

Université de Montréal

Caractérisation par analyse moléculaire de variants de l'infection persistante  
par le virus du papillome humain de type 16

par

Marie-Hélène Mayrand

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences biomédicales

Décembre, 1999

© Marie-Hélène Mayrand, 1999



1-1782-1008

W  
4  
U58  
2000  
v.047

1. Institut für Musikwissenschaft

Erweitertes Studium für musikalische Instrumente  
für die Jahre 1999/2000

1. Semester

Prüfung in Musikwissenschaft  
1. Semester

Mitgliedschein für die Teilnahme an der  
Prüfung in Musikwissenschaft  
1. Semester

1. Semester

1. Semester



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation par analyse moléculaire de variants de l'infection persistante  
par le virus du papillome humain de type 16

présenté par :  
Marie-Hélène Mayrand

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Lemay, Président du jury.....  
Allegria Kessous, Membre du jury.....  
Michel Roger, Co-directeur de recherche.....  
François Coutlée, Directeur de recherche.....

Mémoire accepté le : 00-04-28

## SOMMAIRE

Les types oncogènes du virus du papillome humain (VPH) sont maintenant considérés comme des agents causaux du cancer du col utérin. La persistance de l'infection par ces VPH apparaît être une condition importante pour la progression de l'infection vers le cancer. Parmi les VPH oncogènes, le VPH-16 est le plus répandu. On le retrouve fréquemment dans le tractus génital de femmes avec ou sans lésion cervicale. Il est si fréquent que la détection répétée d'ADN de VPH-16 pourrait représenter une réinfection ou une infection persistante.

Pour cette raison, nous avons entrepris une étude utilisant l'analyse moléculaire de variants pour déterminer si des échantillons génitaux consécutifs d'une même femme, démontrant de l'ADN de VPH-16 de façon répétée, contenaient tous le même variant. Nous avons utilisé le Single - Strand Conformation Polymorphism - PCR (SSCP-PCR) et le séquençage pour identifier les variants de VPH-16. Nous avons voulu déterminer la proportion des infections dites persistantes sur la base d'une détection répétée d'ADN de VPH-16, qui sont vraiment des infections persistantes tel que démontré par la détection répétée du même variant de VPH-16. Nous avons également comparé la performance du SSCP-PCR à celle du séquençage pour l'identification de différents variants de VPH-16 et pour la confirmation de l'infection persistante.

Cinquante femmes prenant part à l'Étude Canadienne Femmes-VIH ont été sélectionnées car des échantillons génitaux séquentiels contenaient de façon répétée de l'ADN de VPH-16. Cent quarante-quatre échantillons ont été analysés par SSCP-PCR. La région non codante du génome a été amplifiée avec deux paires d'amorces. Un signal pouvant être interprété a été obtenu pour 141 échantillons. L'analyse SSCP a permis d'identifier 17 variants dans notre population. L'analyse de séquence n'a porté que sur le fragment d'ADN obtenu avec la première paire d'amorces. Un total de 22 variants ont été identifiés avec l'analyse de séquence. Sept variants n'ont pu être distingués entre eux par l'analyse SSCP. De plus, deux variants ont démontré une

différence de signal SSCP avec la deuxième paire d'amorces, changement qui n'a pas été mis en évidence par l'analyse de séquence, qui elle ne s'intéressait qu'à la première paire d'amorces. On a pu observer un changement de variant prédominant au cours de l'étude chez 5 des 50 femmes (10%). Quatre de ces changements ont été mis en évidence par le SSCP et confirmés par le séquençage. Un des changements n'a été identifié que par l'analyse de séquence.

Nos expériences confirment que la majorité des femmes chez qui l'on retrouve de l'ADN de VPH-16 dans des échantillons génitaux consécutifs présentent une infection persistante plutôt qu'une réinfection, comme en témoigne l'identification répétée du même variant. De plus, nous croyons que le SSCP peut représenter une alternative intéressante à la séquence pour différencier l'infection persistante par le VPH-16 d'une réinfection par un variant différent de VPH-16. Toutefois, l'information fournie par l'analyse de séquence est plus complète et plus précise.

## TABLE DES MATIÈRES

| <u>Identification</u>  | <u>page</u> |
|--|-------------|
| Sommaire .....   | iii         |
| Liste des tableaux .....   | vii         |
| Liste des figures .....  | viii        |
| Liste des sigles et abréviations .....   | ix          |
| Introduction .....   | 1           |
| Revue de la littérature .....  | 3           |
| 1. Le virus du papillome humain (VPH) .....  | 3           |
| 1.1 Les caractéristiques virales .....   | 3           |
| 1.2 La taxinomie des PV .....  | 6           |
| 1.3 La physiopathologie des infections à VPH .....   | 9           |
| 2. Considérations épidémiologiques et cliniques .....  | 13          |
| 2.1 L'épidémiologie de l'infection par le VPH .....  | 13          |
| 2.1.1 Les VPH non génitaux .....   | 13          |
| 2.1.2 Les VPH génitaux .....   | 14          |
| 2.2 Les VPH et le cancer du col utérin : évidence<br>supportant l'existence d'un lien causal ..... | 16          |
| 2.2.1 Plausibilité biologique .....  | 16          |
| 2.2.2 Force et reproductibilité du lien .....  | 17          |
| 2.2.3 Séquence temporelle .....  | 18          |
| 2.3 Déterminants de la progression de l'infection<br>persistante vers le cancer .....              | 19          |
| 2.3.1 Facteurs viraux .....  | 20          |
| 2.3.2 Facteurs de l'hôte (immunité) .....  | 20          |
| 2.3.3 Facteurs environnementaux .....  | 23          |
| 3. Infection persistante par le VPH .....  | 25          |
| 3.1 Importance de l'infection persistante .....  | 25          |

| <u>Identification</u>   | <u>page</u> |
|---|-------------|
| 3.2 Caractéristiques épidémiologiques associées<br>à la persistance.....                                    | 27          |
| 4. Techniques de caractérisation de la persistance.....   | 29          |
| 4.1 Définition de la persistance.....   | 29          |
| 4.2 Techniques de détection de l'ADN de VPH et<br>d'identification des types.....                           | 31          |
| 4.2.1 Techniques de détection directes de l'ADN.....  | 31          |
| 4.2.2 Techniques de détection de l'ADN de<br>VPH par amplification du signal.....                           | 32          |
| 4.2.3 Techniques de détection de l'ADN de<br>VPH par amplification de l'ADN.....                            | 34          |
| 4.3 Techniques d'identification des différents variants de<br>VPH-16 (analyse moléculaire de variants)..... | 35          |
| 4.3.1 LSSP-PCR.....   | 37          |
| 4.3.2 SSCP-PCR.....   | 38          |
| 4.3.3 Séquençage.....   | 43          |
| Hypothèses et objectifs.....  | 44          |
| Article.....  | 45          |
| Discussion.....   | 82          |
| Conclusion.....   | 93          |
| Bibliographie.....  | 95          |
| Annexe.....   | 113         |

## LISTE DES TABLEAUX

|   | <u>page</u> |
|---|-------------|
| <b>Article:</b>   |             |
| Table 1: Genetic diversity of 144 HPV-16 isolates from 50 women<br>by SSCP analysis of PCR-amplified LCR.....                             | 60          |
| Table 2: Virological characteristics of consecutive isolates from five<br>women who exhibited changes in HPV-16 variants overtime.....    | 61          |
| Table 3: Sequencing data and SSCP analysis of HPV-16 amplified<br>LCR from 141 HPV-16 isolates.....                                       | 65          |
| <b>Discussion :</b>   |             |
| Tableau I : Efficacité du SSCP à fournir un signal adéquat avec<br>différentes paires d’amorces et caractéristiques du signal obtenu..... | 85          |
| Tableau II : Fréquence et caractéristiques du signal SSCP<br>des différents variants identifiés dans notre population.....                | 86          |



**LISTE DES FIGURES**

|   | <u>page</u> |
|---|-------------|
| <b>Revue de la littérature :</b>  |             |
| Figure 1: Plan schématique du génome de VPH-16.....   | 5           |
| Figure 2: Exemple d'arbre phylogénétique.....   | 8           |
| Figure 3: Représentation schématique du principe de l'analyse SSCP.....   | 39          |
| Figure 4: Schématisation du protocole de SSCP.....  | 41          |
| <b>Article :</b>  |             |
| Figure 1: SSCP patterns of fragment AB (A) and CD (B).....  | 59          |
| Figure 2: Similar SSCP patterns of the AB fragment generated from<br>two consecutive specimens collected from the same woman.....   | 62          |
| Figure 3: Different SSCP patterns of the AB fragment generated from<br>two consecutive specimens collected from the same woman..... | 63          |

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

$^{32}\text{P}$  : phosphore 32

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BPV : 'bovine papilloma virus'

CL : cadre de lecture

cm : centimètre

CMV : cytomégalovirus

EIA : 'enzymatic immunoassay'

HLA : 'human leucocyte antigen'

HSV : 'herpes simplex virus'

kd : kilodalton

LCR : 'long control region'

LIE : lésion intra-épithéliale

LIEBG : lésion intra-épithéliale de bas grade

LIEHG : lésion intra-épithéliale de haut grade

LSSP-PCR : 'low stringency single primer polymerase chain reaction'

MTS : maladie transmise sexuellement

NK : 'natural killer'

nm : nanomètre

pb : paire de base

PCR : 'polymerase chain reaction'

pg : picogramme

PV : 'papilloma virus'

Rb : rétinoblastome

RFLP : 'restriction fragment length polymorphism'

RNC : région non codante

SSCP : 'single-strand conformation polymorphism'

VIH : virus de l'immunodéficience humain

VPH : virus du papillome humain



## INTRODUCTION

Le lien de causalité entre le virus du papillome humain (VPH) et le cancer du col utérin a été reconnu par des experts rassemblés par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1992 (Munoz et coll., 1992). Cette reconnaissance couronne des années de recherche accomplie par des scientifiques de diverses disciplines. Il s'agit probablement d'un des exemples les plus réussis de collaboration entre chercheurs cliniciens et fondamentalistes de tous types: virologistes, gynécologues, épidémiologistes, biologistes moléculaires. Cette découverte est d'autant plus importante que l'infection par le VPH est la maladie transmise sexuellement la plus fréquente dans le monde (Ho et coll., 1998). Le cancer du col, quant à lui, demeure un problème majeur de santé publique. Dans les pays en voie de développement, il représente le cancer le plus fréquent chez la femme, tandis que dans les pays industrialisés, le cancer du col est le cinquième plus fréquent, et ce malgré des programmes de dépistages relativement efficaces (Franco, 1996). De plus, l'incidence du cancer du col ainsi que la mortalité qui y est associée semblent augmenter chez les jeunes femmes dans les pays industrialisés (Brinton et coll., 1992; Herrero, 1996). On comprend donc pourquoi ce domaine de recherche est si actif.

La progression rapide des connaissances donne espoir de mieux prévenir cette maladie. Il reste toutefois encore beaucoup de chemin à parcourir avant d'arriver à la prévention complète du cancer du col. De nombreuses interrogations demeurent. Ce travail de recherche s'est penché sur un aspect de ce problème. L'infection par le VPH est fréquente et le cancer du col, en comparaison, est rare. Une étape importante de la progression de l'infection par le VPH vers le cancer du col semble être la persistance de l'infection par le VPH (Remmink et coll., 1995; ter Harmsell et coll., 1999). Mais même en présence d'une infection persistante par le VPH il n'y a pas invariablement progression vers le cancer. Ceci pourrait être dû, entre autres, au fait que certaines infections considérées comme persistantes ne sont en fait qu'une succession d'infections transitoires. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer une méthode qui permettrait de mieux classifier les infections génitales par le VPH en infections

persistantes ou transitoires. Ce projet voulait également préciser si des femmes actives sexuellement, chez qui de l'ADN de VPH-16 était détecté de façon répétitive dans le temps, pouvaient s'être simplement réinfectées par ce génotype répandu plutôt que présenter une infection persistante par la même souche de VPH-16.

Avant d'aborder le travail de recherche lui-même, nous réviserons d'abord les caractéristiques de cette famille de virus de même que sa classification taxinomique. Nous aborderons ensuite la physiopathologie et l'épidémiologie de l'infection par le VPH. Par après, nous discuterons des travaux ayant permis d'établir le lien entre l'infection par le VPH et le cancer du col utérin, en insistant sur le rôle que joue la persistance de l'infection par les VPH oncogènes dans la progression de la simple infection au cancer. Ceci nous amènera aux principaux objectifs de cette étude: l'évaluation des différentes méthodes permettant de mieux définir la persistance et l'application de ces méthodes pour déterminer la proportion des infections persistantes causées par le VPH-16 telles que définies par le génotypage, qui sont confirmées comme persistantes par l'analyse de variants.

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1. Le virus du papillome humain (VPH)

#### 1.1 Les caractéristiques virales

L'infection des humains par les papillomavirus (PV) remonte probablement aux origines de l'Homme. En effet, des études récentes démontrent que cette pandémie existe probablement depuis des siècles (Chan et coll., 1992 a et b). Ce n'est toutefois qu'en 1907 qu'a commencé à entrevoir l'existence des PV en établissant la nature virale des verrues vulgaires. On a démontré alors que l'inoculation d'un extrait acellulaire de verrue d'une personne à une autre causait l'apparition de lésions similaires (Shah et Howley, 1996). Une trentaine d'années plus tard, on décrivait la nature oncogène de cette famille de virus, les papillomavirus, suite à l'étude, par Shope, de la papillomatose cutanée chez le lapin. Les connaissances sur les PV ont ensuite progressé lentement, principalement à cause de la difficulté de propager les PV par culture cellulaire ou par inoculation d'animaux de laboratoire (Chow et Broker, 1994; Cobb, 1996; Lorincz, 1996; Shah et Howley, 1996). Le cycle viral complet des PV n'a jamais été réalisé in vitro (Chow et Broker, 1994). Le clonage de leur génome dans des bactéries dans les années 70 a permis de générer une quantité d'ADN suffisante pour des études de biologie moléculaire. On a pu séquencer le génome des PV et comprendre l'organisation du génome viral (Shah et Howley, 1996; Villa, 1997). La démonstration dans les années 80 du pouvoir transformant in vitro de certaines protéines des PV a stimulé l'intérêt de la communauté scientifique pour ce groupe de virus (Arends et coll., 1990; Shah et Gissman, 1990). L'évidence du lien entre certains papillomavirus humains (VPH) et le cancer du col utérin n'ont que décuplé les efforts pour mieux comprendre l'ensemble de la biologie des VPH (Franco, 1995).

Les PV sont des virus répandus dans la nature. On trouve des PV chez plusieurs vertébrés, dont les primates, le bœuf, le cheval, le lapin, le chien, le mouton (Howley, 1996). Ce sont de petits virus de 55 nm non enveloppés, avec une capsid

isocahédrique composée de 72 capsomères. La capside est composée de deux protéines: la protéine majeure (L1) de 56 kd qui constitue environ 80% du poids en protéines du virus et de la protéine mineure (L2) de 76 kd. Ces protéines sont codées par le génome viral. Celui-ci est constitué d'un double brin d'ADN circulaire d'une longueur d'environ 7900 pb. La guanine et la cytosine constituent environ 42% du génome. Les séquences codantes des cadres de lectures (CL) sont transcrites à partir du même brin. La transcription se fait dans le sens horaire, à partir de plusieurs promoteurs, dont le plus étudié est le promoteur P97 (Howley, 1996). Le génome peut être divisé en trois régions: une région comprenant les gènes précoces, une région comprenant les gènes tardifs et une région régulatrice non codante, désignée LCR pour « long control region » ou RNC pour « région non codante ». La réplication virale s'effectue à l'intérieur du noyau des cellules épithéliales.

L'organisation du génome viral est très similaire chez tous les PV. La région non codante représente environ le huitième du génome. Cette région contrôle la réplication virale et la transcription des CL. Les CL sont séparés en cadres de lecture précoces (E pour 'early') et en cadres de lecture tardifs (L pour 'late'). Cette division nous vient de l'étude du papillomavirus bovin (BPV-1). Dans ce virus, la région du génome suffisante pour induire la transformation cellulaire a été désignée précoce. Elle représente environ 69% du génome. Par analogie, les régions correspondantes du génome des autres PV sont nommées précoces. Il existe une dizaine de CL précoces potentiels dans le génome des PV. Le VPH-16 en contient sept (Figure 1).

Voyons brièvement le rôle des différents CL. La fonction de chacune des protéines codées par ces CL sera détaillée plus loin. Le CL E1 est impliqué dans la réplication virale plasmidique. E2 module la transcription du génome viral. La protéine E2 est impliquée dans l'initiation de la réplication virale et dans la régulation des promoteurs viraux (Arends et coll., 1990; Shah et Gissman, 1990). E4 produit une protéine cytoplasmique ressemblant à la cytokératine.

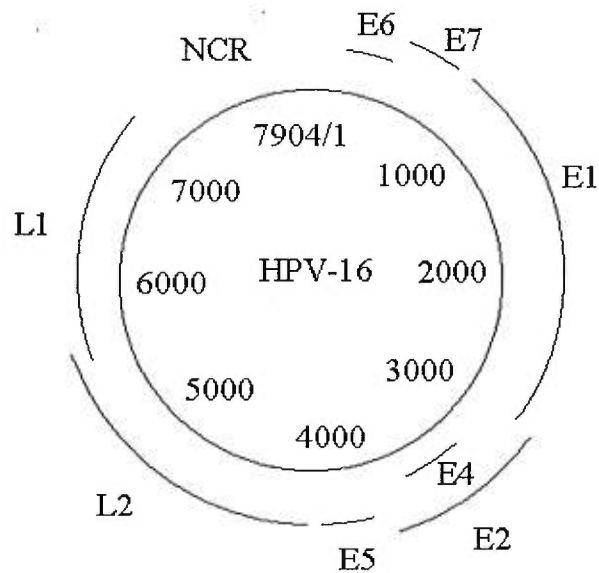


Figure 1 : Plan schématique du génome de VPH-16, adapté de Shah et Howley, 1996.

Le rôle de la protéine E5, à laquelle on reconnaît un certain pouvoir transformant, n'est pas entièrement compris. E6 et E7 jouent un rôle primordial dans la transformation cellulaire, particulièrement pour les VPH oncogènes (voir plus loin). Il existe deux CL tardifs, L1 et L2. L'antigénicité des PV est localisée sur L1 et L2. Ces deux protéines comprennent des régions hautement conservées chez tous les PV. Ils codent pour les protéines de la capside. La fonction de L2 demeure obscure, puisque des particules virales complètes peuvent être produites avec L1 uniquement, tout en gardant le même aspect en microscopie électronique que des particules produites avec L1 et L2.

Le séquençage complet de plusieurs VPH a permis de les comparer entre eux (Howley et Schlegel, 1988; Schrager et coll., 1989; Arends et coll., 1990; Howley, 1996; Villa, 1997). Ceci a également permis de réaliser les limites des classifications alors utilisées. L'accumulation de connaissances en biologie moléculaire et sur l'organisation génomique des PV, de même que l'intérêt grandissant pour ce groupe de virus au potentiel oncogène, a mis en évidence le besoin d'un système de classification rigoureux. Un tel système permet non seulement de catégoriser et d'établir des liens phylogénétiques entre les différents types de VPH, mais également de distinguer les



isolats entres eux, produisant ainsi un outil épidémiologique précieux (Ho et coll., 1991; Chan et coll., 1992 a et b; Heinzl et coll., 1995; Ramesar et coll., 1995; Stewart et coll., 1996).

## 1.2 La taxinomie des PV

Les PV ont historiquement été regroupés avec les polyomavirus et le virus vacuolisant simien pour former la famille des papovaviridae. Cependant, des différences fondamentales existent entre ces virus, si bien que deux familles séparées pourraient être créées (Lorincz, 1996). Le regroupement des PV eux-mêmes en unités taxinomiques s'est beaucoup modifié au cours des années, reflétant les progrès technologiques. Nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucune méthode nous permettant de distinguer les différents PV sur une base sérologique. Les PV sont tout d'abord regroupés selon l'espèce qu'ils infectent, puisqu'ils sont hautement spécifiques à une espèce animale (Ramesar et coll., 1995; Beutner et Tying, 1997; Villa, 1997). Nous nous intéresserons pour le reste de ce document principalement aux PV infectant les humains (VPH), qui constituent le sous-groupe le plus important (Lorincz, 1996).

La première méthode de classification des VPH était basée sur le degré d'homologie génomique mesurée par hybridation ADN-ADN en phase homogène sous des conditions stringentes. Cette méthode de classification basée sur l'hybridation a été remplacée par une classification basée sur le degré d'homologie des séquences du génome des différents VPH. Le 'Papillomavirus Nomenclature Committee' a établi une définition des types basée sur la séquence des CL E6, E7 et L1. Un nouveau type doit présenter moins de 90% d'homologie avec chacun des types de VPH déjà décrits. Un sous-type présentera entre 90% et 98% d'homologie avec les autres sous-types, et des variants d'un même type, plus de 98% (de Villiers, 1994).

Il y a plus de 100 types de VPH reconnus dont plus de 80 entièrement caractérisés. Ces types sont généralement spécifiques à un processus physiopathologique. Par exemple, certains ont un tropisme particulier pour la peau et y

causent des verrues vulgaires (VPH-1 et VPH-2), alors que d'autres se retrouvent au niveau des muqueuses génitales et y causent des lésions pré-invasives de haut grade de même que des cancers (VPH-16 et VPH-18). On classe donc quelquefois de façon informelle les VPH selon l'épithélium qu'ils infectent. On compte une trentaine de types de VPH génitaux. Ceux-ci sont subdivisés selon leur association avec les cancers génitaux et leur potentiel transformant. On retrouve des VPH associés avec les condylomes acuminés, qu'on considère être des VPH à faible risque (i.e., VPH-6 et VPH-11), tandis que d'autres sont associés avec un risque élevé de lésions pré-invasives et de cancer (i.e., VPH-16 et VPH-18) (Lorincz et coll., 1992; Franco, 1996; Koutsky et coll., 1997).

La caractérisation complète de plusieurs VPH a permis de construire des arbres phylogénétiques basés sur l'homologie de séquences, qui permettent de déduire l'évolution probable des VPH dans le temps. Ces études démontrent que les différents embranchements représentent probablement des milliers d'années d'évolution (Ho et coll., 1993a). Les différents types de VPH sont donc des virus génétiquement très stables (Ho et coll., 1991 et 1993a; Chan et coll., 1992b). Ce regroupement des différents VPH basé sur l'étude du génome viral se rapproche beaucoup des regroupements se basant sur des données biologiques. Par exemple, les VPH associés à l'épidermodysplasie verruciformis (VPH-5, VPH-8, VPH-9, VPH-12, VPH-4), se retrouvent tous sur un même embranchement, tandis que les VPH génitaux associés aux lésions pré-invasives significatives (VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39), se trouvent également regroupés (Chan et coll., 1992a). De telles analyses nous permettent de croire que lorsque de nouveaux VPH seront décrits, leur emplacement sur un arbre phylogénétique nous permettra d'entrevoir leur potentiel pathologique (Figure 2).

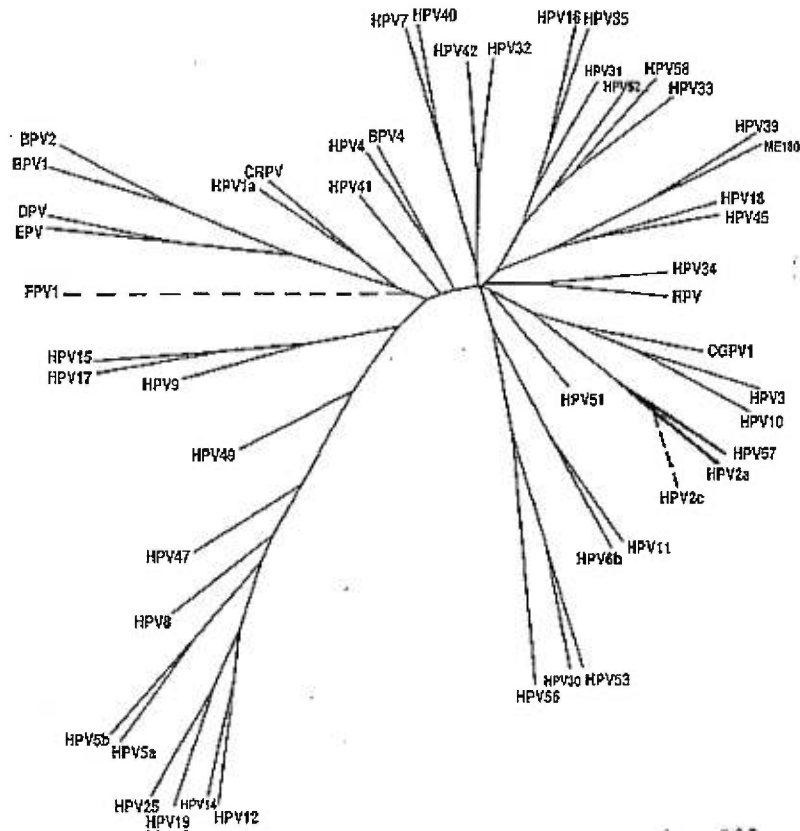


Figure 2 : Exemple d'arbre phylogénétique, tiré de Chan et coll., 1992a. On remarque que les VPH-6 et VPH-11, auxquels on assigne un faible potentiel de malignité, sont situées à proximité l'un de l'autre. Par ailleurs, les VPH à plus haut potentiel oncogène, tels les VPH-16, VPH-18 et VPH-45 sont également regroupés.

Étant donné son association avec le cancer épithélial du col utérin de même que sa prévalence élevée dans la population normale, le VPH-16 est un des PV le mieux caractérisé. On sait que la RNC du génome comporte plus de variation (jusqu'à 5%) que les autres régions du génome (Chan et coll., 1992a). Cette région est donc souvent choisie lorsqu'on veut identifier le plus de variants possible dans une population. Plus de 50 variants de VPH-16 ont été identifiés et partiellement séquencés à date (Ho et coll., 1993a; Myers et coll., 1995). Il est probable que d'autres variants seront décrits dans le futur.

### 1.3 La physiopathologie des infections à VPH

Avant même de connaître la biologie moléculaire des VPH, de nombreuses évidences indiquaient qu'il existe des variations fondamentales dans le pouvoir oncogène entre les types de ce groupe de virus, permettant de les classer en un groupe oncogène et un autre groupe non oncogène (Beutner et Tyring, 1997). Par exemple, les VPH oncogènes immortalisent les kératinocytes humains en culture cellulaire. Lorsque ces cellules transformées sont injectées à des souris nues (avec la présence de cofacteurs), elles provoquent l'apparition de tumeurs (DiPaolo et coll., 1990 et 1998; Guibinga et coll., 1995; Coutlée et coll., 1997). De plus, si on poursuit suffisamment longtemps in vitro la culture de cellules infectées par VPH-16, il peut y avoir apparition de clones malins, même en l'absence de co-facteurs (zur Hausen, 1991).

L'avancement des connaissances sur la biologie moléculaire des PV a permis d'étudier en détail les fonctions de chacune des protéines codées par le génome viral, et ainsi comprendre la séquence des événements menant de l'infection cellulaire au cancer. On connaît relativement peu les premières étapes de l'interaction entre le virus et la cellule, soient l'interaction de la particule virale avec un récepteur cellulaire et l'entrée dans la cellule. Les VPH peuvent se fixer à de nombreux types cellulaires quoiqu'ils n'infectent que les cellules épithéliales (Howley, 1996). On ne connaît pas le récepteur cellulaire pour le VPH. La protéine L1 semble jouer un rôle dans l'interaction avec la cellule.

Après l'entrée dans la cellule, il y a transcription des CL précoces. E1 et E2 sont impliqués dans l'amorce de la réplication virale. E1 est le plus grand CL et est très similaire parmi les différentes espèces de PV (Howley, 1996) Lorsque E2 est présent, il se lie à E1 et augmente la force du lien entre celui-ci et la région d'origine de la réplication virale, localisé dans la RNC. Certaines régions de la RNC ont, quant à elles, un rôle de modulation de l'activité des promoteurs viraux. E2 code pour des protéines régulatrices qui se lient à des sites spécifiques de la RNC. Ces protéines modulent ainsi le niveau de transcription virale. La protéine E2 complète régule à la hausse le niveau

de transcription des autres gènes viraux en se liant à une séquence stimulatrice de la RNC. Un autre produit du gène E2 est une protéine incomplète. Cette protéine E2 incomplète compétitionne avec la protéine E2 complète pour le même site de la RNC, agissant ainsi comme un répresseur de la transcription virale. Les protéines E2 semblent donc jouer un rôle indirect au niveau du pouvoir oncogène du virus. En effet, lorsque le CL E2 est intact, il y a modulation de la transcription virale. Or, lorsque le génome du VPH s'intègre au génome cellulaire, le bris nécessaire à cette intégration se produit habituellement dans la région E1-E2 du génome viral. Les protéines E2 n'étant plus synthétisées, les CL E6 et E7 sont exprimés en l'absence de contrôle (Baker et coll., 1987). Le mécanisme de transformation cellulaire par E6 et E7 sera élaboré en détail plus loin. Le CL E4 se trouve dans la région précoce mais est en fait un gène tardif. Le rôle exact de la protéine E4 n'est pas connu. On sait qu'elle n'est pas essentielle à la réplication virale ou à la transformation cellulaire. Elle jouerait probablement un rôle dans la destruction du squelette cellulaire de cytokératine et ainsi, faciliterait l'accès du virus au noyau. La protéine E5 est très conservée parmi les PV qui causent des fibropapillomes et joue donc probablement un rôle dans le tropisme de ces PV pour les fibroblastes. Par contre, son rôle est moins clair chez les VPH. On a pu démontrer une certaine activité transformante de la protéine E5 du VPH-16 in vitro, mais E5 est rarement exprimée dans les cellules cancéreuses où l'on retrouve de l'ADN de VPH, ce qui met en doute son rôle in vivo (Leptak et coll., 1991; Leechanachai et coll., 1992). On ne connaît pas le produit du gène E3

Les CL tardifs ne sont transcrits que dans les couches superficielles de l'épithélium. Les produits des CL tardifs forment la capsidie protéique. On connaît peu les étapes subséquentes du cycle viral qui sont l'assemblage et le relargage des particules virales. On sait toutefois qu'elles n'entraînent pas de cytolysse et qu'elles se produisent au niveau des couches épidermiques supérieures à la couche granulaire. Le relargage a lieu au niveau de la couche cornée.

Il existe deux types de réplication virale: la réplication épisomale ou plasmidique et la réplication végétative. Dans le premier cas, il y a plusieurs copies

virales par cellule, qui se divisent de façon synchrone avec la cellule. Il y a donc une division virale par cycle cellulaire. Ce type de division assure une infection latente et persistante. La réplication plasmidique se produit au moment de l'établissement de l'infection. Elle garde le nombre de copies du génome viral stable à 50-400 copies par cellule (Howley, 1996). L'origine de la réplication plasmidique se situe au niveau de la RNC, au site de liaison avec la protéine E1 tel que décrit plus tôt. La réplication végétative a lieu dans les couches plus différenciées de l'épiderme où il n'y a plus de division cellulaire. Il se produit à ce moment une augmentation importante de la synthèse d'ADN viral. Cet ADN est destiné aux virions. On ignore ce qui produit le passage de la réplication plasmidique à la réplication végétative.

Les expériences de transformation cellulaire *in vitro* ont permis d'identifier la portion du génome responsable du pouvoir oncogène comme étant E6 et E7 (Munger et coll., 1989a et b; Werness et coll., 1990). En effet, les gènes E6 et E7 sont suffisants pour immortaliser en culture des cellules humaines de prépuce ou des kératinocytes cervicaux (Munger et coll., 1989, Hawley-Nelson et coll., 1989). La protéine E6 forme un complexe avec la protéine p53 cellulaire (Werness et coll., 1990). Or, p53 est un transactivateur de la transcription cellulaire. Il est considéré comme un «gardien du génome», permettant d'interrompre le cycle de réplication cellulaire pour favoriser la réparation de portions du génome endommagées. La protéine p53 régularise la croissance cellulaire et supprime la croissance tumorale. L'absence de p53 permet donc à des anomalies chromosomiques cellulaires de se perpétuer. L'interaction entre la protéine E6 et le p53 résulte en la dégradation du p53 (Scheffner et coll., 1990). On a pu reconstituer *in vitro* l'ubiquitination de la protéine p53, nécessitant la présence de la protéine E6 (Scheffner et coll., 1993). On a pu également constater *in vivo* que la quantité de p53 était 2 à 3 fois moindre dans les cellules cervicales cancéreuses, comparativement aux cellules cervicales normales (Scheffner et coll., 1991). Il en résultera donc une baisse de la 'protection cellulaire naturelle' anti-tumorale (Beutner et Tyring, 1997). On sait par ailleurs qu'il existe différents phénotypes de p53 ayant des résistances différentes à la dégradation lorsque complexés avec la protéine E6. Ceci

pourrait expliquer en partie les susceptibilités différentes des patientes à la progression vers un cancer (Storey et coll., 1998).

La protéine E7, quant à elle, se lie à la protéine cellulaire du rétinoblastome (Rb) (Munger et coll., 1989a et b; Werness et coll., 1990). L'action oncogénique de la protéine E7 nécessite donc la présence d'une protéine Rb intacte et possédant un site de liaison ayant une grande affinité (Howley, 1996). Cette protéine régularise normalement à la baisse la croissance cellulaire. Lorsque liée à la protéine E7, l'activité de Rb diminue considérablement, possiblement suite à une diminution du lien entre la protéine Rb et le produit du gène E2 (Yokota et coll., 1992).

La protéine E7 des VPH oncogènes lie la protéine Rb dix fois plus que celle des VPH non oncogènes (Gage et coll., 1990). L'acquisition de certaines portions du gène E7 d'un VPH oncogène par un VPH non oncogène, permet d'ailleurs au VPH non oncogène d'immortaliser les cellules (Pater et coll., 1992). Alors que dans les lésions pré-néoplasiques précoces l'ensemble des gènes viraux sont exprimés, E6 et E7 sont exprimés de manière préférentielle dans les lésions cervicales pré-néoplasiques plus avancées. (Stoler, 1996). Le lien entre E7 et la protéine Rb semble être particulièrement important lorsque seule l'expression de E6 et E7 est retenue dans la cellule. Le gène E7 semble être suffisant pour transformer des cellules de rongeurs contenant un oncogène ras activé (Phelps et coll., 1988). Par contre, au niveau des cellules cervicales humaines *in vivo*, lorsque l'ensemble du génome est intégré au niveau cellulaire, l'expression de E6 semble être suffisante pour entraîner la transformation cellulaire (Beutner, 1997).

E1 et E2 initient la réplication virale. Le virus est toutefois dépendant de substrats cellulaires: polymérase, thymidine kinase, etc... . Or la réplication végétative, qui produit une quantité importante de copies du génome viral, n'a lieu que dans des cellules qui ne se divisent plus. Les protéines E6 et E7 représentent probablement une stratégie virale permettant d'obtenir des produits nécessaires à la réplication virale, puisqu'une fois transformées, les cellules épithéliales se diviseront.

## 2. Considérations épidémiologiques et cliniques

### 2.1 L'épidémiologie de l'infection par le VPH

#### 2.1.1 Les VPH non génitaux

Les maladies causées par les PV sont largement répandues et ce, chez plusieurs espèces. Chez l'humain, les VPH causent principalement des maladies de la peau et des muqueuses. Voyons tout d'abord brièvement les pathologies associées aux VPH non génitaux.

Les maladies de la peau causées par des VPH les plus connues sont les verrues et l'épidermodysplasie verruciformis. Les verrues vulgaires, planes, ou plantaires sont des tumeurs bénignes et fréquentes de la peau présentant principalement un épaissement des couches cornées. Elles affectent particulièrement les enfants et adolescents. Elles sont associées le plus fréquemment aux types 1, 2, 3, 7 et 10. L'épidermodysplasie verruciformis, quant à elle, est une maladie rare, autosomale récessive ou liée au chromosome X, qui est associée à des verrues disséminées avec transformation néoplasique fréquente. De nombreux types peuvent être impliqués (Arends et coll., 1990).

Les maladies des muqueuses se retrouvent principalement au niveau des voies génitales, des voies respiratoires et de la cavité buccale. La maladie des voies respiratoires la mieux connue est la papillomatose laryngée récurrente. Cette entité pathologique est causée par le VPH-6 et le VPH-11. On retrouve des papillomes (tumeurs bénignes) au niveau de l'épithélium du larynx, principalement au niveau des cordes vocales. Ces papillomes peuvent obstruer les voies respiratoires. Ils ont tendance à récidiver après traitement. Environ 60% des cas débutent avant l'âge de 10 ans. Ces virus sont transmis au nouveau-né lors de son passage dans le vagin au moment de la naissance. Il est à noter que ces cas de papillomatose sont très rares en comparaison des condylomes génitaux. Certains types de VPH infectent, eux,



préférentiellement la cavité buccale. Les types 13 et 32 sont associés à l'hyperplasie focale épithéliale tandis que les autres lésions de la bouche sont habituellement causées par les virus associés aux verrues vulgaires, aux condylomes acuminés, ou possiblement aux types génitaux oncogènes dans les lésions cancéreuses orales (Shah et Howley, 1996).

### 2.1.2 Les VPH génitaux

Plus d'une trentaine de VPH génitaux ont été décrits (Schiffman et Brinton, 1995). Les estimés de prévalence varient selon la technique utilisée pour détecter l'ADN viral, selon la population étudiée, et selon qu'on calcule une prévalence instantanée ou une prévalence de période (prévalence cumulative) (Schiffman et Brinton, 1995). On estime à environ 10% à 20% la proportion des hommes et femmes sexuellement actifs âgés entre 15 et 45 ans qui sont porteurs d'ADN de VPH au niveau du tractus génital, à un moment précis, lorsque les méthodes de détection les plus sensibles sont utilisées (Koutsky, 1997). La prévalence de l'infection est la plus élevée chez les femmes sexuellement actives de moins de 25 ans (Schiffman, 1992b). La baisse de prévalence observée après trente ans est indépendante de l'activité sexuelle et pourrait représenter le développement d'une immunité efficace (Burk et coll., 1996). La prévalence de période atteint 60% lorsque des prélèvements successifs sont faits (Wheeler et coll., 1996; Ho et coll., 1998). On a déjà calculé que le risque de contracter au moins une infection par le VPH entre 20 et 79 ans était de 79%, et ce, dans une population non sélectionnée pour un risque particulier (Syrjanen et coll., 1990).

Comme il s'agit d'un agent transmissible principalement sexuellement, les facteurs de risque de l'acquisition du VPH sont majoritairement liés à l'activité sexuelle. Le jeune âge, le nombre total de partenaires sexuels, la fréquence des relations sexuelles, ainsi que le comportement sexuel du partenaire mâle sont les facteurs de risques principaux de l'acquisition d'une infection par le VPH (Ley et coll., 1991; Kataja et coll., 1993). Le jeune âge à la coïtarche était autrefois considéré comme un facteur de risque indépendant, possiblement relié à la présence d'un épithélium plus

immature et d'une zone de transformation plus large (Herrero et coll., 1990). On pense plutôt aujourd'hui qu'il s'agit d'une variable confondante influençant le nombre total de partenaires sexuels (Koutsky, 1997).

Les autres facteurs traditionnellement rapportés comme étant liés à l'acquisition du VPH influencent probablement plus nos méthodes de détection que l'acquisition de l'infection (Schneider et Koutsky, 1992). En effet, les différentes techniques de détection de l'ADN viral sont toutes influencées par la charge virale. Une charge élevée facilitera la détection. Certaines conditions pourraient favoriser une réplication plus active du virus ou encore changer l'évolution naturelle de l'infection et rendre ainsi le virus plus facile à détecter. Parmi celles-ci on retrouve les contraceptifs oraux (Koutsky, 1997), la grossesse (Schneider et coll., 1987), et l'immunosuppression (Ho et coll., 1994). L'augmentation de la fréquence détectée de l'infection par le VPH chez les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peut être en partie expliquée par l'immunosuppression (Sun et coll., 1997; Rattray et coll., 1996; Garzetti et coll., 1995; Vernon et coll., 1994; Conti et coll., 1993; Palefsky et coll., 1990 et 1992; Korn et coll., 1995; Rezza et coll., 1998; Rugpao et coll., 1998; Critchlow et coll., 1998). En effet, on remarque une augmentation de la prévalence de l'infection par le VPH chez des femmes séropositives pour le VIH, à mesure que le nombre de CD4 diminue (Sun et coll., 1997). Ceci supporte l'hypothèse de la baisse d'immunité facilitant la détection de VPH. En effet, une défense immunitaire réduite peut être associée à une augmentation de la charge virale ou encore à une augmentation de la durée de l'infection, deux facteurs qui augmenteront la prévalence de l'infection par le VPH. Par contre, contrairement aux autres causes d'immunosuppression, le VIH est transmis sexuellement et partage donc avec le VPH les facteurs de risque d'une transmission augmentée.

L'infection par le VPH est le plus souvent asymptomatique et transitoire (Evander et coll., 1995; Syrjanen, 1994). Ceci contribue probablement à sa large diffusion. Par exemple, environ 90% des personnes infectées par un VPH génital n'en auront pas connaissance et ne développeront jamais de pathologie associée (Koutsky,

1997). Elles élimineront complètement l'infection ou celle-ci restera à l'état latent. Dans le cas d'une infection latente, ces personnes pourraient présenter des pathologies associées (ex. : condylomes) plusieurs années après le contact initial.

Chez les personnes qui présenteront des manifestations cliniques, la maladie précise sera reliée au(x) type(s) acquis (van den Brule et coll., 1991). Les types 6, 11, 42, 43, 44 sont dits à faible risque puisqu'ils sont principalement associés aux condylomes génitaux et aux lésions de bas grade et ne sont presque jamais retrouvés dans des lésions cancéreuses (Lorincz et coll., 1992; Stoler, 1996). La prévalence des condylomes est très élevée dans la population nord-américaine. Les estimations dépendent de la population étudiée. On l'évalue à environ 1% de la population en général. Elle atteindrait jusqu'à 13% dans la clientèle des cliniques de maladies transmises sexuellement (Koutsky, 1997).

On croit que le virus gagnerait accès à l'épithélium suite à un trauma tissulaire mineur. Les condylomes proviendraient de la réplication d'une seule cellule basale infectée, puisque toutes les cellules d'un condylome contiennent le même matériel génétique viral (Beutner et Tying, 1997). Le matériel génétique viral demeure habituellement sous forme plasmidique dans le noyau cellulaire. Les condylomes non traités peuvent régresser spontanément ou persister.

Les types 16, 18, 45, 56 sont régulièrement retrouvés dans des cancers et sont donc étiquetés à haut risque (Lorincz et coll., 1992). Nous verrons dans la prochaine section le lien existant entre les VPH oncogènes et le cancer du col. La prévalence des lésions pré-néoplasiques associées à ces types de VPH est de 1 à 14% selon les populations étudiées (Mitchell et coll., 1996).

## 2.2 Le VPH et le cancer du col: évidence supportant l'existence d'un lien causal

### 2.2.1 Plausibilité biologique

La plausibilité biologique d'une association est un des éléments importants qui doit être présent pour permettre de conclure à l'existence d'une association de cause à effet entre ces deux éléments (Jenicecek et Cléroux, 1982). En effet, le mécanisme proposé par lequel la cause entraîne l'effet doit être cohérent (plausible) selon les données actuelles de la science. Or, les données physiopathologiques que nous avons discutées dans la première section sont fortement en faveur d'une association de type causal entre les VPH oncogènes et certains cancers, particulièrement celui de l'épithélium du col utérin. La plausibilité biologique du lien VPH/cancer du col est maintenant acceptée (zur Hausen, 1991). On ne peut toutefois tirer la conclusion de l'existence d'un lien causal uniquement sur cette base.

### 2.2.2 Force et reproductibilité du lien

Avant même d'impliquer précisément les VPH, il était devenu évident que le cancer épithélial du col utérin possédait de nombreuses caractéristiques d'une maladie transmissible sexuellement (Schiffamn, 1992b; Mitchell et coll., 1996). Des études épidémiologiques avaient démontré que le risque du cancer du col était relié à plusieurs caractéristiques de l'activité sexuelle, tels l'âge à la coïtarche, le nombre de partenaires sexuels, ainsi que le comportement sexuel du partenaire masculin (Slattery et coll., 1989; Franco, 1996; Brinton, 1992; Schiffman, 1992b et 1995; Londesborough et coll., 1996). La recherche d'un agent causal s'est donc dirigée vers un agent transmis sexuellement. Plusieurs MTS ont été impliquées à un moment ou à un autre. La gonorrhée, le *Chlamydia trachomatis*, la syphilis, le CMV, le HSV-2, le trichomonas et même les *Ptirus pubis* ont été investigués dans l'espoir d'identifier un agent causal. (Brinton, 1992; Mitchell et coll., 1996).

Les premières études portant sur les VPH ont été particulièrement limitées étant donné l'impossibilité de cultiver le virus ou de le propager dans des animaux de laboratoire (Beutner et Tying, 1997). Ce n'est qu'avec le développement de techniques de biologie moléculaire au cours des 20 dernières années, que des études ont commencé à démontrer de façon répétée un lien entre les VPH et les lésions pré-invasives et

invasives du col utérin. Les résultats contradictoires des premières années peuvent être expliqués par le manque de sensibilité des méthodes diagnostiques alors utilisées. Elles engendraient de telles erreurs de classification quant au statut de porteur d'ADN de VPH, qu'il était très difficile de démontrer un lien fort entre les VPH et le cancer du col (Franco, 1991). Depuis l'utilisation répandue du PCR et des méthodes de détection ultra-sensibles des acides nucléiques, on détecte de l'ADN de VPH dans plus de 90% des tumeurs épithéliales du col utérin et ce, dans des études portant sur des populations diverses (zur Hausen, 1991; Bosc et coll., 1995). Le risque relatif de développer un cancer du col utérin en présence d'une infection par le VPH est de 20 à 70, ce qui en fait un des liens les plus forts entre un agent causal et un cancer (Franco, 1996). On croit maintenant que l'infection par le VPH explique quasi entièrement le lien entre le cancer du col et l'activité sexuelle (Kjellberg et coll., 1999).

### 2.2.3 Séquence temporelle

La séquence temporelle menant de l'infection par le VPH vers le cancer du col est de mieux en mieux connue. L'infection par le VPH précède l'apparition de lésions cervicales (Chua et coll., 1995; Remmink et coll., 1995; Herrington et coll., 1995; Swan et coll., 1999). L'infection par un VPH oncogène se produirait par contact sexuel, permettant l'accès du virus à la couche cellulaire basale du col utérin (Schneider et Koutsky, 1992). On retient toutefois que la contagiosité est faible, du moins chez les personnes de plus de 25 ans, tel que démontré par le peu de concordance de types ou variants de VPH présents au niveau des organes génitaux des partenaires d'un même couple (Ho et coll., 1993b; Hippelainen et coll., 1994). Une immunité acquise par une infection antérieure pourrait être protectrice contre l'acquisition d'une nouvelle infection par le partenaire actuel (Burk et coll., 1996), quoique le rôle de l'immunité croisée contre des types différents demeure imprécis. Ces données seront capitales dans le développement de vaccins contre les VPH. La transmission pourrait être beaucoup plus fréquente chez les adolescentes en raison de l'absence d'immunité acquise (Rosenfeld et coll., 1992). La courbe de prévalence de l'infection par les VPH, avec son pic chez les 16-25 ans, pourrait en effet indiquer une transmission fréquente à

l'initiation de l'activité sexuelle, alors que les individus n'ont pas encore d'immunité contre les VPH (Schiffman, 1992b).

Après le contact avec la cellule, le matériel viral pénètre dans celle-ci et se retrouve dans le noyau cellulaire (Beutner et Tying, 1997). Par la suite, le génome viral peut s'intégrer au hasard dans le génome humain (Stoler, 1996). Cette intégration entraîne une expression accrue des CL E6 et E7, par perturbation de la régulation par E2, causant une augmentation de la production de protéines oncogènes et une inhibition de la régulation des fonctions cellulaires (Stoler, 1996). Il peut alors y avoir apparition de lésions néoplasiques intra-épithéliales de bas puis haut grade (LIEBG et LIEHG) et éventuellement d'un cancer. Les LIEBG incluent les changements cellulaires associés au VPH et les changements cellulaires pré-néoplasiques précoces tels noyaux augmentés de volume et hyperchromatiques, chromatine irrégulière, multinucléation. Les LIEHG incluent les changements pré-néoplasiques plus avancés de même que les carcinomes in situ. On y retrouve un rapport cytoplasme/noyau inférieur à 50%, et des anomalies nucléaires marquées (Sherman, 1994). Ces lésions néoplasiques intra-épithéliales représentent probablement un continuum par lequel évolue la majorité des cancers (Schiffman et Brinton, 1995). La guérison spontanée peut survenir à toutes les étapes. Elle est fréquente durant les premières étapes de la carcinogenèse (Nasiell et coll., 1986; Holowaty et coll., 1999). De plus, la présence d'ADN de VPH oncogène augmente substantiellement le risque de progression vers une maladie significative (LIEHG et plus) (Koutsky et coll., 1992; Ho et coll., 1998).

### 2.3 Déterminants de la progression de l'infection vers le cancer

Heureusement, la majorité des infections par les VPH sont transitoires et sont éliminées spontanément en quelques mois (Rosenfeld et coll., 1992; Hidelsheim et coll., 1994; Syrjanen, 1994; Ho et coll., 1998). Par contre, une proportion (variant entre 16% et 35% selon les critères pathologiques diagnostiques utilisés) des infections se manifestant par une LIEBG progresseront vers une LIEHG et même vers un cancer

(Schiffman et Brinton, 1995). Voyons les différents facteurs influençant cette progression.

### 2.3.1 Facteurs viraux

Le facteur viral le plus évident est bien sûr le type de VPH causant l'infection. Les types oncogènes prédisposent à la progression des LIEBG vers les LIEHG en comparaison avec les types non-oncogènes (Schiffman et Brinton, 1995; Remmink et coll., 1995). Récemment, l'étude des variants des types oncogènes, particulièrement ceux du VPH-16, a permis de mettre en évidence un potentiel tumoral différent selon le variant impliqué (Remmink et coll., 1995; Xi et coll., 1997). L'intégration du génome viral dans le génome de la cellule humaine est également un événement important puisqu'on retrouve le VPH sous cette forme dans les cellules cancéreuses (Cooper et coll., 1992). Une charge virale élevée semble aussi associée au développement de LIEHG (Schiffman et Brinton, 1995; Hankins et coll., 1999). La charge virale pourrait d'une part être un facteur de risque en elle-même. Une infection par un inoculum plus élevé pourrait entraîner une synthèse accrue d'oncoprotéines virales et augmenter le risque de développer des lésions significatives. D'autre part, une charge virale élevée pourrait n'être que le reflet d'une moins bonne immunité permettant une réplication plus active, ou pourrait refléter une masse plus grande de cellules transformées. Enfin, la persistance de l'infection acquiert de plus en plus d'importance comme facteur de risque pour la progression. Toute une section y sera consacrée plus loin.

### 2.3.2 Facteurs de l'hôte (immunité)

L'infection par le VPH est le plus souvent transitoire. Ceci est possiblement dû à une réponse immunitaire permettant la disparition de l'infection avant même l'apparition de lésions. Le statut HLA de même que l'immunité cellulaire, particulièrement les «cellules tueuses naturelles» ou cellules NK, joueraient un rôle-clé dans cette fonction (Garzetti et coll., 1995). C'est probablement cette même immunité qui permet la disparition des LIE.

Certains allèles du système HLA (HLA B7 et DQB1\*0302) pourraient être associés à un risque accru d'acquérir un VPH oncogène ou encore à un risque accru de maladie progressive. Une infection par un inoculum plus élevé pourrait entraîner une synthèse accrue d'oncoprotéines virales et augmenter le risque de développer des lésions significatives (Apple et coll., 1995; Bontkes et coll., 1998; Helland et coll., 1998; Hildesheim et coll., 1998;). Une interaction entre certains haplotypes, dont le HLA-B7, et des variants de VPH-16 démontrant un changement précis d'acides aminés au niveau de la protéine E6, a été soulevée comme une des causes possibles d'augmentation du risque de progression vers le cancer, en permettant d'échapper aux mécanismes habituels de surveillance du système immunitaire (Ellis et coll., 1995). Certains autres haplotypes, dont le DRB1\*013, pourraient être protecteurs (Sastre-Garau et coll., 1996; Hildesheim et coll., 1998).

Par ailleurs, le risque de développer une maladie significative par VPH pourrait également avoir une base génétique. Celle-ci serait liée aux différents isoformes de la protéine cellulaire p53 (Storey et coll., 1998). Certaines mutations au niveau de la protéine cellulaire p53 rendrait celle-ci plus facilement dégradable par la protéine E6 des VPH oncogènes. Le processus de réparation génomique cellulaire serait alors compromis et le risque de progression augmenté.

On a reconnu il y a longtemps l'association entre les maladies secondaires aux VPH et l'immunosuppression induite par les immunomodulateurs utilisés chez les patients à la suite d'allogreffes (Alloub et coll., 1989). Les patientes greffées du rein ont été les plus étudiées, la greffe de rein étant une des greffes les plus pratiquées. De plus, elle l'est chez une population relativement jeune et à bon pronostic. Ceci permet un temps d'observation satisfaisant. On estime que la prévalence de lésions génitales associées aux VPH dans une population de patientes transplantées du rein peut atteindre 15-30% (Lefebvre et coll., 1995). On a retrouvé dans une population de femmes immunosupprimées suite à une greffe rénale une prévalence 17 fois plus élevée d'infections à VPH au niveau génital que dans un groupe contrôle de patientes



immunocompétentes. De plus, le risque de maladie associé au VPH peut être 9 fois plus élevé (Halpert et coll., 1986). La durée de l'immunosuppression semble influencer le risque de développer une maladie associée au VPH. Des femmes recevant des immunosuppresseurs depuis moins de trois ans n'avaient pas de signe de LIE malgré la détection d'ADN de VPH au niveau du tractus génital. Par contre, toutes les femmes avec LIEHG étaient immunosupprimées depuis au moins 62 mois (Petry et coll., 1994).

Les personnes infectées par le VIH fournissent également une preuve du rôle crucial du système immunitaire dans le contrôle des maladies pré-invasives et invasives du col utérin. Ces femmes ont une prévalence élevée d'infection par le VPH, probablement, d'une part, à cause des comportements sexuels communs à l'acquisition des deux virus et d'autre part à cause d'une détection plus facile dans le contexte d'immunosuppression (Brisson et coll., 1996; Palefsky, 1998). Une fois infectées par le VIH, ces femmes démontrent également plus fréquemment des LIE (Laga et coll., 1992; Sun et coll., 1997). Il a déjà été suggéré que cette progression plus rapide pourrait être secondaire à une interaction directe entre le VPH et le VIH (Vernon et coll., 1993 et 1994). Toutefois, ces deux types de virus infectent des cellules-cibles différentes. D'autres ont soulevé la possibilité que des types ou des variants différents de ceux retrouvés dans une population VIH-séronégative, infectent préférentiellement les femmes VIH-séropositives pour expliquer l'augmentation du risque de maladie progressive. Leurs travaux n'ont pas confirmé cette hypothèse: ils ont retrouvé les mêmes types et variants chez les personnes VIH-séropositives et VIH-séronégatives (Icenogle et coll., 1992; Sun et coll., 1997; Palefsky et coll., 1999). On croit maintenant que l'accélération de la progression clinique serait avant tout liée à l'immunodéficience induite par le VIH (Wright et coll., 1994). En effet, le risque de développer une dysplasie est proportionnel au niveau d'immunodéficience induite par le VIH (Schafer et coll., 1991). On a même pu remarquer qu'une thérapie antirétrovirale hautement active, qui entraînait une augmentation des lymphocytes T CD4, était associée à une régression des LIE chez les femmes VIH-séropositives et ce, malgré la persistance de l'infection par le VPH (Heard et coll., 1998). Ceci renforce l'hypothèse

que c'est principalement par l'immunosuppression que le VIH est associé à des lésions cervicales. Par ailleurs, l'immunodéficience diminuerait la capacité d'éliminer l'infection causée par le VPH. On retrouve en effet plus d'infections persistantes chez les femmes VIH-séropositives (Sun et coll., 1997). On retrouve également plus souvent d'infections causées par plusieurs types de VPH chez les femmes porteuses du VIH (Ho et coll., 1994; Palefsky et coll., 1999)

### 2.3.3 Facteurs environnementaux

L'association entre le tabac et le cancer du col n'est toujours pas clairement comprise. Il est difficile dans les études épidémiologiques de s'assurer qu'une association observée n'est pas avant tout liée à l'activité sexuelle. C'est sans doute pourquoi certaines études retiennent le tabac comme un cofacteur alors que d'autres le réfutent après avoir contrôlé pour différentes variables (Brinton, 1992). La plausibilité biologique du tabac comme carcinogène n'est toutefois plus débattue. On a démontré in vitro le rôle de condensés de fumée de cigarette dans la promotion de la carcinogenèse dans des cellules infectées par le VPH (Yang et coll., 1996). Des substances carcinogènes du tabac ont été retrouvées au niveau du mucus cervical (Schiffman et coll., 1987; Prokopczyk et coll., 1997). On a également pu mettre en évidence une augmentation du risque avec le nombre de cigarettes fumées (Winkelstein, 1990). La conclusion finale reste à établir.

La majorité de l'évidence épidémiologique semble indiquer le rôle protecteur d'une diète riche en aliments antioxydants (Verreault et coll., 1989; Slattery et coll., 1990). Certains ont retrouvé une baisse du niveau plasmatique d'éléments antioxydants chez les femmes avec lésions pré-invasives du col utérin (Palan et coll., 1996). Des déficiences alimentaires pourraient expliquer en partie les différences régionales dans la prévalence de lésions cervicales induites par le VPH (Franco, 1996).

La présence simultanée d'autres agents infectieux pourrait également moduler l'effet des VPH au niveau de l'épithélium cervical. Contrairement au VIH qui semble

exercer son action principalement par son effet sur l'immunité, d'autres agents pourraient agir directement au niveau cellulaire. Nous discuterons de l'effet possible du virus Herpès simplex 2 (HSV-2) et du virus Herpès humain 6 (HHV-6).

Plusieurs études séro-épidémiologiques ont démontré une association entre HSV-2 et le cancer du col utérin. On retrouvait en effet plus fréquemment des anticorps contre HSV-2 chez les femmes avec cancers du col que chez les femmes sans maladie cervicale. Toutefois la majorité de ces études présentaient des erreurs méthodologiques importantes en ne contrôlant pas pour les facteurs confondants associés à l'activité sexuelle ou à l'infection par les VPH (Guibinga et coll., 1995). Des études subséquentes n'ont pu mettre en évidence une association entre la présence d'anticorps contre HSV-2 et le cancer du col utérin (Kaufman et Adam, 1986; Jha et coll., 1993).

Les études *in vitro* présentent elles aussi des résultats contradictoires. Deux régions du génome de HSV-2 possédant un pouvoir transformant ont été identifiées : les régions Bg1 IIC et Bg1 IIN (Galloway et coll., 1982; Hayashi et coll., 1985; DiPaolo et coll., 1998) . Un groupe de chercheurs a démontré que des cellules immortalisées par HPV-16 ou -18 devenaient capables de générer des tumeurs lorsque transfectées par Bg1 IIN (DiPaolo et coll., 1998) . Les séquences de Bg1 IIN étaient intégrées dans le génome humain de façon stable. Toutefois, ni ces séquences d'ADN, ni leurs produits n'ont été retrouvés de façon répétée dans les cellules tumorales (Guibinga et coll., 1995). Il est possible que la présence continue de HSV-2 ne soit pas nécessaire au processus tumoral et qu'après une séquence d'événements moléculaires conduisant à la transformation, on ne retrouve plus de trace de génome de HSV-2 ou de ses produits au niveau des cellules tumorales (Galloway et coll., 1983; zur Hausen et coll., 1982).

HHV-6 a été identifié pour la première fois dans les lymphocytes au niveau du sang périphérique (Salahuddin et coll., 1986). Quelques années plus tard, on identifiait la capacité de ce virus à se multiplier *in vitro* dans les cellules épithéliales, à transactiver les promoteurs de VPH, et à accélérer la formation de tumeurs chez la souris.(Chen et coll., 1994). Depuis, on cherche à élucider son rôle, s'il existe, dans la

genèse du cancer du col. On a pu démontrer la présence occasionnelle du virus (0 à 20% des sujets étudiés) au niveau du tractus génital féminin (Leach et coll., 1994; Harnett et coll., 1995; Okuno et coll., 1995; Romano et coll., 1996) La seule étude voulant démontrer la présence de HHV-6 au niveau d'échantillons cervicaux de femmes avec dysplasie et/ou cancer, n'a pu démontrer la présence du HHV-6 que chez une seule femme sur 85. Le rôle exact de ces virus est donc encore loin d'être élucidé.

### 3. Infection persistante par le VPH

Comme nous venons de le démontrer, l'infection du tractus génital par un VPH oncogène est un événement relativement fréquent. Heureusement la plupart de ces infections se résolvent spontanément et ne progressent pas vers un cancer. Une étape qui semble cruciale dans la progression de la simple infection vers le cancer est la persistance de cette infection.

#### 3.1 Importance de l'infection persistante

Les études qui se sont penchées sur le rôle de la persistance de l'infection dans la progression des maladies cervicales confirment son importance. La force du lien entre la persistance de l'infection et la progression de la maladie dépendra de la sensibilité de la technique utilisée pour détecter l'ADN de VPH, du nombre de types à haut risque inclus dans le test de détection, de l'utilisation de matériel cytologique ou biopsique pour le diagnostic de la maladie cervicale, de la présence ou de l'absence de traitement durant la période d'étude et enfin du temps d'observation.

On croit que le temps nécessaire au passage d'une LIEBG vers un cancer est d'environ 20 ans (Schiffman et Brinton, 1995). Il est possible que le facteur carcinogène initial doive exercer son action de façon continue pour dépasser les mécanismes naturels de réparation cellulaire. Dans ce contexte, l'infection persistante par un VPH oncogène deviendrait essentielle à la progression de la maladie. Entre 4 et

50% des infections par les VPH sont persistantes (Sun et coll., 1997; Hildesheim et coll., 1994). La grande différence entre les estimations de la proportion d'infections persistantes par le VPH peut être expliquée par la présence ou l'absence, dans la population étudiée, des différents déterminants de la persistance que nous détaillerons plus loin et par la sélection initiale de patientes ayant ou non des lésions au niveau du col. Le VPH-16 (comme les autres VPH oncogènes) semble persister plus longtemps que les types non-oncogènes, avec une durée médiane d'infection de près d'un an (Ho et coll., 1998). Il est d'ailleurs un des types de VPH retrouvé le plus fréquemment dans les infections persistantes. Environ 50% des infections par le VPH-16 seraient persistantes (Hildesheim et coll., 1994; Londesborough et coll., 1996).

Chez des femmes avec cytologie normale ayant une infection persistante pendant 18 mois par le VPH-16, le risque de développer une LIE serait de 44% en deux ans. Ce qui serait deux fois plus élevé que le risque de 22% retrouvé chez des femmes avec une infection transitoire (ter Harmsell et coll., 1999). Dans une autre étude portant sur de jeunes femmes avec cytologie normale, on a trouvé un risque de développer une LIE de 37 fois plus élevé pour les femmes avec une infection persistante durant au moins 6 mois par rapport à des femmes non-infectées par le VPH (Ho et coll., 1998).

Des personnes infectées de manière persistante pendant 3 mois par un VPH, avec LIE à la cytologie de base, auraient un risque 4 fois plus élevé de ne pas voir leur LIE disparaître que des personnes avec LIE sans VPH détectable (Ho et coll., 1995). Dans une autre étude de 342 femmes avec cytologie anormale suivies sans traitement pendant une période de 3 à 36 mois, 19 femmes ont démontré une progression de leur maladie cervicale. Toutes ces femmes avaient une infection persistante avec un type oncogène de VPH, infection qui était présente depuis le début de l'étude. Aucune des 35 patientes qui ont acquis un VPH à haut risque en cours d'étude n'avait démontré de progression de la maladie à la fin de la période d'observation (Remmink et coll., 1995).

### 3.2 Caractéristiques épidémiologiques associées à la persistance

Une fois le rôle crucial de la persistance de l'infection par un VPH oncogène dans la progression des maladies cervicales établi, il est devenu important de tenter d'identifier les facteurs pouvant contribuer à cette persistance. Tout d'abord, il est apparu évident qu'un âge avancé des patientes infectées, était associé à la persistance des infections par le VPH (Hildesheim et coll., 1994; Ho et coll., 1998). Cette association peut être expliquée par le fait que la majorité des infections sont acquises au début de l'activité sexuelle et sont transitoires. Les femmes plus âgées avec infections persistantes représentent probablement une sous-population d'une cohorte ayant acquis l'infection plusieurs années plus tôt, mais qui, contrairement au reste de la cohorte, ne l'a pas éliminé.

Par ailleurs, comme la majorité des infections sont transitoires, plus l'intervalle entre les prélèvements sera long, plus les infections persistantes seront rares (Brisson et coll., 1996). La persistance est habituellement considérée comme étant cliniquement significative à partir de 3 à 6 mois. Chaque personne éliminera son infection à un rythme différent. Des prélèvements à quelques semaines d'intervalle augmenteront les chances de trouver de l'ADN de VPH encore présent au niveau du tractus génital. Plus on allongera l'intervalle entre les prélèvements, plus il y aura de femmes qui auront éliminé leur infection. Hildesheim et coll. ont évalué la fréquence des infections persistantes si des prélèvements sont faits à 12 mois d'intervalle à 53%, et s'ils sont pris à 18 mois d'intervalle, à 27% (Hildesheim et coll., 1994). Par contre, pour une patiente donnée, plus l'infection est établie depuis longtemps, moins la patiente a de chances de l'éliminer. En effet, une patiente aurait entre 30 et 40% des chances d'éliminer son infection dans la première année suivant l'acquisition d'un VPH oncogène, mais ses chances baisseraient à 11% seulement entre 12 à 18 mois après l'acquisition de l'infection (Ho et coll., 1998).

Les caractéristiques des différents VPH ont également un rôle à jouer dans la fréquence de la persistance. Les VPH à haut risque persistent plus fréquemment (2 à 4

fois) et plus longtemps que les VPH à faible risque (Hildesheim et coll., 1994; Brisson et coll., 1996; Sun et coll., 1997; Ho et coll., 1998). Certains variants de VPH-16 démontrant un changement au niveau de la protéine E6 ont également été associés à une persistance plus fréquente (Londesborough et coll., 1996). Enfin, une charge virale augmentée, serait également associée à un risque accru de persistance (Brisson et coll., 1996). Il est difficile de préciser la nature de cette association, particulièrement avec des études transversales. En effet, la charge virale élevée pourrait aussi bien être une cause de la persistance, l'inoculum ayant dépassé les capacités des défenses immunologiques, qu'une conséquence de la persistance, avec une charge virale qui augmente avec le temps.

Enfin, le statut immunologique de l'hôte apparaît important, comme le démontre les études de la persistance de l'infection par le VPH chez les femmes VIH-séropositives. La persistance est 6 fois plus fréquente chez celles-ci, et la fréquence de la persistance augmente avec le degré d'immunosuppression (Sun et coll., 1997). On retrouve également plus de persistance chez les femmes infectées avec plusieurs types de VPH simultanément, ce qui pourrait être considéré comme un signe d'immunité moins efficace, bien qu'il puisse aussi refléter le niveau d'activité sexuelle (Ho et coll., 1998).

Par ailleurs, l'infection persistante par le VPH a été documentée également dans un tout autre contexte. En effet, on a pu démontrer l'existence d'infections persistantes par le VPH-16 6 mois après la naissance, chez 83% des nouveau-nés infectés par le VPH-16 à la naissance (Cason et coll., 1995). Ceci est d'autant plus inquiétant qu'on évalue à 35-55% le taux de transmission périnatale du VPH-16 (Pakarian et coll., 1994; Tenti et coll., 1999). Il n'existe pour l'instant aucun suivi à plus long terme de ces enfants, tant au niveau de l'infection par le VPH que des manifestations cliniques. Des études à plus long terme seront nécessaires pour éclaircir le rôle possible de la transmission périnatale de VPH oncogènes dans le développement de cancers à l'âge adulte.

On peut retenir que la persistance de l'infection continuera à prendre de l'ampleur au fur et à mesure que d'autres études de cohorte confirmeront son importance dans le développement du cancer du col. A présent que la grande majorité des équipes de recherche utilisent des méthodes de détection ultra-sensibles, les études devraient démontrer une association de plus en plus forte entre l'infection persistante et le cancer du col.

#### 4. Techniques de caractérisation de la persistance

##### 4.1 Définition de la persistance

Avant de caractériser la persistance, encore faut-il savoir ce qu'on veut caractériser. En d'autres mots, que considère-t-on comme étant une infection persistante? La définition doit préciser la durée pertinente de même que ce qu'on doit détecter de façon consécutive pour être certains qu'il s'agit bien d'une infection persistante.

D'un point de vue clinique, on ignore à partir de quel intervalle de temps la détection consécutive d'ADN de VPH acquiert un caractère pronostic négatif. Il n'existe probablement pas de valeur seuil au-delà de laquelle l'infection persistante devienne soudainement significative. Il est plus probable que l'augmentation de la durée de l'infection augmente graduellement le risque de progression de la maladie cervicale. Cette hypothèse n'a toutefois pas été testée.

Pour tenter de différencier l'infection transitoire de l'infection persistante, on ne peut que se fier à la durée médiane « normale » de détection de l'ADN de VPH. Plusieurs études qui s'intéressaient à la persistance avaient un devis transversal (cross-sectionnel), ce qui nous donne une idée de la prévalence de la persistance, mais non de sa durée (Moscicki et coll., 1992; Hildesheim et coll., 1994; Evander et coll., 1995). De plus, la détection d'ADN de VPH étant très fluctuante à court terme, un deuxième



prélèvement des années après le premier pourrait sûrement sous-estimer la fréquence de la persistance, puisque le deuxième pourrait être négatif uniquement momentanément. (Wheeler et coll., 1996). Il existe tout de même quelques études longitudinales pouvant nous indiquer la durée médiane de l'infection. Par exemple, on a évalué que la durée médiane de l'infection par la majorité des types de VPH était de 6-12 mois dans une cohorte de jeunes femmes (Ho et coll., 1998). D'autre part, environ 50% des femmes chez qui on détecte de l'ADN de VPH à un examen, n'en auront plus 6 mois plus tard. Un autre 25% des femmes seront « guéries » après une autre période de 6 mois (Sun et coll., 1997). Pour cette raison, dans un contexte de recherche, on considère habituellement une infection de plus de 6 mois comme étant persistante.

Certaines études s'intéressant à la persistance ont défini celle-ci avant tout en terme de détection répétée d'ADN de VPH sans égard au type. La réévaluation des résultats en définissant plus strictement la persistance en considérant le type impliqué, a rapidement démontré que la première façon surestimait la fréquence de la persistance et elle n'est plus utilisée (Brisson et coll., 1996). La quasi totalité des études définissent maintenant la persistance comme étant la détection répétée consécutive d'ADN de VPH d'un même type à 6 mois d'intervalle. Toutefois, la possibilité que cette définition surestime également la prévalence de la persistance a été soulevée (Franco et coll., 1994) En effet, le typage représente une étape importante de l'évaluation de la persistance. Par contre, le typage pourrait être d'une utilité plus limitée lorsqu'il s'agit d'évaluer la persistance de types fréquents. Dans cette situation, il serait impossible de faire la différence entre une infection persistante et la disparition de l'infection suivie d'une réinfection avec un VPH de même type. C'est le cas, par exemple, du VPH-16 qui est non seulement le VPH le plus fréquemment retrouvé dans les lésions préinvasives et invasives du col, mais également un des types les plus fréquents dans la population sans lésion cervicale (Hildesheim et coll., 1994; Ho et coll., 1998). Pour cette raison, l'étude des variants de VPH-16 a été perçue comme une façon de raffiner la définition de la persistance car celle-ci n'inclut que des cas de détection consécutive répétée d'un même variant de VPH-16 (Franco et coll., 1994; Xi et coll., 1995).

Pour présenter les techniques de caractérisation de la persistance, il faudra donc présenter ces différentes étapes, soient les techniques de détection d'ADN de VPH, les techniques de typage, et l'analyse moléculaire de variants.

## 4.2 Techniques de détection de l'ADN de VPH et d'identification des types

### 4.2.1 Techniques de détection directes de l'ADN

Avant le développement des différentes techniques de biologie moléculaire, d'autres approches, moins précises, étaient utilisées pour détecter l'infection par le VPH. On se fiait au diagnostic de manifestations cliniques tels les condylomes, ou encore à des manifestations subcliniques, telle la cytologie cervicale ou la colposcopie montrant des LIE (Roman et Fife, 1989). On a également eu recours à l'identification de virions par microscopie électronique ou à la détection d'anticorps par tests sérologiques (Caussy et coll., 1988). Le clonage du génome de VPH dans des vecteurs plasmidiques bactériens a permis l'utilisation de méthodes de détection directe de l'ADN, telles l'hybridation de type Southern blot ou dot blot.

Le Southern blot était une des techniques les plus utilisées pour étudier le VPH avant l'avènement du PCR (Cole, 1993). Cette technique consiste à extraire l'ADN de l'échantillon puis à le couper en fragments de différentes longueurs par des enzymes de restriction. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel. L'ADN est transféré du gel à une membrane, et fixé sur cette membrane. La membrane est ensuite exposée à une solution contenant des sondes spécifiques radiomarquées qui s'hybrideront avec les bases correspondantes de l'ADN à détecter (Cho et Hedrick, 1994). Une première hybridation, avec quelques sondes génériques, dans des conditions non stringentes permettra d'identifier la majorité des échantillons contenant de l'ADN de VPH. Par la suite, une seconde hybridation dans des conditions stringentes avec des sondes spécifiques au type, permettra d'identifier les types impliqués. Les échantillons donnant un signal avec la sonde générique, mais ne donnant aucun signal avec les sondes spécifiques de type seront considérés comme

comportant de l'ADN de VPH non encore typé (Schiffman et coll., 1991; Cole, 1993). La technique du dot blot (ou slot blot) est similaire, sauf qu'elle ne comporte pas d'étape de digestion enzymatique suivie d'électrophorèse. L'ADN extrait et purifié est directement appliqué sur la membrane à l'aide d'une plaque comportant des puits en forme de point ou de trait. Cette technique est aussi sensible que le Southern blot, mais est moins laborieuse (Kiviat et coll., 1990). La technique de type Southern blot était l'étalon jusqu'à la généralisation de l'utilisation du PCR dans les années 90 (Schiffman, 1992a). On évalue son seuil de détection à environ  $10^5$  copies de génome viral de VPH (Tham et coll., 1991). Cette technique était toutefois complexe, laborieuse et demandait des quantités importantes d'ADN (Caussy et coll., 1988; Bauer et coll., 1991; Coutlée et coll., 1997).

Des techniques de détection directe de l'ADN, plus facilement utilisables dans des laboratoires cliniques, ont également été développées. Le système ViraPap/ViraType© utilisait une technique d'hybridation de type dot blot et permettait de détecter 7 types de VPH (Lorincz, 1992). Sa sensibilité de détection se comparait à celle du Southern blot (Kiviat et coll., 1990). Ces méthodes de détection étaient par contre limitées par l'utilisation d'un nombre restreint de sondes spécifiques de type, et ne permettaient donc de détecter qu'un petit nombre de types de VPH (Reid et Lorincz, 1995). Les techniques de détection directe de l'ADN ne sont plus utilisées et ont été remplacées par des techniques plus sensibles (Lorincz, 1996).

#### 4.2.2 Techniques de détection de l'ADN de VPH par amplification de signal

Des techniques basées sur l'amplification du signal, sans amplification de l'ADN présent initialement dans l'échantillon, peuvent détecter des quantités plus faibles d'ADN que les techniques directes. Le système commercial Hybrid Capture© appartient à cette catégorie. Son mode de fonctionnement a été décrit en détail ailleurs (Reid et Lorincz, 1995; Coutlée et coll., 1997; Peyton et coll., 1998). En résumé, il s'agit d'un immunoessai enzymatique (EIA), détectant des hybrides ARN-ADN. Des sondes d'ARN se fixent à l'ADN de VPH de l'échantillon à tester. Par la suite ces

hybrides sont immobilisés dans des tubes par des anticorps anti-hybrides. Finalement les hybrides immobilisés sont mis en contact avec des anticorps monoclonaux anti-ADN-ARN, marqués à la phosphatase alcaline. La lecture se fait par un luminomètre, en comparaison avec des contrôles positifs calibrés. Le système détecte 14 types de VPH. Cinq types à faible risque : 6, 11, 42, 43, 44, et 8 types à haut risque : 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56.

La pertinence de l'utilisation de ce système en clinique a été étudiée tant pour le dépistage primaire du cancer du col, que pour le dépistage secondaire (Cox et coll., 1995; Wright et coll., 1995; Schneider et coll., 1996). Le nombre restreint de types détectés, la sensibilité limitée, de 50 à 90%, et la pauvre valeur prédictive positive, de 18 à 59%, de même que les coûts impliqués en ont empêché l'utilisation de masse dans les programmes de dépistage de cancer du col (Cole, 1993; Cox et coll., 1995; Wright et coll., 1995; Scheiner et coll., 1996; Cope et coll., 1997; Coutlée et coll., 1997; Clavel et coll., 1998a).

Une version améliorée du système Hybrid Capture© existe maintenant. Le seuil de positivité du test est passé de 10 pg à 0,2 pg d'ADN de VPH, ou 1000 copies de génome de VPH (Lorincz, 1996). L'utilisation de microplaques rend l'application du test plus facile en laboratoire clinique (Cope et coll., 1997). Quatre types supplémentaires de VPH à haut risque sont inclus dans le nouveau test (39, 58, 59, 68). Sa sensibilité approche 93% pour la détection de VPH oncogènes chez les femmes avec pathologie cervicale (Clavel et coll., 1998b). Ce nouveau test demandera sûrement des ajustements. Il semblerait y avoir une quantité inacceptable de faux positifs lorsque certains milieux de collection d'échantillons sont utilisés. De plus, on a observé une réactivité croisée entre certains types à haut risque et d'autres types à faible risque (Peyton et coll., 1998).

#### 4.2.3 Techniques de détection de l'ADN de VPH par amplification de l'ADN

Les techniques de détection par amplification d'ADN produisent plusieurs copies de la portion voulue du génome avant de procéder à la détection de l'ADN par des techniques traditionnelles (ex.: dot blot). La technique de PCR a été décrite dans les années 80. Elle permet la formation de millions de copies d'ADN, en quelques heures. L'utilisation du PCR pour la détection de l'ADN de VPH a été décrite à la fin des années 80 (Manos et coll., 1989; Van den Brule et coll., 1991). La technique s'est améliorée au cours des années suivantes pour devenir la technique de choix pour détecter l'ADN de VPH dans un contexte de recherche. Les amplifications utilisant des amorces consensus sont préférées, étant donné qu'elles permettent l'amplification simultanée de plusieurs types, incluant des types non encore décrits. Deux paires d'amorces sont principalement utilisées en recherche : la paire GP5-GP6 et la paire MY09-MY11 (Lorincz, 1996). La paire d'amorce MY09-MY11 ciblant la région L1 a été particulièrement bien décrite et standardisée (Resnick et coll., 1990; Bauer et coll., 1991; Schiffman et coll., 1991; Kuypers et coll., 1993; Hildesheim et coll., 1994; Bosch et coll., 1995; Coutlée et coll., 1997). Une amplification réussie du gène humain de la  $\beta$ -globine permet de s'assurer que l'échantillon est adéquat pour l'analyse par PCR et qu'il ne contient pas d'inhibiteurs, ce qui évite de classer comme VPH-négatifs des échantillons qui sont en fait non interprétables. Cette méthode de détection s'est avérée environ 2 à 4 fois plus sensible que le système ViraPap/ViraType®, et 2 à 3 fois plus sensible que l'hybridation de type Southern blot (Melcher et coll., 1989; Bauer et coll., 1991; Gravitt et coll., 1991; Schiffman et coll., 1991). L'augmentation de la sensibilité du PCR par rapport au Southern blot s'explique surtout par la détection d'un plus grand nombre de types de VPH, par PCR, chez les femmes sans pathologies cervicales (Schiffman et coll., 1991). La grande force du PCR, sa sensibilité qui atteint 10 copies d'ADN viral, représente également une de ses faiblesses (Tham et coll., 1991; Goldsborough et coll., 1992). En effet, elle permet de diminuer au maximum les faux négatifs et ainsi les erreurs de classement des échantillons en VPH-positifs et VPH-négatifs. Par contre, des précautions particulières doivent être prises pour éviter la contamination d'échantillons VPH-négatifs par des échantillons VPH-positifs ou par

des amplicons, qui peut être causée par des quantités minuscules d'échantillons VPH-positifs. Des contrôles négatifs doivent être placés dans chacun des lots de réaction de PCR pour confirmer l'absence de contamination.

Après l'amplification par PCR avec les amorces MY09-MY11, on procède habituellement à une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. L'identification d'une bande de 450 bp confirme l'amplification réussie. La détection radiographique étant plus sensible, il n'est toutefois pas rare de retrouver un échantillon avec un signal positif par hybridation, alors qu'il ne produisait pas de signal sur gel avec bromure d'éthidium. Par la suite, la détermination du type amplifié se fait par hybridation avec des sondes spécifiques aux différents types viraux. Une première hybridation avec une sonde générique permet d'identifier les spécimens démontrant un VPH pour lequel une sonde spécifique n'existe pas. Ceux-ci auront une hybridation positive avec la sonde générique mais négative avec toutes les sondes spécifiques de type (Schiffman et coll., 1991). Pour caractériser les VPH pour lesquels il n'existe pas de sonde spécifique de type, on utilisera le séquençage ou le RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Bernard et coll., 1994). Des méthodes de détection non-isotopiques existent également, mais sont moins souvent utilisées (Coutlée et coll., 1995; Lungu et coll., 1995; Jacobs et coll., 1997).

#### 4.3 Techniques d'identification des différents variants de VPH-16 (analyse moléculaire de variants)

L'étude de variants a été utilisée pour répondre à des questions de plusieurs ordres. La possibilité de reconnaître un génome viral particulier laisse en effet entrevoir la possibilité de mieux comprendre l'épidémiologie de l'infection par le VPH, son lien avec le cancer du col, les différents modes de transmission, de même que d'étudier la fréquence de l'infection simultanée par plusieurs virus.

On a étudié les modes de transmission et la contagiosité des VPH (Ho et coll., 1993b). On a pu confirmer l'existence d'infections avec variants multiples. Par

ailleurs, la construction d'arbres phylogénétiques a suggéré que les mutations à l'origine de la différence entre les variants ne sont pas apparues sur une courte période, mais qu'elles étaient plutôt présentes depuis des millénaires et que les différents variants de VPH ont co-évolué avec l'espèce humaine (Ho et coll., 1991; Chan et coll., 1992b). On a aussi pu investiguer des différences dans la réponse immunitaire chez des patientes avec cancer du col (ter Meulen et coll., 1993). Enfin, on a découvert certains variants qui pourraient avoir un potentiel oncogène plus important et ainsi expliquer en partie la différence de progression de la maladie entre différentes patientes (Remmink et coll., 1995; Xi et coll., 1997).

Les régions du génome étudiées pour identifier des variants diffèrent selon le but visé. Par exemple, les études s'intéressant avant tout à la différence de potentiel oncogène ont surtout étudié les variations dans la région codant pour les protéines oncogènes (Fuginaga et coll., 1990 et 1994; ter Meulen et coll., 1993; Ellis et coll., 1995; Hecht et coll., 1995). Par contre les études s'intéressant avant tout à l'identification de variants comme outil épidémiologique (études de l'évolution, de la transmission ou de la persistance) ont surtout utilisé les régions hypervariables (RNC) (Ho et coll., 1991; Xi et coll., 1993 et 1995).

Plus de 50 variants de VPH-16 ont été caractérisés. Comme nous l'avons élaboré plus en détail dans la section taxinomie, les variants ne diffèrent entre eux que par une différence de 2% ou moins au niveau des séquences codantes du génome et de 5% ou moins au niveau des séquences non-codantes (de Villiers et coll., 1994). Ces variations de séquence ne sont toutefois pas réparties uniformément dans le génome. Elles se concentrent dans quelques régions hypervariables du génome au niveau de la RNC et de L1 (Icenogle et coll., 1991; Chan et coll., 1992a). De plus, on observe une co-variation fréquente des gènes mutés dans différentes régions du génome (Yamada et coll., 1997). C'est pourquoi on peut limiter les études de variants à une région du génome sans crainte de manquer un nombre significatif de variants.

Dans le contexte de notre projet de recherche, qui visait à identifier un isolat particulier et à le suivre dans des échantillons consécutifs d'une même patiente, la RNC semblait la région la plus appropriée, pour les raisons mentionnées plus haut. Trois méthodes ont été utilisées pour identifier des mutations au niveau de cette portion du génome : Le LSSP-PCR (Low-stringency single specific PCR), le SSCP-PCR (single-strand conformation polymorphism-PCR) et le séquençage.

#### 4.3.1 LSSP-PCR

Il s'agit d'une méthode simple et rapide permettant d'identifier des mutations de quelques bases au niveau de fragments d'ADN. Elle a été développée pour l'identification de personnes (ADN de mitochondries). Dans ce procédé, le gène à identifier est utilisé comme matrice pour un PCR dans des conditions de faible stringence. Une seule amorce est utilisée. Les produits de PCR résultent donc de l'interaction entre l'amorce et son site spécifique de même qu'entre l'amorce et les autres sites du génome où les interactions sont possibles étant donné les conditions de faible stringence. Il y a ainsi production de multiples produits de PCR différents qui sont spécifiques à un fragment d'ADN. Une seule mutation influencera cette « signature du gène ». Les différents produits sont séparés par électrophorèse sur gel avec bromure d'éthidium ou nitrate d'argent pour visualisation (Simpson et Pena, 1997).

Le LSSP-PCR n'a été évalué que par une seule équipe pour la détection de mutations dans le génome de VPH-16 (van Becklum, 1995). La méthode a été évaluée sur 34 échantillons de 17 patients. De ces 34 échantillons, 22 échantillons avaient été recueillis de façon prospective chez 5 individus. Deux paires d'amorces différentes ont été testées. Les résultats du LSSP-PCR ont été comparés aux résultats de séquençage. Huit variants ont été identifiés par séquençage. Les 5 individus ayant plusieurs échantillons présentaient tous un variant identique dans leurs échantillons consécutifs. Le LSSP-PCR a permis d'identifier 6 variants différents. Toutefois il n'y avait pas de concordance avec les variants identifiés par séquençage et ceux identifiés par LSSP-



PCR. De plus, l'identification de variants changeait même pour un spécimen donné selon la paire d'amorce utilisée. Le LSSC-PCR ne semble donc pas être une méthode fiable pour identifier des mutations au niveau du génome de VPH-16.

#### 4.3.2 SSCP-PCR

Il s'agit d'une technique de détection de mutations qui se veut simple, rapide, efficace et relativement peu dispendieuse, décrite en 1989 (Orita et coll., 1989b). Elle est utilisée à la fois pour dépister des mutations inconnues et connues. Cette technique s'appuie sur le fait que des petits brins d'ADN simple, possédant des différences minimales de séquence (parfois une seule mutation), démontrent une mobilité électrophorétique différente dans des gels non-dénaturants de polyacrylamide. La vitesse de migration de l'ADN lors de l'électrophorèse dépend principalement de la charge électrique, elle-même dépendante du poids moléculaire. Par contre, de l'ADN simple brin peut se replier sur lui-même et former des liens au niveau de bases complémentaires dans des régions d'auto-complémentarité. La configuration ainsi adoptée influencera la vitesse de migration, car même si la charge totale de deux fragments est identique, le ratio «taille/charge», lui, sera différent en raison du repli sur eux-mêmes des fragments (Humphries et coll., 1997). Comme une seule mutation influencera la configuration secondaire adoptée, il sera possible de distinguer deux fragments d'ADN qui ne différeront que par une seule mutation (Figure 3).

Il s'agit donc simplement d'une réaction de PCR dont les produits sont dénaturés, habituellement par chauffage, afin de séparer les brins d'ADN. Les produits de PCR sont ensuite dilués, afin de diminuer la proportion des fragments qui pourront reformer des liens pour redevenir de l'ADN double-brin, avant d'être chargés pour migration sur un gel non-dénaturant (Beier, 1993 ; Humphries et coll., 1997). Les produits de PCR peuvent être utilisés directement. On peut leur incorporer un nucléotide radiomarqué ou procéder à un marquage terminal pour permettre une détection par autoradiographie. On peut également utiliser le nitrate d'argent pour la détection (Oto et coll., 1993). Le bromure d'éthidium fonctionne moins bien, étant

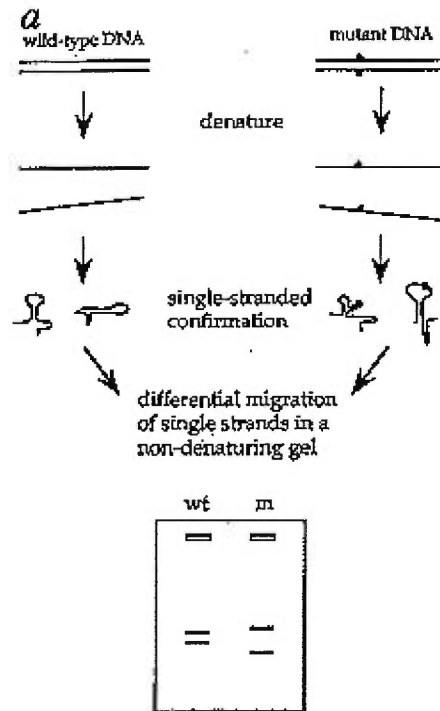


Figure 3 : Représentation schématique du principe de l'analyse SSCP, tiré de Grompe, 1993. Une mutation est représentée par un point sur les brins d'ADN. Les brins sont séparés. On remarque que les conformations de l'ADN simple-brin sont différentes à cause de la mutation présente. Cette différence de conformation se traduit par une différence de mobilité électrophorétique, visible sur le gel.

donné que les produits de PCR utilisés sont dénaturés (Beier, 1993). L'utilisation de nucléotides radiomarqués augmente la sensibilité, et permet donc à la fois de diminuer le nombre de cycles de PCR nécessaires à la détection, et d'augmenter la dilution des échantillons avant la migration. La diminution des cycles de PCR diminue la formation de produits de PCR non désirés qui peuvent brouiller le signal de SSCP. Une plus grande dilution permet de diminuer la quantité d'ADN qui se retrouvera sous forme d'ADN double-brin et ainsi d'augmenter la force du signal SSCP (Humphries et coll., 1997).

La taille du fragment est probablement le facteur influençant le plus la performance du SSCP. On retrouve une sensibilité maximale, à 97%, pour les

fragments de 155 pb (Sheffield et coll., 1993). La sensibilité de détection de mutations est d'environ 90% pour les fragments de 200 pb et de 80% pour les fragments de 300 à 350 pb (Hayashi et Yandell, 1993). Si les fragments sont plus petits ils ne pourront se replier pour former une structure secondaire. S'ils sont plus gros, l'impact d'une seule mutation pourrait ne pas influencer suffisamment la mobilité pour être détectable (Humphries et coll., 1997; Wallace, 1997). Dans les cas où l'on doit détecter des mutations dans de longs fragments d'ADN, on peut utiliser des enzymes de restriction pour couper les fragments, afin d'obtenir des segments plus petits, de longueur appropriée pour le SSCP (Lee et coll., 1992).

La température doit être gardée la plus stable possible étant donné qu'elle affecte la formation et la stabilité des liens secondaires (Orita et coll., 1989a; Hongyo et coll., 1993). Une électrophorèse dans une chambre à 4°C ou dans une pièce climatisée à température contrôlée, permettent d'atteindre cet objectif. La composition du fragment d'ADN étudié influencera la facilité à détecter des mutations. En effet, une haute teneur en guanine et en cytosine rendra les mutations plus faciles à détecter par SSCP, car le triple lien hydrogène que forment la guanine et le cytosine est plus résistant à la chaleur que le double lien que forment l'adénosine et la thymine (Humphries et coll., 1997).

L'acrylamide est la matrice la plus utilisée pour les gels de SSCP. Le ratio « acrylamide/bisacrylamide », de même que le pourcentage d'acrylamide dans le gel influenceront la sensibilité du SSCP (Spinardi et coll., 1991; Savov et coll., 1992). Un gel plus long (40 cm) permettra d'augmenter le temps de migration et ainsi de mieux séparer des fragments n'ayant qu'une petite différence d'électromobilité (Humphries et coll., 1997). L'addition de glycérol dans le gel, de même que des changements dans la concentration du tampon utilisé, pourront augmenter la clarté du signal (Spinardi et coll., 1992).

La majorité des études portant sur l'identification des variants de VPH-16, l'ont fait par séquençage (voir plus loin). Par contre, avec l'intérêt grandissant d'identifier

des variants de VPH-16, particulièrement dans des échantillons cliniques et pour des nombres importants de patientes, il n'est pas surprenant qu'on se soit intéressé à des méthodes de détection de mutations plus simples, plus rapides et moins coûteuses. Avec les caractéristiques que nous venons de décrire, le SSCP était une technique prometteuse (Grompe, 1993). Xi et coll., ont décrit la possibilité d'identifier des variants de VPH-16 par le SSCP (Xi et coll., 1993). Ils ont choisi d'amplifier la RNC étant donné qu'elle est plus variable que les régions codantes. La RNC a été amplifiée par deux paires d'amorces (AB et CD) avec une région de chevauchement entre les deux fragments produits, pour s'assurer d'amplifier toute la RNC. Par la suite, ces fragments sont coupés par des enzymes de restriction de façon à obtenir des fragments de longueur adéquate pour l'analyse par SSCP (Figure 4). Du  $^{32}\text{P}$  a été incorporé à la réaction de PCR pour permettre la détection par auto-radiographie.

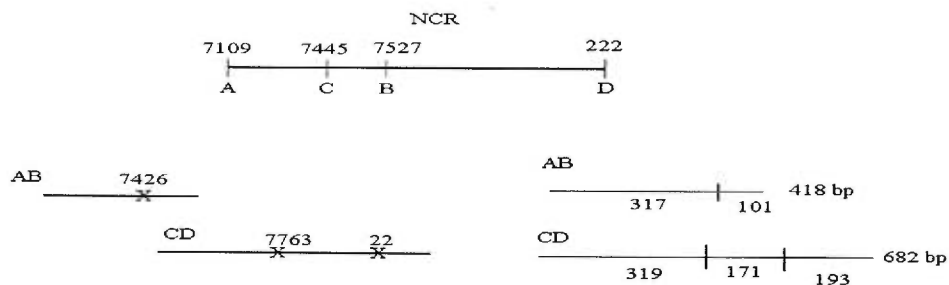


Figure 4 : Schématisation du protocole de SSCP, adapté de Xi et coll., 1993. Les lettres A,B,C,D représentent les amorces et illustrent leur site d'attachement au niveau de la RNC. Les chiffres indiquent la position au niveau du génome (voir la figure 1). Les X représentent le site d'action des enzymes de restriction. La dernière portion de la figure montre les 5 segments d'ADN obtenus de même que leur longueurs respectives.

Sept lignées cellulaires contenant du VPH-16 déjà bien caractérisé ont d'abord été analysées par SSCP. Les résultats obtenus par SSCP ont été comparés aux données de séquence. Tous les changements de mobilité observés par SSCP correspondaient aux mutations retrouvées dans la séquence. Par la suite le SSCP a été évalué sur 48 échantillons cliniques provenant de 24 homosexuels. Douze signaux différents ont été retrouvés par SSCP. Tous les changements de mobilité pouvaient être expliqués par une mutation, mise en évidence par le séquençage (Xi et coll., 1993).

Par la suite, la même équipe a utilisé le SSCP pour évaluer la persistance de variants de VPH-16 longitudinalement dans une cohorte. Le séquençage a été utilisé pour confirmer les résultats de SSCP, bien que tous les isolats n'aient pas été évalués par séquençage. Au total, 30 variants ont été identifiés par SSCP dans 405 échantillons provenant de 110 patientes. Des infections par variants multiples ont été démontrées par séquençage. Il semble que pour qu'un variant secondaire soit détectable par SSCP, il doit représenter au moins 20% du total des variants (Xi et coll., 1995). Par ailleurs, aucun changement de variant principal n'a été retrouvé chez 70 femmes, autant par SSCP que par séquençage, pour une période de suivi allant jusqu'à 2.8 années.

Une autre équipe a utilisé le SSCP pour déterminer si des femmes infectées de façon persistante par le VPH-16, l'étaient toujours par le même variant. Ils ont utilisé pour leur étude le protocole de Xi et coll. (1993). Ils ont également comparé la performance du SSCP au séquençage pour l'identification de variants. Ils n'ont identifié que 4 variants différents avec le SSCP alors que le séquençage a permis d'en identifier 11. Pour cette raison, le SSCP a été abandonné en cours d'étude comme méthode d'identification de variants. Par ailleurs, sept femmes ont eu plus d'un spécimen prélevé, permettant un suivi longitudinal. Chez ces sept femmes, le même variant a été retrouvé dans tous les spécimens (van Becklum et coll., 1995).

### 4.3.3 Séquençage

Le séquençage de portions du génome du VPH-16 demeure l'étalon contre lequel se comparent les autres méthodes de détection de variants de VPH-16. (Xi et coll., 1993; Van Becklum, 1995 a et b). Il s'agit de la méthode de référence pour la détection de mutations. Le séquençage implique tout d'abord une amplification par PCR du fragment à étudier. Pour cette amplification, une polymérase de « haute fidélité » peut être utilisée afin de diminuer les mutations induites par le PCR (Xi et coll., 1995). Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse puis purifiés. Les produits purifiés peuvent être séquencés directement ou clonés avant la séquence. Par la suite, une autre amplification par PCR incorpore des didéoxynucléotides fluorescents ou radiomarqués comme bases terminales permettant la lecture (Cho et Hedrick, 1994).

## HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Le lien entre le VPH et le cancer du col n'est plus mis en doute. L'infection par le VPH est fréquente, mais heureusement la majorité des femmes infectées ne développeront pas de cancer. Nous avons discuté des différents facteurs qui influenceront la progression de la simple infection vers le cancer, en accordant une attention particulière au rôle de l'infection persistante par un VPH oncogène. Devant l'importance grandissante qu'acquiert l'infection persistante, il devient primordial de s'assurer de bien la définir et d'évaluer les différentes techniques qui nous permettent d'atteindre cette fin.

La première hypothèse de ce projet de recherche est que le SSCP-PCR est une technique sensible, simple et rapide, permettant de détecter des variants de VPH-16 sur des échantillons cliniques. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé 144 échantillons provenant de 50 femmes infectées de manière persistante, pour au moins 6 mois, par le VPH-16. Nous avons comparé la performance du SSCP-PCR au séquençage pour l'identification de différents variants.

La deuxième hypothèse de ce projet de recherche est qu'étant donné la fréquence de l'infection par le VPH-16, tant chez les femmes avec lésions cervicales que chez les femmes sans pathologie cervicale, une définition de la persistance basée uniquement sur le type surestime la fréquence de l'infection persistante. Pour tester cette hypothèse, nous avons vérifié par SSCP-PCR et par séquençage si des femmes présentant de l'ADN de VPH-16 de façon répétée sur des échantillons génitaux consécutifs, présentaient toujours le même variant. Seules les femmes démontrant toujours le même variant ont été considérées dans l'estimation de la fréquence de l'infection persistante par le VPH-16.

**ARTICLE**



**Consecutive detection of HPV-16 DNA in genital samples does not always represent persistent infection as determined by single-strand conformation polymorphism and PCR sequencing analyses**

Running Head: Molecular Variant analysis of persistent HPV-16 infection.

Marie-Hélène Mayrand<sup>1,2</sup>, François Coutlée<sup>1,2,3\*</sup>, Catherine Hankins<sup>3,4</sup>, Normand Lapointe<sup>1,5</sup>, Pierre Forest<sup>2</sup>, Manon de Ladurantaye<sup>2</sup>, The Canadian Women's HIV Study Group<sup>6</sup>, and Michel Roger<sup>1,2</sup>.

1- Départements de Microbiologie et de Pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada.

2- Département de Microbiologie et Infectiologie, Hôpital Notre-Dame, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada.

3- Department of Epidemiology and Biostatistics, and department of oncology, McGill University, Montreal, Qué., Canada.

4- Unité de Maladies Infectieuses, Direction de la Santé Publique de Montréal-Centre, Montréal, Qué., Canada.

5- Centre Maternel et Infantile sur le SIDA, Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Qué., Canada.

6- The Canadian Women's HIV Study Group includes the following investigators throughout Canada: Principal investigators: Catherine Hankins, Normand Lapointe; **Calgary:** John Gill. **Edmonton:** Barbara Romanowski, Stephen Shafran. **Halifax:** Rob Grimshaw, David Haase, Lynn Johnston, Wally Schlech. **Hamilton:** Stephan Landis, John Sellors, Fiona Smaill. **Montréal:** François Beaudoin, Ngoc Bui, Alena Capek, Marc Boucher, Michel Chateauvert, Manon Coté, François Coutlée, Douglas Dalton, Gretty Deutsch, Julian Falutz, Diane Francoeur, Lisa Hallman, Eleanor Hew, Lina Karayan, Marina Klein, Louise Labrecque, Richard Lalonde, Christiane Lavoie, Catherine Lounsbury, John Macleod, Nicole Marceau, Gail Myhr, Grégoire Noel, Robert Piché, Manisha Raut, Chantal Rondeau, Jean-Pierre Routy, Karoon Samikian, Pierre Simard, Christina Smeja, Graham Smith, Paul-Pierre Tellier, Emil Toma.

**Ottawa:** Garry Garber, Garry Victor. **Québec:** Louise Côté, Edith Guilbert, Michel Morissette, Hélène Senay, Sylvie Trottier. **Toronto:** Phil Berger, Lisa Friedland, Donna Keystone, Joan Murphy, Anne Phillips, Marion Powell, Anita Rachlis, Pat Rockman, Irving Salit, Cheryl Wagner, Sharon Walmsey. **Saskatoon:** Kurt Williams. **St-John's:** Ian Bowmer, Rory Windrim. **Sudbury:** Roger Sandre. **Vancouver:** Penny Ballem, David Burdge, Brian Conway, Mariane Harris, Deborah Money, Julio Montaner, Deborah Money, Janice Veenhuizen.

\*Address for correspondence: François Coutlée, Département de Microbiologie et Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke est, Montréal (Québec), H2L 4M1, Canada. Tel. 514-281-6000, ext. 5103; fax: 514-896-4607

Article soumis au Journal of Clinical Microbiology, novembre 1999.

## ABSTRACT

Persistent HPV infection is a risk factor for progression to high-grade squamous intraepithelial lesions or cancer of the uterine cervix. Detection in consecutive genital samples of HPV-16 DNA, a frequently encountered HPV type, could represent persistent infection or reinfection. We undertook a study using PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing of PCR products (PCR-sequencing), to determine if consecutive HPV-16-positive samples contained the same HPV-16 variant. Fifty women had at least two consecutive genital specimens obtained at 6 month intervals that contained HPV-16 DNA by a consensus L1 PCR assay. A total of 144 samples were amplified with two primer pairs for SSCP analysis of the entire long control region. Three (2%) of these samples yielded results that could not be interpreted. Seventeen different SSCP patterns were identified in our population while PCR-sequencing identified 22 variants. The most frequent SSCP pattern was found in 75 (53%) samples from 27 (54%) women. The SSCP patterns obtained from consecutive specimens were identical for 46 (92%) of 50 women, suggesting truly persistent infection. Four women exhibited in consecutive specimens different HPV-16 SSCP patterns that were all confirmed by PCR-sequencing. PCR-sequencing also identified an additional woman infected consecutively by two different HPV-16 variants that exhibited the same SSCP pattern. Four of the latter five women would have been misclassified as having persistent HPV-16 infection on the basis of HPV typing.

## INTRODUCTION

Human papillomaviruses (HPV) are now considered etiological agents of cancer of the uterine cervix (7,37). This fact is of major public health importance since HPV infection is the most frequent sexually transmitted disease (STD) worldwide and since up to 60 % of sexually active women will be infected by HPV in the genital tract (25). Irrespective of HPV infection status, less than one in 10,000 woman will develop invasive cervical cancer (1). The fact that most HPV-infected women do not develop cytological anomalies (10) underlines the importance of factors modulating the progression of cervical disease to cancer in HPV-infected women. These factors could include HPV genotype and molecular variant, HPV viral load, persistence of HPV infection, coinfection with other STD agents, and immune status of the host (13,15,19,20,35,40,41,50).

Recent studies have demonstrated that infection with high-risk HPV types is usually transient (16,24,25,47). Persistence of HPV infection substantially increases the risk of progression to clinically relevant pre-invasive and invasive disease (3,9,25,26,31,32,35). Persistence of HPV infection is often defined as the consecutive detection of the same HPV type at 3 to 6 month intervals. However, when the genotype involved is prevalent in the population of women under study, reinfection with the same genotype could occur, simulating persistent infection. This could result in misclassification of consecutive transient HPV infections as persistent infections.

Genomic heterogeneity of HPV-16 isolates, the most prevalent type detected in high-grade and cancerous lesions of the uterine cervix (7,25,46), results from a limited number of nucleotide changes, especially in non-coding regions of the HPV genome (27). On this basis, HPV-16 can be classified into more than 40 variants (8,28,33,52) which have a less than 2% variation in DNA sequence (46). Molecular variant analysis of HPV-16 isolates allows to distinguish reinfection from persistence (18,43).

Sequence analysis of hypervariable regions of the HPV genome (18) remains the gold standard method for molecular variant analysis. However, single strand conformation polymorphism (SSCP) is a simple alternative to sequencing for this purpose (49). Only one group has compared in parallel the value for HPV-16 variant analysis of PCR-SSCP versus PCR-sequencing on clinical specimens (43).

The objective of our study was to evaluate the accuracy of PCR-SSCP in classifying women who had consecutive genital samples containing HPV-16 DNA as being persistently infected or being reinfected by HPV-16. We also compared the number of variants identified by SSCP and DNA sequencing procedures. Using both methods, we investigated if women considered persistently infected with HPV-16 harboured the same variant over time. Our work is the largest published study to date using DNA sequencing for variant analysis in the definition of persistence of HPV-16 infection in a cohort of HIV-seropositive women.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients' protocol

The present study focused on 50 women participating in the Canadian Women's HIV Study cohort (21,22) who had at least two consecutive samples containing HPV-16 DNA sequences by the L1 MY09-MY11 consensus PCR assay. Women were included from the date of the first HPV-16-positive sample to the date of loss of HPV-16, loss to follow-up, or September 1997, whichever came first. All participants provided written informed consent to participate. Ethics committees of each participating institution had approved the Canadian Women's HIV Study protocol.

The Canadian Women's HIV Study is conducted across Canada since 1993 in 28 sexually transmitted diseases (STD) clinics, human immunodeficiency virus (HIV) clinics, and family practices. It evaluates the relationship between HPV infection, HIV infection, and cervical disease using cross-sectional, cohort and descriptive methodologies (21,22). The original study design, the characteristics of the cohort, and HPV typing results have already been described in detail elsewhere (12,21,22,22). Women were eligible to participate in the Canadian Women's HIV Study if they were seropositive for HIV-1. HIV-1 seronegative women were also eligible if they had three or more lifetime male sexual partners or were at risk for STD, and accepted to have annual serological tests for HIV antibodies (21,22).

In the Canadian Women's HIV Study, a standardised questionnaire is administered upon study entry and six months thereafter to obtain information on sociodemographic characteristics, sexual behaviour, history of STD, opportunistic infections, as well as recent CD4 T lymphocyte counts (21,22). For HIV-seronegative women, vaginal tampon specimens are obtained at 6-month intervals while cervicovaginal lavages and Pap smears are collected at one-year intervals. For HIV-seropositive participants, all three specimens are obtained at 6-month intervals. When a vaginal tampon and a cervicovaginal lavage are obtained at the same annual visit and

both contain HPV-16 DNA, the isolate from the cervicovaginal lavage is chosen for molecular variant analyses.

### **Sample processing**

Participants inserted and immediately withdrew a vaginal tampon before pelvic examination (12,17). The tampon was placed into a sterile jar containing 50 ml of transport media composed of 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM EDTA and 150 mM NaCl. Cervicovaginal lavages were obtained during pelvic examinations with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS) [pH 7.4] (5,44,44). Specimens were refrigerated within one hour and transported to a central laboratory on wet ice. Tampons were then squeezed to obtain a suspension of exfoliated cells. Cell suspensions from tampons and cervicovaginal lavages were pelleted after centrifugation at 2,500 rpm for 10 min at 4°C and resuspended in 500 µl of 10 mM Tris [pH 8.3]. Cell suspensions were lysed with Tween 20 at a final concentration of 0.8% (v/v), and digested with 250 µg/ml of proteinase K for 2 hours at 45°C (11). Cell lysates were boiled for 10 min and stored at -70°C until tested. The delay between sampling and processing was never extended beyond 5 days.

### **β-globin and HPV DNA amplification**

Five microliters from each sample was amplified for β-globin DNA with PC04-GH20 primers to control for DNA integrity, for the presence of an adequate number of epithelial cells, and for amplification inhibitors (5,12). β-globin-negative samples were extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol (36). Five hundred ng of extracted nucleic acids was then reamplified for β-globin. β-globin-positive samples (lysate or extracted DNA) were then tested for HPV. A volume of five microliters of each cell lysate was amplified under standard conditions with the MY09-MY11-HMB01 consensus HPV primers (12,14,21,24). Negative, weak positive (10 HPV18 DNA copies), and strong positive controls (HPV types 6/11, 16, 31, 33, 35, 39, 45), were included in each amplification run. Amplified products were spotted onto nylon

membranes and were reacted as described elsewhere under stringent conditions with  $^{32}\text{P}$ -labelled oligonucleotide probes for HPV types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56 and 58 (4,5,5,12,24).

### **Amplification of HPV-16 LCR for molecular variant analyses**

The complete long control region (LCR) of HPV-16, an hypervariable non-coding segment of HPV-16 genome between nucleotide positions 7109 and 222, was amplified with two sets of primers (43,48,49): primers A and B amplified a 418 bp fragment (nucleotide positions 7109 to 7527) designated the AB fragment, while primers C and D generated a 682 bp fragment (nucleotide positions 7445 to 222) designated the CD fragment.

Amplification reactions were performed with 2.5  $\mu\text{l}$  of lysate in a 10  $\mu\text{l}$  reaction volume containing 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 2.5 U of *AmpliTaq* or *AmpliTaq Gold* DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Montréal, Qué.), 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer, 0.25 mM each dCTP, dTTP, dGTP and 0.075 mM dATP, and 0.5  $\mu\text{l}$  of [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; Amersham, Montréal, Qué.). *AmpliTaq Gold* DNA polymerase was used when signals generated with *AmpliTaq* were too weak. Amplification reactions were completed in a 9600 Thermal Cycler (Roche Diagnostic System, Mississauga, Ont.) for 35 cycles (48). Each cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 25 seconds, a reannealing step at 62°C for 25 seconds, and an extension step at 72°C for 50 seconds. The last cycle was followed by an extension step at 72°C for 10 min. In each set of PCR reactions, we included negative controls to ensure the absence of contamination. A plasmid containing HPV-16 DNA (pHPV-16) obtained from Dr zur Hausen, Germany, was considered as the reference strain for SSCP analysis and was also used as a positive control.



### Molecular variant analysis by SSCP

The SSCP analysis of HPV-16 LCR-amplified products was carried out as described originally by Xi et al.(43,48,49). Briefly, PCR product was cleaved prior to denaturation to obtain fragments of suitable length for SSCP. The AB fragment was digested with 2 units of *Hha*1 (Gibco-BRL, Mississauga, Ont.) into two fragments of 101 pb and 317 pb, respectively. The CD fragment was digested with 4 units of *Dde*I (New England Biolabs, Boston, MA) into 3 fragments of 319 pb, 193 pb, and 171 pb, respectively. Two  $\mu$ l of each digested PCR product was diluted with 8  $\mu$ l of 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, and 0.05% xylene cyanol, and heat denatured at 97°C for 10 min (49). Digested products were then rapidly quenched on ice. Electrophoresis of digested AB fragments was completed in a 10% polyacrylamide vertical gel for 20 hours at 400V at 4°C in 0.089 M Tris-borate [pH 8.0], 0.089 M boric acid and 8 mM EDTA (TBE). Digested CD fragments were migrated on a 5% polyacrylamide gel containing 10% glycerol at 500V at 4°C for 17 h in TBE. The gels were dried in a gel dryer and exposed to Kodak X-Omat AR X-ray films (Eastman Kodak, Rochester, NY) for 2 to 24 hours at -70°C. Different exposure times were required to obtain a clear signal for each specimen.

SSCP patterns of single-stranded HPV-16 PCR products from the five fragments of each HPV-16 isolate were compared with the reference patterns generated by pHPV-16. HPV-16 isolates could thus be classified into reference-like and non-reference-like variants. HPV-16 isolates were considered as different variants if at least one fragment showed polymorphism. All specimens from a patient were run on the same gel. All representative isolates having SSCP patterns different from pHPV-16 were compared together on one gel, which permitted comparisons of all SSCP patterns found in our population. Half of the samples were analysed twice by SSCP, including all samples from participants with isolates exhibiting a change of SSCP pattern over time. Two observers independently interpreted the gels and both reached the same interpretation of SSCP patterns, without knowledge of DNA sequence analysis.

### Molecular variant analysis by PCR-sequencing

Amplifications were performed as described above by replacing [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP by 0.25 mM dATP in the master mix. HPV-16 LCR fragments were generated with the Expand High Fidelity PCR system (Boehringer Mannheim, Laval, Qué.), a mixture of *Taq* DNA polymerase and *Bwo* DNA polymerase that has a low rate of misincorporation. When the intensity of the bands generated was too weak, *AmpliTaq Gold* DNA polymerase was used. PCR-amplified HPV-16 DNA fragments were purified with the QIAquick gel extraction kit protocol as recommended by the manufacturer (Quiagen Inc., Mississauga, Ont).

Direct sequencing of PCR products was done initially. Because we often obtained ambiguities at several base positions, we decided to clone PCR products before sequencing for the remaining samples using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Calrsbad, CA) with the pCR2.1 TOPO vector and competent *E. coli* TOP10 strain. Clones containing the AB fragment were identified by digestion with restriction enzymes *Hind*III and *Xho*I. Plasmid DNA from transformed clones was then further purified before sequencing using the QIAprep Spin Miniprep system (Quiagen Inc.) according to the manufacturer instructions.

Five hundred ng of purified template was sequenced on a Long Reader 4200 DNA sequencing system (Li-Cor, Lincoln, NB). The sequencing M13 primer was labelled with IR800. The data was processed with the software Baseimage IR. PCR-generated fragments were sequenced from both directions. Due to possible misincorporation of bases by the *Taq* DNA polymerase and to the possibility of multiple variants in one sample, isolates from the same woman for which clones demonstrated a difference in nucleotide sequence were sequenced at least twice to insure that mutations were not introduced by PCR. Isolates were sequenced up to five times if differences persisted.

## Data analysis

HPV-16 LCR DNA sequences were compared using the BLAST sequence analysis software from the Genetic Computer Group (2), to known HPV sequences contained in the Genbank database (Los Alamos National Laboratories). HPV-16 LCR DNA sequences were compared with the sequence from the HPV-16 prototype strain reported in the HPV compendium from Los Alamos National Laboratory (33). Isolates with a DNA sequence different from the prototype strain were classified as non-prototype-like variants. Sequences from non-prototype-like variants were aligned and compared two by two with the BLAST sequence analysis program to further classify HPV-16 variants. Sequencing analysis was completed without knowledge of SSCP results. For statistical analysis, we used the Student-t test for continuous variables and the z statistic test for proportions. Double-sided P values of  $< 0.05$  were considered significant. The frequencies of clinical and immunological characteristics were obtained with SAS software.

## RESULTS

### Consecutive detection of HPV-16 in clinical specimens

From September 1993 to September 1997, 807 women were recruited in the Canadian Women's HIV study. Four hundred and eighty four participants were HIV-seropositive while 323 were HIV-seronegative. Fifty (6.2%) of the 807 women had at least two consecutive specimens containing HPV-16 DNA and were selected for this current study. Thirty-six (7.4%) of the 484 HIV-seropositive women and 14 (4.3%) of the 323 HIV-seronegative had persistent HPV-16 infection, respectively ( $P = 0.100$ ). The evaluation of determinants of persistence of HPV infection is part of a global study that will be the subject of future publications. We will now consider for this work only the 50 women with at least 2 consecutive specimens containing HPV-16 DNA, and thus considered to have persistent infection on the basis of HPV typing.

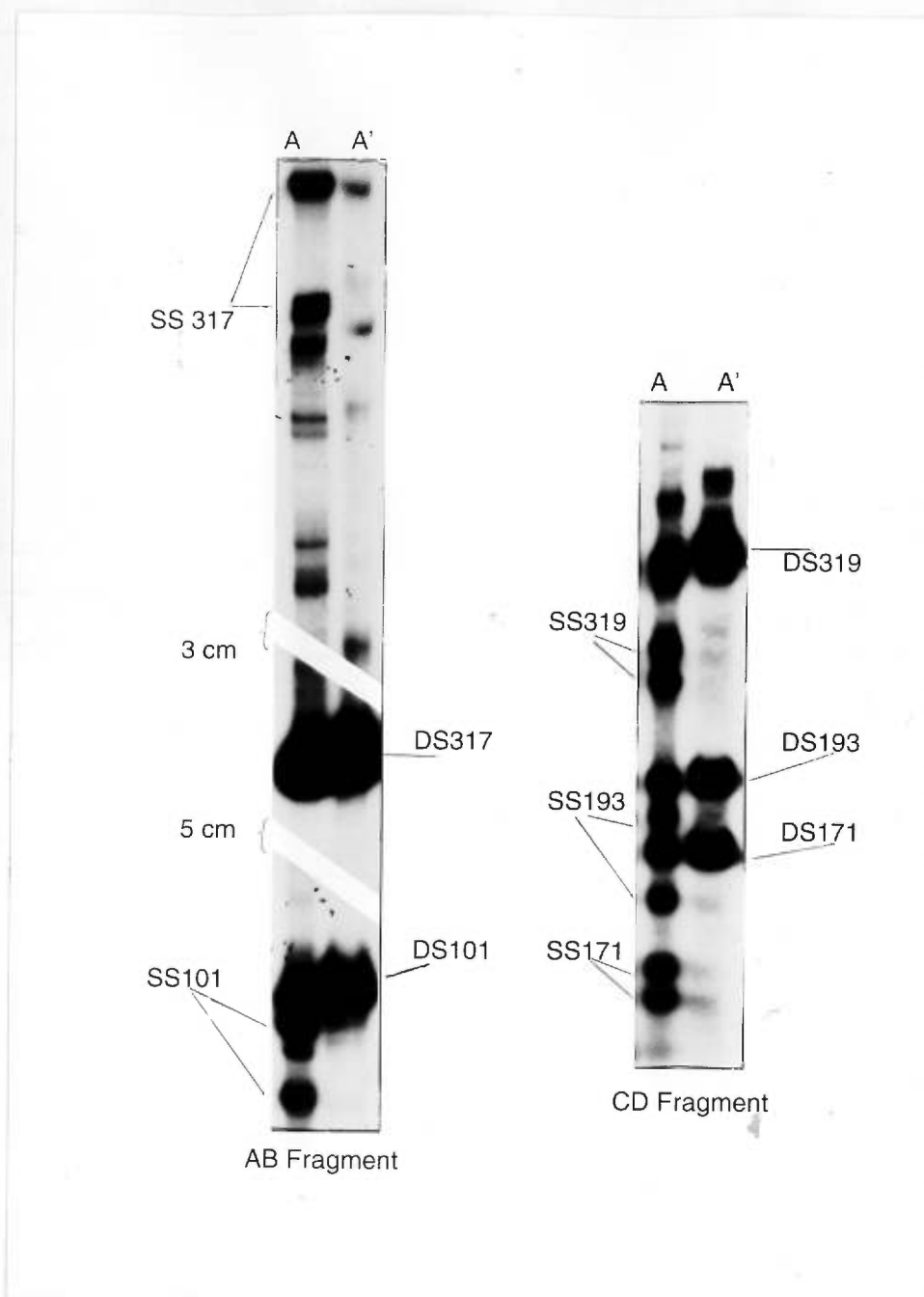
The average age of 36 HIV-seropositive women and 14 HIV-seronegative women was  $33.8 \pm 9.9$  years (median, 32 years; age range, 20 to 65 years) and  $23.9 \pm 4.6$  years (median, 22.5 years; age range, 19 to 35 years), respectively. In the group of HIV-seropositive women, 14 (38.9%) woman had less than three lifetime male sexual partners and 22 (61.1%) had at least 3 lifetime male sexual partners. In the group of HIV-seronegative women, 2 (14.3%) women had less than three lifetime male sexual partners but were at risk for STD and 12 (85.7%) had at least 3 lifetime male sexual partners. Before the first positive HIV-1 serology test, 14 (38.9%) of 36 HIV-seropositive participants had at least one STD. Since the first positive test for HIV, 9 (25.0%) of 36 HIV-seropositive women had acquired a new STD. Thirty-six percent of HIV-seronegative women had a diagnosis of STD in the past. The mean CD4 cell count for HIV-seropositive women at the time of the first HPV-16-positive test, was  $290 \pm 234 \times 10^6$  cells per L (median of  $252 \times 10^6$  cells per L). Of the latter participants, 11 (32.4%) women had CD4 counts below  $200 \times 10^6$  cells per L, 19 (55.9%) had CD4 counts between 200 and 499, and 4 (11.8%) had CD4 counts above 500.

Each woman had between two to eight consecutive samples that tested positive for HPV-16. Fifty percent of women with persistent infection had 2 samples, 25% had 3 samples, 14% had 4 samples and 11% had between 5 and 8 consecutive samples containing HPV-16 DNA sequences.

### **Analysis of persistent HPV-16 infection with SSCP**

SSCP analysis was used to evaluate the genomic diversity of HPV-16 LCR DNA amplified from 144 clinical specimens. Overall, 141 of the 144 specimens (104 cervicovaginal lavages, 37 tampons) from 50 women with persistent HPV-16 infection gave a positive result for HPV-16 by SSCP analysis when primer pairs A-B or C-D were used. We obtained adequate signals for SSCP analysis for 141 (97.9%) of 144 samples using primers A and B, and for 118 (81.9%) of 144 samples using primers C and D. Examples of SSCP patterns are shown on figure 1. The 3 samples for which an interpretable SSCP pattern could not be obtained with the AB fragment did not generate a SSCP pattern with the CD fragment and generated weak signals for HPV-16 DNA by the L1 consensus PCR assay (data not shown).

With primer pair A-B, 17 SSCP patterns were found in 141 isolates. With primer pair C-D, 5 SSCP patterns were found in 118 isolates. Overall, 17 different variants were identified by SSCP analysis considering results obtained with both primer pairs. The number of isolates generating reference-like or non-reference-like SSCP patterns with each primer pair is provided in table 1. Of the 66 samples containing non-reference-like HPV-16 variants with SSCP of the AB fragment, SSCP of the CD fragment showed a pattern suggestive of reference-like variant in 35 samples. Overall, SSCP testing of the AB fragment identified 9 non-reference variants that would have been misclassified as reference variant with the SSCP analysis of the CD fragment. Of the 50 women with persistent HPV-16 infection, 27 (54%) women were infected with the reference-like HPV-16 variant. Five variants infected more than 84% of women with persistent HPV-16 infection (data not shown).



*Figure 1: SSCP patterns of fragment AB (A) and CD (B). Samples were amplified with primers located in the LCR and subjected to non-denaturing gel electrophoresis after digestion with restriction enzymes, as described in the methods section. Wells A contain single strand (SS) DNA and wells A' contain double strand (DS) DNA.*

*TABLE 1- Genetic diversity of 144 HPV-16 isolates from 50 women by SSCP analysis of PCR-amplified LCR.*

No. of isolates with SSCP results corresponding to reference or non-reference patterns

|                               | Reference AB  | Non-reference AB <sup>a</sup> | NA AB        | Total      |
|-------------------------------|---------------|-------------------------------|--------------|------------|
| Reference CD                  | 62 (1)        | 35 (10)                       | 0 (0)        | <b>97</b>  |
| Non-reference CD <sup>b</sup> | 0 (0)         | 21 (6)                        | 0 (0)        | <b>21</b>  |
| NA CD                         | 13            | 10                            | 3            | <b>26</b>  |
| <b>Total</b>                  | <b>75 (1)</b> | <b>66 (16)</b>                | <b>3 (0)</b> | <b>144</b> |

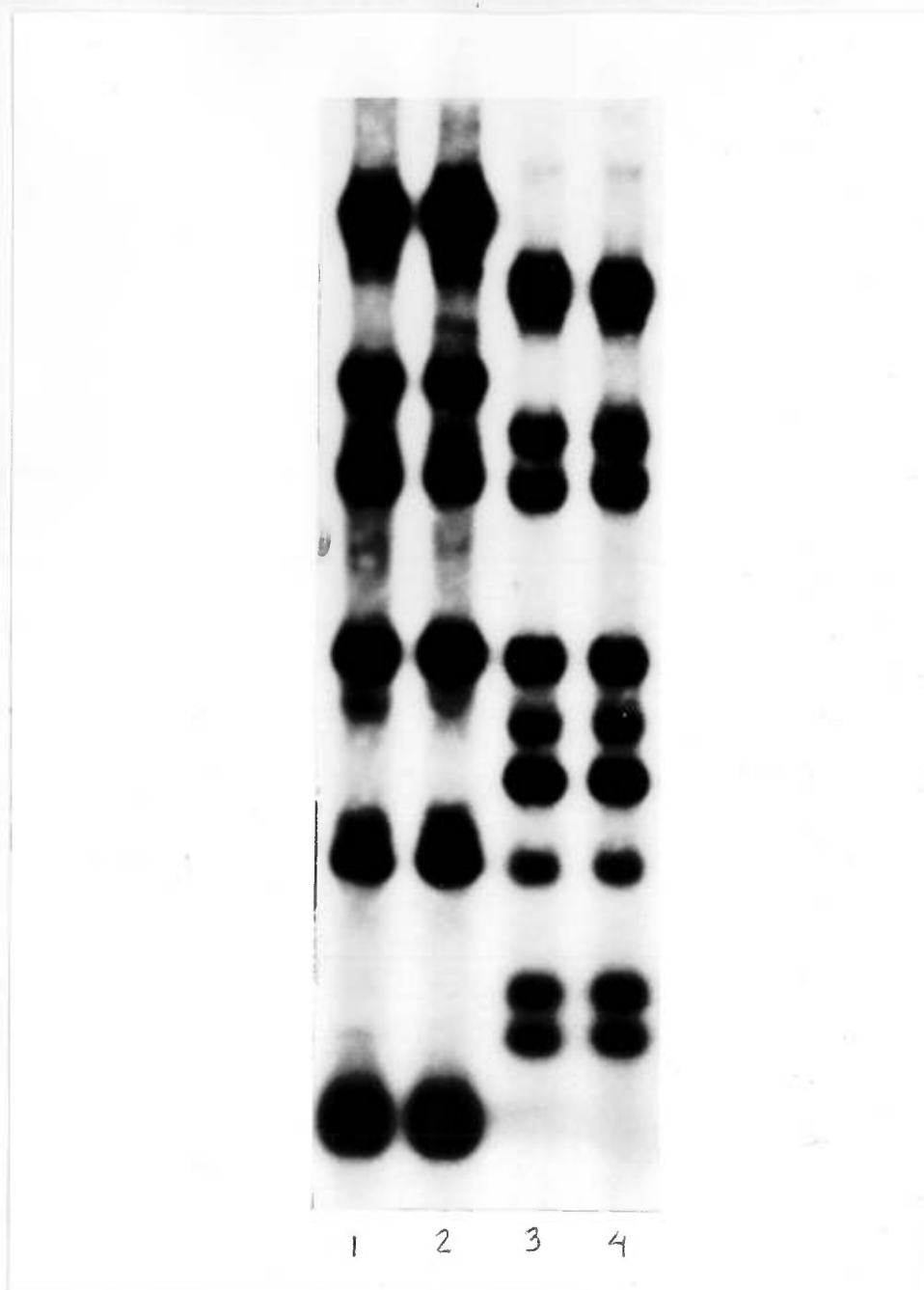
The number of isolates demonstrating reference-like or non-reference-like SSCP patterns are described in the table according to the fragment used for SSCP. The reference-like pattern was that generated by pHPV-16. The SSCP analysis of PCR-amplified fragment AB and fragment CD was accomplished as described in the methods section. Numbers in parenthesis represent the number of different patterns identified by SSCP analysis of the AB fragment when both fragments could be analysed. a: 16 non-reference-like patterns were generated with the AB fragment. b: 4 non-reference-like patterns were generated with the CD fragment. NA is for not amplified.

TABLE 2- Virological characteristics of consecutive isolates from five women who exhibited changes in HPV-16 variants overtime.

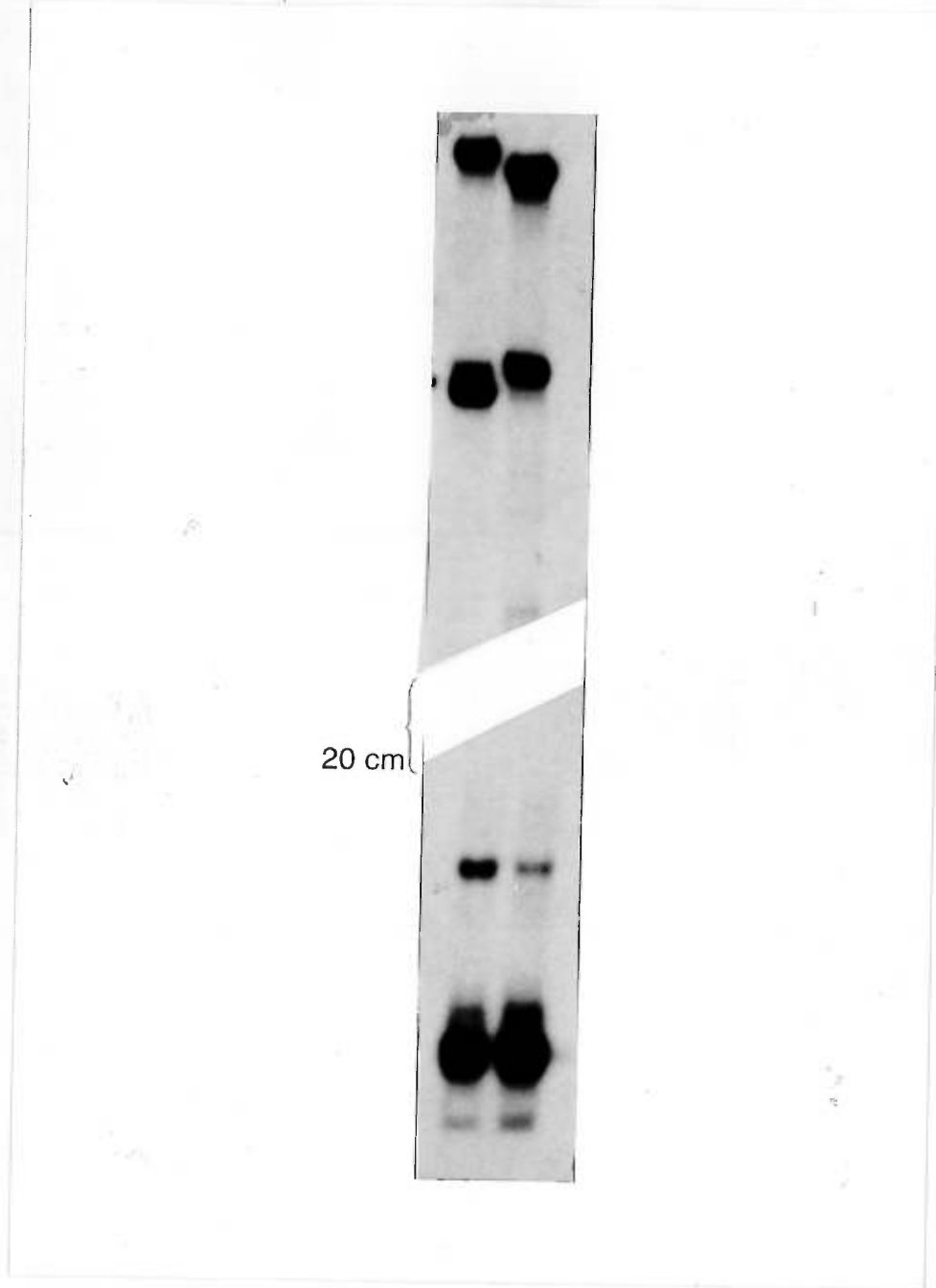
| Participant | sample | HIV status | Sampling time | SSCP type | Sequence type |
|-------------|--------|------------|---------------|-----------|---------------|
| WM 638      | 1-     | seroneg.   | 7/95          | 14        | XXII          |
|             | 2-     | seroneg.   | 4/96          | 1         | II            |
|             | 3-     | seroneg.   | 8/96          | 1         | II            |
|             | 4-     | seroneg.   | 3/97          | 1         | II            |
| WQ 505      | 1-     | seroneg.   | 5/94          | 1         | II            |
|             | 2-     | seroneg.   | 10/94         | 14        | XXII          |
|             | 3-     | seroneg.   | 4/95          | 1         | II            |
| WT 034      | 1-     | seropos.   | 9/93          | 16        | XX            |
|             | 2-     | seropos.   | 8/94          | 1         | II            |
| WT 085      | 1-     | seropos.   | 5/94          | 12        | V             |
|             | 2-     | seropos.   | 10/94         | 1         | II            |
| WM112       | 1-     | seropos.   | 10/94         | 1         | V             |
|             | 2-     | seropos.   | 1/96          | 1         | II            |

Seroneg. is for HIV-seronegative and seropos. is for HIV-seropositive. The SSCP type I corresponds to the pHPV-16 HPV pattern. SSCP types and sequence types are described in more details in table 3.





*Figure 2: SSCP patterns of the AB fragment generated from two consecutive specimens collected from two different women. Wells 1 and 2 contain specimens from one woman, and wells 3 and 4 contain specimens from another woman. Patterns for each woman were identical, suggesting persistent infection by the same variant in both cases.*



*Figure 3: SSCP patterns of the AB fragment generated from two consecutive specimens collected the from same woman. Patterns were different suggesting consecutive transient infections.*

The SSCP patterns of the HPV-16 LCR obtained from consecutive specimens were identical for 46 (92%) of 50 women, suggesting persistent HPV-16 infection by the same variant (figure 2). In samples from five of these women, the presence in one sample of a weaker signal suggested infection with a minor variant. Three of these weak changes were visible on SSCP of the AB fragment and 2 on the SSCP analysis of the CD fragment. No change of signal, either weak or complete, was visible on SSCP of both fragments. Four women had a complete modification of SSCP pattern of the digested AB fragment (Figure 3 and table 2). One of these four women is still considered as having persistent infection since the same new variant was detected in the three next consecutive specimens (table 2). All changes were confirmed by at least a second run of PCR-SSCP for each sample.

### **Comparison of SSCP and DNA sequencing for analysis of HPV-16 variants**

Sequencing the AB fragment (PCR-sequencing) generated by amplification of HPV-16 LCR served as the gold standard test to evaluate the ability of PCR-SSCP to identify HPV-16 variants. Overall, PCR-sequencing identified 22 different variants in comparison with only 17 variants by SSCP analysis (table 3). SSCP analysis of AB fragment could thus not discriminate between 7 variants defined by DNA sequence. Moreover, two different variants (10 and 15) identified by SSCP were in fact the same variant as assessed by PCR sequencing of the AB fragment. Although initially these two SSCP variants were considered to have different SSCP patterns of the AB and CD fragments, they were considered different on the basis of SSCP of the CD fragment only after rereading the filters after sequence analysis. Ten of the 28 women for whom SSCP analysis identified the presence of a reference-like variant, were infected by non-prototypic variants as determined by DNA sequencing. Mutations defining each variant are displayed in table 3 and compared with results obtained with SSCP analysis. The nucleotide positions that were frequently involved in mutations identifying variants included nucleotide position 7192 (substitution of a G to a T) found in 16 variants, nucleotide positions 7232 (substitution of an A to a C) and 7488 (substitution of a G to an A) found in 4 variants each (table 3).



Sequence type

Mutations at position

|       | 7172 | 7173 | 7177 | 7184 | 7192 | 7204 | 7231 | 7232 | 7281 | 7292 | 7309 | 7315 | 7338 | 7376 | 7380 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| XIV   | -    | -    | -    | -    | T    | G    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| XV    | -    | -    | -    | -    | T    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| XVI   | -    | -    | -    | -    | T    | -    | G    | -    | -    | G    | -    | -    | -    | -    | -    |
| XVII  | -    | -    | -    | -    | T    | -    | -    | C    | G    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| XVIII | -    | -    | -    | -    | T    | -    | -    | C    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| XIX   | -    | -    | -    | G    | T    | -    | -    | C    | -    | -    | -    | -    | T    | -    | -    |
| XX    | -    | -    | -    | -    | T    | -    | -    | C    | -    | -    | -    | -    | T    | -    | -    |
| XXI   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | C    | -    | -    | -    |
| XXII  | -    | -    | -    | -    | T    | -    | -    | -    | -    | -    | A    | -    | -    | -    | -    |

| Sequence type | Mutations at position |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |  |                     | SSCP type <sup>c</sup> |
|---------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|---------------------|------------------------|
|               | 7386                  | 7393 | 7394 | 7425 | 7428 | 7434 | 7449 | 7457 | 7469 | 7484 | 7488 | 7495 |  |                     |                        |
| Prototype     | G                     | C    | C    | A    | G    | G    | T    | A    | G    | A    | G    | T    |  |                     |                        |
| I             | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 1                   |                        |
| II            | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 1                   |                        |
| III           | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 10, 15 <sup>d</sup> |                        |
| IV            | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 12                  |                        |
| V             | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 16                  |                        |
| VI            | -                     | -    | -    | A    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 2                   |                        |
| VII           | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 5                   |                        |
| VIII          | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | C    |  | 6                   |                        |
| IX            | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | C    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 1                   |                        |
| X             | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 1                   |                        |
| XI            | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 9                   |                        |
| XII           | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 1                   |                        |
| XIII          | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  | 1                   |                        |
| XIV           | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | C    |  | 11                  |                        |

| Sequence type | Mutations at position |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | SSCP type |
|---------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|
|               | 7386                  | 7393 | 7394 | 7425 | 7428 | 7434 | 7449 | 7457 | 7469 | 7484 | 7488 | 7495 |           |
| XV            | -                     | -    | -    | G    | -    | -    | C    | -    | -    | -    | -    | -    | 1         |
| XVI           | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | A    | -    | -    | 4         |
| XVII          | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 7         |
| XVIII         | C                     | -    | -    | -    | -    | A    | -    | T    | -    | C    | A    | -    | 8         |
| XIX           | -                     | T    | T    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | C    | A    | -    | 3         |
| XX            | -                     | T    | T    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | C    | A    | -    | 13        |
| XXI           | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | A    | -    | -    | -    | 17        |
| XXII          | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 14        |

Figure Legend :

- a The sequence type was determined arbitrarily from the combinations of mutations identified in the amplified AB fragment.
- b The reference sequence was that of the prototype strain reported in the HPV compendium as described in the method section.
- c The SSCP type was determined according to the patterns of bands obtained with SSCP analysis of AB and CD fragment.
- d two SSCP types were described for sequence type III on the basis of differences in migration of the CD fragment between these two variants while only the AB fragment was sequenced, illustrating the advantage of testing all the LCR instead of only one section.

However, classification of participants into reinfection versus persistent infection was nearly identical using SSCP or sequencing. The difference in SSCP patterns in consecutive HPV-16 isolates from the same woman occurring in four participants, were all confirmed by DNA sequencing. The modifications of SSCP patterns corresponded to base substitution(s) (table 2). Only one participant (WM112) was consecutively infected with two variants identified with PCR-sequencing. PCR-SSCP pattern obtained for these isolates suggested the presence of a minor variant in the second sample but failed to demonstrate the replacement of the first variant by a new one. HPV-16 isolates from these samples were amplified and sequenced five times but only one variant different from the variant identified in the first sample was demonstrated.



## DISCUSSION

Our study is the largest published study to date refining the definition of HPV persistence in HIV-infected women using DNA sequencing and it demonstrates the usefulness of molecular variant analysis to identify women with truly persistent HPV-16 infection. It is also the largest evaluation comparing in parallel SSCP to sequencing for HPV-16 variant analysis in women at risk for STD. Variant analysis has been used to investigate the epidemiology of HPV-16, the phylogenetic analysis of evolution of HPV-16, and determinants of cervical disease progression (6,8,18,27-29,43,49,51,52). HPV-16 non-prototype variants confer a higher risk than the prototype variant for the development of high-grade cervical lesions (50). Variant analysis has also been applied to HPV types other than 16 (23,34,38,39).

Targeting hypervariable regions of the HPV genome increases the probability of finding molecular variants (49). SSCP analysis of HPV-16 LCR was first described by Xi et al. (49). Using their primers, only 2.1% of HPV-16-positive samples could not be amplified. In our hands, the primer pair C-D did not perform as well as primer pair A-B in terms of the number of variants identified (17/141 versus 5/118,  $P = 0.042$ ) and the number of isolates that generated visible bands (141/144 (97.9%) versus 118/144 (87.5%),  $P = 0.002$ ). Of the 9 women showing a change of SSCP pattern overtime or the addition of weak signals suggestive of a minor variant, seven changes were revealed with the AB fragment and two with the CD fragment only. Another group has also confirmed the superiority of primer pair A-B for SSCP and sequence analysis (43).

The most frequent variant identified by SSCP in our group of persistently infected women was the reference-like strain. Variant analysis is limited by the extent to which HPV variants tend to occur in tight geographical clusters. If a variant occurs frequently in a population, then it becomes an insensitive marker of persistence because of the high probability of reinfection by the same variant. Fortunately, 16 different non-reference-like variants identified by PCR-sequencing accounted for nearly 50% of persistent HPV-16 infections in our population. The ethnic diversity of women

recruited, the fact that participants in the Canadian Women's HIV study were sexually active and continuously exposed to STD agents, as well as the national basis for recruitment, reduced the possibility of finding a limited number of variants. This variety of variants facilitates the prospective evaluation of persistent HPV-16 infection.

PCR-sequencing permitted us to identify 22 different variants from 141 HPV-16 isolates detected in 50 sexually active women. Using a PCR-sequencing approach targeting the LCR region of the HPV-16 genome, Chan et al. identified 38 variants from 118 HPV-16 isolates (8). Another study identified 12 variants from 32 HPV-16 isolates (45). A greater number of HPV-16 variants can be found in populations at risk for STD such as ours (43).

HPV-16 genomic variants can be classified by several methods that analyse PCR products from regions of the viral genome demonstrating variability. Several groups have studied HPV-16 variants in various populations (8,18,29,48-50). Beside our work, only one study compared in parallel sequencing to SSCP analysis of HPV-16 PCR products (43). Although others found that PCR-sequencing and PCR-SSCP gave comparable results, these comparisons were done only on selected specimens exhibiting different SSCP patterns from a limited number of subjects (36 participants overall) (48-50). Since SSCP and sequencing were conducted only on a subset of samples, these studies were restricted mainly to the evaluation of the specificity of SSCP by demonstrating that changes in SSCP patterns corresponded to base substitution(s). Large-scale studies recruiting women at risk for STD and comparing side by side molecular variant tests were needed.

For the comparison of SSCP with DNA sequencing, we chose the fragment AB since it exhibits more variability than the fragment CD (43) and since nearly all HPV-16 isolates could be amplified with primer pair A-B. SSCP analysis is easy to execute, allows for the simultaneous testing of several samples per gel, and provides results in 24 hours. In our population of women persistently infected with HPV-16, differences in SSCP patterns were reproducible and could be explained by base substitution(s). Two

observers reached the same conclusions independently. Interpretation of SSCP patterns was sometimes difficult however as illustrated by SSCP variants 10 and 15. However, two SSCP types were described for sequence type III since they exhibited differences in migration of the CD fragment while only the AB fragment was sequenced, illustrating the advantage of testing all the LCR instead of only one section. Although our results demonstrate that SSCP is an adequate alternative to sequencing to establish HPV-16 persistent infection, we found, as reported by others, that a more complete analysis of the variable region can be obtained by sequence analysis of PCR amplified products (28,42,43,49). We found seven variants defined by sequencing that did not generate different SSCP patterns in our cohort. In our protocol, a change in variants from consecutive specimens had to be confirmed, eliminating the possibility that a mutation that was introduced by PCR would define a new variant. The replacement of a variant by a new one was missed for one woman by SSCP that suggested the presence of a minor variant rather than a complete change of variants.

In contrast to Xi et al. (48) who found no change of predominant variant in 344 consecutive specimens from 70 patients, we observed a change of predominant variant for 10% of women with persistent HPV-16 infection. Four of these five women would have been misclassified as having persistent infection without molecular variant analysis. Others have found that most women with repeated detection of HPV-16 in serial samples represented true persistent infection caused mainly by one variant (43,48,49). These differences with our study could be explained by several factors. Firstly, 70% of our study population was HIV-seropositive. Secondly, women in our cohort were very much exposed to HPV as demonstrated by the high prevalence rate of HPV DNA detection (21) and the high risk for STD in participating women, as presented elsewhere (21,22). Finally, the initial study that used SSCP to study persistence (48), may have underestimated the frequency of reinfection since two variants accounted for up to 70% of all HPV-16 variants identified. It is of interest that another team in Brazil has identified, as we have, a change of variant in consecutive specimens (18). Participant WQ505 illustrates the complexity of variant analysis. A new variant replaced the first variant but was then replaced in the last sample by the

first variant. Since we did not sequence more than five clones of HPV-16 PCR products per sample, we could not exclude that the first variant was still present in the second specimen at a low copy number. This woman could thus also be persistently infected by one variant combined with a transient infection by a new variant.

Establishment of infection with multiple variants has been demonstrated (8,8,23,27,29,30,48,49). We demonstrate here that even in a high-risk population, superinfection by a new variant is a rare event but does occur. SSCP patterns for five women suggested the presence of more than one variant. Since we did not sequence systematically multiple clones for each sample, we can only rely on PCR-SSCP to estimate the prevalence (10%) of coinfection with more than one variant.

Our experiments confirmed that PCR-SSCP is an alternative to identify women persistently infected by HPV-16. However, SSCP has a lower resolution to identify molecular variants than sequencing. The additional information on the nature of persistent infection provided by molecular variant analysis was useful for 10% of women who would have been misclassified as persistently infected by HPV-16. Molecular variant analysis may become more interesting if specific variants are associated with increased risk of disease progression or persistence of HPV infection.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Mme Diane Gaudreault and Mme Diane Bronsard for processing genital samples. The Medical Research Council of Canada and the National Health Research and Development Programme, Health Canada supports The Canadian Women's HIV Study. F.C. and M.R. are clinical research scholars supported by the FRSQ.

**REFERENCES**

1. SEER Cancer Statistics Review: 1973-1992. 1995. C. Kosari, Ries LEG, Miller BA, Hanky BF, A. Harras, and B. Edwards (eds.). National Cancer Institute, Bethesda.
2. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
3. Baldauf, J.J., M. Dreyfus, J. Ritter, P. Meyer, E. Philippe, and G. Obert. 1996. A PCR study on the coexistence of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNAs in cervical neoplasia. *Int J Gyn Cancer* **6**:389-395.
4. Bauer, H.M., C.E. Greer, and M.M. Manos. 1992. Determination of genital human papillomavirus infection by consensus polymerase chain reaction amplification, p. 131-152. In C.S. Herrington and J.O.D. McGee (eds.), *Diagnostic molecular pathology, a practical approach*. IRL press, Oxford.
5. Bauer, H.M., Y. Ting, C.E. Greer, J.C. Chambers, C.J. Tashiro, J. Chimera, A. Reingold, and M.M. Manos. 1991. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* **265**:472-477.
6. Bernard, H.-U., S.-Y. Chan, M.M. Manos, C.-K. Ong, L.L. Villa, H. Delius, C.L. Peyton, H.M. Bauer, and C.M. Wheeler. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Inf Dis* **170**:1077-1085.

7. **Bosch, F.X., M.M. Manos, N. Muñoz, M. Sherman, A.M. Jansen, J. Peto, M.H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, K.V. Shah, and IBSCC Study Group.** 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* **87**:796-802.
8. **Chan, S.-Y., L. Ho, C.-K. Ong, V. Chow, B. Drescher, M. Durst, J. Ter Meulen, L. Villa, J. Luande, H.N. Mgaya, and H.-U. Bernard.** 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* **66**:2057-2066.
9. **Cole, H.M.** 1993. Diagnostic and therapeutic technology assessment: human papillomavirus DNA testing in the management of cervical neoplasia. *JAMA* **270**:2975-2981.
10. **Coutlée, F., M.H. Mayrand, D. Provencher, and E. Franco.** 1997. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clinical & Diagnostic Virology* **8**:123-141.
11. **Coutlée, F., L. Bobo, A. Hawwari, G. Dalabetta, N.E. Hook, K.V. Shah, and R.P. Viscidi.** 1992. Detection of HPV-16 in cell lines and cervical lavages specimens by a polymerase chain reaction-enzyme immunoassay assay. *J Med Virol* **37**:22-29.
12. **Coutlée, F., C. Hankins, N. Lapointe, and The Canadian Women's HIV study Grou.** 1997. Comparison between vaginal tampon and cervicovaginal lavage specimens collection for detection of human papillomavirus DNA by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* **51**:42-47.
14. **Coutlée, F., A.M. Trottier, G. Ghattas, R. Leduc, E. Toma, G. Sanche, I. Rodrigues, B. Turmel, G. Allaire, and P. Ghadirian.** 1997. Risk factors for oral human papillomavirus in adults infected and not infected with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis* **24**:23-31.

15. **DiPaolo, J.A., C.D. Woodworth, F. Coutlée, D.B. Zimonic, J. Bryant, and A. Kessous.** 1998. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 BGLII N subfragment XHO2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. *Int J Cancer* **76**:865-871.
16. **Evander, M., K. Edlund, A. Gustafsson, M. Jonsson, E. Karlsson, E. Rylander, and G. Wadell.** 1995. Human papillomavirus infection is transient in young women: population-based cohort study. *J Inf Dis* **171**:1026-1030.
17. **Fairley, F.K., S. Chen, S.N. Tabrazi, M.A. Quinn, J.J. McNeil, and S. Garland.** 1992. Tampons: a novel patient-administered method for the assessment of genital human papillomavirus infection. *J Inf Dis* **165**:1103-1106.
18. **Franco, E.L., L.L. Villa, P. Rahal, and A. Ruiz.** 1994. Molecular variants analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* **86**:1558-1559.
19. **Guibinga, G.H., F. Coutlée, A.K. Kessous, C. Hankins, N. Lapointe, and The Canadian Women's HIV study Group.** 1995. Role of herpes simplex type 2 virus in genital cancers: review of the evidence. *Arch STD/HIV Res* **9**:163-179.
20. **Hall, S., A.T. Lorincz, F. Shah, M.E. Sherman, F. Abbas, G. Paull, R.J. Kurman, and K. Shah.** 1996. Human papillomavirus DNA detection in cervical specimens by hybrid capture: correlation with cytologic and histologic diagnoses of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Gyn Oncol* **62**:353-359.

21. **Hankins, C., F. Coutlée, N. Lapointe, P. Simard, T. Tran, J. Samson, L. Hum, and The Canadian Women's HIV study Group.** 1999. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *Can Med Ass J* **160**:185-191.
22. **Hankins, C., N. Lapointe, S. Walmsley, and The Canadian Women's HIV study Group.** 1998. Participation in clinical trials among women living with HIV in Canada. *Can Med Ass J* **159**:1359-1365.
23. **Heinzel, P.A., S.Y. Chan, L. Ho, M. O'Connor, P. Balaram, M.S. Campo, K. Fujinaga, N. Kiviat, J. Kuypers, and H. Pfister.** 1995. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* **33**:1746-1754.
24. **Hildesheim, A., M.H. Schiffman, P.E. Gravitt, A.G. Glass, C.E. Greer, T. Zhang, D.R. Scott, B.B. Rush, P. Lawler, M.E. Sherman, R.J. Kurman, and M.M. Manos.** 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Inf Dis* **169**:235-240.
25. **Ho, G.Y.F., R. Bierman, L. Beardsley, C.J. Chang, and R.D. Burk.** 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New Engl J Med* **338**:423-428.
26. **Ho, G.Y.F., R.D. Burk, S. Klein, A.S. Kadish, C.J. Chang, P. Palan, J. Basu, R. Tachezy, R. Lewis, and S. Romney.** 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* **87**:1365-1371.
27. **Ho, L., S.-Y. Chan, V. Chow, T. Chong, S.-K. Tay, L.L. Villa, and H.-U. Bernard.** 1991. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* **29**:1765-1772.



28. **Ho, L., S.Y. Chan, R.D. Burk, B.C. Das, K. Fujinaga, J.P. Icenogle, T. Kahn, N. Kiviat, W. Lancaster, and P. Mavromara-Nazos.** 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* **67**:6413-6423.
29. **Ho, L., S.-K. Tay, S.-Y. Chan, and H.-U. Bernard.** 1993. Sequence variants of human papillomavirus type 16 from couples suggest sexual transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasia. *J Inf Dis* **168**:803-809.
30. **Icenogle, J.P., M. Laga, D. Miller, A.T. Manoka, R.A. Tucker, and W.C. Reeves.** 1993. Genotypes and sequence variants of human papillomavirus DNAs from human immunodeficiency virus type 1-infected women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Inf Dis* **166**:1210-1216.
31. **Koutsky, L.A., K.K. Holmes, C.W. Critchlow, C.E. Stevens, J. Paavonen, T.A. DeRouen, D.A. Galloway, D. Vernon, and N.B. Kiviat.** 1992. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *New Engl J Med* **327**:1272-1278.
32. **Londesborough, P., L. Ho, G. Terry, J. Cuzick, C. Wheeler, and A. Singer.** 1996. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* **69**:364-368.
33. **Myers, G., B. H.-U. Bernard, H. Delius, C.C. Baker, J. Icenogle, A.L. Halpern, and C. Wheeler.** 1995. Human papillomavirus. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, N.M.

34. **Ong, C.K., S.Y. Chan, M.S. Campo, K. Fujinaga, P. Mavromara-Nazos, V. Labropoulou, H. Pfister, S.K. Tay, J. Ter Meulen, and L.L. Villa.** 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* **67**:6424-6431.
35. **Remmink, A.J., J.M.M. Walboomers, T.J.M. Helmerhorst, F.J. Voorhorst, L. Rozendaal, E.K.J. Risse, C.J.L.M. Meijer, and P. Kenemans.** 1995. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* **61**:306-311.
36. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor press, Cold Spring harbor.
37. **Schiffman, M.H.** 1995. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **87**:1345-1347.
38. **Smits, H.L., K.F. Traanberg, M.R. Krul, P.R. Prussia, C.L. Kuiken, M.F. Jebbink, J.A. Kleyne, R.H. van den Berg, B. Capone, and A. de Bruyn.** 1994. Identification of a unique group of human papillomavirus type 16 sequence variants among clinical isolates from Barbados. *J Gen Virol* **75**:2457-2462.
39. **Stewart, A.C., A.M. Eriksson, M.M. Manos, N. Munoz, F.X. Bosch, J. Peto, and C.M. Wheeler.** 1996. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* **70**:3127-3136.
40. **Storey, A., M. Thomas, A. Kalita, C. Harwood, D. Gardiol, F. Mantovani, J. Breuer, I.M. Leigh, G. Matlashewski, and L. Banks.** 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer [see comments]. *Nature* **393**:229-234.

41. **Swan, D.C., R.A. Tucker, G. Tortolero-Luna, M.F. Mitchell, L. Wideroff, Unger, ER, R.A. Nisenbaum, W.C. Reeves, and J.P. Icenogle.** 1999. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* **37**:1030-1034.
42. **van Belkum, A.** 1995. Low-stringency single specific primer PCR, DNA sequencing and single-strand conformation polymorphism of PCR products for identification of genetic variants of human papillomavirus type 16. *J Virol Methods* **55**:435-443.
43. **van Belkum, A., L. Juffermans, L. Schrauwen, G. van Doornum, M. Burger, and W. Quint.** 1995. Genotyping human papillomavirus type 16 isolates from persistently infected promiscuous individuals and cervical neoplasia patients. *J Clin Microbiol* **33**:2957-2962.
44. **Vermund, S.H., M.H. Schiffman, G.L. Goldberg, D.B. Ritter, A. Weltman, and R.D. Burk.** 1989. Molecular diagnosis of genital human papillomavirus infection comparison of two methods used to collect exfoliated cervical cells. *Am J Obst Gyn* **160**:304-308.
45. **Vernon, S.D., W.C. Reeves, K.A. Clancy, M. Laga, M. St.Louis, H.E. Gary, R.W. Ryder, A.T. Manoka, and J.P. Icenogle.** 1994. A longitudinal study of human papillomavirus DNA detection in human immunodeficiency virus type 1-seropositive and -seronegative women. *J Inf Dis* **169**:1108-1112.
46. **Villa, L.L.** 1997. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Advances in Cancer Research* **71**:321-41:321-341.
47. **Wheeler, C.M., C.E. Greer, T.M. Becker, W.C. Hunt, S.M. Anderson, and M.M. Manos.** 1996. Short-term fluctuations in the detection of cervical human papillomavirus DNA. *Obs Gyn* **88**:261-268.

48. **Xi, L.F., G.W. Demers, N.B. Kiviat, J. Kuypers, A.M. Beckmann, and D.A. Galloway.** 1995. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistence infection. *J Inf Dis* **172**:747-755.
49. **Xi, L.F., W.G. Demers, N.B. Kiviat, J. Kuypers, A.-M. Beckmann, and D.A. Galloway.** 1993. Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand polymorphism analysis. *The journal of infectious diseases* **168**:610-617.
50. **Xi, L.F., L.A. Koutsky, D.A. Galloway, J. Kuypers, J.P. Hughes, C.M. Wheeler, K.K. Holmes, and N.B. Kiviat.** 1997. Genomic variation of human papillomavirus types 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**:796-802.
51. **Yamada, T., M.M. Manos, J. Peto, C.E. Greer, N. Munoz, F.X. Bosch, and C.M. Wheeler.** 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers - a worldwide perspective. *J Virol* **71**:2463-2472.
52. **Yamada, T., C.M. Wheeler, A.L. Halpern, A.C. Stewart, A. Hildesheim, and S.A. Jenison.** 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* **69**:7743-7753.

## DISCUSSION

Comme nous l'avons élaboré plus en détail dans l'introduction de ce mémoire, la persistance de l'infection par un VPH oncogène semble être un facteur primordial dans la progression de la maladie associée à ces VPH. La notion d'infection persistante est toutefois mal définie, ce qui peut gêner la comparaison entre les études ou encore la généralisation des résultats. Nous avons élaboré un projet de recherche visant à mieux définir la persistance de l'infection génitale par le VPH-16. Cette étude inclut un nombre important de patientes et elle étudie une cohorte de femmes VIH-séropositives. Chez ces femmes, l'histoire naturelle de l'infection par le VPH, et plus particulièrement de l'infection persistante, prend un intérêt clinique considérable, à cause de l'association entre l'immunodéficience induite par le VIH et l'augmentation du risque de maladies associées aux VPH (Vermund et coll., 1991; Laga et coll., 1992; Wright et coll., 1994; Sun et coll., 1997).

Nous avons posé comme hypothèse que la prévalence élevée de l'infection par le VPH-16 nous amenait à surestimer la fréquence de l'infection persistante. En effet, puisque la détection de d'ADN de VPH-16 fluctue dans le temps tout en étant très fréquente (Syrjanen et coll., 1994; Evander et coll., 1995;), il est possible qu'un certain nombre de détections répétées d'ADN de VPH-16 représentent des réinfections successives plutôt que des infections persistantes.

Nous avons choisi d'utiliser l'analyse moléculaire de variants pour arriver à différencier une réinfection d'une infection persistante. L'étude de variants a été entreprise par de nombreux chercheurs pour répondre à des questions d'ordres différents : l'analyse phylogénétique des VPH, la transmission des VPH, et l'investigation du potentiel oncogène des différents VPH (Ho et coll., 1991 et 1993 a et b; Chan et coll., 1992; Xi et coll., 1993, 1995 et 1997; Bernard et coll., 1994; Van Becklum et coll., 1995). L'utilité de l'analyse de variants réside dans sa capacité à distinguer entre eux différents VPH-16. En effet, les VPH-16 démontrent, d'une part, une variation intra- type bien documentée au niveau de la région non codante, qui

permet de différencier les variants entre eux (Chan et coll., 1992a; Xi et coll., 1993). D'autre part, la stabilité génomique des VPH nous permet d'exclure l'apparition d'une mutation spontanée comme explication d'un changement de séquence observé au niveau de 2 échantillons prélevés à des moments différents chez le même individu (Ho et coll., 1991; Chan et coll., 1992b). Comme plus de 50 variants ont été identifiés, on peut croire qu'un certain nombre de femmes présentant une réinfection plutôt qu'une infection persistante seront réinfectées par un variant différent. En ne considérant comme persistantes que les infections consécutives par un même variant de VPH-16, on précise la notion d'infection persistante.

La manière la plus certaine d'identifier des variants différents de VPH-16 est certainement le séquençage. Toutefois celui-ci est long et coûteux, ce qui limite son utilisation courante, particulièrement lorsqu'il s'agit d'évaluer un grand nombre d'échantillons cliniques, par exemple lors d'études de cohorte. Le SSCP, qui est beaucoup plus simple et rapide, apparaît comme une alternative prometteuse. L'équipe de Xi, qui a décrit la technique de SSCP pour le VPH-16, a obtenu d'excellents résultats pour ce qui est de la capacité du SSCP à identifier correctement des mutations au niveau de la RNC. Cette performance se confirmait aussi bien au niveau de lignées cellulaires infectées par le VPH-16 qu'au niveau d'un nombre limité d'échantillons cliniques (Xi et coll., 1993). Par contre, une autre équipe a voulu utiliser le même protocole pour déterminer si des femmes infectées de façon persistante par le VPH-16 l'étaient par le même variant, et n'a pas obtenu le même succès avec le SSCP (Van Becklum et coll., 1995). En effet, des problèmes, tant au niveau de la capacité à obtenir des signaux que la capacité pour le SSCP à identifier correctement des mutations, ont surgi. Il semblerait qu'il soit trop tôt pour utiliser de routine la méthode de SSCP décrite par Xi et coll. pour identifier des variants de VPH-16 et que la fiabilité du SSCP pour cette utilisation reste à déterminer.

Notre étude avait également pour but d'évaluer la capacité du SSCP à identifier des variants de VPH-16. Il s'agit de l'évaluation la plus importante de la valeur du SSCP pour identifier des variants de VPH-16. Nous avons comparé en parallèle le

SSCP au séquençage dans l'identification de variants de VPH-16 dans des échantillons cliniques prélevés de façon longitudinale dans une cohorte de femmes.

### **Performance du SSCP : caractéristiques générales**

Nous avons donc entrepris de comparer la capacité du SSCP à identifier des mutations au niveau de la RNC, en le comparant au séquençage. Nous avons testé par SSCP 144 échantillons provenant de 50 patientes infectées pendant au moins 6 mois par le VPH-16. Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus par SSCP au séquençage. Nous avons choisi d'amplifier la région non codante, étant donné qu'elle présente plus de variabilité et ainsi maximise les chances de détecter des différences entre variants (Xi et coll., 1993).

Pour l'analyse SSCP, la RNC entière a été amplifiée en deux réactions indépendantes avec deux paires d'amorces différentes (AB et CD). Ceci permet d'obtenir des fragments d'ADN plus courts que ce qu'on obtiendrait par une seule réaction amplifiant toute la RNC. Ces fragments ont ensuite été digérés par des enzymes de restriction de façon à se rapprocher de la longueur optimale pour l'analyse SSCP (protocole de Xi et coll., 1993, figure 4).

Nous avons obtenu un signal SSCP adéquat pour 141 des 144 échantillons (97.9%) avec la première paire d'amorces (AB) et pour 118 des 144 échantillons (87.5%) avec la deuxième paire d'amorces (CD). Tous les échantillons amplifiés avec CD l'avaient déjà été avec AB. Les trois échantillons n'ayant pas donné de signal avec AB n'en ont également pas donné avec CD. Pour ces 3 échantillons, une petite quantité d'ADN au départ (signaux faibles obtenus au PCR-consensus L1) pourrait expliquer l'absence de signal. Des 141 échantillons testés, 75 ont produit un signal identique au prototype, un plasmide contenant de l'ADN de VPH-16 obtenu du Dr Zur Hausen d'Allemagne. Soixante-six ont produit un signal différent de celui du prototype (Tableau I). Vingt-sept des 50 femmes étudiées étaient infectées par un variant semblable au prototype. Cinq variants représentaient 84% des isolats. Les 4 variants

TABLEAU I : Efficacité du SSCP à fournir un signal adéquat avec différentes paires d'amorces et caractéristiques du signal obtenu. NA=Non amplifié.

|                    | Amplifiés (n=144) |      | Échantillons démontrant le même signal que le prototype |       |
|--------------------|-------------------|------|---|-------|
|                    | #                 | %    | #   | %     |
| Paire d'amorces AB | 141               | 97.9 | 75/141  | 53.1% |
| Paire d'amorces CD | 118               | 81.9 | 97/118  | 82.2% |
| Paires AB et CD    | 118               | 81.9 | 75  |       |
| Paires AB ou CD    | 141               | 97.9 | NA  | NA    |

différents du prototype les plus fréquents représentaient près de 30% des échantillons (Tableau II).

Il est difficile d'expliquer la différence d'efficacité des paires d'amorces. Il est possible que les zones d'attaches des amorces de la deuxième paire soient situées dans une région plus variable de la RNC et que l'amplification soit donc moins efficace. Par ailleurs, le protocole de SSCP inclut une digestion enzymatique après l'amplification par PCR (cf figure 4). Or, cette digestion entraîne la formation de deux segments d'ADN pour le fragment AB et de 3 segments pour le fragment CD. Ces trois segments ne sont ni séparés ni purifiés avant d'être chargés sur le gel pour l'analyse SSCP. Ce protocole implique donc la formation de plus de sous-produits avec CD qu'avec AB, avec pour conséquence la « dilution » du radiomarqueur et ainsi une détection possiblement plus difficile.

Globalement, le SSCP s'est avéré être une méthode simple et rapide, surtout si on le compare au séquençage. Cette méthode permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons dans des délais acceptables. Nous avons obtenu un signal à interpréter pour près de 98% des patientes. De 24 à 48 heures étaient suffisantes, en moyenne, pour obtenir des résultats, si on inclut le temps du PCR et les temps d'exposition prolongés parfois nécessaires pour les échantillons ayant des signaux plus faibles.



TABLEAU II : Fréquence et caractéristiques du signal SSCP des différents variants identifiés dans notre population. (\* les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage par rapport au total; p=idem prototype; d= différent prototype; na=non amplifié)

| Variant  | Nombre d'échantillons *<br>Total=141 | Nombre de patientes *<br>Total=50 | Caractéristique du variant avec AB | Caractéristique du variant avec CD |
|----------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1(prot.) | 75 (53.1%)                           | 27 (54%)                          | P                                  | P ou na                            |
| 2        | 4 (2.8%)                             | 1 (2%)                            | Non digéré                         | P ou na                            |
| 3        | 4 (2.8%)                             | 1 (2%)                            | D1                                 | D1                                 |
| 4        | 10 (7.1%)                            | 3 (6%)                            | D2                                 | D1                                 |
| 5        | 12 (8.5%)                            | 4 (8%)                            | D3                                 | P ou na                            |
| 6        | 2 (1.4%)                             | 1 (2%)                            | D4                                 | P                                  |
| 7        | 2 (1.4%)                             | 1 (2%)                            | D5                                 | D3                                 |
| 8        | 2 (1.4%)                             | 1 (2%)                            | D6                                 | D2                                 |
| 9        | 11 (7.8%)                            | 5 (10%)                           | D7                                 | P ou na                            |
| 10       | 3 (2.1%)                             | 1 (2%)                            | D8                                 | P                                  |
| 11       | 2 (1.4%)                             | 1 (2%)                            | D9                                 | P ou na                            |
| 12       | 1 (0.7%)                             | 1 (2%)                            | D10                                | D1                                 |
| 13       | 2 (1.4%)                             | 1 (2%)                            | D11                                | P                                  |
| 14       | 6 (4.2%)                             | 3 (6%)                            | D12                                | na                                 |
| 15       | 2 (1.4%)                             | 1 (2%)                            | D13                                | D4                                 |
| 16       | 1 (0.7%)                             | 1 (2%)                            | D14                                | P                                  |
| 17       | 2 (1.4%)                             | 1 (2%)                            | D15                                | P                                  |

### La valeur du SSCP dans l'identification de variants

Le SSCP a permis d'identifier un total de 17 variants dans notre population. La paire d'amorces AB a, à elle seule, identifié les 17 variants. La paire d'amorce CD n'en

a identifié que 5, tous déjà identifiés par la paire AB (Tableau II). Pour ce qui est de l'identification de variants, la paire CD n'a donc rien ajouté à la paire AB avec nos conditions expérimentales. Le fait d'avoir trois segments à interpréter sur un même gel implique une migration restreinte de façon à ne pas perdre un des segments lors de l'électrophorèse. Il est possible qu'une migration plus longue puisse permettre une meilleure discrimination des différents signaux SSCP du fragment CD. Chaque échantillon devrait alors être analysé sur deux gels successifs, puisque les trois fragments ne seraient plus contenus sur un seul gel.

Pour l'analyse de séquence, seul le fragment AB a été utilisé. Nous avons choisi le fragment AB car presque tous les échantillons pouvaient être amplifiés par cette paire d'amorces et aussi parce que le fragment AB démontre plus de variabilité que le fragment CD (Van Becklum et coll., 1995). L'analyse de séquence a permis d'identifier 22 variants. Deux variants (interprétés comme tels au SSCP) étaient en fait un seul et même variant, tel que démontré par la séquence. Toutefois, une relecture des films de SSCP après avoir obtenu les résultats de séquence, nous a fait conclure que la différence de signal SSCP était visible uniquement sur le segment CD, et seul le segment AB a été séquencé (voir table 3, de l'article). On comprend que même pour l'analyse de séquence, on aura avantage à choisir un plus long fragment pour maximiser les chances d'identifier une mutation. Par ailleurs, il y a sept variants différents (décrits comme tels par la séquence) qui ont produit un signal de SSCP interprété comme étant semblable au prototype (voir table 3, dans l'article).

Le fait que près de 30% des variants n'ont pu être distingués du prototype peut être expliqué de différentes façons. Tout d'abord, par la longueur des fragments. En effet, le maximum de sensibilité du SSCP est obtenue lors de l'analyse de fragments de 150 à 200 paires de bases (Sheffield et coll., 1993; Humphries et coll., 1996). Ensuite, par le protocole de PCR qui comprenait 35 cycles d'amplification pour obtenir un signal satisfaisant. Humphries et coll. ont démontré qu'un maximum de 20 cycles augmentait la performance de SSCP en diminuant la formation de sous-produits de PCR qui donnent des bandes non spécifiques qui obscurcissent le signal SSCP. Une dilution

d'au moins 10 fois semble également augmenter la sensibilité en diminuant la formation de liens entre les brins d'ADN simples. Finalement, certains auteurs ont suggéré que le changement de signal SSCP est plutôt lié à la position de la substitution des bases qu'à la substitution elle-même (Sheffield et coll., 1993). Comme les différences de bases entre les variants de VPH-16 ont tendance à survenir dans quelques régions bien précises du génome (Chan et coll., 1992; Ho et coll., 1993a; Xi et coll., 1993), il est possible que le SSCP soit moins performant à les identifier que si les mutations étaient dispersées uniformément dans le génome. Considérant l'ensemble de ces limitations, nos résultats se rapprochent beaucoup plus de la performance attendue du SSCP que la concordance de 100% avec le séquençage, rapporté par Xi (Xi et coll., 1993).

Lorsque le SSCP est utilisé pour analyser des échantillons cliniques prélevés dans une population, on ignore généralement le nombre total de mutations existantes. Il est donc impossible de s'assurer que toutes les mutations sont identifiées. La multiplication des conditions expérimentales assure une détection maximale, quoique cette augmentation de sensibilité est marginale lorsque l'on dépasse 2 ou 3 trois conditions différentes (Sheffield et coll., 1993). De plus, il est impossible de tester toutes les conditions, et encore moins de tester toutes les combinaisons possibles: différentes températures, gels avec ou sans glycérol, variations dans la concentration de polyacrylamide dans les gels, différentes solutions tampons, etc. Tout en augmentant la sensibilité du SSCP, la multiplication des conditions expérimentales fait perdre au SSCP ses principaux atouts : simplicité et rapidité.

Le séquençage, quant à lui, permet d'identifier un nombre maximal de variants, aussi bien dans un échantillon clinique donné que dans une population. Par contre, la polymérase peut introduire des mutations. Pour la moitié des échantillons, nous avons utilisé une combinaison de polymérases qui augmentent la fidélité de la réaction de synthèse, diminuant le potentiel d'erreur. Les changements de variants dans des spécimens consécutifs ont tous été confirmés par une deuxième réaction de séquence pour s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'artéfacts introduits par le PCR. De plus, le PCR peut, par hasard, amplifier préférentiellement un variant secondaire et donner ainsi

l'impression qu'il s'agit du variant le plus important. Tout changement de variant observé au niveau d'échantillons d'un même patient devra donc être confirmé. Non seulement le séquençage est à prime abord plus laborieux, mais en plus, pour être fiable, il doit être répété à quelques reprises. Dans tous les cas, lorsque le séquençage identifiait un variant qui n'était pas identifié par SSCP, le spécimen était amplifié à nouveau et séquençé pour confirmer qu'il ne s'agissait pas d'un variant secondaire.

### **Valeur du SSCP dans la confirmation de l'infection persistante**

Neuf des 50 femmes étudiées ont présenté un changement quelconque de signal SSCP lorsque leurs échantillons consécutifs ont été comparés. Cinq de ces 9 femmes ont montré un changement subtil, soit l'addition d'une ou plusieurs bandes secondaires, alors que le signal principal restait constant. Trois de ces changements étaient visibles avec AB et 2 avec CD. Ce type de changement a été interprété comme la présence transitoire d'un variant secondaire. Ces 5 patientes sont considérées comme étant infectées de manière persistante par le variant principal. Les 4 autres patientes ayant démontré un changement de signal ont eu un changement complet du signal principal, visible avec AB. Une de celles-ci a par la suite présenté le second signal sur trois échantillons ce qui témoignait d'une infection persistante avec le second variant.

L'identification de 3 patientes démontrant un changement complet de signal SSCP compatible avec une réinfection plutôt qu'une infection persistante a été confirmée par la séquence. De plus, la séquence a permis d'identifier une autre patiente avec un changement de variant prédominant. Cette identification a été confirmée par plusieurs réactions d'amplification et de séquence. L'interprétation du SSCP avait été celle de l'apparition d'un variant secondaire. Il y a donc 4 patientes qui, sur la base du typage seul, auraient faussement été considérées comme porteuses d'une infection persistante. Trois de ces patientes ont été identifiées par le SSCP et le séquençage, et 1 par le séquençage seulement.

### **Signification d'un changement de variant prédominant**

La méthodologie employée ne nous permet pas d'interpréter avec une certitude absolue le changement de signal SSCP observé chez 9 patientes. La présence occasionnelle de variants secondaires explique le plus probablement l'apparition sporadique de bandes supplémentaires de faible intensité. L'infection simultanée par de multiples variants de VPH-16 est maintenant bien documentée (Ho et coll., 1991; Xi et coll., 1993). La détection de plusieurs variants différents peut être variable dans le temps si l'on analyse plusieurs échantillons d'une même patiente, tout comme la détection du variant prédominant (Xi et coll., 1995). Il est difficile de différencier une infection primaire par de multiple variants, dont l'expression peut varier dans le temps, de l'infection successive avec des variants différents (Xi et coll., 1995). Le SSCP nous aidera dans le suivi du variant le plus important, mais ne nous donnera pas d'information fiable sur la présence ou l'absence de variants secondaires. Seul le séquençage de clones multiples nous permettrait d'évaluer la présence et l'importance de variants secondaires. Nous ne pouvions cependant pas, dans notre projet, effectuer des réactions de séquence multiples sur tous les spécimens. En effet, pour détecter un variant constituant au moins 20% de la quantité de VPH-16 contenu dans un échantillon, il aurait fallu séquencer au moins 5 fois chaque échantillon. Nous n'avons malheureusement pas les ressources pour le faire. La signification clinique de l'infection par plusieurs variants n'est pas bien connue et cette limite du SSCP et du séquençage n'a probablement que peu d'impact dans l'étude de la persistance de l'infection par le VPH-16.

Le changement de variant principal, lui, présente plus d'intérêt. Des études ont démontré la persistance d'un seul variant dans le temps chez une même personne (Xi et coll., 1993 et 1995; Van Becklum et coll., 1995). Par exemple, Xi et coll., n'ont pu mettre en évidence un changement de variant prédominant parmi 55 échantillons provenant de 21 patients dans une première étude et dans 344 échantillons provenant de 70 patients dans une autre étude. L'interprétation généralement donnée est la présence d'une réponse immunitaire efficace qui serait commune à tous les variants de VPH-16

et qui empêcherait donc la réinfection par d'autres variants de VPH-16. Contrairement à ces auteurs, nous avons observé un changement de variant principal chez 5 patientes parmi 50 (10%) dans notre cohorte. Ces changements identifiés à l'analyse SSCP, ont été confirmés par l'analyse de séquence. Les analyses ont été répétées au moins deux fois par SSCP et quatre fois par analyse de séquence. Il est donc peu probable que les différences observées soient dues à un artéfact de l'électrophorèse, à une erreur d'interprétation, à une erreur introduite par la polymérase ou par l'amplification au hasard d'un variant secondaire sur un des échantillons. Nous croyons que ce changement représente le plus probablement une réinfection par un variant différent de VPH-16. Ceci avait déjà été décrit ailleurs auparavant chez une patiente (Franco et coll., 1994). Différents facteurs peuvent expliquer cette différence entre notre étude et les études antérieures. Tout d'abord, 70% des femmes dans notre étude étaient VIH-séropositives. Il est possible que la séropositivité pour le VIH et l'immunodéficience induite par le VIH influencent le risque de réinfection par un variant différent. Ensuite, la population à l'étude était particulièrement exposée aux différentes MTS incluant les VPH (Hankins et coll., 1999), ce qui maximise le risque de réinfection par un VPH-16 différent. Enfin, certaines études de cohortes antérieures peuvent facilement avoir sous-estimé la fréquence de la persistance puisque seulement deux variants représentaient jusqu'à 70% des variants identifiés.

Il est également intéressant de s'interroger sur la signification de la présence d'un seul et même variant prédominant dans différents échantillons provenant de 45 de nos 50 patientes. L'analyse SSCP a été répétée chez 50% de ces patientes avec des résultats similaires. L'analyse de séquence a également confirmé cette persistance. Nous croyons que dans la majorité des cas, ceci confirme effectivement la persistance de l'infection par le même variant de VPH-16. Il est toutefois possible que la fréquence de l'infection persistante soit légèrement surestimée de par la méthodologie de notre étude. En effet, lorsqu'un variant est très fréquent dans une population, certaines patientes pourraient être réinfectées par ce variant. Elles seraient considérées comme ayant une infection persistante puisque le même variant est détecté. Comme les variants de VPH-16 ont tendance à être regroupés en éclosions géographiques, l'analyse d'une

population plus homogène peut diminuer l'utilité de l'analyse moléculaire de variants dans le raffinement de la définition de la persistance. Le nombre de variants différents identifiés dans une population est très variable et dépendra, entre autres, de la mobilité de la population de même que de son niveau d'activité sexuelle (Xi et coll., 1995).

La population dans notre étude a toutefois permis de diminuer l'impact de cette limite. En effet, les femmes de l'Étude Canadienne Femmes-VIH, ont été recrutées à travers tout le Canada. Elles étaient d'origines ethniques diverses et étaient géographiquement mobiles. Nous avons pu retrouver 22 variants différents. Plusieurs d'entre eux n'infectaient qu'un nombre limité de patientes (Tableau II). Nous pouvons donc conclure que pour plusieurs des femmes infectées par le même variant, il s'agissait probablement d'une infection persistante par le VPH-16.

## CONCLUSION

Nous avons effectué une étude comparant l'efficacité du SSCP et du séquençage dans l'identification de variants de VPH-16. Notre but était de préciser la notion d'infection persistante par le VPH-16, en ne considérant comme persistantes que les infections de plus de 6 mois par le même variant de VPH-16. Il s'agit d'une étude importante à cause du nombre de sujets et d'échantillons étudiés, de la population particulièrement à risque d'être infectée par le VPH et le VIH, et de l'utilisation du séquençage pour confirmer la valeur du SSCP dans l'identification de l'infection persistante par le VPH-16 dans une étude de cohorte.

Nos résultats confirment que le SSCP est une méthode fiable, simple et rapide pour identifier des variants de VPH-16. Toutefois la sensibilité du SSCP est nettement inférieure à celle du séquençage pour l'identification de variants de VPH-16. Par ailleurs, l'efficacité du SSCP à identifier un changement de variant prédominant parmi des échantillons consécutifs d'une même patiente se rapproche de celle de l'analyse de séquence.

Nous avons pu mettre en évidence un changement de variant prédominant chez 5 patientes sur 50 (10%) dans notre cohorte. Une de ces patientes a par la suite présenté une infection persistante avec le second variant. Il y a donc 4 patientes, qui par le typage seul, auraient été faussement considérées comme étant infectées de manière persistante par le VPH-16. Il sera intéressant, lors d'études ultérieures, d'identifier certaines caractéristiques épidémiologiques propres à ces patientes ayant présenté une réinfection avec un variant différent de VPH-16 (nouveau partenaire, condition médicale affectant l'immunité, etc) et de vérifier si elles présentent une évolution différente au niveau de la maladie cervicale. Un plus grand nombre de sujets avec une réinfection par un variant différent nous permettrait aussi de vérifier si des variants spécifiques sont impliqués dans ce processus. D'une part, certains variants pourraient induire une réponse immunitaire moins efficace et ainsi permettre une infection par un autre variant. D'autre part, l'immunité induite par les VPH-16 pourrait être « variant-



spécifique » ou tout au moins spécifique à un groupe de variants. Cette hypothèse demandera à être confirmée dans le futur. Pour répondre à cette question, il faudrait non pas étudier les variants définis par l'analyse du LCR, mais plutôt étudier la variabilité génomique des régions associées à l'antigénicité des VPH, dont L1 et L2. Dans le contexte où la vaccination semble la voie la plus prometteuse pour la prévention du cancer du col, la possibilité d'une réinfection par différents variants de VPH-16 soulève une problématique sérieuse qui demandera qu'on s'y attarde attentivement.

## BIBLIOGRAPHIE

Alloub M, Barr BBE, McLaren KM, Smity IW, Bunney MH, Smart GE. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women with renal allografts. *BMJ* 1989; 298: 153-156.

Apple JR, Becker TM, Wheeler CM, Herlich HA. Comparison of human leucocyte antigen DR-DQ disease association found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:427-436.

Arends MAJ, Wyllie AH, Bird CC. Papillomavirus and human cancer. *Hum Pathol*; 21 : 686-690.

Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 61: 962-971.

Bauer, HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265: 472-477.

Beier DR. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for genetic mapping. *Mammalian Genome* 1993; 3: 627-631.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170: 1077-1085.

Beutner KR et Tyring S. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* 1997; 102(5A): 9-15.

Bontkes JB, Van Duin M, De Gruijl TJ, Duggan-Keen MF, Walboomers JMM, Stukart MJ, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Scheper RJ, Stevens FRA, Dyer PA, Sinnott P, Stern PL. HPV 16 infection and progression of cervical intraepithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer* 1998; 78: 166-171.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective - International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.

Brinton LA. Epidemiology of Cervical Cancer – Overview. Dans: The Epidemiology of Cervical Cancer and Human papillomavirus. Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (Editeurs), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1992, pp. 3-23.

Brisson J, Bairati I, Morin C, Fortier M, Bouchard C, Christen A, Bernard P, Roy M, Meisels A. Determinants of persistent detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix. *J Infect Dis* 1996; 173: 794-799.

Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, Dehovitz JA, Landesman SH. The clinical prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 1996; 23: 333-341.

Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, Shergill B, Pakarian F, Raju KS, Best JM. Perinatal infection and persistence of human papilloma virus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol* 1995; 47(3): 209-218.

Caussy D, Orr W, Daya AD, Roth P, Reeves W, Rawls W. Evaluation of methods for detecting human papillomavirus deoxyribonucleotide sequence in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 236-243.

Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 1992a; 66: 5714-5725.

Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types : uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995; 69 : 3074-3083.

Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, ter Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, Bernard HU. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992b; 66: 2057-2066.

Chen M, Popescu N, Woodworth C, Bernemen Z, Corbellino M, Lusso P, Ablashi DV, DiPaolo JA. Human Herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol* 1994; 68 :1173-1178.

Chen TM, Chen CA, Hsieh CY, Chang DY, Chen YH, Defendi V. The state of p53 in primary human cervical carcinomas and its effects in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. *Oncogene* 1993; 8: 1511-1518.

Cho KR et Hedrick L. Molecular Biology. Dans: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract – 4<sup>th</sup> Edition. Kurman RJ (Editeur), Springer-Verlag, New York, NY, 1994, pp. 1173-1198.

Chow LT et Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* 1994; 37 : 150-158.

Chua KL et Hjerpe A. Persistence of Human Papillomavirus infections preceding cervical carcinoma. *Cancer* 1995; 77:121-127.

Clavel C, Bory JP, Rihet S, Masure M, Duval-Binninger J, Putaud I, Lorengato M, Thomas K, Quereux C, Birembaut P. Comparative analysis of the human papillomavirus detection by hybrid capture assay and routine cytologic screening to detect high grade cervical lesions. *Int J Cancer* 1998a; 75: 525-528.

Clavel C, Masure M, Putaud I, Thomas K, Bory JP, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* 1998b; 51: 737-740.

Cobb MW. Human papillomavirus infection. *J Am Acad Derm* 1990; 22: 547-566.  
Cole, HM. Diagnostic and therapeutic technology assessment (DATTA): human papillomavirus DNA testing in the management of cervical neoplasia. *JAMA* 1993; 270: 2975-2981.

Conti M, Agarossi A, Parazzini F, Muggiasca ML, Boschini A, Negri E, Casolati E. HPV, HIV, and risk of cervical intraepithelial neoplasia in former intravenous drug abusers. *Gyn Oncol* 1993; 48 :344-348.

Cooper K, Herrington CS, Lo ES, Evans MF, McGee JO,. Integration of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1992; 45:382-384.

Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lorincz AT, Burk RD, Glass AG, Greer C, Buckland J, Helgesen K, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Liaw KL. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2262-2265.

Coutlée F, Mayrand MH, Provencher D, Franco E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diag Virol* 1997; 8: 123-141.

Coutlée F, Provencher D, Voyer H. Detection of human papillomavirus DNA in cervical lavage specimens by a nonisotopic consensus PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1973-1978.

Cox JT, Lorincz At, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am. J. Obstet Gynecol* 1995; 172; 946-954.

Critchlow CW, Hawes SE, Kuypers JM, Goldbaaum GM, Holmes KK, Surawicz CM, Kiviat NB. Effect of HIV infection on the natural history of anal human papillomavirus infection. *AIDS* 1998; 12: 1177-1184.

de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. Dans: zur Hausen Z (Ed.). *Human Pathogenic Papillomaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology* (no. 186), Springer-Verlag, Berlin, 1994, pp. 1-12.

DiPaolo JA, Woodworth CD, Coutlée F, Zimonic DB, Bryant J, Kessous A. Relationship of stable integration of herpes simplex virus-2 BGLII N subfragment XHO2 to malignant transformation of human papillomavirus-immortalized cervical keratinocytes. *Int J Cancer* 1998; 76: 865-871.

DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Koval DL, Lopez JV, Doniger J. HSV-2 induced tumorigenicity in HPV-16 immortalized genital keratinocytes. *Virology* 1990; 177 : 777-779.

Ellis JRM, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, Stern PL. The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature (Med.)* 1995; 1: 464-470.

Eschle D, Duerst M, ter Meulen J, Luande J, Eberhardt HC, Pawlita M, Gissman L. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1992; 73: 1829-1832.

Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171:1026-30.

Franco EL, Villa LL, Rahal P, Ruiz A. Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(20): 1558-9.

Franco EL. Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 779-780.

Franco EL. The sexually transmitted disease model for cervical cancer: Incoherent epidemiologic findings and the role of misclassification of human papillomavirus. *Epidemiology* 1991; 2: 98-106.

Franco, EL. Epidemiology of anogenital warts and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1996; 23(3): 597-623.

Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Kukushima M, Kato I, Fujinaga K. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes* 1994; 9: 85-92.

Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* 1990; 64: 723-730.

Galloway DA, Goldstein LC, Lewis JB. Identification of proteins encoded by a fragment of herpes simplex virus type 2 DNA that has transforming activities. *J Virol* 1982; 42 :530-537.

Galloway DA, Mc Dougal JK, The oncogenic potential of herpes simplex viruses : evidence for a hit and run mechanism. *Nature* 1983; 394; 21-24.

Garzetti GG, Ciavattini A, Goteri G, De Nictolis M, Menso S, Muzzioli M, Fabris N. HPV DNA positivity and natural Killer Cell Activity in the clinical outcome of mild dysplasia: integration between virus and immune system. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 39:130-5.

Goldsborough MD, McAllister P, Reid R, Temple G, Lorincz AT. A comparison study of human papillomavirus prevalence by the polymerase chain reaction in low risk women and in a gynecology referral group at elevated risk for cervical cancer. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 451-457.

Gravitt P, Hakenewerth A, Stoerker J. A direct comparison of methods proposed for use in widespread screening of human papillomavirus infections. *Mol Cell Probes* 1991; 5: 65-72.

Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature (Genetics)* 1993; 5: 111-117.

Guibinga GH, Coutlée F, Kessous AK, Hankins C, Lapointe N, The Canadian Women's HIV study Group. Role of herpes simplex type 2 virus in genital cancers: review of the evidence. *Arch STD/HIV Res* 1995; 9:163-179.

Halpert R, Fruchter RG, Sedlis A, Butt K, Boyce JG, Sillman FH. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 1986; 68 : 251-8.

Hayashi K et Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutation* 1993; 2: 338-346.

Hayashi Y, Iawaksa T, Smith CC. Multistep transformation by defined fragments of herpes simplex virus type 2 DNA : oncogenic region and its gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82 : 8493-8497.

Hankins C, Coutlée F, Lapointe N, Simard P, Tran T, Samson J, Hum L, The Canadian Women's HIV Study Group. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *Can Med Ass J* 1999; 159: 1359-1365.

Harnett G, Farr TJ, Pietroboni GR, Bucens MR. Frequent shedding of human herpesvirus 6 in saliva. *J Med Virol* 1990; 30 :128-130.

Heard I, Schmitz V, Costagliola D, Orth G, Kazachkine MD. Early regression of cervical lesions in HIV-seropositive women receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1998; 12:1459-64.

Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. Genetic characterization of human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncologic potential. *Int J Cancer* 1995; 60: 369-376.

Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balarqm P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviati N, Kuypers J, Pfister H. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* 1995; 33 : 1746-1754.

Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Magnus P, Borresen-Dale AL, Ronningen KS. An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA1\*0102-DQB1\*0602 haplotype: a population-based case-control study of Norwegian women. *Int J Cancer* 1998; 76: 19-24.

Herrero R. Epidemiology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst monographs* 1996; 21 :1-6.

Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Tenorio F, de Britton RC, Gaitan E, Garcia M, Rawls WE. Sexual behavior, venereal diseases, hygiene practices, and invasive cervical cancer in a high-risk population. *Cancer* 1990; 65(2): 380-386.

Herrington CS, Evans MF, Hallam NF, Charnock FM, Gray W, McGee D. Human papillomavirus status in the prediction of high grade cervical intraepithelialneoplasia in patients with persistent low grade cervical cytological abnormalities. *British J Cancer* 1995; 79 :206-209.

Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Marti D, Kissner T, Sherman ME, Glass AG, Manos MM, Lorincz AT, Kurman RJ, Buckland J, Rush BB, Carrington M. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention* 1998; 7: 1035-1041.

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Bush BB, Lawler P, Sherman ME, Kurman RJ, Manos MM. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-240.

Hippelainen MI, Yliskoski M, Syrjanen S, Saastamoinen J, Hippelainen M, Saarikoski S, Syrjanen K. Low concordance of genital human papillomavirus (HPV) lesions and viral type in HPV-infected women and their male sexual partners. *Sex Transm Dis* 1994; 21(2): 76-82.

Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Eng J Med* 1998; 338: 423-428.

Ho GYF, Burk RD, Fleming I, Klein RS. Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 1994; 56: 788-792.

Ho GYF, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(18): 1365-1371.

Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Mitrajani-Rosenbaum S, Norrild B, Radhakrishna Pillai M, Stoerker J, Syrjaenen K, Syrjaenen S, tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human population. *J Virol* 1993a; 67: 6413-6423.

Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1765-1772.

Ho L, Tay SK, Chan SY, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 suggest sexual transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasia. *J Infect Dis* 1993b; 168:803-809.

Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 252-258.

Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3637-3642.



Howley PM. Papillomaviridae: The Viruses and Their Replication. Dans: Fields Virology, Third Edition. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et coll. (Editeurs), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, pp. 2045-2076.

Howley PM et Schlegel R. The human papillomaviruses. An overview. *Am J Med* 1988; 85(Suppl 2A) : 155-158.

Howley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert H, NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989; 8 :3905-3910.

Humphries SE, Gunadson V, Whittall R, Day INM. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 1997; 43: 427-435.

Icenogle JP, Laga M, Miller D, Manoka AT, Tucker RA, Reeves WC. Genotypes and sequence variants of human papillomavirus DNAs from human immunodeficiency virus type 1-infected women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis* 1992; 166:1210-1216.

Icenogle JP, Sathya P, Miller DA, Tucker RA, Rawls WE. Nucleotides and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virology* 1991; 184: 101-107.

Jacobs MV, Snidjers PJF, van den Brule AJC, Helmerhorst TJM, Meijer C, Walboomers J. A general primer GP5+/GP6+ -mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 791-795.

Jenicek M, Cl  roux R.   pid  miologie : Principes, Techniques, Applications. Edisem Inc., St-Hyacinthe, QC, 1987, 454 p.

Jha PBS, Beral V, Peto J, Hack S, Hermon C, deacon J, Mant D, Chilveres C, Vessy MP, Pike MC, Muller M, Gissman L. Antibodies to human papillomavirus and to other genital infection agents and invasive cervical carcinoma. *Lancet* 1993; 341 : 1116-1119.

Kataja V, Syrjanen S, Yliskoski M, Hippelinen M, Vayrinen M, Saarikoski S, Mantyjarvi R, Jokela V, Salonen JT, Syrjanen K. Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *Am J Epidemiol* 1993; 138: 735-745.

Kaufman RH, Adam E. Herpes simplex virus and human papillomavirus in the development of cervical carcinoma. *Clin Obst Gyn* 1986; 29 :678-690.

Kiviat NB, Koutsky LA, Crichtlow CW, Galloway DA, Vernon DA, Peterson ML, McElhose PE, Pendras SJ, Stevens CE, Holmes KK. Comparison of Southern transfer hybridization and dot filter hybridization for detection of cervical human papillomavirus infection with types 6, 11, 16, 18, 31, 33, and 35. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 561-565.

Kjellberg L, Zhaohui W, Wiklund F, Edlund K, Angstrom T, Lenner P, Sjoberg I, Hallmans G, Wallin KL, Sapp M, Schiller J, Wadell G, Mählck CG, Dillner J. Sexual behaviour and papillomavirus exposure in cervical intra-epithelial neoplasia: a population based case-control study. *J Gen Virol* 1999; 80:391-398.

Korn AP et Landers DV. Gynecologic disease in women infected with human immunodeficiency virus type I. *J Acq Imm Def Synd* 1995; 9 :361-370.

Koutsky LA. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102(5A): 3-8.

Koutsky LA, Holmes KK, Crichtlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon DA, Kiviat NB. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Eng J Med* 1992; 327: 1272-1278.

Kuypers JM, Crichtlow CW, Gravitt PE, Vernon DA, Sayer JB, Manos MM, Kiviat NB. Comparison of dot filter hybridization, Southern transfer hybridization, and polymerase chain reaction amplification for diagnosis of anal human papillomavirus infection. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1003-1006.

Laga M, Icenogle JP, Marsella R, Manoka AT, Nzila N, Ryder RW, Vermund SH, Heyward WL, Nelson A, Reeve WC. Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia: opportunistic complication of HIV infection. *Int J Cancer* 1992; 48:682-688.

Leach CT, Newton ER, Mparlin S, Jenson HB. Human herpesvirus 6 infection of the female genital tract. *J Insect Dis* 1994; 169 :1281-1283.

Lee HH, Lo WJ, Choo KB. Mutational analysis by a combined application of the multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism and the direct linear amplification DNA sequencing protocols. *Anal Biochem* 1992; 205: 289-293.

Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogenes* 1992; 7: 17-25.

Lefebvre G, Darbois Y, Bitker MO, Luciani J, Mouquet C. Infection à virus papilloma humain et transplantation rénale. A propos de 2 observations personnelles et d'une revue de la littérature. *J Gynecol Obstet Biol Reproduct* 1995; 24(6): 600-603.

Leptack C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ 2<sup>nd</sup>, Dotto GP, DiMaio D. Tumorigenic transformation of mouse keratinocytes by the E5 gene of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 1991; 65 : 7078-7083.

Ley C, Bauer HM, Reingold A, Schiffman MH, Chambers JC, Tashiro CJ. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst* 1991; 87: 997-1003.

Londesborough P, Ho L, Terry G, Cusick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotypes as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)* 1996; 69: 364-368.

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-337.

Lorincz AT. Detection of Human Papillomavirus DNA Without Amplification: Prospects for Clinical Utility. Dans: *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human papillomavirus*. Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (Editeurs), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1992, pp. 135-145.

Lorincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North America* 1996; 23 : 707-730.

Lungu O, Sun XW, Wright TC Jr, Ferenczy A, Richart RM, Silverstein S. A polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay method for detecting human papillomavirus in cervical carcinomas and high-grade cervical cancer precursors. *Obstet. Gynecol.* 1995; 85: 337-342.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis Aj, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells VII, Molecular Diagnostics of Human Cancer*, Cold Spring Harbor press, New York, NY, 1989, pp 209-214.

Melchers W, van den Brule A, Walboomers J, de Bruin M, Burger M, Herbrink P, Meijer C, Lindeman J, Quint W. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction as compared to modified FISH and southern-blot analysis. *J Med Virol* 1989; 27: 329-335.

Mitchell MF, Tortoleno-Luna G, Wright T, Sarkar A, Richardes-Kortum R, Hong WK, Schottenfeld D. Cervical Human Papillomavirus Infection and Intraepithelial Neoplasia : a review. *J Nat Cancer Instit* 1996; 21 : 17-25.

Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989a; 63: 4417-4421.

Munger K, Scheffner M, Huibregste JM, Howley PM. Interactions of HPV type 16 oncoproteins with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992; 12 :197-217.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retino blastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989b; 8(13): 4099-4105.

Munoz N, Bosch FX, Shah K, Meheus A. The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. Dans: *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human papillomavirus*. Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (Editeurs), International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. IX-X.

Myers G, Bernard HU, Delius H, Baker CC, Icenogle J, Halpern AL, Wheeler CM. *Human papillomavirus. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos, N.M. 1995.

Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 665-669.

Okuno T, Oishi H, Hayashi K, Nonogaki M, Tanaka K, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J Clin Microbiol* 1995; 33 :1968-1970.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989b; 86: 2766-2770.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989a; 5: 874-879.

Oto M, Miyake S, Yuasa Y. Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional Minislab gel electrophoresis apparatus. *Anal Biochem* 1993; 213: 19-22.

Pakarian F, Kaye J, Cason J, Kell B, Jewers R, Derias NW, Raju KS, Best JM. Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. *Brit J Obstet Gynecol* 1994; 101: 514-517.

Palan PR, Mikhail MS, Goldberg GL, Basu J, Runowicz CD, Romney SL. Plasma level of beta-carotene, lycopene, canthaxanthin, retinol, and alpha and tau-tocopherol in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 181-185.

Palefsky JM. Human papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. *J Natl Cancer Inst* 1998; 23 :15-20.

Palefsky JM, Gonzales J, Greenblatt RM, Ahn DK, Hollander H. Anal intraepithelial neoplasia and anal papillomavirus infection among homosexual males with group IV disease. *JAMA* 1990; 263 :2911-2916.

Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Lamborn K, Hollander H. Natural History of anal cytologic abnormalities and papillomavirus infection among homosexual men with group IV HIV disease. *J Acquired Immune Def Synd* 1992; 5 : 1258-1265.

Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, Young M, Melnick S, Miotti P, Burk R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human deficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:226-236.

Pater MM, Nakshatri H, Kisaka C, Pater A. The first 124 nucleotides of the E7 coding sequence of HPV-16 can render the HPV-11 genome transformation competent. *Virology* 1992; 186 : 348-351.

Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* 1994; 57:836-840.

Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C, Eaton S, Hildesheim A, Morera LA, Rodriguez AC, Herrero R, Sherman ME, Wheeler CM. Comparison of PCR and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3248-3254.

Phelps WC, Yee CL, Munger K. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to adenovirus E1a. *Cell* 1988; 53 :339-347.

Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and non-smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 868-873.

Ramesar JE, Rybicki EP, Williamson AL. Sequence variation in L1 gene of human papillomavirus type 16 from Africa. *Arch Virol* 1995; 140 :1863-1870.

Rattray C, Strickler HD, Escoffery C, Cranston B, Brown C, Manns A, Schiffman MH, Palefsky JM, Hanchaeb B, Blattner WA. Type-specific prevalence of human papillomavirus DNA among Jamaican colposcopy patients. *J Inf Dis* 1996; 173 :718-721.

Reid R et Lorincz AT. Human papillomavirus tests. *Bail Clin Obstet Gynecol* 1995; 9: 65-103.

Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Voochoorst FJ, Rozendaal L, Risse EKL, Meijer E, Kenemans . The presence of persistent high risk genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 62: 306-311.

Resnick RM, Cornelissen MTE, Wright DK, Elchinger GH, Fox HS, ter Schegget J, Manos MM. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1477-1484.

Rezza G, Giuliani M, Serraino D, Branca M, Benedetto A, Garbuglia A, Ippolito G, Franceschi S. Risk factors for cervical presence of human papillomavirus DNA among women at risk for HIV infection. *Epidemiol Inf* 1998; 121: 173-177.

Romano N, Romano FM, Viviani E, Vitale F, Villafrate MR, Perna AM, Bonura F, Guttadorau R. Rare association of Human Herpesvirus-6 DNA with Human Papillomavirus DNA in cervical smears of Women with normal and abnormal cytologies. *J Clin Microbiol* 1996; 34 :1589-1591.

Rosenfeld WD, Rose E, Vermund SH, Shreiber K, Burk RD. Follow-up evaluation of cervico-vaginal human papillomavirus infection in adolescents. *J Pediatr* 1992; 121: 301-311.

Rugpao S, Nagachinta T, Wanapirak C, Srisomboon J, Suryanon V, Siroroj B, Chaiyarassamee O, Prasertwitayakij W, Celentano DD, Nelson KE, Vernon SD, Duerr A. Gynaecological conditions associated with HIV infection in women who are partners of HIV-positive Thai blood donors. *Int J STD AIDS* 1998; 9:677-682.

Salahuddin SZ, Ablashi SV, Markham PD, Joseph SF, Sturzenegger S, Kaplan M, Halligan G, Biberfeld p, Wong-Staal F, Kramarsky B, Gallo RC. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986;134 :596-601.

Satre-Garau X, Loste MN, Vincent-Salomon A, Favre M, Mouret E, De La Rochefordiere A, Durand JC, Tartour E, Lepage V, Charron D. Decreased frequency of HLA-DRB1\*13 alleles in Frenchwomen with HPV-positive carcinoma of the cervix. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1996; 69: 159-164.

Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6741-6742.

Schafer A, Friedmann W, Mielke M, Schwartlander B, Koch MA. 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* 1991; 164: 593-599.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by the human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63 :1129-1136.

Scheffner M, Huibregtse JM, Viestra RD. The HPV16 E6 and E6AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1990; 75 :495-505.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman SW, Stanton CK, Manos MM. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85 :958-63.

Schiffman MH, Bauer HM, Lorincz AT, Manos MM, Byrne JC, Glass AG, Cadell DM, Howley PM. Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 573-577.

Schiffman MH et Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995; 76: 1888-1901.

Schiffman MH, Haley NJ, Felton JS, Anreus AW, Kastow RA, Lancaster WD, Kurman RJ, Brinton LA, Lannom LB, Hoffman D. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituent in the cervix. *Cancer Res* 1987; 47: 3886-3888.

Schiffman MH. Validation of Hybridization Assays: Correlation of Filter In Situ, Dot Blot and PCR with Southern Blot. Dans: *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human papillomavirus*. Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (Editeurs), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1992a, pp. 169-179.

Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992b; 84:394-398.

Schiffman MH. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1345-1347.

Schlegel R, Phelps WC, Zhang YL, Barbosa M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 1988; 7: 3181-3187.

Schneider A, Hotz M, Gissmann L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 1987; 40: 198-201.

Schneider A et Koutsky LA. Natural History and Epidemiological Features of Genital HPV Infections. Dans; *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human papillomavirus*. Munoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (Editeurs), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1992, pp. 25-52.

Schneider A, Zahm DM, Kirchmayr R, Schneider VL. Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 - validity of cytologic study, cervicography, and human papillomavirus detection. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1534-1541.

Shah KV et Howley PM. Papillomaviruses. Dans: *Fields Virology, Third Edition*. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et coll. (Editeurs), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, pp. 2077-2109.

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-332.

Sherman ME. Cytopathology. Dans: *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract - 4<sup>th</sup> Edition*. Kurman RJ (Editeur), Springer-Verlag, New York, NY, 1994, pp. 1097-1130.

Schrager LK, Friedland GH, Maude D, Schreiber K, Adachi A, Pissuti DJ, Koss LG, Klein RS. Cervical and vaginal squamous cell abnormalities in women infected with human immunodeficiency virus. *J Acquired Immune Def Synd* 1989; 2: 570-575.

Simpson AJG et Pena SDJ. Sequence-Specific Gene Signature Produced by Low Stringency Single Specific Primer Polymerase Chain reaction. Dans: *Detection of Mutations and Polymorphism in DNA*. CRC Press, Boca raton, FL, 1997, pp.143-149.

Slattery ML, Overall JC, Abbott TM, Robinson LM, French TK, Jolles C, Gardner JW, West DW. Dietary vitamin A, C, and E and selenium as risk factors for cervical cancer. *Epidemiol.* 1990; 1: 8-15.

Slattery ML, Overall JC, Abbott TM, et coll. Sexual activity, contraception, genital infections and cervical cancer: support for a sexually transmitted disease hypothesis. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 248-258.

Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4009.

Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM. Intratype variation in 12 human papillomavirus types : a worldwide perspective. *J Virol* 1996; 79 : 3127-3136.

Stoler MH. A brief synopsis of the role of human papillomavirus in cervical carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1091-1098.



Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-234.

Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright, TC. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1997; 337 : 1343-1349.

Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1030-1034.

Syrjanen KJ. Human papillomavirus in genital carcinogenesis. *Sex Transm Dis* 1994; 21 (suppl.): S86-S89.

Syrjanen K, Hakama M, Saarikoski S, Vayrynen M, Yliskoski M, Syrjanen S, Kataya V, Castren O. Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm Dis* 1990; 17(1): 15-19.

Tenti P, Zappatore R, Migliora P, Spinillo A, Belloni C, Carnevali L. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 475-479.

ter Harmsel B, Smedts F, Kuijpers J, van Muyden R, Oosterhuis W, Quint W. Relationship between human papillomavirus type 16 in the cervix and intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 46-50.

ter Meulen J, Schweigler AC, Eberhardt HC, Luande J, Mgaya HN, Mueller M, Bleul C, Ulken V, Ikenberg H, Pawlita M, Gissman L. Sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 18 in tumor and non-tumor patients and antibody response to a conserved seroreactive epitope. *Int J Cancer* 1993; 53: 257-259.

Tham KM, Chow VT, Singh P, Tock EP, Ching KC, Lim-Tan SK, Sng IT, Bernard HU. Diagnostic sensitivity of polymerase chain reaction and Southern blot hybridization for the detection of human papillomavirus DNA in biopsy specimens from cervical lesions. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 638-646.

Van Belkum A. Low-stringency single specific primer PCR, DNA sequencing and single-strand conformation polymorphism of PCR products for identification of genetic variants of human papillomavirus type 16. *J Virol Methods* 1995; 55:435-443.

Van Belkum A, Juffermans J, Schrauwen L, van Doornum G, Burger M, and Quint W. Genotyping human papillomavirus type 16 isolates from persistently infected promiscuous individuals and cervical neoplasia patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2957-2962.

Van den Brule AJC, Walboomers JMM, du Maine M, Kenemans P, Meijer CJLM. Differences in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytomorphological normal cervical smears is associated with a history of intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 48:404-408.

Vernon SD, Hart CE, Reeves WC, Icenogle JP. The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus 16 transcription. *Virus Res* 1993; 27: 133-145.

Vernon, SD, Reeves WC, Clancy KA, Laga M, St.Louis M, Gary HE, Ryder RW, Manoka AT, Icenogle JP. A longitudinal study of human papillomavirus DNA detection in human immunodeficiency virus type 1-seropositive and -seronegative women. *J Inf Dis* 1994; 69: 1108-1112.

Verrault R, Chu J, Mandelson M, Shy K. A case-control study of diet and invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1989; 43: 1050-1054.

Villa, LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Advances in Cancer Research* 1997; 71:321-341.

Wallace AJ. Combined Single Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex analysis. Dans: *Detection of Mutations and Polymorphism in DNA*. CRC press, Boca Raton, FL, 1997, pp.79-94.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.

Wheeler CM, Greer CE, Becker TM, Hunt WC, Anderson SM, Manos MM. Short-term fluctuations in the detection of cervical human papillomavirus DNA. *Obstet Gynecol* 1996; 88:261-268.

Winkelstein W Jr. Smoking and cervical cancer.current status : a review. *American J Epidemiol* 1990; 131 :945-957.

Wright TC, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Devanter N, Sun XW. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected by the immunodeficiency virus: prevalence, risk factors and validity of Papanicolaou smears. *Obstet Gynecol* 1994; 84:591-597.

Wright TC, Sun XW, Koulos J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 202-210.

Xi LF, Demers GW, Kiviat NB, Kuypers J, Beckman AM, Galloway DA. Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by Single Strand Conformation Polymorphism Analysis. *J Inf Diseases* 1993;168:610-617.

Xi LF, Demers W, Koutsky LA, Kiviat NB, Kuypers J, Watts H, Holmes KK, Galloway DA. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *J Infect Dis* 1995; 172: 747-755.

Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. Genomic variation of human papillomavirus types 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 796-802.

Yamada, T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers - a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71:2463-2472.

Yang X, Jin G, Nakao Y, Rahimtula M, Pater MM, Pater A. Malignant transformation of HPV 16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Int J Cancer* 1996; 65: 338-344.

Yokota J, Tsukada Y, Nakajima T. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between the transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc natl Acad Sci USA* 1992;89 : 4549-4553.

zur Hausen H. Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events. *Lancet* 1982; 2;1370-1372.

zur Hausen H. Human Papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virol* 1991; 184 :9-13.

## ANNEXE



## The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research

François Coutlée<sup>a,b,\*</sup>, Marie-Hélène Mayrand<sup>a</sup>, Diane Provencher<sup>b,d</sup>,  
Eduardo Franco<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Départements de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC H2L 4M1, Canada*

<sup>b</sup> *Centre de Recherche Louis-Charles Simard, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC H2L 4M1, Canada*

<sup>c</sup> *Department of Oncology, Division of Epidemiology, McGill University, Montréal, QC, Canada*

<sup>d</sup> *Département de Gynécologie-Obstétrique, Division de Gynécologie-Oncologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC H2L 4M1, Canada*

Received 1 May 1997; received in revised form 4 July 1997; accepted 7 July 1997

### Abstract

**Background:** Human papillomaviruses (HPV) are now considered etiologic agents of cancer of the uterine cervix. Adjunctive diagnostic procedures for the detection of HPV infection could increase the sensitivity of primary and secondary screening of cervical cancer. HPV testing could also improve the specificity of screening programs resulting in avoidance of overtreatment and saving of costs for confirmatory procedures.

**Objectives:** To review the rationale of HPV testing in genital diseases and the potential applications of HPV DNA detection methods for clinical and epidemiological purposes.

**Results:** Progression of HPV infection is associated with the persistence of HPV infection, involvement of high-risk HPV types, high HPV viral load in specimens, integration of viral DNA and possibly the presence of cofactors. The design of HPV diagnostic tests will need to take into account these parameters of disease progression. HPV DNA detection techniques based on signal-amplification are standardized, commercially available and detect several high-risk HPV types. They increase the sensitivity of screening for high-grade and low-grade lesions. Although they may yield false-negative results in the presence of significant HPV-related disease, new test formats could resolve this weakness. Amplification techniques are ideal instruments for epidemiologic purposes since they minimize misclassification of HPV infection status and allow for the detection of low viral burden infections. They are currently not readily applicable to diagnostic laboratories.

\* Corresponding author. Département de Microbiologie et Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Pavillon Notre-Dame, 1560 Sherbrooke est, Montréal, QC H2L 4M1, Canada. Tel: +1 514 2816000; fax: +1 514 8964607; e-mail: coutleef@ere.umontreal.ca

**Conclusions:** Before recommending HPV testing, prospective trials of untreated LSIL with HPV testing as well as the determination of the efficacy and cost-effectiveness of novel HPV tests, need to be completed. © 1997 Elsevier Science B.V.

*Keywords:* HPV testing; Virology; Cervical cancer

## 1. Introduction

Cervical cancer is the second most common malignant neoplasia in women worldwide (Franco, 1996; Schiffman et al., 1995). In Western countries, cancer of the uterine cervix still ranks fifth in the list of malignant diseases afflicting women, despite efficient screening programs (Franco, 1996). The 5 year survival rate of 67% for invasive cancer in the United States has remained stable for the last two decades, which underscores the importance of directing attention to preventive strategies. Moreover, in several European countries, there is a recent trend of increased incidence of cervical cancer in women younger than 50 years of age.

Current prevention protocols for cervical cancer control rely on the periodic use of Papanicolaou (Pap) smears to identify women at risk of having precursor cervical lesions or cancer, and for whom further investigation is warranted. Screening protocols using Pap smears have been shown to efficiently reduce the rate of invasive cervical cancer (Franco, 1996). Squamous intraepithelial lesions (SIL) of the uterine cervix include a spectrum of precursor lesions, formerly designated cervical intraepithelial neoplasia (CIN) or dysplasia (Reid, 1993), that can progress into squamous carcinoma. The Bethesda cytology classification divides squamous cell abnormalities in two categories: low-grade SIL (LSIL) and high-grade SIL (HSIL) (Reid, 1993). Cell abnormalities that do not correspond to these categories or to benign reactive changes are classified as atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS). LSIL combines cytological changes suggestive of mild dysplasia (or cervical intraepithelial neoplasia (CIN I)) and HPV-induced morphological changes (koilocytotic condylomatous atypia) (Schiffman et al., 1995). HSIL comprises moderate and severe dysplasia lesions (previously known

as CIN II and III) and carcinoma in situ. HSIL is rare, the overall prevalence being lower than 1%. Although HSIL lesions are more likely to progress to cancer than LSIL (Cole, 1993), they may sometimes spontaneously regress even in the presence of high-risk HPV types (Shah et al., 1996). Women with LSIL have a 16-fold increased risk of developing higher grade lesions (Schiffman et al., 1995; Cole, 1993; Reid, 1993). Up to 25% of women with LSIL will progress to HSIL over 4 years (Schiffman et al., 1995).

Desirable characteristics of screening tests include sensitivity, ease of performance and acceptability, reproducibility, safety of use and low cost. High specificity of the test is also a key feature because it helps reducing the usage and cost of confirmatory procedures. Cytology smears have most of these characteristics but may underestimate the severity of cervical disease and generate false-negative results even in the presence of high-grade epithelial lesions. Cervical cancer may develop in the interval between smears (Cox, 1996). The sensitivity of cytology smears to detect significant cervical lesions ranges between 50 and 80%, a moderate level of sensitivity that is partially compensated by repeated testing after short intervals (Cox, 1996). For example, the safety of repeated cytological surveillance was demonstrated in a study using colposcopy with concurrent cytology in women who had a previous smear showing mild dyskaryosis at least 24 months before enrolment (Jones et al., 1992). This study was completed to assess the impact of missed lesions by cytological surveillance protocol of women with mild dyskaryosis. One group of 214 women was managed with repeated cytology: 70 of these women had colposcopy because of persistent cytological anomalies while 144 women were still under cytological surveillance at enrolment. Of these 144 women, 82% had no or low grade disease (CIN I), 6% had CIN II and 12% had CIN III. Concurrent smears would have identified 67% of

women with CIN III at colposcopy. The risk of missing CIN III lesions with the cytological surveillance of women with mild dyskaryosis was reduced to 4% with the addition of a third repeat smear one year after the second smear, a strategy that could reduce the number of colposcopies performed and surveillance costs (Jones et al., 1992). Only one third of women with initial smears showing mild dysplasia were referred to colposcopy in the surveillance group. A second group of 137 women had early colposcopy. None of these women had CIN III disease at enrolment but nearly one third had persistent low-grade disease. Invasive cancer was not encountered in either group during the 24–40 month period of observation, illustrating the low risk of serious disease rapidly evolving while under surveillance.

In two studies recruiting women referred to colposcopy because of abnormal cytologies, smears performed concurrently with colposcopy missed 42–62% of women with HSIL (Sigurdsson et al., 1996; Hall et al., 1996). An important proportion of smears with ASCUS had been recorded in women with underlying HSIL (Hall et al., 1996). In one academic medical Center, 9% of women with ASCUS at cytology smears were proven to harbor at biopsy a CIN II or CIN III lesion (Williams et al., 1997). Important intraobserver and interobserver variations are described with cytology smears (Cox, 1996). High-grade lesions can also escape detection by colposcopy-directed biopsies in up to 3% of women with abnormal smears (Sigurdsson et al., 1996).

False-positive rate estimates of cytology smears range from 7 to 27% (Cox, 1996) and could lead to excessive treatment or investigation. For each cytology smear result indicating an invasive cervical cancer, there is nearly one hundred smears demonstrating the presence of abnormal epithelial cells that could suggest the presence of benign, premalignant cervical or undetermined diseases (Franco, 1996). The introduction of the Bethesda classification of cytological smears led to an increase in the frequency of abnormal smears, because of the creation of the ASCUS category and expansion of the definition of low-grade lesions. Lack of understanding of management guidelines for ASCUS smears and the increased rate of

minor abnormalities have led to excessive diagnostic work-up and unnecessary treatment (Johnson et al., 1995; Cox, 1996).

Additional testing procedures are clearly needed to improve the sensitivity of cytology smears for primary screening of cervical cancer, but also to improve the specificity of screening programs and reduce costs of confirmatory procedures such as colposcopy. As discussed below, molecular methods for HPV detection offer a promising alternative (Cole, 1993; Reid and Lorincz, 1995) as screening tools to detect cervical precancerous and cancerous lesions undetected with Pap smears. A new generation of sensitive HPV detection tests that screen for a greater number of high-risk HPV types are being developed and evaluated. We will review the basis for HPV testing in the prevention of cervical cancer as well as assay formats that could prove useful for clinical and research use.

## **2. Etiology of cervical cancer precursors and cervical cancer**

### *2.1. Risk factors for cervical cancer*

Epidemiological investigations have demonstrated that cervical cancer is associated with sexual activity (Franco, 1995). Consistent markers of sexual activity are associated with cervical cancer: the number of sexual partners and the age at first intercourse of the women, as well as the past and present sexual behavior of the male partner(s) (Franco, 1996; Schiffman et al., 1995). Because of the strong association between smoking and sexual activity, the role of tobacco smoking has yet to be determined unequivocally (Franco, 1996), although *in vitro* experiments suggest a role as a cofactor (Yang et al., 1996). The same difficulty is encountered with demonstrating an effect for oral contraceptive use. Parity was found to be a risk factor for cervical cancer (Franco, 1996).

### *2.2. Role of HPV*

From the beginning, the strong association between sexual activity and cervical cancer suggested the implication of a sexually transmissible

agent (Stoler, 1996). Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted infectious agent in North America (Cole, 1993). HPV infection is a consistent and independent predictive factor for the presence of pre-invasive (Franco, 1995) and invasive cervical lesions (Schiffman et al., 1995). High relative risks of HPV infection for CIN and invasive cancer have been calculated from numerous studies performed on various populations (Schiffman et al., 1995; Franco, 1996, 1995; Schiffman, 1995). HPV infection precedes precancerous lesions. The rate of detection of HPV DNA increases with higher grades of precancerous disease and invasive cancer (Lorincz et al., 1990). Prospective studies strongly suggest that the presence of HPV DNA in smear-negative women indicates an increased risk of developing SIL and HSIL within a few years (Koutsky et al., 1992). High-risk HPV types (see below) are predictive of progression from LSIL to HSIL (Schiffman and Brinton, 1995). In vitro experiments have clearly demonstrated that HPV DNA from high-risk types transforms epithelial cells and the molecular events underlying the oncogenic potential of HPV have been well described elsewhere (Stoler, 1996).

### 3. Biology of human papillomaviruses

#### 3.1. Genomic organization of HPV

HPV infects the skin or mucosal epithelia causing latent, subclinical and clinical infections. The 7900 base-pair DNA genome is divided into a noncoding region, the upstream regulatory region (URR), an early region (E genes) involved in the transforming abilities of high-risk HPV types, and a late region (L genes) coding for structural proteins. Several of the viral gene products are generated through gene splicing. Areas of homology between HPV types are located mainly in the E1, E6 and L1 open reading frames (ORFs) (Roman and Fife, 1989) and allow for cross-hybridization reactions between types and consensus amplification with genomic amplification technologies.

#### 3.2. HPV typing

HPV typing is based on genetic relatedness measured by homogeneous reassociation kinetics studies between DNA strands or more recently, by alignment of DNA sequences of the L1 ORF. More than 70 HPV types infect humans and at least 30 types are preferentially found in the anogenital tract (de Villiers, 1994; Schiffman et al., 1995). Genital HPV types are classified into three categories based on their association with premalignant and invasive cancer. HPV types 16, 18, 45 (Lorincz et al., 1992; Richart and Wright, 1993; Reid and Lorincz, 1995) are considered high-risk oncogenic types since they are commonly detected in HSIL and invasive cancer lesions (Cole, 1993). HPV-6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 57, 66 are low-risk types mainly associated with condylomas or LSIL. HPV types 26, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 64, 68, and 70, are designated intermediate-risk since they are detected mostly in precancerous lesions and less often in invasive cancerous lesions (Schiffman et al., 1995).

#### 3.3. Detection of HPV in genital lesions

The prevalence of HPV infection measured with polymerase chain reaction (PCR) exceeds 90% in cases of SIL (Melbye et al., 1996). A study conducted in 22 countries disclosed that nearly 95% of invasive cervical cancer contained HPV DNA (Bosch et al., 1995), HPV types 16, 18, 31, and 45 encompassing over 80% of types implicated. Although HPV-16 is the most frequently detected type in invasive cancer and HSIL (50–70% of cases), it can also be detected in women without cervical lesion (Cole, 1993; Schiffman et al., 1995). HPV DNA detection is correlated with measures of sexual activity (Franco, 1996; Schiffman et al., 1995), especially for high-risk types (Franco et al., 1997). Other predictors of HPV infection include parity, age, oral contraceptive use and smoking (Schiffman et al., 1995). The decreased prevalence of HPV infection after age 30 is independent of sexual activity and could be related to the development of an efficient immune response (Burk et al., 1996).



### 3.4. Natural history of HPV infection

The prevalence of HPV infection varies from 5 to 30% in sexually active women (Schiffman et al., 1995; Rozendaal et al., 1996). In nearly one third of infected women, more than one type is detected when PCR assays are used (see below) (Schiffman et al., 1995). Most genital HPV infections are transient (Cole, 1993; Evander et al., 1995; Hildesheim et al., 1994). The three-fold increase in risk to develop CIN in HPV-16-seropositive women (Chua et al., 1996) (a measure of past and present infection) is much lower than the 180-fold increase in risk found with HPV-16 DNA detection (a measure of present infection), suggesting that most infection with HPV-16 are transient and eliminated before the development of CIN. In situations where infection persists, HPV induces low-grade lesions in one to two years after primary infection (Schiffman, 1995; Schneider, 1994).

## 4. Risk factors for progression of HPV disease and development of cancer

A minority of HPV-infected women will develop cervical cancer (Cox, 1996). Several viral, host and environmental factors can predict progression of HPV-induced lesion from precursor diseases to higher grade lesions.

### 4.1. HPV type

In women with SIL, infection with high-risk HPV types is predictive of progression to higher grade lesions as opposed to low-risk types (Schiffman et al., 1995; Rozendaal et al., 1996). A cohort study performed on women attending an STD clinic demonstrated that infection with high-risk HPV types was a risk factor for developing CIN II or III lesions (Koutsky et al., 1992). In the latter study, the cumulative incidence of CIN reached 28% for HPV-infected women as compared with 3% for HPV-uninfected women. More than one third of women infected with HPV-16 or -18 developed high-grade CIN lesions.

### 4.2. HPV viral load

The level of viral DNA correlated in cross-sectional studies with the grade of HPV-induced lesions (Schiffman et al., 1995; Cox et al., 1995; Schneider et al., 1996). Persistently high viral load infections are also a determinant of persistent cervical dysplasia (Ho et al., 1995).

### 4.3. HPV persistence

As demonstrated in prospective studies, persistence of HPV infection is associated with progression of HPV-induced disease (Schiffman et al., 1995; Ho et al., 1995; Schiffman, 1995; Remmink et al., 1995; Cole, 1993; Londesborough et al., 1996). Future studies will need to elucidate the determinants of persistence of HPV infection.

### 4.4. HPV expression

Non-isotopic hybridization assays and PCR tests have demonstrated that expression of the E6 and E7 ORFs occurs in low-grade and high-grade lesions while the E2 ORF is expressed only in low-grade lesions (Coutlée et al., 1991a; Daniel et al., 1995). A significant correlation can be found between the level of expression of E6 and CIN grade (McNicol et al., 1995). The level of expression of HPV may be a marker of risk for progression, but further studies are needed to delineate its utility.

### 4.5. HPV integration

DNA molecules from high-risk HPV types remain episomal in low-grade lesions but are mostly integrated in the human genome in invasive tumors (Cullen et al., 1991; zur Hausen, 1991; Daniel et al., 1995). Integration may disrupt the E2 ORF, resulting in uncontrolled production of E6 and E7 oncoproteins (Cole, 1993; Stoler, 1996). Integration of HPV-16 was shown to precede microinvasion in high-grade dysplasia (Daniel et al., 1995).

### 4.6. Cofactors

HPV transforms human epithelial cells but requires a second oncogene for tumorigenicity

(Guibinga et al., 1995). Additional factors could be involved in the genesis of invasive cancer since the prevalence of HPV infection is much higher than cancer. Host genetic factors need to be studied. HLA alleles have been associated with invasive cancer (Schiffman et al., 1995). The increased risk conferred by lifetime number of sexual partners still remains after controlling for HPV status (Schiffman et al., 1995): this could be related to false-negative HPV results or to other sexually transmitted diseases (STDs) acting as cofactors. Other viral agents, tobacco, oral contraceptive and immunosuppression (Guibinga et al., 1995; McDougall, 1994; Schiffman et al., 1995), could play the role of cofactors.

## 5. Analysis of HPV DNA in clinical specimens

### 5.1. Specimens suitable for DNA analysis

Several sampling methods of genital specimens have been used for HPV detection. In situ hybridization on biopsies correlates with the detection of HPV DNA with histopathology, but is not representative of the entire cervical epithelium. Superficial epithelial cells from a large area of the uterine cervix are collected with cervical scrapes. Cervical scrapes or swabbing are standard procedures for the investigation of genital STD. Cells obtained with a cytobrush from the endocervix and transformation zone, a site where HPV-related diseases develop preferentially, may be more appropriate. Cervicovaginal lavage (Burk et al., 1986; Ritter et al., 1988; Morrison et al., 1992a; Vermund et al., 1989; Goldberg et al., 1989) collects cells from the external cervix, endocervical cells being shed into the posterior fornix and vaginal epithelial cells, and is often considered as the best sampling mean to obtain material for HPV analysis when multifocal viral lesions are suspected. Cervicovaginal lavage specimens were shown to reflect results on concurrent cervical biopsies for HPV status (Brown et al., 1996) using the Hybrid capture (see below). Of the 18 women with positive biopsies for HPV DNA, 14 had concurrent lavages containing HPV. In another

study, collection of cells with a cytobrush was more efficient than cervicovaginal lavages for HPV detection with Hybrid capture (Hall et al., 1996).

However, the collection of these specimens requires the performance of a gynecological examination. Sampling methods for HPV detection in genital secretions that do not require a speculum-assisted examination would facilitate mass-screening of underserved populations. Non-invasive sampling in wide-scale epidemiological and natural history studies of HPV infection could reduce the selection bias introduced by refusal to participate because of pelvic examination. Vaginal tampon specimens represent an easy self-administered non-invasive sampling method (Fairley et al., 1992). Almost 90% correlation was found between vaginal tampon and cervical samples in two studies for HPV DNA detection (Fairley et al., 1992; Coullée et al., 1997a). In one study (Coullée et al., 1997b), 93.9% of cervical HPV infection could have been confirmed with PCR using vaginal tampon specimens alone.

Complete concordance using PCR between self-administered and physician-administered cervicovaginal lavage was shown in one study, but patient compliance was low (Morrison et al., 1992b). Detection of HPV DNA in vulvar or self-administered vaginal swabs has also been found to correlate with results obtained with cervical scrapes in nearly 90% of women (Bauer et al., 1991; Moscicki, 1993). Urine can also serve as a non-invasive sample for HPV analysis when using PCR (Vossler et al., 1995). The high concordance between cervical and non-invasive sampling means could be explained by contamination of samples with vaginal cells, shedding of cervical cells or by the presence of multicentric HPV infection. Differences in the detection rates and typing of HPV DNA between non-invasive and invasive sampling methods could be explained in part by differential viral shedding, localized HPV infection, incomplete sample collection. Definitive determination of the utility of non-invasive samples necessitates prospective evaluations of their predictive value for disease progression or persistence of HPV infection.

### 5.2. Diagnostic methods for identification of HPV-infected individuals

The importance of using adequate HPV detection methods was illustrated by misclassification of HPV status in several studies that failed to demonstrate the association between markers of sexual activity and HPV infection (Franco, 1992). The development of HPV tests for clinical use is complicated by the important number of high-risk HPV types implicated, and by the fact that HPV is often a low viral load infection requiring sensitive assays. We will review the advantages and drawbacks of methods available for HPV detection as well as their potential application.

HPV can not be easily isolated in cell culture. Although serology identifies individuals that are or were infected with HPV (Reid and Lorincz, 1995), the risk to develop CIN in HPV-16-seropositive women (Chua et al., 1996) is much lower than the risk measured with HPV DNA detection. Serology is an interesting epidemiological tool with less potential for clinical diagnosis at present. Serological tests are not actually commercialized and standardized. The diagnosis of current HPV infection essentially relies on methods detecting HPV DNA or RNA in clinical specimens. The assay formats available for nucleic acid analysis include direct nucleic acid testing, signal-amplification methods and nucleic acid amplification assays.

### 6. Direct DNA detection techniques

The principles of direct hybridization tests are well presented in several review articles (Reid and Lorincz, 1995; Lorincz (1996)). In situ hybridization is less sensitive than other hybridization assays but localizes HPV DNA to cells or lesions within tissues. It is also a good method for HPV analysis on paraffin-embedded specimens (Reid and Lorincz, 1995) and helps to confirm the presence of low-grade lesions in equivocal biopsies (Lorincz (1996)).

Filter-based hybridization assays have been used extensively in HPV research. Southern and

dot blots are fastidious and lengthy procedures that are not readily applicable to diagnostic laboratories, often require large amounts of DNA and utilize radioactive probes. Once considered the gold standard for HPV research, Southern blot has now been replaced by the polymerase chain reaction (PCR) assays for this purpose (see below). The dot blot ViraPap/ViraType test (Digene diagnostics, Silver Spring, MD) was licensed for diagnostic purposes, but could only detect a limited number of HPV types (Reid and Lorincz, 1995). It is now replaced by the Hybrid capture system (see below).

### 7. Signal-amplification method for DNA detection

Signal-amplification tests can detect lower quantities of DNA or RNA than direct methods by amplifying the detection signal without modifying the initial amount of nucleic acids contained in samples. Two test formats use signal-amplification: branched DNA assays (Wolcott, 1992) and enzyme immunoassays (EIA) for DNA-RNA hybrids (Coutlée et al., 1989, 1990, 1991a; Reid and Lorincz, 1995). The Hybrid Capture System HPV DNA detection test (Hybrid capture, Digene diagnostics, Silver Spring, MD) belongs to the second category and is one of the best candidate of available HPV tests for diagnostic purposes. In this assay, exfoliated cells are treated with sodium hydroxide to hydrolyze RNA and denature DNA. Processed samples are hybridized in solution with two mixtures of non-isotopic single-stranded long RNA probes (Reid and Lorincz, 1995): one for low-risk types 6, 11, 42, 43, 44, and one for high-risk types 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56. Homogeneous hybridization reactions are faster especially with single-stranded probes and are more easily used in diagnostic laboratory compared with filter-based assays. Hybridized products are transferred into tubes coated with an antibody which recognizes specifically DNA-RNA hybrids but is not dependent on base sequence or composition. Bound hybrids are quantitated with the addition of a monoclonal antibody against DNA-RNA hybrids labelled with alkaline phos-

phatase, and a chemiluminescent substrate (dioxetane). The emission of light is measured as relative light units in a luminometer. The intensity of light emitted is proportional to the quantity of bound hybrids. A specimen is considered positive if its reactivity is at least that of the positive control (100 000 copies of HPV DNA).

### *7.1. Analytical and clinical performance of hybrid capture*

The analytical sensitivity of Hybrid capture reaches 50 000 HPV-16 DNA copies (Reid and Lorincz, 1995; Cavuslu et al., 1996). Hybrid capture has a coefficient of variation below 5%. Several studies have evaluated the sensitivity and specificity of Hybrid capture against histological diagnosis or PCR (Schiffman et al., 1995; Sun et al., 1995a; Nindl et al., 1995). Studies have mainly recruited women referred to colposcopy clinics for abnormal cytology smears. Cervical swabs (Sun et al., 1995a) and cervicovaginal lavage specimens (Schiffman et al., 1995) were evaluated with hybrid capture. As expected, hybrid capture was less sensitive than nucleic acid amplification techniques in genital specimens (Sun et al., 1995a; Shah et al., 1997; Cavuslu et al., 1996; Schiffman et al., 1995) and anal samples (Melbye et al., 1996). Hybrid capture was compared with L1 PCR assay using a method with low sensitivity for detection of amplified products (Sun et al., 1995a). Overall, HPV was detected in 69% of samples with PCR and 61% with hybrid capture. HPV positivity rates were similar for women with high-grade lesions (79% versus 83% for PCR). 92% of samples containing HPV with this suboptimal PCR method were positive by hybrid capture (Sun et al., 1995a). The significance of detecting by PCR low viral load infection for clinical purposes still needs to be determined. HPV DNA was detected by hybrid capture in 75–80% of women with biopsy-confirmed low-grade or high-grade cervical lesions (Sun et al., 1995a; Schiffman et al., 1995; Nindl et al., 1995). False-negative results of hybrid capture could be explained in part by the absence in the probe pool of RNA probes for some types such as HPV 58 and 39 (Schiffman et al., 1995).

PCR detected the presence of high-risk HPV types in 80% of samples positive by hybrid capture for high-risk types (Schiffman et al., 1995). Discordant results between these two methods could be partially explained by an underestimation of the presence of HPV-51 by the PCR assay used (Schiffman et al., 1995). In a recent comparison of PCR and hybrid capture, the sensitivity of PCR and Hybrid capture to detect cytological abnormalities were 89% and 43%, respectively (Shah et al., 1997). However, the specificity of hybrid capture was much higher (93% vs. 48%). It may be that the high threshold of molecular sensitivity of Hybrid capture increases the specificity of positive tests for detection of disease. In one comparative cross-sectional study, the specificity of hybrid capture to detect cervical disease reached 83.6% as opposed to 50.9% for PCR (Melbye et al., 1996). These results were obtained with immunosuppressed women and cannot be generalized since the performance of Hybrid capture may be increased because of the presence of higher viral load infections due to a defective immune system.

The interlaboratory reliability of a prototype hybrid capture assay was evaluated by independent laboratories (Schiffman et al., 1995). The accuracy of the participating laboratories ranged from 83 to 92%. The percent agreement between laboratories scored from 87 to 94%, ( $\kappa$  values: 0.61–0.83). Agreement on positivity between institutions was lower (48–78%). Discordant results were not near the cut-off value.

## **8. Clinical application of signal-amplification tests**

The clinical utility of HPV testing is still a subject of controversy at present (Stoler, 1996). Since various screening procedures for cervical cancer (cytology, colposcopy and HPV testing) can be combined differently according to the clinical situation, Jenkins analyzed with a stochastic model (Jenkins et al., 1996) the impact of using HPV tests in clinical practice. Three strategies were compared. The first approach was the recommended policy in the United Kingdom of periodic cytology testings supplemented by

colposcopy if LSIL persists. The second strategy combined cytology testing with HPV testing for women with initial LSIL results: colposcopy was done for women with persistent high-risk HPV infection. In the third approach, HPV testing and cytology were performed routinely for all women: the decision to refer women to colposcopy was dependant upon results of cytology and HPV testing (intensive clinical management was chosen for women with higher grade anomalies or women with milder anomalies but persistent infection with HPV). The author found the first two strategies to implicate similar resources. In his model, HPV testing for women with low-grade anomalies at cytology had little impact on the incidence of invasive cancer compared with the first strategy. The author demonstrated that if HPV tests could be adapted to a self-test format and increase target population coverage, then the impact of HPV testing on the incidence of invasive cancer would be greater. Use of non-invasive samples could facilitate their application.

Recent technological developments have greatly improved HPV testing. Their application in clinical practice can be foreseen especially in selected populations of women. We will discuss areas of application as well as potential pitfalls of signal-amplification-based HPV testing in primary screening of cervical cancer, in secondary screening in the triage of women with LSIL, in the evaluation of biopsy that are difficult to interpret and in quality assurance (Cox, 1996).

#### *8.1. Primary screening of cervical cancer*

Signal-amplification HPV assays could be considered as alternative tests to current screening strategies. Also, HPV testing combined with cytology could decrease the risk of missing HSIL or cancer, and increase the negative predictive value of screening for SIL (Cox, 1996). By observing negative results in both tests, one could extend the time interval between screening opportunities. Patient populations known to have a poor compliance to medical treatment or follow-up could benefit the most from the addition of HPV testing in primary screening strategy.

The value of hybrid capture in primary screening was investigated in a cohort study of 967 women (Schneider et al., 1996) with previous normal smears (Table 2). Women were screened concurrently with cytology smear, cervicography and hybrid capture. High-risk HPV types were detected in 50% of women with CIN II and III. The use of hybrid capture adopted as a primary screening tool resulted in increased costs as opposed to the standard clinical practice.

The rate of false-negative cytology results increases with age (Cox, 1996). Infection in older women may also more often represent persistent HPV infection, which could increase the positive predictive value of HPV testing. Hybrid capture may thus be more useful in women older than 30 years of age. Primary screening with Hybrid capture introduces the issue of management of HPV-positive women with normal cytology smears. The knowledge of being infected by an oncogenic virus will induce emotional distress in patients, especially in view of scanty data on the evolution of subclinical HPV infections. Reliable markers to predict progression are still lacking and could prove useful since most lesions will regress without treatment. Prospective studies that will help further define additional factors predictive of disease are required before any recommendation can be made. More data is needed to evaluate the role of HPV testing as a primary screening tool in the general population and in older women.

#### *8.2. HPV testing in secondary screening*

The management of women with high-grade lesions is widely accepted while that of minor cytological abnormalities remains controversial (Ferency, 1993). LSIL represents a heterogeneous group of lesions in terms of clinical evolution (Cole, 1993). LSIL may often revert to normal (Schiffman, 1992). LSIL could also represent misdiagnosis (Cox, 1996). Further investigation of these 'false-positive cases' is costly. However, low-grade lesions on smears sometimes hide a more aggressive disease, since 5–20% of women with borderline or low-grade change smears have high-grade disease at colposcopy (Wright et al., 1995; Cox, 1996).

Table 1  
Value of HPV DNA detection assays as secondary screening tests for women referred to colposcopy because of ASCUS

| Study   | No. of women | Method    | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%)        | NPV (%) |
|---|--------------|-----------|-----------------|-----------------|----------------|---------|
| 1. Cox et al. (Cox et al., 1992)                  | 137          | VP        | 66              | 79              | — <sup>a</sup> | —       |
| 2. Wright et al. (Wright et al., 1995)            | 181          | VP        | 59              | 65              | —              | —       |
|   |              | Pap       | 77              | 63              | —              | —       |
|   |              | VP or Pap | 93              | 41              | —              | —       |
| 3. Hatch et al. (Hatch et al., 1995) <sup>b</sup> | 44           | HC        | 60              | 68              | 35             | 85      |
| 4. Cox et al. (Cox et al., 1995)                  | 217          | HC        | 86              | 71              | 47             | 94      |
|   |              | Pap       | 60              | 77              | 44             | 87      |
|   |              | HC or Pap | 90              | 58              | 39             | 95      |

VP is for Vira Pap.

HC is for Hybrid capture.

Sensitivity and specificity to predict the presence of CIN lesions at biopsy unless stated otherwise.

PPV is for positive predictive value.

NPV is for negative predictive value.

<sup>a</sup> Means not calculated.

<sup>b</sup> Sensitivity and specificity calculated for the presence or absence of high grade CIN on biopsy.

Potential areas of application of HPV testing include the identification of women with initial smears showing LSIL or ASCUS at risk of having or developing higher grade disease (Jenkins et al., 1996), and the selection of women who could benefit the most from a closer follow-up or colposcopy. HPV testing could also help to classify borderline lesions into benign reactive atypia and condylomatous atypia. However, the impact on clinical care of HPV status still needs to be clarified and no consensus has emerged yet. The value of direct HPV testing (ViraPap/ViraType) to identify women with LSIL at risk of developing higher grade lesions (Cox et al., 1992) was investigated on 482 women referred to colposcopy because of a previous smear with LSIL or ASCUS (Table 1 and Table 2). For women with cytological evidence of LSIL, a positive ViraPap/ViraType test for HPV detection was not associated significantly with the presence of CIN on histology, although HPV results did improve the identification of cervical lesions in women with indeterminate smears. However, CIN was encountered in one third of HPV-negative women with this technique. In another study (Sigurdsson et al.,

1996), 100 women referred to colposcopy for an abnormal cytological smear were evaluated with ViraPap/ViraType, PCR as well as Pap smears. The follow-up period was extended to 5 years. The sensitivity of high-risk HPV detection with ViraPap for the presence of CIN II–III lesions at colposcopy reached 72%. The most relevant studies for the clinical use of HPV testing in secondary screening have used a commercially available test, the Hybrid capture, to identify women with HSIL or cancer undetected with cytology. Several studies demonstrated that the detection of high-risk HPV DNA in cervical specimens from women referred to colposcopy correlated with the presence of high-grade lesions at biopsy. (Hatch et al., 1995; Hall et al., 1996; Cox et al., 1995; Wright et al., 1995).

A study (Hatch et al., 1995) using Hybrid capture was conducted on 311 women referred to a colposcopy clinic because of abnormal Pap smears (Table 1 and Table 2). Unfortunately, hybrid capture failed to detect clinically relevant disease of the uterine cervix. Nearly 50% of the women with cervical cancer were HPV-negative. Of the 38 women with LSIL on Pap smear and

Table 2  
Value of HPV DNA detection assays as secondary screening tests for women referred to colposcopy because of SIL

| Study   | No. of women | Method    | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV            | NPV |
|---|--------------|-----------|-----------------|-----------------|----------------|-----|
| 1. Cox et al. (Cox et al., 1992)                          | 345          | VP        | 63              | 55              | — <sup>a</sup> | —   |
|   |              | Pap       | 44              | 92              | —              | —   |
|   |              | VP or Pap | 78              | 79              | —              | —   |
| 2. Wright et al. (Wright et al., 1995)                    | 217          | VP        | 80              | 68              | —              | —   |
|   |              | Pap       | 73              | 72              | —              | —   |
|   |              | VP or Pap | 92              | 33              | —              | —   |
| 3. Hall et al. (Hall et al., 1996) <sup>c</sup>           | 151          | HC        | 93              | 30              | —              | —   |
|   |              | Pap       | 87              | 30              | —              | —   |
|   |              | HC or Pap | 100             | 20              | —              | —   |
| 4. Ferenczy et al. (Ferenczy et al., 1996) <sup>b,c</sup> | 364          | HC        | 75              | 64              | 37             | 90  |
|   |              | Pap       | 88              | 57              | 37             | 94  |
|   |              | HC or Pap | 95              | 47              | 34             | 97  |
| 5. Schneider et al. (Schneider et al., 1996) <sup>b</sup> | 967          | HC        | 50              | 96              | 32             | 98  |
|   |              | HC or Pap | 58              | 92              | 23             | 98  |
| 6. Hatch et al. (Hatch et al., 1995) <sup>b,c</sup>       | 311          | HC        | 73              | 51              | 59             | —   |
|   |              | Pap       | 76              | 57              | 58             | —   |
|   |              | HC or Pap | 92              | 43              | 55             | —   |

See legend in Table 1.

<sup>a</sup> Means not calculated.

<sup>b</sup> Sensitivity and specificity calculated for the presence or absence of high grade CIN and cancer on biopsy.

<sup>c</sup> Calculations were presented for women with SIL or ASCUS at cytology.

high-grade lesions on histology, 29 (47%) were HPV-positive. An important number of HPV-positive women had only low-grade lesions at colposcopy. In another study performed on a similar patient population, sensitivity of cytology and ViraPap for detecting CIN I or II were similar with a slight advantage for HPV testing (Table 1 and Table 2) (Wright et al., 1995). Another study (Hall et al., 1996) correlated the presence of HPV DNA measured by Hybrid capture with colposcopy results from 151 women referred because of abnormal smears (ASCUS or LSIL). The majority of the women recruited in that study harbored high-risk HPVs. The viral load estimated with Hybrid capture was low for disease-free women and scored over a wide range of reactivities for women with disease. High-risk HPVs were detected in 93% of women with HSIL but also in 39% of women without disease. Since women infected only with low-risk HPV types did not have high-grade lesion, these women could have avoided colposcopy. This study illustrates the

poor specificity of HPV testing for detecting CIN in populations with a high prevalence rate of HPV infection.

The significance and management of women with ASCUS smears are unclear. Some clinicians refer to colposcopy women with ASCUS smears to rule out serious underlying lesions. A better identification of women at risk of CIN with HPV testing could reduce the burden imposed on colposcopist by these referrals. One study focused on the value of Hybrid capture in the triage of 217 women with a cytological diagnosis of ASCUS (Table 1) (Cox et al., 1995). Most of the participants were between 18 and 22 years of age. The only HPV-negative CIN II lesion harboured an HPV type not contained in the probe mixture of Hybrid capture. The quantity of viral DNA measured with Hybrid capture correlated with the presence of CIN disease. Although Hybrid capture had a sensitivity of 86% to detect CIN (Table 1), it had a sensitivity of 93% to detect CIN II or III lesions in comparison to a sensitivity of 73% for

cytology. A combination of both tests identified all women with CIN II or III. The authors concluded that HPV testing would have substantially reduced referral to colposcopy in young sexually active women. In another study, the sensitivity of HPV DNA testing to detect CIN lesions in women with ASCUS smears was inferior to that of the repeat cytology smear (Wright et al., 1995), while its performance was superior to cytology for LSIL smears (Table 1 and Table 2). Because of discrepancies between studies, more studies recruiting women with ASCUS are needed to determine the exact figure of efficiency of these screening strategies.

From the various studies on hybrid capture, we can estimate that the sensitivity of HPV DNA testing was higher than cytology and ranged from 50 to 93%, while the specificity ranged from 30 to 96% for the detection of CIN lesions (Hall et al., 1996). The application of Hybrid capture on liquid-based cytologic samples was evaluated recently (Ferenczy et al., 1996) for secondary screening on 364 women (mean age of 33 years old) referred to colposcopy for abnormal smear results. Liquid-based cytology offers the advantage of testing the residual material with Hybrid capture. To reduce costs and increase specificity for significant lesions, only high-risk HPV types were screened. Results obtained were similar to previous studies (Table 2).

In several studies, the combination of cytology and HPV DNA testing seemed to improve the sensitivity for detecting cervical lesions (Herrington et al., 1995; Cox et al., 1992; Sigurdsson et al., 1996; Hall et al., 1996; Wright et al., 1995; Cox et al., 1995; Ferenczy et al., 1996). One group compared the sensitivity of combination of cytology results with HPV testing for detection of lesion and the sensitivity of combining cytology with an hypothetical random adjunct test, assuming that the latter test yielded the same prevalence rate of positive results than HPV testing (Ferenczy et al., 1996). The sensitivity of cytology with HPV testing was equivalent to the combination of cytology with hypothetical random adjunct test. However, the specificity of the combination of HPV testing with cytology was significantly better.

One drawback of studying the value of tests in cross-sectional studies relates to the fact that recruited women may have had disease for a longer period of time, resulting in higher viral loads than the general population in the context of routine annual examination. This introduces a bias in favor of the test which has to be considered if one wants to apply these figures to primary screening. Better HPV tests could reduce the need to perform colposcopy in women with LSIL under specific circumstances. However, such decision will depend on the target population since the predictive values of HPV tests vary with the prevalence of HPV types in the community (Hatch et al., 1995). Other potential factors that could increase the identification of women at risk of higher grade disease should be defined, as well as the value of serial testings. Viral load could also be an important variable to predict the presence of CIN in women with low-grade lesions (Cole, 1993; Hall et al., 1996; Cox et al., 1995).

### *8.3. Cost-effectiveness of HPV testing in secondary screening*

The cost-effectiveness of repeating cytology smears or using Hybrid capture in a triage protocol to select women with low-grade cytological anomalies at risk for higher grade lesions and requiring colposcopy, was analyzed on 398 women (Wright et al., 1995). The combination of cytology and Hybrid capture to detect CIN had a sensitivity of 92%. The performance and cost of colposcopy on all women with low-grade anomalies was equivalent to the triage with HPV testing plus cytology, due to the lack of specificity of Hybrid capture. Still 71% of women would have had colposcopy using HPV testing. The lowest cost procedure was to repeat the smear and perform colposcopy if abnormal. The cost of colposcopy to all women with LSIL would have been similar to triaging with HPV DNA to select women for colposcopy.

### *8.4. Prognostic value of HPV testing*

An area of interest for HPV testing would be the identification of women with low-grade lesions



at risk of developing higher grade disease in the future. If the positive predictive value of HPV testing was good, HPV positive women could be offered a closer follow-up. The studies presented above were cross-sectional studies. In cross-sectional studies, some women identified as CIN I or with borderline lesions at biopsy may evolve into higher grade lesions in the near future. Nevertheless, a positive HPV test could still be considered at the time of screening as a false-positive result. Long term implications of tests performed once in evolving diseases need to be considered. To determine the value of HPV diagnostic tests to identify women with LSIL or normal smears at risk of developing HSIL, consecutive samples could prove to be a better predictor of disease. In a cohort of 145 HPV-positive and 69 HPV-negative women (Stellato et al., 1992), colposcopy and HPV testing (ViraPap test) were repeated at 4 month intervals. At inclusion, 65% of HPV-positive women had a normal cytology smear. Only 57% of the HPV-infected women remained infected. Cytological changes and histologically-confirmed CIN were encountered mainly in women persistently infected with high-risk HPV types.

#### 8.5. Classification of borderline smears

HPV testing could also help pathologists to classify smears as ASCUS or LSIL. In doubt, there is a tendency to overdiagnose LSIL under those circumstances (Stoler, 1996), which could lead to overtreatment. Patients could also be wrongly informed that they are infected by a sexually transmissible agent. This information could have a profound impact on patients and relationships with partner(s). Considering the sensitivity of current HPV tests, it seems unwise at present to reassure HPV-negative patients with borderline smears.

#### 8.6. Other potential applications of Hybrid capture

Women with acetowhite lesions and negative biopsies were found to be at risk to develop CIN lesions if positive for HPV DNA using Southern

blot and PCR (Cole, 1993). Fifty-five percent of women with indeterminate histology and HPV infection can have biopsy-proven CIN on repeat biopsy against only 11% in the HPV-negative group (Cole, 1993). In situ hybridization for HPV detection is not sensitive enough in this population of patients (Cole, 1993). The application of Hybrid capture and PCR in this setting could be further evaluated in trials. The use of HPV testing for quality control of cytology smear interpretation has been suggested (Cox, 1996). The expected rate of oncogenic HPV types within each diagnostic group is known and could be compared with rates obtained by diagnostic cytopathology laboratories.

#### 8.7. The future of signal amplification tests

As explained above, the first version of Hybrid capture did not produce optimal results because of the sensitivity endpoint of the assay. The benefit of applying this test in clinical practice is difficult to demonstrate. However, proponents of Hybrid capture claim that several recently introduced improvements allow to detect as few as 1000 molecules per reaction. This sensitivity endpoint, located between the sensitivity level of PCR and previous Hybrid capture test, would seem to be the best compromise to detect significant HPV infection and still avoid detection of irrelevant low viral load infections. Microtiter plates now replace tubes and are more practical for diagnostic laboratories. Several new probes are included for high-risk types 39, 58, 59, 68. The clinical value of the late version of Hybrid capture will need to be studied especially in women with low-grade cytological anomalies. If the sensitivity level of 1000 copies is maintained in clinical trials, then the test will be of value in clinical decision making.

### 9. Nucleic acid amplification for HPV DNA detection

#### 9.1. Genomic amplification for HPV diagnosis

The principles of PCR and ligase chain reaction assays have been described extensively in various articles (see ref. Wolcott, 1992). Type-specific

PCR tests are not practical means for detecting HPV infection in clinical specimens because of the important number of types involved in human pathology. Consensus PCR assays amplify several relevant HPV types in one amplification reaction. Subsequent typing is accomplished with specific oligonucleotide probes and sometimes by restriction fragment length polymorphism or sequencing. Two consensus PCR assays have been mainly used in epidemiological studies: the MY09-MY11 and the GP5-GP6 primer pairs. Both target the L1 gene and simultaneously amplify several genital HPV types. The GP5-GP6 assay can detect at least 19 different genotypes (van de Brule et al., 1990) including types 43 and 44 that are less efficiently detected by MY09-MY11. Biotin-labelled amplicons can be detected in microtiter-plates with the GP5-GP6 system (Jacobs et al., 1997) with an analytical sensitivity of 10 to 200 copies depending on the type tested. MY09-MY11 consensus HPV PCR is the most widely used PCR assay for HPV, is well standardized and has been validated on clinical samples (Bauer et al., 1991; Ley et al., 1991; Resnick et al., 1990; Ting et al., 1990; Schiffman et al., 1993; Hildesheim et al., 1994; Bosch et al., 1995). Although it detects as little as ten copies of viral DNA from frequently encountered genital types, it demonstrates a variable amplification efficiency for several types (Goldsborough et al., 1992). Non-isotopic detection of amplified products facilitates the use of this consensus test for large-scale testing (Manos et al., 1989; Bauer et al. (1992), Coutlée et al., 1995). Consensus PCR tests are complex and less readily adaptable to diagnostic laboratories. None of the consensus PCR test is commercialized and standardized for routine clinical use.

The rate of detection of HPV is usually two to three times greater with amplification assays than direct techniques (Schiffman et al., 1995). The increased sensitivity of PCR is less obvious in immunosuppressed women (Melbye et al., 1996). In one study recruiting HIV-infected and uninfected women, sensitivity of Hybrid capture and PCR was similar to detect cervical disease (88.9 vs. 93.3%). These results were mainly accounted for by the group of HIV-infected women for whom the sensitivity of both tests reached 100%.

However, the positive predictive value of Hybrid capture was twice that of PCR (43.2 vs. 20.6%). The clinical usefulness of the extreme level of sensitivity reached with PCR is unknown, since viral load is a determinant of HPV-induced lesion. Prospective follow-up studies will allow to determine the predictive value of detecting small quantities of HPV DNA in clinical specimens. Persistence could prove to be a good predictor irrespective of the viral load.

Gene amplification is also prone to false-positive reactions due to contamination or to false-negative tests because of the presence of DNA degradation in sample or amplification inhibitors (Namkoong, 1995; Coutlée et al., 1991b). The problem of contamination is no more an impediment to clinical applications of PCR, since several PCR tests for various infectious agents have been devised and are currently applied in diagnostic laboratories. Procedures to control contamination are well described (Coutlée et al., 1991c). The presence of inhibitors can also be monitored by coamplification of an internal control and the quality of DNA can be evaluated by coamplification of a human gene.

## 9.2. *Clinical evaluation of PCR*

Cuzick et al. investigated the value of detecting HPV types 16, 18, 31, and 33 with PCR to screen women for cervical diseases. 2009 women were screened with a prevalence of 4% of CIN II and III lesions (Cuzick et al., 1995). Seventy-five percent of these cases were detected with PCR for HPV detection as opposed to 56% by cytological smears. Nearly half of the falsely-negative cytology smears were positive for HPV while only one fourth of HPV-negative women had abnormal cytology results. HPV testing could thus complement but not replace cytology smears (Cuzick et al., 1995).

PCR was applied to a cohort of 1622 women followed for a mean of 40 months with triannual screening (Rozendaal et al., 1996). This study evaluated the predictive value of the presence of HPV for the development of CIN III among women with normal initial smears. Of the HPV-

positive participants, 7% developed CIN III, 2% CIN II, 2% CIN I and 8% had transient anomalies, while only 0.1% of the HPV-negative women developed CIN III lesions. The unadjusted odds ratio for CIN III reached 115 for women infected with high-risk HPVs. This study suggested that women with a normal smear and a negative PCR test for HPV could need less frequent screening while those with a normal smear but positive HPV test could be followed more regularly. However, PCR alone failed to detect CIN II–III in two out of ten women.

In opposite to these encouraging results, one study compared the sensitivity of various PCR tests and Hybrid capture for HPV detection in invasive cervical cancer specimens (Sun et al., 1995b). HPV was detected in at least one assay in 90% of cases, but at best in 70% of cases using only one PCR test and 63% of cases with Hybrid capture alone. The authors argued that the actual HPV tests, even using PCR, will not replace cytological smears. Considering these results, PCR assays can not be applied yet for clinical purposes.

### 9.3. Research applications of PCR

PCR is the most powerful tool to investigate risk factors for HPV infection or cancer in epidemiological studies. The natural history of HPV infection has been more clearly defined with PCR. Most of the key studies on the role of HPV in cervical cancer have used PCR. This methodology has permitted to minimize misclassification of HPV status that confused the scientific community on the role of HPV in cervical cancer (Franco, 1992). Consensus PCR not only allows for the detection of most genital HPV types with great sensitivity but also permits variant analysis of frequently encountered types in persistent infection. Variant analysis is an important tool in the follow-up of persistent HPV infections, helping to distinguish them from transient infections with different variants of the same HPV type (Franco et al., 1994). PCR also allows for the discovery and characterization of novel HPV types (Manos et al., 1994). By including a reverse transcriptase step, the analysis of expression of HPV in clinical specimens can be accomplished

with PCR (Czeglédy et al., 1995; Rose et al., 1995; Hsu and McNicol, 1992; Cornelissen et al., 1990). PCR is now the gold standard test in research for the analysis of HPV infection.

A semiquantitative PCR method suggested that measurement of viral load by PCR could improve the clinical utility of this test (Morrison et al., 1992a). Quantitative PCR assays however require to control for amplification efficiency and sample inhibition with an internal control. Without an internal control, PCR assays are considered semiquantitative and can not be reliably used to evaluate the HPV viral load contained in clinical samples. A low-stringency PCR assay demonstrated the qualities of quantitative PCR test (Cabalero et al., 1995).

## 10. Conclusions

The availability of powerful non-radioactive methods for HPV diagnosis has allowed the evaluation of the potential role of HPV testing in clinical practice. The sensitivity of Hybrid capture needs to be improved (Nindl et al., 1995). A novel version of this test could prove more useful for clinical application. In most of the evaluations completed so far, the populations studied were highly selected. These assays have not been evaluated in populations at lower risk for significant HPV infection and thus, with a lower viral load. Several evaluations have also tested stored rather than freshly obtained specimens. HPV detection assays will have to be tested in general diagnostic laboratories with less expertise in DNA testing.

To apply a diagnostic test for HPV, we need to better define factors affecting the evolution of disease (Schneider et al., 1996). It has been demonstrated that persistence of HPV infection and viral load are important determinants of progression. The clinical significance of quantitative results obtained with Hybrid capture remains controversial (Hall et al., 1996; Sun et al., 1995a; Schiffman et al., 1995; Cox et al., 1995). Prospective trials will help to further define the risk of women co-infected with multiple HPV types or women infected consecutively with different oncogenic types. The quantitation of the level of

expression of HPV or the presence of integrated HPV genome in clinical specimens could also prove useful.

There are several problems in recommending HPV testing in triage protocols for patients with LSIL. In some populations, up to 42% of women without CIN on biopsy are HPV-positive (Sun et al., 1995a). Comparisons between amplification and non-amplification techniques will be important since the high sensitivity of PCR could detect many more transient infections. The inability of hybrid capture to detect HPV infection in women with cancer needs to be further evaluated but could be resolved with a new version of test. Large prospective trials of untreated LSIL need to be completed before specific recommendations can be made.

As suggested by some, a combination of HPV testing and cytology could be considered if colposcopic services are limited, in communities where the prevalence of HSIL is low, and for those who wish to avoid colposcopy (Wright et al., 1995). In the future it is more than likely that official recommendations on HPV testing will be available for clinical management of cervical diseases. The efficacy and cost-effectiveness of HPV screening in various patient populations still need to be determined, especially for the improved version of Hybrid capture, as well as for the application of HPV testing as primary screening tool.

## References

- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472–7.
- Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital human papillomavirus infection by consensus polymerase chain reaction amplification. In: Herrington CS, McGee JOD, editors. *Diagnostic Molecular Pathology, A Practical Approach*. Oxford: IRL press 1992;6:131–152.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796–802.
- Brown DR, Rawlings K, Handy V, et al. Human papillomavirus detection by hybrid capture in paired cervicovaginal lavage and cervical biopsy specimens. *J Med Virol* 1996;48:210–4.
- Burk RD, Kelly P, Feldman J, et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 1996;23:333–41.
- Burk RD, Kadish AS, Calderin S, Romney SL. Human papillomavirus infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridization: correlation with biopsy results and papanicolaou smear. *Am J Obst Gyn* 1986;154:982–9.
- Caballero OL, Villa LL, Simpson JG. Low stringency-PCR (LS-PCR) allows entirely internally standardized DNA quantitation. *Nucl Acids Res* 1995;23:192–3.
- Cavuslu S, Mant C, Starkey WG, et al. Analytical sensitivities of Hybrid-capture, consensus and type-specific polymerase chain reactions for the detection of human papillomavirus type 16 DNA. *J Med Virol* 1996;49:319–24.
- Chua K-L, Wiklund F, Lenner P, et al. A prospective study on the risk of cervical intra-epithelial neoplasia among healthy subjects with serum antibodies to HPV compared with HPV DNA in cervical smears. *Int J Cancer* 1996;68:54–9.
- Cole HM. Diagnostic and therapeutic technology assessment: human papillomavirus DNA testing in the management of cervical neoplasia. *J Am Med Assoc* 1993;270:2975–81.
- Cornelissen MTE, Smits HL, Briet MA, et al. Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas. *J Gen Virol* 1990;71:1243–6.
- Coulée F, Bobo L, Mayur K, Yolken RH, Viscidi RP. Immunodetection of DNA with a biotinylated RNA probe: a study of reactivity of a monoclonal antibody to DNA-RNA hybrids. *Anal Biochem* 1989;181:96–105.
- Coulée F, Rubalcaba EA, Viscidi RP, Murphey P, Lederman HW. Quantitative detection of messenger RNA by solution hybridization and enzyme immunoassay. *J Biol Chem* 1990;265:11601–4.
- Coulée F, St-Antoine P, Olivier C, et al. Inhibitors of *Taq* polymerase: a potential cause for discordant results for detection of HIV-1 DNA with PCR. *J Infect Dis* 1991a;164:817–818.
- Coulée F, Shah KV, Rader JS, Currie JL, Viscidi RP. Detection of transcripts of human papillomaviruses 16 and 18 in cancer-derived cell lines and cervical biopsies by enzyme immunoassay for DNA-RNA hybrids following solution hybridization. *J Clin Microbiol* 1991b;29:968–974.
- Coulée F, Viscidi RP, Saint-Antoine P, Kessous A, Yolken RH. The polymerase chain reaction: a new tool for the understanding of the pathogenesis and detection of HIV-1 at the molecular level. *Mol Cell Probes* 1991c;5:241–259.
- Coulée F, Provencher D, Voyer H. Detection of human papillomavirus DNA in cervical lavage specimens by a nonisotopic consensus PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:1973–8.
- Coulée F, Provencher D, Gauthier J. Is there a clinical utility for HPV detection tests for screening preinvasive and invasive diseases of the uterine cervix? *Germes Ideas* 1997a;2:40–44.

- Coutlée F, Hankins C, Lapointe N, et al. Comparison between vaginal tampon and cervicovaginal lavage specimens collection for detection of human papillomavirus DNA by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1997b;51:42–47.
- Cox JT. Clinical role of HPV testing. *Obst Gynecol Clin North Am* 1996;23:811.
- Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:946–54.
- Cox TJ, Schiffman MH, Winzelberg AJ, Patterson JM. An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinics. *Obstet Gynecol* 1992;80:389–95.
- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasms. *J Virol* 1991;65:606–12.
- Cuzick J, Szarewski A, Terry G, et al. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995;345:1533–6.
- Czeglédy J, Iosif C, Hansson BG, Evander M, Gergely L, Wadell G. Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer?. *Int J Cancer* 1995;64:211–5.
- Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E, Krishna S. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:2589–93.
- de Villiers E-M. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Opin Microbiol Immunol* 1994;108:2–9.
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995;171:1026–30.
- Fairley FK, Chen S, Tabrazi SN, Quinn MA, McNeil JJ, Garland S. Tampons: a novel patient-administered method for the assessment of genital human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 1992;165:1103–6.
- Ferenczy A. Management of the patient with an abnormal Papanicolaou test. Recent developments. [Review]. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1993;20:189–202.
- Ferenczy A, Franco E, Arseneau J, Wright TC, Richart RM. Diagnostic performance of Hybrid capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid assay combined with liquid-based cytology study. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:651–6.
- Franco E, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. *J Infect Dis* 1997;172:756–63.
- Franco EL. Measurement errors in epidemiological studies of human papillomavirus and cervical cancer. The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus, 1992:181–197.
- Franco EL. Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:779–80.
- Franco EL, Villa LL, Rahal P, Ruiz A. Molecular variants analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1558–9.
- Franco ELF. Epidemiology of anogenital warts and cancer. In: Crum CP, Lorincz AT, editors. *Human Papillomavirus*. New York: Saunders, 1996:597–623.
- Goldberg GL, Vermund SH, Schiffman MH, Ritter DB, Spitzer C, Burk RD. Comparison of cytobrush and cervicovaginal lavage sampling methods for the detection of genital human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1669–72.
- Goldsborough MD, McAllister P, Reid R, Temple G, Lorincz AT. A comparison study of human papillomavirus prevalence by the polymerase chain reaction in low risk women and in a gynecology referral group at elevated risk for cervical cancer. *Mol Cell Probes* 1992;6:451–7.
- Guibinga GH, Coutlée F, Kessous AK, Hankins C, Lapointe N. The Canadian Women's HIV study Group. Role of herpes simplex type 2 virus in genital cancers: review of the evidence. *Arch STD/HIV Res* 1995;9:163–79.
- Hall S, Lorincz AT, Shah F, et al. Human papillomavirus DNA detection in cervical specimens by hybrid capture: correlation with cytologic and histologic diagnoses of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Gynecol Oncol* 1996;62:353–9.
- Hatch KD, Schneider A, Abdel-Nour MW. An evaluation of human papillomavirus testing for intermediate-and high-risk types as triage before colposcopy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1150–7.
- Herrington CS, Evans MF, Hallam NF, Charnock FM, Gray W, McGee D. Human papillomavirus status in the prediction of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia in patients with persistent low-grade cervical cytological abnormalities. *Br J Cancer* 1995;71:206–9.
- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994;169:235–40.
- Ho GYF, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1365–71.
- Hsu EM, McNicol PJ. Characterization of HPV-16 E6/E7 transcription in CasKi cells by quantitative PCR. *Mol Cell Probes* 1992;6:459–66.
- Jacobs MV, Snijders PJF, van den Brule AJC, Helmerhorst TJM, Meijer C, Walboomers J. A general primer GP5 + / GP6 + -mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997;35:791–5.
- Jenkins D, Sherlawjohnson C, Gallivan S. Can papilloma virus testing be used to improve cancer screening. *Int J Cancer* 1996;65:768–73.

- Johnson K, The Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. Periodic health examination, update: 1. Screening for human papillomavirus infection in asymptomatic women. *Can Med Assoc J* 1995;152:483–493.
- Jones MH, Jenkins D, Cuzick J, et al. Mild cervical dyskaryosis: safety of cytological surveillance. *Lancet* 1992;339:1440–3.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *New Engl J Med* 1992;327:1272–8.
- Ley C, Bauer HM, Reingold A, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in young woman. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:997–1003.
- Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* 1996;69:364–8.
- Lorincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. In: Crum CP, Lorincz AT, editors. *Human Papillomavirus*. New York: Saunders, 1996:707–731.
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328–37.
- Lorincz AT, Schiffman MH, Jaffurs WJ, Marlow J, Quinn AP, Temple GF. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:645–51.
- Manos MM, Waldman J, Zhang TY, et al. Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *J Infect Dis* 1994;170:1096–9.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker T, Wolinski SM. Use of the polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209–15.
- McDougall JK. Cofactors in the progression of HPV-associated tumors. *Antibiot Chemother* 1994;46:150–64.
- McNicol P, Guijon F, Wayne S, Hidajat R, Paraskevas M. Expression of human papillomavirus type 16 E6-E7 open reading frame varies quantitatively in biopsy tissue from different grades of cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 1995;33:1169–73.
- Melbye M, Smith E, Wohlfahrt J, et al. Anal and cervical abnormality in women—prediction by human papillomavirus tests. *Int J Cancer* 1996;68:559–64.
- Morrison EAB, Goldberg GL, Hagan RJ, Kadish AS, Burk RD. Self-administered home cervicovaginal lavage: a novel tool for the clinical-epidemiologic investigation of genital human papillomavirus infections. *Am J Obstet Gynecol* 1992a;167:104–107.
- Morrison EAB, Goldberg GL, Kadish AS, Burk RD. Polymerase chain reaction detection of human papillomavirus: quantitation may improve clinical utility. *J Clin Microbiol* 1992b;30:2539–2543.
- Moscicki A-B. Comparison between methods for human papillomavirus DNA testing: a model for self-testing in young women. *J Infect Dis* 1993;167:723–5.
- Namkoong SE. Clinical application of HPV typing in cervical cancer. *Int J Gynecol Obstet* 1995;49 Suppl:S59–S67.
- Nindl I, Zahm D-M, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Schneider A. Human papillomavirus detection in high-grade squamous intraepithelial lesions: comparison of hybrid capture assay with a polymerase chain reaction system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;23:161–4.
- Reid R. Biology and colposcopic features of human papillomavirus-associated cervical disease. *Obstet Gyn Clin North Am* 1993;20:123–49.
- Reid R, Lorincz AT. Human papillomavirus tests. *Bail Clin Obstet Gyn* 1995;9:65–103.
- Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995;61:306–11.
- Resnick RM, Cornelissen MTE, Wright DK, et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1477–84.
- Richart RM, Wright TC. Controversies in the management of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1993;71:1413–21.
- Ritter DB, Kadish AS, Vermund SH, Rommey SL, Villari D, Burk RD. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in exfoliated cervicovaginal cells as a predictor of cervical neoplasia in a high-risk population. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:1517–25.
- Roman A, Fife KH. Human papillomaviruses: are we ready to type?. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:166–90.
- Rose BR, Thompson CH, Tattersall MHN, Elliott PM, Cosart YE. Identification of E6,E7 transcription patterns in HPV 16-positive cervical cancers using the reverse transcription polymerase chain reaction. *Gynecol Oncol* 1995;56:239–44.
- Rozendaal L, Walboomers JMM, Vanderlinden JC, et al. PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytologically normal cervical smears. *Int J Cancer* 1996;68:766–9.
- Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:394–8.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:958–63.
- Schiffman MH. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1345–7.
- Schiffman MH, Kiviat NB, Burk RD, et al. Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. *J Clin Microbiol* 1995;33:545–50.

- Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995;76 Suppl:1888–1901.
- Schneider A. Natural history of genital papillomavirus infection. *Intervirology* 1994;37:201–14.
- Schneider A, Zahm DM, Kirchmayr R, Schneider VL. Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3—validity of cytologic study, cervicography, and human papillomavirus detection. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1534–41.
- Shah KV, Kessiss TD, Shah F, Gupta JW, Shibata D, Jones RW. Human papillomavirus investigation of patients with cervical intraepithelial neoplasia 3, some of whom progressed to invasive cancer. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:127–30.
- Shah KV, Solomon L, Daniel R, Cohn S, Vlahov D. Comparison of PCR and Hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 1997;35:517–9.
- Sigurdsson K, Arnadottir T, Snorraddottir M, Benediksdottir K, Saemundsson H. Human papillomavirus (HPV) in an Icelandic population: correlation of HPV DNA to cytologic and histopathologic lesions and evaluation of treatment strategies. *Int J Gynecol Cancer* 1996;6:175–82.
- Stellato G, Nieminen P, Aho H, Vesterinen E, Vaheri A, Paavonen J. Human papillomavirus infection of the female genital tract: correlation of HPV DNA with cytologic, colposcopic, and natural history findings. *Eur J Gynaecol Oncol* 1992;13:262–7.
- Stoler MH. A brief synopsis of the role of human papillomavirus in cervical carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1091–8.
- Sun XW, Ferenczy A, Johnson D, et al. Evaluation of the Hybrid Capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. *Am J Obstet Gynecol* 1995a;173:1432–1437.
- Sun XW, Koulos JP, Felix JC et al. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995b;346:636.
- Ting Y, Manos M. Detection and typing of genital human papillomavirus. In: *PCR protocols: A Guide To Methods and Applications*. New York: Academic press, 1990:356–370.
- van de Brule AJC, Snidjers PJF, Gordjin RLJ, Bleker OP, Meijer CJLM, Walboomers JMM. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 1990;45:644–9.
- Vermund SH, Schiffman MH, Goldberg GL, Ritter DB, Weltman A, Burk RD. Molecular diagnosis of genital human papillomavirus infection: comparison of two methods used to collect exfoliated cervical cells. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:304–8.
- Vossler JL, Forbes BA, Adelson MD. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus from urine. *J Med Virol* 1995;45:354–60.
- Williams ML, Rimm DL, Pedigo MA, Frable WJ. Atypical squamous cells of undetermined origin: correlative histologic and follow-up studies from an academic medical center. *Diagn Cytopathol* 1997;16:1–7.
- Wolcott MJ. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:370–86.
- Wright TC, Sun XW, Koulos J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 1995;85:202–10.
- Yang XL, Jin G, Nakao Y, Rahimtula M, Pater MM, Pater A. Malignant transformation of HPV 16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Int J Cancer* 1996;65:338–44.
- zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991;254:1167–73.