour les patients atteints d'EV ou greffés d'organe. Si l'infection par HPV joue un rôle dans la physiopathogénie du psoriasis, l'efficacité de la photothérapie semble alors paradoxale. Favre *et al.* [19] et Weisseborn *et al.* [23] ont montré que la PUVAthérapie n'influençait pas la prévalence des anticorps anti HPV5 ou de la détection d'ADN d'HPV5 chez des patients psoriasiques. De plus, les patients atteints de dermatite atopique et fréquemment traités par PUVA thérapie ne présentaient pas d'augmentation de la prévalence de l'infection par HPV5, confirmant, ainsi la spécificité du psoriasis et l'absence d'effet favorisant liée à la photothérapie. L'effet antiprolifératif de la PUVAthérapie limiterait même l'infection par HPV5 dépendante de la prolifération épidermique. On ne peut cependant exclure le rôle favorisant de l'infection par HPV de type EV dans la carcinogenèse cutanée induite par la PUVAthérapie. En effet, ces virus sont détectés dans les lésions précancéreuses et les cancers épidermoïdes qui se développent chez les patients traités par PUVAthérapie [23-26]. La PUVA thérapie pourrait sélectivement favoriser la réplication de certains types d'HPV, en particulier le type 5 [23]. Par contre, Zumtobel *et al.* [26] ont constaté de très faible charges virales en HPV5 chez leurs 2 patients psoriasiques traités par PUVA, à la différence des résultats obtenus dans les carcinomes épidermoïdes des patients atteints d'EV. Les auteurs ne retiennent donc pas le rôle des HPV dans la carcinogenèse épidermique induite par la PUVA, et la présence d'HPV au sein des lésions de psoriasis ne doit pas remettre en question l'utilisation de traitements immunosuppresseurs ou par UV car ils inhibent la prolifération épidermique et l'activation lymphocytaire génératrice de cytokines favorisant la réplication virale [19].

Aspects biologiques

Il existe donc un pourcentage non négligeable de tumeurs épithéliales cutanées ne contenant pas d'ADN d'HPV avec les techniques de détection actuellement disponibles. Soit ces techniques sont insuffisantes, soit les HPV jouent le rôle de co-facteur dans la carcinogenèse épithéliale. Par analogie avec le cancer du col utérin, si les HPV sont impliqués en tant qu'agent causal dans les cancers cutanés, on pourrait s'attendre à une plus grande fréquence de détection dans les lésions pré-cancéreuses par rapport aux lésions cancéreuses. Or les fréquences de détection sont relativement similaires entre les lésions bénignes et les tumeurs cutanées. C'est pourquoi Pfister et ter Shegget [7] ont suggéré l'hypothèse du « hit and run » dans laquelle l'agent carcinogène ne serait plus le virus mais les protéines virales qui persisteraient dans la cellule épithéliales. Les interactions moléculaires entre les HPV et les UV sont mal connues, en particulier pour les HPV cutanés [27]. Si la plupart des données concernent les HPV muqueux, elles ne sont pas négligeables pour autant étant donné la fréquence des co-infections HPV muqueux et HPV cutanés au sein des tumeurs épithéliales. Chez l'animal, il semble qu'une irradiation par les UV soit absolument nécessaire pour qu'il y ait transformation, donc apparition de lésions malignes. L'activation des HPV par les UV est bien illustré chez le lapin infecté par le Cottontail Rabbit PapillomaVirus. En effet, Zhang *et al.* [28] ont montré qu'une irradiation des animaux par des UV induisait le développement de lésions papillomateuses. Les mécanismes de réactivation virale et de transformation sont encore mal connus. Néanmoins, l'effet des UV sur les HPV, d'une part, et sur le système immunitaire, d'autre part, pourraient être impliqués dans ces phénomènes.

ASPECTS MOLÉCULAIRES

La carcinogenèse non mélanique cutanée fait suite à un processus impliquant plusieurs étapes cellulaires au cours desquelles les mutations vont s'accumuler. La première étape ou étape d'initiation est déclenchée par une mutation de l'ADN induite par l'irradiation UV, en particulier UVB. En effet, l'irradiation UVB des kératinocytes entraîne la formation de dommages au niveau de l'ADN sous la forme de dimères de pyrimidines et de photoproduits 6-4. Ces lésions sont caractéristiques et constituent une véritable signature moléculaire de l'effet des UV sur les cellules épidermiques [29]. Ces lésions génomiques vont stimuler l'expression de la protéine p53 qui va pouvoir remplir son rôle de protéine « gardienne du génome » en stoppant le cycle cellulaire pendant les phases G1 et G2 pour permettre la réparation de l'ADN, ou en déclenchant l'apoptose si les lésions de l'ADN sont trop importantes. L'étape d'initiation franchie, les étapes successives de promotion et de progression vont permettre le développement des cancers cutanés. Ces étapes nécessitent des mutations additionnelles touchant les gènes responsables du maintien de l'intégrité génétique (gènes de réparation de l'ADN), les gènes contrôlant la prolifération cellulaire au niveau du cycle cellulaire (gènes suppresseurs de tumeurs et

oncogènes), et les gènes contrôlant l'environnement tumoral (gènes impliqués dans la surveillance immunitaire, et dans l'invasion et l'angiogenèse tumorale).

UV, HPV ET GÈNES CONTRÔLANT LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Il convient de distinguer les HPV muqueux et les HPV cutanés dont les protéines E6 et E7 se comportent différemment vis-à-vis des gènes suppresseurs de tumeurs TP53 et gène du rétinoblastome. En effet, la protéine E6 des HPV muqueux, qui possède une forte affinité pour p53, va favoriser la dégradation de cette protéine suppresseur de tumeur par le protéasome. La cellule va ainsi perdre la capacité de s'arrêter pendant la phase G1 du cycle cellulaire à la suite d'une lésion de l'ADN ou de mourir par apoptose si les lésions de l'ADN sont trop importantes (fig. 1). La protéine E7 des HPV muqueux lie avec une forte affinité la protéine du rétinoblastome pRb qui ne peut plus séquestrer le facteur de transcription E2F et le libère. Ce facteur de transcription permet l'entrée et la propagation dans la phase S du cycle cellulaire. Ainsi, en permettant l'échappement aux points de contrôle du cycle cellulaire, les HPV muqueux favorisent la propagation d'instabilités génomiques induites par les UV. Par contre, bien qu'exprimées au sein des tumeurs cutanées, l'oncoprotéine E6 des HPV cutané ne dégrade pas p53 [30] et la protéine E7 des HPV cutanés ne possède pas de pouvoir transformant ou immortalisant sur les kératinocytes [31].

P53

L'expression de p53 est fortement accrue dans les tumeurs malignes cutanées des patients immunodéprimés (transplantés et EV) par rapport aux lésions bénignes de ces sujets ou de sujets immunocompétents [32, 33]. Par contre, il n'existait aucune corrélation avec l'infection HPV [34]. Les mutations signatures caractéristiques des UV récemment retrouvées sur le gène TP53 au sein de tumeurs cutanées infectées par des HPV de type EV [35], ne sont probablement que le témoin de l'exposition aux UV [36]. En effet, parmi les mutations du gène p53 séquencées au sein des tumeurs de ces patients, seules 55 p. 100 étaient caractéristiques de l'effet des UVB suggérant le rôle d'autres agents mutagènes ; les UVA par l'intermédiaire de la production d'espèces réactives oxygénées toxiques pour l'ADN pourraient être impliquées [36]. Purdie *et al.* ont montré que l'expression d'un HPV cutané (HPV77, retrouvé uniquement au niveau de lésions malignes chez des patients transplantés rénaux) pouvait être stimulée par les UV, via l'activation de p53 [37]. Cependant, Ruhland et de Villiers [38] ont démontré que les UV exerçaient également des régulations positives ou négatives sur le promoteur viral en fonction du type d'HPV étudié, soulignant ainsi la complexité des mécanismes impliqués au sein de tumeurs cutanées souvent infectées par plusieurs types d'HPV.

En raison de la présence d'HPV muqueux oncogène au sein des cancers cutanés non mélaniques, l'inactivation de la protéine suppresseur de tumeur p53 par l'oncoprotéine E6

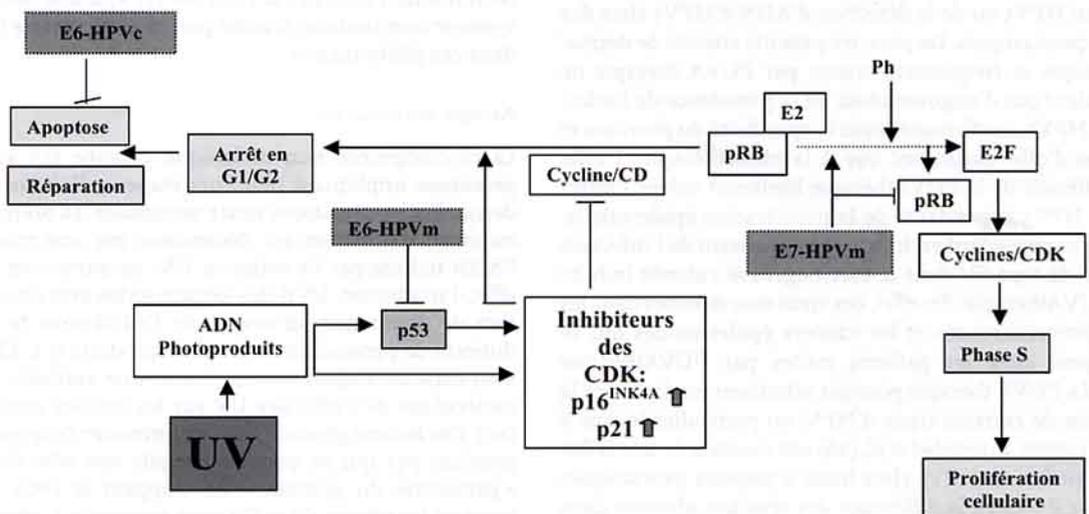


Fig. 1. Interactions HPV muqueux ou cutanés, UV et cycle cellulaire. Des lésions de l'ADN induites par les UV entraînent une expression accrue des protéines p53 et p16^{INK4A} qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire en G1 et G2 nécessaire à la réparation de l'ADN ou à l'apoptose si les dommages génomiques sont trop importants. Si les lésions touchent un gène suppresseur de tumeur tel que TP53, la protéine p53 mutée ne pourra plus jouer son rôle de gardienne du génome et la carcinogénèse est initiée. Les protéines E6 et E7 des HPV muqueux (HPVm) à haut risque interagissent avec la p53 et la protéine du rétinoblastome (pRb) respectivement. Suite à sa dégradation par l'oncoprotéine virale E6 des HPV muqueux, la p53 ne peut plus promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire en G1 nécessaire à la réparation de l'ADN lésé ou l'induction de l'apoptose. De plus, l'oncoprotéine E7 des HPVm favorise la libération du facteur de transcription E2F qui permet la progression du cycle cellulaire. Les cellules présentant des mutations induites par les UV peuvent proliférer et initier le processus de carcinogénèse. Cependant, les UV peuvent aussi directement activer la protéine p16^{INK4A}, qui est un inhibiteur du cycle cellulaire, permettant alors l'arrêt du cycle. Les protéines E6 et E7 de certains HPV cutanés (HPVc) n'interagissent pas avec la p53 et la pRb, mais la protéine E6 des HPVc empêche l'apoptose induite par les UV par une voie p53 indépendante, via la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bak. Ainsi les protéines virales E7 des HPV muqueux et E6 des HPV muqueux et cutanés, par leur action inhibitrice de l'apoptose et sur les points de contrôle du cycle cellulaire peuvent promouvoir la carcinogénèse induite par les UV.

joue probablement un rôle dans la carcinogenèse épithéliale. Mais, il existe aussi un déterminisme génétique expliquant que certains patients vont développer de façon plus fréquente des cancers épithéliaux. En 1998, Storey *et al.* [39] ont montré le rôle d'un polymorphisme génétique de TP53 au niveau du codon 72 de l'exon 4 qui s'exprime par la présence, soit d'un résidu proline, soit d'un résidu arginine en position 72 de la protéine p53. Ainsi, la présence d'un résidu arginine en position 72 rend la protéine p53 beaucoup plus sensible à la dégradation *in vitro* par l'oncoprotéine virale E6 des HPV muqueux 16, 18 ou 11. Dans un travail récent, nous avons pu démontrer que le génotype arginine/arginine du code 72 de l'exon 4 de TP 53 représentait un facteur de risque potentiel pour le développement des cancers cutanés épithéliaux en zones photoexposées chez les patients greffés rénaux [8]. En effet, le taux d'homozygotie arginine/arginine était significativement supérieur dans les tumeurs de patients transplantés (83 p. 100) par rapport aux patients immunocompétents avec (60 p. 100) ou sans tumeurs (59 p. 100). Il n'existait toutefois pas de corrélation entre le génotype de TP53 et la présence d'ADN d'HPV cutané ou muqueux et d'autres co-facteurs sont probablement impliqués. McGregor *et al.* [40] ont montré que les individus homozygotes arginine/arginine présentaient une sensibilité cutanée aux UV plus importante que les individus possédant un résidu proline. Ces auteurs [40] suggèrent donc que la forme native proline de p53 est plus efficace que la forme arginine dans son rôle de gardienne du génome. A la différence de la forme proline de TP53, la forme arginine de TP53 serait préférentiellement mutée et persisterait, expliquant son implication dans la carcinogenèse cutanée. Il est également possible que d'autres polymorphismes génétiques soient impliqués. Une étude préliminaire récente a ainsi montré que le polymorphisme génétique d'un gène de détoxification des radicaux libres induits par les UV était associé au risque de développement des cancers cutanés chez les patients greffés rénaux soumis à une forte exposition aux UV [41].

CYCLE CELLULAIRE

Les UV par l'intermédiaire de l'activation de p53, entraînent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2 permettant ainsi à la cellule de réparer les lésions génomiques qu'ils ont induites. Par contre, les effets des radiations UV sur les interactions entre les oncoprotéines virales E6 et E7 des HPV et les protéines régulant le cycle cellulaire sont encore très mal connus [27]. Du fait de la dégradation de p53 par l'oncoprotéine virale E6 des HPV muqueux, l'irradiation UV de cellules infectées par des HPV muqueux ne déclenche pas l'arrêt du cycle cellulaire, ni n'augmente l'expression de p53. La liaison de l'oncoprotéine E7 des HPV muqueux à pRb libère le facteur de transcription E2F et empêche aussi l'arrêt du cycle cellulaire. Les cellules épithéliales infectées par les HPV muqueux et présentant des mutations induites par les UV peuvent donc proliférer et évoluer vers une lésion cancéreuse. Cependant, d'autres travaux [42, 43] ont montré que des cellules exprimant l'oncoprotéine E6 d'HPV muqueux et soumis à des UV étaient capables de s'arrêter en G1

ou G2 malgré l'absence d'expression de p53 liée à sa dégradation. Les mêmes résultats étaient observés avec des lignées cellulaires génétiquement déficientes en p53. L'irradiation par des UVB de cellules HeLa infectées par HPV18 entraînent aussi un arrêt du cycle en G2 probablement par stabilisation ou activation d'une autre protéine suppresseur de tumeur, p16^{INK4a}. L'arrêt du cycle cellulaire s'effectuerait donc de façon indépendante à p53 suite à l'activation par les UV de p16^{INK4a} [44]. Par contre, l'oncoprotéine E7 des HPV muqueux par sa liaison avec pRb empêche l'arrêt du cycle cellulaire y compris après irradiation UV à la différence de E7 d'HPV1 responsable de lésions cutanées bénignes et entraînant un arrêt du cycle en G1 après activation par les UV de p16^{INK4a} [45]. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec précaution car l'activité des différents gènes précités peut être inhibée ou modifiée s'ils sont la cible de mutations induites par les UV, expliquant les discordances entre les résultats obtenus sur des tumeurs infectées par HPV et les modèles expérimentaux issus de cellules transfectées par les gènes des oncoprotéines d'HPV.

APOPTOSE

Après irradiation UVB des kératinocytes, le gène TP53 est activé permettant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [46]. La protéine p53 exercerait alors son rôle de gardienne du génome et en cas de mutations constitutionnelle ou acquise, elle serait impliquée dans la carcinogenèse cutanée. Cependant, les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni qui présentent une mutation constitutionnelle du gène TP53, ne sont pas prédisposés aux cancers cutanés induits par les UV, suggérant l'intervention d'autres voies apoptotiques indépendantes de p53. Comme nous l'avons vu, la protéine E6 des HPV cutanés (HPV 77, 5 et 8) n'induit pas la dégradation de la protéine p53 à la différence de la protéine E6 des HPV muqueux [30]. Ainsi après irradiation UV, l'activation du gène TP53 dans les cellules infectées par des HPV cutanés entraîne l'arrêt du cycle cellulaire [47]. De plus, les oncoprotéines E6 de certains HPV cutanés inhibent aussi l'apoptose induite par les UV dans des cellules génétiquement déficientes pour le gène TP53, suggérant que E6 est capable d'inhiber d'autres voies apoptotiques [47]. L'expression du gène E6 de ces HPV cutanés protégerait donc les cellules de l'apoptose induite par les UV. Ainsi, ces virus possèdent bien des propriétés oncogéniques dans la mesure où ils permettent aux cellules de poursuivre leur cycle cellulaire, y compris après irradiation par les UV. Les mécanismes moléculaires de l'inhibition de l'apoptose par les protéines E6 des HPV cutanés ne sont pas encore connus, mais ils pourraient impliquer les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2. Jackson *et al.* [48] ont ainsi montré que les UVB stimulaient l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak favorisant l'élimination par apoptose des kératinocytes irradiés. Par contre, l'oncoprotéine virale E6 des HPV cutanés en dégradant la protéine Bak, empêchait l'apoptose des kératinocytes irradiés. De plus, les tumeurs cutanées infectées par ces HPV n'exprimaient pas la protéine Bak [49]. De même, la protéine E6 des HPV18 bloquait l'apoptose des kératinocytes irradiés

du fait de la dégradation de la protéine p53. Zhang *et al.* [50] ont aussi montré que la protéine virale E5 des HPV muqueux de type 16 protégeait les kératinocytes de l'apoptose induite par les UVB. Enfin, Simbulan-Rosenthal *et al.* [51] ont récemment démontré que l'immortalisation de kératinocytes humains normaux par les oncoprotéines E6 et E7 des HPV de type 16 modifiait la réponse apoptotique de ces cellules aux UVB.

HPV, UV ET GÈNES CONTRÔLANT LA RÉPARATION CELLULAIRE

Si l'infection des cellules par les HPV n'augmente pas la « mutabilité » par les UV du gène codant p53, en revanche, il a été montré *in vitro*, que les mécanismes de réparation de l'ADN par excision (qui sont dépendants de la p53) sont altérés par la présence d'HPV muqueux à haut risque (HPV16), voire par la simple présence du gène E6 de cet HPV [52-54]. Ces données montrent que l'action transformante des HPV n'est pas due uniquement à une perte du contrôle du cycle cellulaire (interaction entre des protéines virales et des protéines contrôlant le cycle cellulaire), mais aussi, dans le cas d'irradiation UV, par la déficience des systèmes de réparation.

Rôle du système immunitaire au cours de la carcinogenèse cutanée liée aux HPV et aux UV

Il est maintenant bien établi que des épisodes d'irradiation par les UVB diminuent fortement les réponses immunitaires systémiques et locales [22]. Ainsi, un défaut de mise en place d'une réponse immunitaire, accompagné de la perte de fonctions immunitaires favoriseront le développement de niches écologiques propices à la colonisation et au développement des HPV. Il est également remarquable de constater que l'infection kératinocytaire par les HPV ne s'accompagne que d'une très faible, voire inexistante réaction inflammatoire. En l'absence de réaction inflammatoire, la présentation des protéines virales par les cellules dendritiques épidermiques aux lymphocytes est donc fortement compromise. De plus, les kératinocytes infectés semblent résistants vis-à-vis des lymphocytes T cytotoxiques. Les kératinocytes infectés par les HPV pourraient ainsi représenter un sanctuaire protégé sur le plan immunologique. Stockfleth *et al.* [55] ont récemment montré que l'application d'un immunomodulateur, l'imiquimod, entraînait la guérison clinique, histologique et virologique de lésion épithéliales infectées par HPV. Cet effet bénéfique s'expliquerait par la reconstitution locale d'une réponse immunitaire normale préalablement altérée par les HPV. Ces résultats suggèrent donc un effet immunosuppresseur induit par les protéines virales qui favoriserait la persistance épidermique de l'infection virale et éventuellement des cellules tumorales, y compris chez les sujets immunocompétents [56].

Conclusion

La peau constitue une barrière efficace contre toute agression environnementale (physique, chimique et biologique). Les

UV, tout comme les HPV, sont des agents potentiellement carcinogènes. Dans les cas particuliers d'exposition aux radiations UV et/ou aux HPV, des systèmes de surveillance efficaces (systèmes de réparation de l'ADN, système immunitaire) permettent de déceler et de faire face à ces agressions ce qui limite l'apparition de lésions malignes. Si le rôle carcinogène des HPV muqueux est bien établi pour le cancer du col de l'utérus, l'implication des HPV dans la carcinogenèse cutanée demeure encore spéculatif. L'ADN d'HPV est très fréquemment détecté dans les lésions cutanées bénignes, précancéreuses et cancéreuses par rapport à la peau saine, que ce soit chez les sujets immunocompétents ou immunodéprimés. De plus, l'association spatio-temporelle entre les UV et les HPV, semble favoriser leurs propriétés oncogéniques, essentiellement par le biais d'une inhibition de l'apoptose. Bien que la charge virale des cellules infectées soit très faible, la persistance de protéines virales qui permettraient la survie des cellules infectées par l'intermédiaire d'une inhibition de l'apoptose ou d'une tolérance immunitaire, joue probablement un rôle essentiel dans la carcinogenèse cutanée liée à l'infection par HPV [7, 9, 12].

Remerciements. Les auteurs remercient la Fondation de Transplantation pour leur soutien financier qui a permis la réalisation de ce travail.

Références

- Soufir N, Moles JP, Vilmer C, Moch C, Verola O, Rivet J et al. P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. *Oncogene* 1999;18:5477-81.
- Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;341:1633-8.
- Mouglin C, Bernard B, Lab M. Biologie des infections à papillomavirus. I. Caractéristiques générales. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997;55:55-63.
- Harwood CA, Proby CM. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:101-14.
- de Villiers EM. Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother* 1998;52:26-33.
- Boxman IL, Mulder LH, Russell A, Bouwes Bavinck JN, Green A, Ter Schegget J. Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol* 1999;141:246-9.
- Pfister H, ter Schegget J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 1997;15:335-47.
- Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000;61:289-97.
- Meyer T, Arndt R, Christophers E, Nindl I, Stockfleth E. Importance of human papillomaviruses for the development of skin cancer. *Cancer Detect Prev* 2001;25:533-47.
- Cairey-Remonnay S, Humbey O, Mouglin C, Algros MP, Mauny F, Kanitakis J et al. TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in cutaneous squamous cell carcinoma and benign epithelial lesions of renal transplant recipients and immunocompetent individuals: lack of correlation with human papillomavirus status. *J Invest Dermatol* 2002;118:1026-31.

11. Derancourt C, Mougin C, Chopard Lallier M, Coumes-Marquet S, Drobacheff C, Laurent R. Papillomavirus humains oncogènes révélés par technique d'hybridation *in situ* dans la maladie de Bowen extra-génitale. *Ann Dermatol Venerol* 2001;128:715-8.
12. Storey A. Papillomaviruses : death-defying acts in skin cancer. *Trends Mol Med* 2002;8:417-21.
13. Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* 2002;32:579-81.
14. Majewski S, Jablonska S. Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations ? *Arch Dermatol* 2002;138:649-54.
15. Bouwes Bavinck JN, Hardie DR, Green A, Cutmore S, MacNaught A, O'Sullivan B et al. The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. *Transplantation* 1996;61:715-21.
16. Euvrard S, Chardonnet Y, Pouteil-Noble C, Kanitakis J, Chignol MC, Thivolet J et al. Association of skin malignancies with various and multiple carcinogenic and noncarcinogenic human papillomaviruses in renal transplant recipients. *Cancer* 1993;72:2198-206.
17. Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ et al. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 1997;108:712-5.
18. de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, ter Schegget J, Vermeer BJ, de Fijter JW, Bruijn JA et al. The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high : a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer. *Transplantation* 2000;69:44-9.
19. Favre M, Orth G, Majewski S, Baloul S, Pura A, Jablonska S. Psoriasis : A possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 1998;110:311-7.
20. Mahe E, Descamps V. PUVA therapy and human papillomavirus type 5 detection in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1998;111:912-3.
21. Nickoloff BJ. The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol* 1999;135:1104-10.
22. Aubin F. Photoimmunologie. *Encycl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris), Dermatologie* 2002;98-780-A-10, 7 p.
23. Weissenborn SJ, Hopfl R, Weber F, Smola H, Pfister HJ, Fuchs PG. High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA. *J Invest Dermatol* 1999;113:122-6.
24. Bayle-Lebey P, Labadie F, Basset-Seguín N, Bazex J. Carcinomes cutanés et papillomavirus 5. Révélation lors d'une photochimiothérapie UVA prolongée. *Ann Dermatol Venerol* 1994;121:496-8.
25. Harwood CA, Spink PJ, Surentheran T et al. Detection of human papillomavirus DNA in PUVA-associated non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 1998;111:123-7.
26. Zumtobel U, Schwarze HP, Favre M, Taieb A, Delaunay M. Widespread cutaneous carcinomas associated with human papillomaviruses 5, 14 and 20 after introduction of methotrexate in two long-term PUVA-treated patients. *Dermatology* 2001;202:127-30.
27. Aubin F, Humbey O, Cuerrini JS, Laurent R, Mougin C. Ultraviolet et papillomavirus humains. In Aubin F, Prétet JL, Mougin C. *Les papillomavirus humains : Biologie et Pathologie Tumorale*. Editions Tec et Doc-Lavoisier, Paris, 2003 (in press).
28. Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 1999;263:388-94.
29. Wikonkal NM, Brash DE. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999; 4:6-10.
30. Steger G, Pfister H. In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol* 1992;125:355-60.
31. Yamashita T, Segawa K, Fujinaga Y, Nishikawa T, Fujinaga K. Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8. *Oncogene* 1993;8:2433-41.
32. McGregor JM, McKee PH, Khorshid M, Proby CM. P53 expression and human papillomavirus infection in transplant recipients and in patients with epidermodysplasia verruciformis. *Br J Dermatol* 1996;134:374.
33. Gibson GE, O'Grady A, Kay EW, Leader M, Murphy GM. p53 tumor suppressor gene protein expression in premalignant and malignant skin lesions of kidney transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 1997;36:924-31.
34. McGregor JM, Berkhout RJ, Rozycka M, ter Schegget J, Bouwes Bavinck JN, Brooks L et al. p53 mutations implicate sunlight in post-transplant skin cancer irrespective of human papillomavirus status. *Oncogene* 1997;15:1737-40.
35. Padlewska K, Ramoz N, Cassonnet P, Riou G, Barrois M, Majewski S et al. Mutation and abnormal expression of the p53 gene in the viral skin carcinogenesis of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 2001;117:935-42.
36. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Tumeurs cutanées chez les greffés d'organe. *Presse Med* 2002;31:1895-903.
37. Purdie KJ, Pennington J, Proby CM, Khalaf S, de Villiers EM, Leigh IM et al. The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *Embo J* 1999;18:5359-69.
38. Ruhland A, de Villiers EM. Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines. *Int J Cancer* 2001;91:828-34.
39. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;393:229-34.
40. McGregor JM, Harwood CA, Brooks L, Fisher SA, Kelly DA, O'Nions J et al. Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. *J Invest Dermatol* 2002;119:84-90.
41. Ramsay HM, Harden PN, Reece S, Smith AG, Jones PW, Strange RC et al. Polymorphisms in glutathione S-transferases are associated with altered risk of nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients : a preliminary analysis. *J Invest Dermatol* 2001;117:251-5.
42. Lloign M, Drobetsky EA. The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis* 2002;23:35-45.
43. Gabrielli BG, Sarcevic B, Sinnamon J, Walker G, Castellano M, Wang XQ et al. A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay. *J Biol Chem* 1999;274:13961-9.
44. Chazal M, Marionnet C, Michel L, Mollier K, Dazard JE, Della Valle V et al. P16(INK4A) is implicated in both the immediate and adaptative response of human keratinocytes to UVB irradiation. *Oncogene* 2002;21: 2652-61.
45. Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7

protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol* 2001;75:4705-12.

46. Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bacon P, Panella J, Choubey D et al. Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene* 2002;21:2991-3002.

47. Jackson S, Storey A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000;19:592-8.

48. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 2000;14:3065-73.

49. Jackson S, Ghali L, Harwood C, Storey A. Reduced apoptotic levels in squamous but not basal cell carcinomas correlates with detection of cutaneous human papillomavirus. *Br J Cancer* 2002;87:319-23.

50. Zhang B, Spandau DF, Roman A. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin from UVB-irradiation-induced apoptosis. *J Virol* 2002;76:220-31.

51. Simbulan-Rosenthal CM, Veleno A, Veldman T, Schlegel R, Rosenthal DS. HPV E6/7 immortalization sensitizes human keratinocytes to UVB by

altering the pathway from caspase-8 to caspase-9-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:24709-16.

52. Ford JM, Baron EL, Hanawalt PC. Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* 1998;58:599-603.

53. Rey O, Lee S, Park NH. Impaired nucleotide excision repair in UV-irradiated human oral keratinocytes immortalized with type 16 human papillomavirus genome. *Oncogene* 1999;18:6997-7001.

54. El-Mahdy MA, Hamada FM, Wani MA, Zhu Q, Wani AA. p53 degradation by HPV-16 E6 preferentially affects the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and sensitizes mammary epithelial cells to UV-irradiation. *Mutat Res* 2000;459:135-45.

55. Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, Salasche S, Papadopoulos L, Ulrich C et al. A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5 p. 100 imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2002;138:1498-502.

56. Frazer IH, Thomas R, Zhou J, Leggatt GR, Dunn L, McMillan N et al. Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev* 1999;168:131-42.

Publication n°5

HPV et ultraviolets

Aubin F, Humbey O, Guerrini JS, Prétet JL, Mougin C

Chapitre 8, in Papillomavirus Humains - Biologie et pathologie tumorale.

Edition TEC & DOC, Londres – Paris – New-York, juin 2003

8

HPV et ultraviolets

*François Aubin, Olivier Humbey, Jean-Sébastien Guerrini,
Jean-Luc Prétet, Christiane Mougin*

Les cancers cutanés non mélaniques sont les cancers les plus fréquents dans la population caucasienne. Les ultraviolets (*UV*) sont reconnus comme un facteur de risque majeur pour ce type de cancers en raison, d'une part de la localisation préférentielle des lésions sur des zones photoexposées, et d'autre part de la détection très fréquente de mutations induites par les UV, touchant en particulier des gènes suppresseurs de tumeur (Basset-Seguin *et al.*, 2001). De plus, certains papillomavirus humains (HPV) potentiellement oncogènes sont capables d'infecter les cellules épidermiques. Parmi plus de 100 types d'HPV répertoriés à l'heure actuelle, on distingue deux grandes familles : les HPV muqueux et les HPV cutanés, regroupant aussi les HPV de type EV. Les HPV muqueux de type 16 et 18 sont de puissants agents carcinogènes impliqués, entre autres, dans le développement du cancer du col de l'utérus (Bosch *et al.*, 1995 ; Mougin *et al.*, 1997 ; Walboomers *et al.*, 1999 ; Wallin *et al.*, 1999 ; Clavel *et al.*, 2001). Mais ce sont les HPV cutanés qui sont les plus susceptibles d'interagir avec les UV dans le processus de carcinogenèse cutanée (Proby *et al.*, 1996 ; de Villiers, 1998), bien qu'une co-infection HPV muqueux et HPV cutanés soit fréquemment retrouvée au sein des tumeurs cutanées.

1. Aspects épidémiologiques de l'infection cutanée à HPV

Ce chapitre est détaillé dans la cinquième partie de cet ouvrage. Nous n'en décrivons que les grandes lignes.

1.1. Sujets immunocompétents

La présence d'HPV au niveau de la peau saine chez les sujets immunocompétents est relativement fréquente. Les follicules pileux constituent d'importants réservoirs d'HPV. En effet, Boxman *et al.* (1997, 1999) ont montré que 45 % des volontaires sains (10/22) présentaient de l'ADN d'HPV de type épidermodysplasie verruciforme (EV) dans ces sites. Dans les lésions cancéreuses des sujets immunocompétents, la prévalence des HPV n'est pas plus élevée que dans les tissus sains et avoisine 35 % (Shamanin *et al.*, 1996 ; Harwood *et al.*, 2000). De plus, Boxman *et al.* (2000) n'ont pas retrouvé d'association significative entre la présence d'ADN d'HPV de type EV et le développement de cancers cutanés épithéliaux. Toutefois, il faut noter que le spectre des HPV associés aux carcinomes épidermoïdes est très étendu (de Villiers, 1998). À ce jour, la responsabilité des HPV dans la carcinogenèse épithéliale cutanée des sujets immunocompétents n'est pas établie, et d'autres cofacteurs, tels que les UV ou la réponse immunitaire, jouent vraisemblablement un rôle important (Proby *et al.*, 1996).

1.2. Patients immunodéprimés

Pour plus de détails, se reporter au chapitre 24, « Épidémiologie des infections à HPV après transplantation d'organe ».

Plusieurs études sont en faveur du rôle des UV dans la susceptibilité des sujets immunodéprimés à l'infection virale. Les patients atteints d'EV présentent un déficit génétique (vraisemblablement responsable d'un déficit de l'immunité cellulaire) conduisant à l'apparition de verrues sur toutes les parties du corps (Ramos *et al.*, 2002). Certains types d'HPV (dont les HPV 5 et HPV 8 qui ne sont pas à risque pour la population générale) sont retrouvés dans les lésions de ces patients (Majewski et Jablonska, 2002). Trente à 60 % des lésions cutanées évoluent vers la malignité, qui ne concerne que les zones photoexposées. La fréquence de détection des HPV de type EV dans les lésions cancéreuses peut atteindre plus de 90 %, fréquence similaire à celle des HPV à haut risque associés au cancer du col de l'utérus (Proby *et al.*, 1996).

L'association HPV et cancers cutanés chez les patients greffés rénaux a été largement étudiée. Dans une étude contrôlée récente (Cairey-Remonay *et al.*, 2002a), nous avons retrouvé de l'ADN d'HPV dans 64 % des carcinomes épidermoïdes de patients greffés rénaux et dans seulement 37 % des carcinomes épidermoïdes de sujets immunocompétents ($p = 0,001$). En revanche, 79 % des lésions épithéliales bénignes provenant de sujets greffés rénaux présentaient de l'ADN d'HPV. Ces résultats suggèrent donc encore une fois l'implication d'autres cofacteurs (exposition aux UV, facteurs génétiques...) dans la carcinogenèse épithéliale. De très nombreux types d'HPV sont aussi retrouvés dans les tumeurs mais la diversité virale est accrue par rapport aux sujets immunocompétents et il n'est pas rare de détecter plusieurs types d'HPV au sein d'une même lésion (Proby *et al.*, 1996). Enfin, chez ces patients, la fréquence de détection des HPV

de type EV dans les follicules pileux atteint plus de 90 % (Boxman *et al.*, 1997). Dans plus de 90 % des cas, les cancers cutanés chez les patients transplantés apparaissent sur les zones photoexposées (Proby *et al.*, 1996). De Jong-Tieben *et al.* (2000) ont confirmé le rôle des UV dans l'évolution des lésions à HPV sur une série de 75 transplantés rénaux. En effet, les auteurs ont montré que 60 % des patients présentaient des HPV de type EV au niveau de lésions bénignes, que ces patients aient développé (41 cas) ou non (34 cas) un cancer cutané. De façon intéressante, il se trouve que les 34 patients qui n'ont pas développé de cancer ont été significativement moins exposés au soleil (De Jong-Tieben *et al.*, 2000). Par ailleurs, chez les individus qui ont développé un cancer, la prévalence des HPV de type EV est plus élevée dans les lésions bénignes et malignes qui ont été exposées au soleil que dans celles non photoexposées.

1.3. Patients traités par PUVAthérapie

Pour plus de détails, se reporter au chapitre 31, « HPV et lésions cutanées bénignes de l'adulte ».

2. Carcinogénèse cutanée liée aux HPV et aux UV

Avec les techniques de détection actuellement disponibles, un pourcentage non négligeable de tumeurs épithéliales cutanées s'avèrent ne pas contenir d'ADN d'HPV. Il n'est toutefois pas exclu que les techniques soient insuffisantes pour détecter tous les types d'HPV existants connus ou encore non typés (en particulier les HPV cutanés). De plus, l'existence de mutants ou de variants doit être prise en compte. Par ailleurs, il est probable aussi que les HPV ne jouent qu'un rôle de cofacteur dans la carcinogénèse cutanée, en association avec d'autres facteurs tels que les UV et l'immunosuppression (Meyer *et al.*, 2001). Une grande diversité d'HPV est détectée dans les cancers cutanés des sujets immunocompétents, et aucun type particulier d'HPV ne semble préférentiellement associé. À la différence des cancers cervicaux, dans les cancers cutanés des patients EV, l'intégration de l'ADN viral est un événement rare ; en outre, peu de choses sont connues sur l'état physique de l'ADN viral dans les cancers cutanés chez les patients non EV (Pfister et ter Schegget, 1997). Par ailleurs, l'ADN viral pourrait disparaître dans les cellules malignes, indiquant que les activités d'HPV ne seraient plus nécessaires à un stade avancé de la maladie, ceci pouvant expliquer que la charge virale HPV est très faible dans les cancers cutanés (Meyer *et al.*, 2001).

L'irradiation UV des kératinocytes entraîne l'apparition de dommages au niveau de l'ADN sous forme de dimères de pyrimidine et de photoproduits 6-4. Ces anomalies génomiques sont caractéristiques et constituent une véritable signature moléculaire de l'effet des UV sur les cellules épidermiques (Douki et Cadet, 2001). Elles vont stimuler l'expression de p53 qui va pouvoir remplir son rôle de « gardienne du génome » en stoppant le cycle cellulaire pendant les pha-

ses G1 et G2 pour permettre la réparation de l'ADN, ou en déclenchant l'apoptose si les lésions sont trop importantes (Allday *et al.*, 1995 ; Herzinger *et al.*, 1995 ; Gniadecki *et al.*, 1997).

Les effets combinés des HPV cutanés et des UV dans la carcinogenèse épithéliale ont été peu étudiés jusqu'à ce jour.

2.1. HPV et UV

L'activation de la réplication des papillomavirus par les UV est bien illustré chez le lapin infecté par le CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*). En effet, Zhang *et al.* (1999) ont montré qu'une irradiation des animaux par des UV induisait le développement de lésions papillomateuses. La prolifération des cellules épithéliales associée à une expression des gènes E6/E7 a été observée dans près de 40 % des zones irradiées. Récemment, Ruhland et de Villiers (2001) ont démontré que les UV exerçaient des régulations positives ou négatives sur le promoteur viral en fonction du type d'HPV étudié, soulignant ainsi la complexité des mécanismes impliqués au sein de tumeurs cutanées. Ainsi, il semble qu'une exposition aux UV favorise la réactivation d'infections latentes. Les mécanismes de réactivation virale et de transformation cellulaire subséquentes ne sont pas encore élucidés.

2.2. HPV cutanés, UV et p53

L'expression de p53 est fortement accrue dans les cancers cutanés de patients immunodéprimés (transplantés et EV) par rapport aux lésions bénignes observées chez les mêmes sujets ou chez des sujets immunocompétents (Ro *et al.*, 1993 ; Pizarro *et al.*, 1995 ; McGregor *et al.*, 1996 ; Gibson *et al.*, 1997 ; Cairey-Remonnay *et al.*, 2002b). La surexpression intratumorale de p53 ne semble pas corrélée à la présence d'ADN viral mais refléterait plutôt l'effet mutagène des UV (McGregor *et al.*, 1997 ; Cairey-Remonnay *et al.*, 2002b). Des mutations, signatures caractéristiques des UV, ont en effet été identifiées sur le gène TP53 dans des tumeurs infectées par des HPV de type EV (Padlewska *et al.*, 2001). Par ailleurs, Purdie *et al.* (1999) ont montré que l'expression d'un HPV cutané (HPV 77, retrouvé uniquement dans des lésions malignes de patients transplantés rénaux) pouvait être modulée par les UV. Les HPV 77 possèdent, dans leur région non codante, un site de fixation pour la p53. Ce site est fonctionnel car une p53 exogène permet l'activation du promoteur viral. Cette activation est aussi obtenue par la p53 endogène dont l'expression est induite par une irradiation, mais elle est bloquée lors de la coexpression du gène E6 d'HPV 18. Cette étude confirme que l'activation du promoteur viral est sous la dépendance de p53 et que les UV peuvent donc activer la réplication de certains HPV cutanés (figure 1).

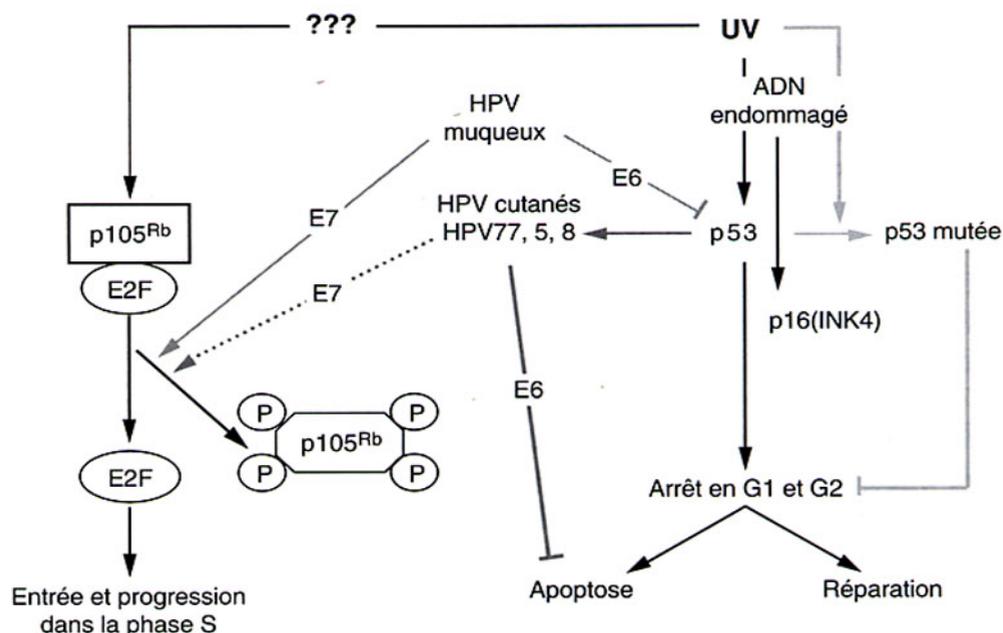


Figure 1 ■ Interactions HPV muqueux ou cutanés, UV et cycle cellulaire.

Des lésions de l'ADN induites par les UV entraînent une expression accrue des protéines p53 et p16^{INK4a} qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire en G1 et G2 nécessaire à la réparation de l'ADN ou à l'apoptose si les dommages génomiques sont trop importants. Si les lésions touchent un gène suppresseur de tumeur tel que TP53, la protéine p53 mutée ne pourra plus jouer son rôle de « gardien du génome ». Une action mutagène directe des UV sur la p105^{Rb} n'a jamais été décrite. Les protéines E6 et E7 des HPV muqueux à haut risque interagissent avec la p53 et la p105^{Rb} respectivement. Ainsi, la protéine p53 ne peut plus promouvoir l'arrêt en G1 nécessaire à la réparation de l'ADN lésé ou l'induction de l'apoptose. De plus, l'oncoprotéine E7 favorise la libération du facteur de transcription E2F qui favorise l'entrée précoce en S et la progression dans la phase S du cycle cellulaire. À l'inverse, les protéines E6 et E7 de certains HPV cutanés n'interagissent pas avec les protéines p53 et p105^{Rb}. La protéine E6 de ces HPV protège toutefois les cellules de l'apoptose induite par les UV par une voie p53 indépendante, via la dégradation de la protéine proapoptotique Bak. Au total, la prolifération de cellules infectées par des HPV muqueux et/ou cutanés contenant des dommages génomiques induits par les UV est donc facilitée.

2.3. HPV, UV et cycle cellulaire

Les UV entraînent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2, permettant ainsi à la cellule de réparer les lésions génomiques qu'ils ont induites. En revanche, les effets des radiations UV sur les interactions entre les oncoprotéines virales E6 et E7 des HPV et les protéines régulant le cycle cellulaire sont encore très mal connus. Du fait de la dégradation de p53 par l'oncoprotéine virale E6 des HPV muqueux, l'irradiation UV de cellules immortalisées par des HPV muqueux ne déclenche pas l'arrêt du cycle cellulaire, ni n'augmente l'expression de p53 (Gujuluva *et al.*, 1994). Toutefois, Loignon et Drobetsky (2002) ont montré que des fibroblastes humains exprimant l'oncoprotéine E6 d'HPV muqueux, soumis à des UV, étaient capables de s'arrêter en G1 malgré le faible niveau de p53. Les mêmes résultats étaient observés avec des lignées cellulaires génétiquement déficientes en p53, p21 et pRb. L'irradiation par des UVB de cellules HeLa infectées

par HPV18 entraînent aussi un arrêt du cycle en G2, probablement par stabilisation ou activation de p16^{INK4a} (Gabrielli *et al.*, 1999). Chazal *et al.* (2002) ont d'ailleurs montré que de faibles doses d'UVB entraînent une accumulation de p16^{INK4a} dans des kératinocytes humains normaux. De même, l'irradiation UV de kératinocytes exprimant l'oncoprotéine E6 d'HPV cutané entraîne l'arrêt du cycle cellulaire *via* l'activation du gène TP53 et de son gène cible p21 (Jackson et Storey, 2000).

En revanche, l'oncoprotéine E7 des HPV muqueux de type 16 empêche l'arrêt du cycle en G1 induit par les UV, et ce, par inactivation de p105^{Rb} et d'autres protéines cellulaires (Loignon et Drobetski, 2002). Giarre *et al.* (2001) ont aussi montré que E7 d'HPV16 déstabilise la p105^{Rb} et neutralise la fonction inhibitrice de p16^{INK4a}, ce que ne fait pas la protéine E7 des HPV cutanés de type 1. Le potentiel oncogène de E7 d'HPV16 serait en partie lié à l'absence d'arrêt du cycle cellulaire en G1, contrairement à E7 d'HPV1 qui n'empêche pas l'arrêt du cycle en G1. Enfin, l'activité des différents gènes précités peut être inhibée ou modifiée s'ils sont la cible de mutations induites par les UV, ce qui explique les discordances entre les résultats obtenus sur des tumeurs infectées par HPV et les modèles expérimentaux issus de cellules transfectées par les gènes codant les oncoprotéines d'HPV (Butz *et al.*, 1999).

2.4. HPV, UV et réparation de l'ADN

La mutation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire peut être aussi à l'origine du processus de carcinogenèse. C'est le cas des mutations du gène TP53 induites par les UV. La protéine p53 mutée ne peut plus assurer son rôle de « gardien du génome ». L'infection des cellules par les HPV n'augmente pas la « mutabilité » de ce gène par les UV (Ford *et al.*, 1998). En revanche, il a été montré *in vitro* que les mécanismes de réparation de l'ADN par excision (qui sont dépendants de la p53) sont altérés par la présence d'HPV muqueux à haut risque (HPV16), voire par la simple présence du gène E6 de cet HPV (Ford *et al.*, 1998 ; Rey *et al.*, 1999 ; El-Mahdy *et al.*, 2000). Ces données montrent que l'action transformante des HPV n'est pas due uniquement à une perte du contrôle du cycle cellulaire, mais aussi, dans le cas d'irradiation UV, à la déficience des systèmes de réparation.

2.5. HPV et polymorphisme de TP53

Bien que l'inactivation de p53 et p105^{Rb} par les oncoprotéines des HPV muqueux joue un rôle important dans la carcinogenèse épithéliale, il existe probablement un déterminisme génétique expliquant que certains patients vont développer de façon plus fréquente des cancers épithéliaux. En 1998, Storey *et al.* (1998) ont montré le rôle d'un polymorphisme génétique de TP53 au niveau du codon 72 de l'exon 4, qui s'exprime par la présence d'un résidu proline ou d'un résidu arginine en position 72 de la protéine p53. Ainsi, la présence d'un

résidu arginine rend p53 beaucoup plus sensible à la dégradation *in vitro* par E6 des HPV muqueux 16, 18 ou 11. Dans un travail récent, nous avons montré que le génotype arginine/arginine représentait un facteur de risque potentiel pour le développement de cancers cutanés épithéliaux chez les patients greffés rénaux (Cairey-Remonnay *et al.*, 2002a). En effet, le taux d'homozygotie arginine/arginine était significativement supérieur dans les tumeurs de patients transplantés (83 %) par rapport aux patients immunocompétents avec (60 %) ou sans tumeur (59 %). Il n'existait toutefois pas de corrélation entre le génotype de TP53 et la présence d'ADN d'HPV cutanés ou muqueux, suggérant que d'autres cofacteurs sont vraisemblablement impliqués. Ainsi, McGregor *et al.* (2002) ont montré que les individus arginine/arginine présentaient une sensibilité cutanée aux UV plus importante que les individus possédant un résidu proline. De plus, une perte d'hétérozygotie dans les cancers non mélaniques était plus fréquente chez les individus arginine/proline par rapport aux individus arginine/arginine. La forme arginine de p53 serait préférentiellement mutée, ce qui pourrait expliquer son implication dans la carcinogenèse cutanée. McGregor *et al.* (2002) suggèrent donc que la forme native proline de p53 est plus efficace que la forme arginine dans son rôle de gardienne du génome, en cas d'infection par HPV. D'autres polymorphismes génétiques ne sont pas à exclure. Une étude récente a montré que le polymorphisme génétique d'un gène de détoxification des radicaux libres produits sous l'action des UV était associé au risque de développement de cancers cutanés chez les patients greffés rénaux soumis à une forte exposition aux radiations ionisantes (Ramsay *et al.*, 2001). Ainsi, le génotype homozygote de la glutathion S-transférase mu1 était significativement plus fréquent (70 %) chez les patients greffés rénaux présentant des cancers épidermoïdes cutanés que chez les transplantés rénaux exempts de cancer cutané (47,6 %). Malheureusement, les auteurs n'indiquaient pas le statut viral HPV de leurs patients. Il serait souhaitable d'étudier d'autres gènes de susceptibilité aux UV, en particulier le gène codant le récepteur de la mélanocortine 1 (MC1R) (Scott *et al.*, 2002) chez les malades immunodéprimés susceptibles de développer des cancers cutanés associés à HPV. En effet, ce gène est impliqué dans la susceptibilité cutanée aux UV. Récemment, différentes observations ont suggéré que les homologues de p53, p73 et p63 pouvaient eux aussi jouer un rôle dans la carcinogenèse épithéliale associée aux HPV muqueux (O'Nions *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2001). La protéine p73, en se fixant sur p53, empêche celle-ci d'exercer son effet proapoptotique, et la formation des complexes p73-p53 serait favorisée par le variant homozygote arginine de p53 (Marin *et al.*, 2000).

2.6. HPV, UV et apoptose

Après l'irradiation UVB de kératinocytes, le gène TP53 est activé permettant aussi d'induire l'apoptose, sans que la protéine proapoptotique Bax ne soit activée (Qin *et al.*, 2002). En cas de mutations constitutionnelles ou acquises de p53, ces processus ne sont plus régulés et peuvent conduire au développement d'une

tumeur cutanée (Jiang *et al.*, 1999 ; Ziegler *et al.*, 1994). Cependant, les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, qui présentent une mutation constitutionnelle du gène TP53, ne sont pas prédisposés aux cancers cutanés induits par les UV, ce qui suggère que des processus d'apoptose peuvent être mis en jeu *via* des voies indépendantes de p53. L'activation de la voie Fas/Fas ligand (Leverkus *et al.*, 1997 ; Hill *et al.*, 1999), la libération du facteur inducteur de l'apoptose (AIF) (Cande *et al.*, 2002) ainsi que des facteurs activant les caspases (Smac/Diablo et Omi) (Chai *et al.*, 2000 ; Martins *et al.*, 2002), et la stabilisation de la protéine proapoptotique Bak (Jackson *et al.*, 2000) pourraient être impliqués dans l'apoptose induite par les UV. La protéine E6 des HPV cutanés (HPV 77, 5 et 8) n'induit pas la dégradation de p53. Toutefois, l'apoptose de cellules infectées par ces HPV est inhibée après irradiation UV (Jackson et Storey, 2000). Il en est de même en ce qui concerne des cellules génétiquement déficientes en p53, ce qui permet de suggérer que E6 est capable d'inhiber des voies apoptotiques indépendantes de p53 (Jackson et Storey, 2000). Les mécanismes moléculaires de l'inhibition de l'apoptose par E6 des HPV77, 5 et 8 ne sont pas encore connus, mais ils pourraient impliquer les protéines proapoptotiques de la famille Bcl2. Jackson *et al.* (2000) ont montré que les UVB stimulent l'expression de la protéine proapoptotique Bak (mais non Bax, ni Bik) favorisant l'élimination par apoptose des kératinocytes irradiés. En revanche, l'oncoprotéine virale E6 des HPV cutanés de type 5, 8 et 77 qui dégrade la protéine Bak, bloque le processus apoptotique de kératinocytes irradiés. De plus, les tumeurs cutanées infectées par ce type d'HPV n'expriment pas la protéine Bak (Jackson *et al.*, 2002). Bak serait donc potentiellement impliquée dans la carcinogenèse cutanée associée aux UV et aux HPV cutanés. Zhang *et al.* (2002) ont aussi montré que la protéine virale E5 des HPV muqueux de type 16 protégeait les kératinocytes de l'apoptose induite par les UVB, après fixation de E5 sur le récepteur à l'EGF, et activation des voies de signalisation en aval (PI3-kinase, protéine kinase B et ERK1/2 MAPK). Enfin, Simbulan-Rosenthal *et al.* (2002) ont démontré que l'immortalisation de kératinocytes humains normaux par les oncoprotéines E6 et E7 des HPV de type 16 modifiait la réponse apoptotique de ces cellules aux UVB. La modulation de l'apoptose induite par les UV en présence des protéines E6 et E7 des HPV16 a été récemment confirmée par Lee *et al.* (2002). En effet, l'apoptose d'astrocytes induite par les UV diminue lorsque E7 est hyperexprimée, alors qu'elle augmente lorsque E6 est hyperexprimée.

3. Rôle du système immunitaire au cours de la carcinogenèse cutanée liée aux HPV et aux UV

Il est maintenant bien établi que des épisodes d'irradiation intense par les UVB diminuent fortement les réponses immunitaires systémiques et locales (Aubin, 2002). Au niveau de la peau, ce phénomène se traduit, chez l'Homme comme chez les rongeurs, par une chute du nombre de cellules exprimant les complexes

majeurs d'histocompatibilité de classe II, liée essentiellement à une déplétion des cellules de Langerhans épidermiques. Cela peut être à l'origine d'une déficience dans l'initiation d'une réponse immunitaire, dans la mesure où ces cellules, qui possèdent des propriétés très efficaces de présentation de l'antigène, jouent le rôle de sentinelles aux interfaces air/épithélium. Les irradiations conduisent également à la perte de certaines fonctions effectrices. Chez les souris irradiées, les réactions d'hypersensibilité de contact ou d'hypersensibilité retardée à un alloantigène sont inhibées suite à la génération d'une réponse lymphocytaire suppressive de type Th2. Une étude chez l'Homme a montré une diminution significative du taux de lymphocytes T et de cellules CD4 + dans la circulation générale pendant les périodes de fort ensoleillement (Garssen *et al.*, 1998). Ainsi, un défaut de mise en place d'une réponse immunitaire, accompagné de la perte de fonctions immunitaires favoriseront le développement de niches écologiques propices à la colonisation et au développement des HPV, comme on peut le constater pour d'autres agents infectieux (Norval, 2001). Il est également remarquable de constater que l'infection kératinocytaire par les HPV ne s'accompagne que d'une réaction inflammatoire très faible, voire inexistante. En l'absence de réaction inflammatoire, la présentation des protéines virales par les cellules dendritiques épidermiques aux lymphocytes est donc fortement compromise. De plus, les kératinocytes infectés par les HPV semblent résistants vis-à-vis des lymphocytes T cytotoxiques. Les kératinocytes pourraient ainsi représenter un sanctuaire protégé sur le plan immunologique. Stockfleth *et al.* (2002) ont récemment montré que l'application d'un immunomodulateur, l'imiquimod, entraînait la guérison clinique, histologique et virologique de lésions épithéliales infectées par HPV. Cet effet bénéfique s'expliquerait par la reconstitution locale d'une réponse immunitaire normale, préalablement altérée par les HPV. Ces résultats suggèrent donc un effet immunosuppresseur directement induit par les protéines virales, qui favoriserait la persistance du virus au niveau de l'épiderme, et éventuellement le développement de cellules tumorales, y compris chez les sujets immunocompétents (Frazer *et al.*, 1999).

4. Conclusion

La peau constitue une barrière efficace contre toute agression environnementale (physique, chimique et biologique). Les UV, tout comme les HPV, sont des agents potentiellement carcinogènes. Dans les cas particuliers d'exposition aux radiations UV et/ou aux HPV, des systèmes de surveillance efficaces (systèmes de réparation de l'ADN, système immunitaire) permettent de déceler ces agressions et d'y faire face, ce qui limite l'apparition de lésions malignes. Si le rôle carcinogène des HPV muqueux est bien établi pour le cancer du col de l'utérus, l'implication des HPV dans la carcinogenèse cutanée demeure encore spéculatif. L'ADN d'HPV est très fréquemment détecté dans les lésions cutanées bénignes, précancéreuses et cancéreuses (contrairement à la peau saine), que ce soit chez

les sujets immunocompétents ou immunodéprimés. De plus, l'association spatio-temporelle entre les UV et les HPV semble favoriser leurs propriétés oncogéniques, essentiellement par le biais d'une inhibition de l'apoptose. Bien que la charge virale des cellules infectées soit très faible, la persistance de protéines virales, en particulier E6, qui permet la survie des cellules infectées par l'intermédiaire d'une inhibition de l'apoptose ou d'une tolérance immunitaire, joue probablement un rôle essentiel dans la carcinogenèse cutanée associée aux HPV et aux UV (Pfister et Ter Schegget, 1997 ; Meyer *et al.*, 2001 ; Storey, 2002).

Remerciements

Les auteurs remercient la Ligue contre le cancer et l'ARERS pour le soutien financier d'Olivier Humbey.

Références bibliographiques

- Allday MJ, Inman GJ, Crawford DH, Farrell PJ (1995). DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is transactivation competent and G2/M when it is transactivation defective. *EMBO J*, **14** : 4994-5005.
- Aubin F (2002). Photo-immunologie. *Encycl. Méd. Chir.* Elsevier, Paris, Dermatologie 98 780-A-10, 7 p.
- Basset-Seguín N, Chazal M, Soufir N (2001). Rayonnement UV et cancers cutanés non mélaniques. In : Aubin F, Humbert P. *Rayonnement ultraviolet et peau*. John Libbey Eurotext, Paris, 90-93.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer : a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, **87** : 796-802.
- Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J (1997). Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol*, **108** : 712-715.
- Boxman IL, Mulder LH, Russell A, Bouwes Bavinck JN, Green A, Ter Schegget J (1999). Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol*, **141** : 246-249.
- Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, Green A (2000). Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer*, **86** : 118-121.
- Butz K, Whitaker N, Denk C, Ullmann A, Geisen C, Hoppe-Seyler F (1999). Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV-positive cancer cells. *Oncogene*, **18** : 2381-2386.
- Cairey-Remonnay S, Humbey O, Mougín C, Algros MP, Mauny F, Kanitakis J, Euvrard S, Laurent R, Aubin F (2002a). TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in cutaneous squamous cell carcinoma.

- noma and benign epithelial lesions of renal transplant recipients and immunocompetent individuals: lack of correlation with human papillomavirus status. *J Invest Dermatol*, **118** : 1026-1031.
- Cairey-Remonnay S, Algros MP, Kanitakis J, Euvrard S, Mougin C, Laurent R, Aubin F (2002b). P53 expression and HPV status in cutaneous squamous cell carcinoma of renal transplant recipients and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol*, **118** : 1089.
- Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, **84** : 215-222.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406** : 855-862.
- Chazal M, Marionnet C, Michel L, Mollier K, Dazard JE, Della Valle V, Larsen CJ, Gras MP, Basset-Seguin N (2002). P16 (INK4A) is implicated in both the immediate and adaptative response of human keratinocytes to UVB irradiation. *Oncogene*, **21** : 2652-2661.
- Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P (2001). Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer*, **84** : 1616-1623.
- de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, ter Schegget J, Vermeer BJ, de Fijter JW, Bruijn JA, Westendorp RG, Bouwes Bavinck JN (2000). The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer. *Transplantation*, **69** : 44-49.
- de Villiers EM (1998). Human papillomavirus infections in skin cancers. *Bio-med Pharmacother*, **52** : 26-33.
- Douki T, Cadet J (2001). Effets des rayonnements UV sur l'ADN. In: Aubin F, Humbert P. *Rayonnement ultraviolet et peau*. John Libbey Eurotext, Paris, 9-16.
- El-Mahdy MA, Hamada FM, Wani MA, Zhu Q, Wani AA (2000). p53-degradation by HPV-16 E6 preferentially affects the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and sensitizes mammary epithelial cells to UV-irradiation. *Mutat Res*, **459** : 135-145.
- Ford JM, Baron EL, Hanawalt PC (1998). Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res*, **58** : 599-603.
- Frazer IH, Thomas R, Zhou J, Leggatt GR, Dunn L, McMillan N, Tindle RW, Filgueira L, Manders P, Barnard P, Sharkey M (1999). Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev*, **168** : 131-142.
- Gabrielli BG, Sarcevic B, Sinnamon J, Walker G, Castellano M, Wang XQ, Ellem KA (1999). A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay. *J Biol Chem*, **274** : 13961-13969.
- Garsen J, Norval M, el-Ghorr A, Gibbs NK, Jones CD, Cerimele D, De Simone C, Caffieri S, Dall'Acqua F, De Gruijl FR, Sontag Y, Van Loveren H (1998). Estimation of the effect of increasing UVB exposure on the human immune system and related resistance to infectious diseases and tumours. *J Photochem Photobiol B*, **42** : 167-179.
- Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M (2001). Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16

- E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol*, **75** : 4705-4712.
- Gibson GE, O'Grady A, Kay EW, Leader M, Murphy GM (1997). p53 tumor suppressor gene protein expression in premalignant and malignant skin lesions of kidney transplant recipients. *J Am Acad Dermatol*, **36** : 924-931.
- Gniadecki R, Hansen M, Wulf HC (1997). Two pathways for induction of apoptosis by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **109** : 163-169.
- Gujuluva CN, Baek JH, Shin KH, Cherrick HM, Park NH (1994). Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene*, **9** : 1819-1827.
- Harwood CA, Surentheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM (2000). Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol*, **61** : 289-297.
- Herzinger T, Funk JO, Hillmer K, Eick D, Wolf DA, Kind P (1995). Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene*, **11** : 2151-2156.
- Hill LL, Ouhtit A, Loughlin SM, Kripke ML, Ananthaswamy HN, Owen-Schaub LB (1999). Fas ligand : a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science*, **285** : 898-900.
- Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*, **14** : 3065-3073.
- Jackson S, Storey A (2000). E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene*, **19** : 592-598.
- Jackson S, Ghali L, Harwood C, Storey A (2002). Reduced apoptotic levels in squamous but not basal cell carcinomas correlates with detection of cutaneous human papillomavirus. *Br J Cancer*, **87** : 319-323.
- Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, Kripke ML (1999). p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, **18** : 4247-4253.
- Lee WT, Lee SH, Carriedo SG, Giffard RG, Yoon YJ, Kim JH, Park KA, Lee JE (2002). UV-vulnerability of human papilloma virus type-16 E7-expressing astrocytes is associated with mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation. *Mol Cells*, **14** : 288-294.
- Leverkus M, Yaar M, Gilchrist BA (1997). Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp Cell Res*, **232** : 255-262.
- Loignon M, Drobetsky EA (2002). The initiation of UV-induced G (1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis*, **23** : 35-45.
- Majewski S, Jablonska S (2002). Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations ? *Arch Dermatol*, **138** : 649-654.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG Jr (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet*, **25** : 47-54.
- Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through

- a reaper-like motif. *J Biol Chem*, 277 : 439-444.
- McGregor JM, McKee PH, Khorshid M, Proby CM (1996). P53 expression and human papillomavirus infection in transplant recipients and in patients with epidermodysplasia verruciformis. *Br J Dermatol*, 134 : 374.
- McGregor JM, Berkhout RJ, Rozycka M, ter Schegget J, Bouwes Bavinck JN, Brooks L, Crook T (1997). p53 mutations implicate sunlight in post-transplant skin cancer irrespective of human papillomavirus status. *Oncogene*, 15 : 1737-1740.
- McGregor JM, Harwood CA, Brooks L, Fisher SA, Kelly DA, O'nions J, Young AR, Suretheran T, Breuer J, Millard TP, Lewis CM, Leigh IM, Storey A, Crook T (2002). Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. *J Invest Dermatol*, 119 : 84-90.
- Meyer T, Arndt R, Christophers E, Nindl I, Stockfleth E (2001). Importance of human papillomaviruses for the development of skin cancer. *Cancer Detect Prev*, 25 : 533-547.
- Mougin C, Bernard B, Lab M (1997). Biology of papillomavirus infections. I. General characteristics. *Ann Biol Clin*, 55 : 555-563.
- Norval M (2001). Rayonnement UV et infection. In : Aubin F, Humbert P. *Rayonnement ultraviolet et peau*. John Libbey Eurotext, Paris, 105-109.
- O'Nions J, Brooks LA, Sullivan A, Bell A, Dunne B, Rozycka M, Reddy A, Tidy JA, Evans D, Farrell PJ, Evans A, Gasco M, Gusterson B, Crook T (2001). p73 is over-expressed in vulval cancer principally as the Delta2 isoform. *Br J Cancer*, 85 : 1551-1556.
- Padlewska K, Ramoz N, Cassonnet P, Riou G, Barrois M, Majewski S, Croissant O, Jablonska S, Orth G (2001). Mutation and abnormal expression of the p53 gene in the viral skin carcinogenesis of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol*, 117 : 935-942.
- Park JS, Kim EJ, Lee JY, Sin HS, Namkoong SE, Um SJ (2001). Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer*, 91 : 822-827.
- Pfister H, Ter Schegget J (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol*, 15 : 335-347.
- Pizarro A, Gamallo C, Castresana JS, Gomez L, Palacios J, Benito N, Espada J, Fonseca E, Contreras F (1995). p53 protein expression in viral warts from patients with epidermodysplasia verruciformis. *Br J Dermatol*, 132 : 513-519.
- Proby CM, Storey A, McGregor JM, Leigh IM (1996). Does human papillomavirus play a role in non-melanoma skin cancer ? *Papillomavirus Report*, 7 : 53.
- Purdie KJ, Pennington J, Proby CM, Khalaf S, de Villiers EM, Leigh IM, Storey A (1999). The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J*, 18 : 5359-5369.
- Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bacon P, Panella J, Choubey D, Nickoloff BJ (2002). Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene*, 21 : 2991-3002.
- Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, Favre M (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet*, 32 : 579-581.
- Ramsay HM, Harden PN, Reece S, Smith AG, Jones PW, Strange RC, Fryer AA (2001). Polymorphisms in

- glutathione S-transferases are associated with altered risk of nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients : a preliminary analysis. *J Invest Dermatol*, **117** : 251-255.
- Rey O, Lee S, Park NH (1999). Impaired nucleotide excision repair in UV-irradiated human oral keratinocytes immortalized with type 16 human papillomavirus genome. *Oncogene*, **18** : 6997-7001.
- Ro YS, Cooper PN, Lee JA, Quinn AG, Harrison D, Lane D, Horne CH, Rees JL, Angus B (1993). p53 protein expression in benign and malignant skin tumours. *Br J Dermatol*, **128** : 237-241.
- Ruhland A, de Villiers EM (2001). Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines. *Int J Cancer*, **91** : 828-834.
- Scott MC, Wakamatsu K, Ito S, Kadekaro AL, Kobayashi N, Groden J, Kavanagh R, Takakuwa T, Virador V, Hearing VJ, Abdel-Malek ZA (2002). Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci*, **115** : 2349-2355.
- Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, Hamm H, Goos M, Hausteiner UF, Jung EG (1996). Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst*, **88** : 802-811.
- Simbulan-Rosenthal CM, Veldman A, Veldman T, Schlegel R, Rosenthal DS (2002). HPV E6/7 immortalization sensitizes human keratinocytes to UVB by altering the pathway from caspase-8 to caspase-9-dependent apoptosis. *J Biol Chem*, **277** : 24709-24716.
- Steger G, Pfister H (1992). *In vitro* expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol*, **125** : 355-360.
- Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, Salasche S, Papadopoulos L, Ulrich C, Christophers E (2002). A randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5 % imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch Dermatol*, **138** : 1498-1502.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, **393** : 229-234.
- Storey A (2002). Papillomaviruses : death-defying acts in skin cancer. *Trends Mol Med*, **8** : 417-21.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, **189** : 12-19.
- Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J (1999). Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med*, **341** : 1633-1638.
- Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM (1999). Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*, **263** : 388-394.
- Zhang B, Spandau DF, Roman A (2002). E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin from UVB-irradiation-induced apoptosis. *J Virol*, **76** : 220-231.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, **372** : 773-776.

Publication n°6

Human papillomavirus in melanoma

Guerrini JS, Prétet JL, Mougin C, Aubin F

Br J Dermatol. 2005, 152(5):909-14

References

- 1 Rubegni P, Burroni M, Sbrano P, Andreassi L. Digital dermoscopy analysis and internet-based program for discrimination of pigmented skin lesion dermoscopic images. *Br J Dermatol* 2005; **152**:395–6.
- 2 Oka H, Hashimoto M, Iyatomi H et al. Internet-based program for automatic discrimination of dermoscopic images between melanomas and Clark naevi. *Br J Dermatol* 2004; **150**:1041 (Letter).

Conflicts of interest: none declared.

Human papillomavirus in melanoma

DOI: 10.1111/j.1365-2133.2005.07099.x

SIR, We read with interest the recent article by La Placa et al.¹ investigating the detection of high-risk (HR) mucosal human papillomavirus (HPV) in primary melanoma (PM) and in acquired dysplastic melanocytic naevi. Using two different polymerase chain reaction (PCR)–enzyme-linked immunosorbent assay methods, the authors found HR HPV genotypes in 24% of acquired dysplastic melanocytic naevi and in 27% of 14 PMs compared with 0% in the control skin samples. However, we wish to make the following comments. Five of 14 melanoma patients positive for HPV DNA were aged over 67 years, and there is evidence showing an association between HPV infection and ageing in immunocompetent patients or in patients with a history of cutaneous skin cancer.² Only three studies^{3–5} regarding the association between melanoma and HPV are available. First, using a nonspecific polyclonal antibody raised against bovine papillomavirus 1, Dreau et al.³ found HPV in 58% of 12 melanomas. Then, using PCR followed by sequencing, Miracco et al.⁴ observed only one case among 54 malignant melanomas of mucosal HR HPV-16 DNA. Finally, seroreactivity to HPV-16 was studied in 84 patients with malignant melanoma and no association for HPV-16 serorecognition was found.⁵

A significant problem for investigations of an association between HPV and skin cancer is that HPV is part of the microbiological flora of healthy human skin. Indeed, high detection rates (25–65%) of both HR mucosal and cutaneous HPV DNA have been found in healthy skin biopsies, plucked hairs and skin swab samples in large series of immunocompetent individuals.⁶ An impressive diversity of known HPV types or putative novel types was identified by sequencing. In general, higher detection rates were found with primers detecting epidermodysplasia verruciformis-related HPV types compared with primers allowing the detection of mucosal DNA HPV. However, HR HPV DNA, especially oncogenic HPV-16, is frequently detected in distal digital and periungual skin in contrast to other skin areas, suggesting a genital–digital mode of transmission.⁷ Thus, skin HPVs represent ubiquitous viruses, highly prevalent in the normal skin of healthy adults and caus-

ing asymptomatic infections likely to be acquired very early in infancy.⁸ This may suggest a commensalic nature, and HPV positivity in skin tumours may merely reflect contamination of the tumours by viral HPV DNA or by particles harboured in cells shed from infected healthy skin.⁹ It should be noted that in all previous studies regarding the presence of HPV in malignant melanoma, no sample of normal skin from the same patients was investigated.

Altogether, the experimental data reported by the authors merely support the conclusion of a putative role of HPV infection in melanoma development. Larger series comparing tumour and normal skin from melanoma patients with normal skin from healthy patients are still required to demonstrate the potential role of HPV infection in melanoma development.

Department of
Cell Biology EA3181 and
*Department of Dermatology,
University Hospital and Medical School,
IFR133, Besançon, France
Correspondence: François Aubin.
E-mail: francois.aubin@univ-fcomte.fr

J.S. GUERRINI
J.L. PRETET
C. MOUGIN
F. AUBIN*

References

- 1 La Placa M, Ambretti S, Bonvicini F et al. Presence of high-risk mucosal human papillomavirus genotypes in primary melanoma and in acquired dysplastic melanocytic naevi. *Br J Dermatol* 2005; **152**:909–14.
- 2 Struijk L, Bouwes Bavinck JN, Wannings P et al. Presence of human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs is associated with a history of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2003; **121**:1531–5.
- 3 Dreau D, Culberson C, Wyatt S, Holder WD Jr. Human papilloma virus in melanoma biopsy specimens and its relation to melanoma progression. *Ann Surg* 2000; **231**:664–71.
- 4 Miracco C, Palummo N, Lavergne D et al. Malignant melanomas: search for human papillomaviruses. *Arch Dermatol* 2001; **137**:826–7.
- 5 Feltkamp MC, Broer R, di Summa FM et al. Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res* 2003; **63**:2695–700.
- 6 Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH et al. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 1997; **108**:712–5.
- 7 Forslund O, Nordin P, Hansson BG. Mucosal human papillomavirus types in squamous cell carcinomas of the uterine cervix and subsequently on fingers. *Br J Dermatol* 2000; **142**:1148–53.
- 8 Antonsson A, Forslund O, Ekberg H et al. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 2000; **74**:11636–41.
- 9 Forslund O, Lindelöf B, Hradil E et al. High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in 'stripped' biopsies from the same tumors. *J Invest Dermatol* 2004; **123**:388–94.

Conflicts of interest: none declared.

Curriculum vitae

CURRICULUM VITAE

GUERRINI Jean-Sébastien

Né le 15 Mars 1978
Route d'Avrigney
70150 Cult
06 75 62 00 33
jean-sebastien.guerrini@univ-fcomte.fr



Vie maritale, 2 enfants
Nationalité française.

FORMATION

- 2003-2008** Thèse de doctorat d'Université en Sciences de la Vie et de la Santé – en cours.
Sujet : Modulation de l'apoptose induite par les rayonnements ultraviolets dans des cellules épithéliales infectées par des papillomavirus humains. Université de Franche-Comté, EA 3181.
- 2002-2003 DEA de Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire.
Université de Franche-Comté, Université de Bourgogne, mention bien (3^{ème}/32, 1^{er}/9 (étudiants bisontins seulement)).
- 2001-2002 Maîtrise de Biochimie, UFR des Sciences et Techniques de Besançon, mention bien (2^{ème}/36).
- 2000-2001 Licence de Biochimie, UFR des Sciences et Techniques de Besançon, mention assez-bien (7^{ème}/63).
- 1999-2000 DEUG Sciences de la Vie, 2^{ème} année, UFR des Sciences et Techniques de Besançon, mention bien (4^{ème}/275).
- 1998-1999 DEUG Sciences de la Vie, 1^{ère} année, UFR des Sciences et Techniques de Besançon.
- 1996-1998 PCEM1, UFR Médecine Pharmacie de Besançon.
- 1995-1996 Baccalauréat série S, Lycée Jules Haag de Besançon.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

En Enseignement :

- 2006-2007** : ATER demi poste spécifique CIES à l'Université de Franche-Comté, UFR SMP, service en biologie cellulaire.
Cours magistraux de transgénèse, Master Biologie Moléculaire de la Cellule
Enseignements dirigés de Biologie Cellulaire 2 (PCEM1/APEMK)
Travaux pratiques de l'UE de M1 Biologie Moléculaire de la Cellule : cytométrie en flux, extraction et purification de vecteur, communication scientifique réalisation de poster
- 2003-2006** : Moniteur à l'Université de Franche-Comté, UFR SMP, service entre biologie cellulaire et l'immunologie.

Cours magistraux de culture cellulaire, PCEM2, Module de biologie cellulaire
Enseignements dirigés de Biologie Cellulaire 2 (PCEM1/APEMK)
Travaux pratiques de l'UE de biologie cellulaire : cytométrie en flux, PCR et PCR en temps réel
Travaux pratiques du master d'immunologie : cytométrie en flux
Travaux pratiques des enseignements de biologie cellulaire de l'ISIFC : PCR et PCR en temps réel

En Laboratoire :

2007-2008 : En charge de la l'optimisation de la fonctionnalisation d'une biopuce intégrée dans un dispositif innovant de transfusion

Techniques utilisées :

Système BIAcore 2000 : appareillage de résonance de plasmon de surface permettant de caractériser des interactions moléculaires.
Fonctionnalisation de surfaces d'or
Microscopie de force atomique

2003-2008 : Préparation du doctorat, EA 3181 : Carcinogenèse épithéliale, marqueurs prédictifs et pronostiques.
« Transfection rétrovirale de kératinocytes humains par les oncoprotéines virales E6 et E7 des papillomavirus humains du genre bêta ».

Techniques utilisées :

Biologie cellulaire :

Culture de lignées cellulaire humaines (HeLa, NCTC, A-253, HaCaT) et culture de kératinocytes primaires humains sur couche nourricière (fibroblastes murins, lignée 3T3)
Extraction de kératinocytes à partir d'abdominoplastie
Production de surnageants rétroviraux
Infection de cellulaires primaires par des rétrovirus recombinants
Western blotting
Hybridation in-situ
Immunomarquages
Irradiation de cellules par des UVB

Biologie Moléculaire :

Extraction d'ADN
Extraction protéique
Extraction d'ARN
Amplification d'ADN par PCR et PCR en temps réel
Synthèse d'ADNc à partir d'ARN (RT PCR)
Analyse de cycle cellulaire (cytométrie en flux)
Clonage : préparation de vecteurs plasmidiques d'expression de E6 et E7 d'HPV 5 et 8, clonage de vecteurs rétroviraux d'expression de E6 et E7 d'HPV 5 et 8, vecteurs d'expression de protéines de fusion GST-E6 et GST-E7 d'HPV 5 et 8

Bactériologie :

Cultures bactériennes
Transformation
Mini et Maxi-Preps

2002-2003 (juin-juin) : Stage de DEA, Laboratoire de Biologie Cellulaire, CHU Besançon et IETG.
« Modulation de l'apoptose induite par les rayonnements ultraviolets dans des cellules épithéliales infectées par des papillomavirus humains ».

Techniques utilisées :

Biologie cellulaire :

Culture de cellules humaines dérivées de cancer du col de l'utérus (HeLa), kératinocytes humains (HaCaT).

Irradiation de cellules par les UVB.

Marquage de cellules par des fluorochromes (Hoechst) et détection par microscopie à fluorescence

Analyse de cycle cellulaire et détection de l'apoptose par cytométrie en flux

Biologie Moléculaire :

Extraction d'ADN : technique Phénol/Chloroforme, précipitation à l'éthanol glacial

Amplification d'ADN cellulaire par PCR

Détection de protéines par la technique de western blotting

2001 (juin à septembre) : Stage de Maîtrise, Laboratoire de Virologie - Biologie Cellulaire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon Franche-Comté.

« *Analyse de l'expression génique au cours de l'apoptose de cellules cervicales tumorales par la technique de protection à la ribonucléase.* »

Techniques utilisées :

Culture de cellules dérivées de cancer du col de l'utérus (HeLa, CaSki, C33A).

Extraction d'ARN

Technique de protection à la ribonucléase

Utilisation de Phosphore 32

COMPETENCES COMPLEMENTAIRES

Stage de formation au travail en laboratoire de niveau L3 (formation INSERM, U645, Besançon, avril 2005 et formation au CIRC, Lyon, mai 2005)

AFPS (Attestation de Formation au Premiers Secours), CIES, mai 2004

Formation à l'utilisation d'extincteurs, CHU J-Minjoz, 2005

STAGES CIES (Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur)

Risques professionnels et secourismes

Communication Orale (X2)

COLLABORATIONS

Stage de 6 mois au Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC, Lyon) dans le groupe « Infection et Biologie des Cancers ». Stage de formation aux techniques d'infection à l'aide de rétrovirus, clonage.

Dans le cadre du projet 1 du cancéropôle Grand Est (Identification of regulatory pathways involved in HPV-induced carcinogenesis) travaux avec l'équipe « Différenciation Cellulaire » du centre allemand de recherche contre le cancer (DKFZ) dirigée par le Pr Angel Alonso. Titre du sous projet concerné : Down-regulation of ligand- and UV-induced apoptosis by mucosal and skin HPV types.

PUBLICATIONS

- MERMET I, KLEINCLAUSS F, MARANDIN A, **GUERRINI JS**, ANGININ R, TIBERGHIE P, SAAS P, AUBIN F. Preventive effect of ultraviolet radiation on murine chronic sclerodermatous graft-versus-host disease. *Transplantation*, 2007; 84:1696-70
- **GUERRINI JS**, MERMET I, CAIREY-REMONNAY S, DROBACHEFF C, FAIVRE B, GAILLARD M, et al. Cervical intraepithelial neoplasia associated with epidermodysplasia verruciformis HPV in an HIV-infected patient: a manifestation of immune restoration syndrome. *Eur J Dermatol*, 2007; 17: 149-52
- RIETHMULLER D, **GUERRINI JS**, AUBIN F. [Intraepithelial lesions and neoplasia associated with human papillomavirus infection]. *Bull Acad Natl Med* 2007; 191: 601-9; discussion 609.
- AUBIN F, **GUERRINI JS**. [Clinical and benign aspects of human papillomavirus-associated lesions]. *Bull Acad Natl Med* 2007; 191: 585-97.
- **GUERRINI JS**, PRETET JL, MOUGIN C, AUBIN F. Human papillomavirus in melanoma. *Br J Dermatol*. 2006, 154: 572
- MONNIER-BENOIT S, MAUNY F, RIETHMULLER D, **GUERRINI JS**, CAPILNA M, FELIX S, SEILLES E, MOUGIN C, PRETET JL. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 2006; 102: 22-31.
- HUMBEY O, CAIREY-REMONAY S, **GUERRINI JS**, ALGROS MP, MOUGIN C, BITTARD H, AUBIN F. Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer*, 2003; 39: 684-90
- AUBIN F, HUMBEY O, **GUERRINI JS**, MOUGIN C, LAURENT R. Cancers cutanés non Mélaniques et Papillomavirus Humains. *Ann Dermatol Venerol* 2003;130: 1131-8
- AUBIN F, HUMBEY O, **GUERRINI JS**, PRETET JL, MOUGIN C. Ultraviolets et Papillomavirus Humains. In : Aubin F, Prétet JL, Mougin C Eds. *Papillomavirus humains. Biologie et pathologie tumorale*. EM Inter, Tec et Doc, Paris, 2003 : 125-38

COMMUNICATIONS ORALES

GUERRINI JS, BOUVARD V, OSWALD E, ALONSO A, TOMMASINO M, MOUGIN C, AUBIN F. E6 and E7 from different beta-HPV do not interfere in HaCat cells UVB-induced apoptosis. 4th International Meeting on HPV and Skin Cancer, Besançon, France, June 28-30, 2007. In: *Bull Cancer Bulletin du Cancer. Volume 94, Numéro 6, 613-23, Juin 2007*

OSWALD E, BERGNER S, **GUERRINI JS**, TOMMASINO M, AUBIN F, ALONSO A. Defensin expression in HPV5 or HPV8 E6/E7 transduced human primary keratinocytes. 4th International Meeting on HPV and Skin Cancer, Besançon, France, June 28-30, 2007. In: *Bull Cancer Bulletin du Cancer. Volume 94, Numéro 6, 613-23, Juin 2007*

GUERRINI JS, BOUVARD V, OSWALD E, TOMMASINO M, ALONSO A, AUBIN F. Les protéines E6 et E7 des HPV de genre bêta n'interfèrent pas dans l'apoptose induite par les rayonnements ultraviolet de cellules HaCat. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, Lyon, 22 Juin 2007. In : *J Invest Dermatol* 2007 ; 127 : 2477.

GUERRINI JS, BOUVARD V, OSWALD E, TOMMASINO M, ALONSO A, AUBIN F. Les protéines E6 et E7 de différents papillomavirus de genre bêta n'interfèrent pas dans l'apoptose de kératinocytes HaCat induite par les UVB. Journée Annuelle de Dermatologie Besançon-Lausanne, Lausanne le 21 Juin 2007.

GUERRINI JS, HUMBEY O, CHARLOT JF, PRETET JL, MOUGIN C, AUBIN F. Effet de la cyclosporine et de la rapamycine sur l'apoptose, induite par les radiations ultraviolettes B, des kératinocytes transfectés par l'oncoprotéine E6 des papillomavirus humains. Forum des jeunes chercheurs, Besançon, 10-11 juin 2004

GUERRINI JS, HUMBEY O, CHARLOT JF, PRETET JL, MOUGIN C, AUBIN F. Effet de la cyclosporine et de la rapamycine sur l'apoptose, induite par les radiations ultraviolettes B, des kératinocytes transfectés par l'oncoprotéine E6 des papillomavirus humains. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, Nice, 11-12 juin 2004

COMMUNICATIONS AFFICHEES

GUERRINI JS, BOUVARD V, OSWALD E, ALONSO A, TOMMASINO M, MOUGIN C, AUBIN F. Les protéines E6 et E7 de différents bêta-HPV ne modulent pas l'apoptose de cellules HaCaT irradiées par des UVB. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, Toulouse 11-13 Septembre 2008

MERMET I, KLEINCLAUSS F, MARANDIN A, **GUERRINI JS**, ANGONIN R, SAAS PH, TIBERGHIE P, AUBIN F. Effect of ultraviolet radiation (UVB or psoralen plus UVA) on murine chronic sclerodermatous graft-versus-host disease. Eur Soc Dermatol Res, Paris, 8-10 Septembre 2006.

KLEINCLAUSS F, MERMET I, MARANDIN A, **GUERRINI JS**, ANGONIN R, TIBERGHIE P, SAAS PH, AUBIN F. UVB irradiation of recipient before and after bone marrow transplantation reduces chronic sclerodermatous graft-versus-host disease by depletion of epidermal Langerhans cells. World Transplant Congress, Boston, 22-27 Juillet 2006 et 16th European Congress of Immunology, Paris 6-9 Septembre 2006.