

Université de Montréal

Élaboration d'un vaccin contre HPV16 (cancer du col de l'utérus)

par
Sarah Falconi

Département de biologie moléculaire, Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc)
en biologie moléculaire

Septembre 2002

© Sarah Falconi, 2002



QH
506
U54
2003
v.012

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Élaboration d'un vaccin contre HPV16 (cancer du col de l'utérus)

présenté par :
Sarah Falconi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :
Dr Éric Cohen, président-rapporteur
Dr Wagner Yotov, directeur de recherche
Dr Jacques Thibodeau, membre du jury

RÉSUMÉ

Les virus du papillome humain (*human papillomavirus* ou HPV) causent le cancer du col de l'utérus chez la femme et d'autres lésions au niveau des muqueuses et de la peau autant chez les hommes que chez les femmes. Les lésions pré-cancéreuses de haut niveau du col de l'utérus, les carcinomes *in situ* et les cancers invasifs du col de l'utérus sont liés aux infections par HPV16, HPV18 et d'autres HPV de risques élevés. Quelques vaccins anti-HPV visant à prévenir le cancer du col de l'utérus sont en développement ou dans les premières phases des essais cliniques. Ces vaccins sont faits de particules ressemblant à des virus (VLP) ou de protéines de HPV. D'autres utilisent des agents bactériens, des cellules dendritiques ou de l'A.D.N. Ces différents vaccins font appel à l'immunisation systémique et aucun d'entre eux ne stimule l'immunité mucoale.

Nos hypothèses de travail sont : a) des types spécifiques de HPV de risque élevé sont liés à la majorité des lésions pré-cancéreuses de haut niveau du col de l'utérus, des carcinomes *in situ* et des cancers du col de l'utérus chez les femmes au Québec; b) un vaccin prophylactique basé sur les adénovirus pourrait diminuer le nombre d'infections pour ce type particulier et prévenir le cancer du col de l'utérus.

Pour développer ce vaccin, nous avons d'abord déterminé les types de HPV responsables des lésions pré-cancéreuses de haut niveau chez les femmes au Québec. Le HPV de type 16 est celui qui prévaut au Québec. Il a donc été sélectionné pour le développement d'un vaccin au Québec. Nous avons sous-cloné le gène L1 de HPV16 (gène codant pour la protéine majeure de la capside L1) dans le vecteur adénoviral (pAdEasy™ de Stratagene). Parallèlement, une protéine de fusion GST-L1 (glutathione-S-transférase-L1) a été produite dans le but de générer des anticorps polyclonaux. L'expression de la protéine L1 de HPV16 par le vecteur adénoviral a été vérifiée par des transfections transitoires dans des cellules HEK293. Finalement, des adénovirus ne pouvant pas se répliquer ont été produits dans des cellules HEK293 (cellules d'encapsulation) avec le vecteur adénoviral pAdEasy™ de Stratagene.

Mots clés : HPV-16, L1, adénovirus recombinant, cancer du col de l'utérus, vaccin prophylactique.

ABSTRACT

The human papillomaviruses (HPV) are causative agents of cervical cancer in women, and some other mucosal and skin lesions in both sexes. The high-grade cervical pre cancerous lesions, carcinoma *in situ*, and cervical invasive cancers are linked to infections by HPV16, HPV18, and other high-risk HPV. A few anti-HPV anti-cancer vaccines are in development or in the first phases of clinical trials. These vaccines are made with virus-like particles (VLP) or with HPV proteins. Others use bacterial agents, dendritic cells or DNA. All of them stimulate systemic immunisation but do not stimulate mucosal immunity.

Our working hypothesis is that a) specific high-risk HPV types are linked to most of the cases with high-grade precancerous cervical lesions, *carcinoma in situ* and cervical cancer in women here, in the province of Quebec; and b) a prophylactic vaccine based on adenoviruses could diminish the number of infections of that particular type and prevent cervical cancer.

To develop the vaccine, we first determined which HPV types are responsible for the higher grade cervical precancerous lesions in women in Quebec. Having selected HPV16 as the most important subtype for vaccine development in Quebec, we then subcloned the L1 protein gene of HPV16, coding for the L1 major capsid protein, into the adenoviral vector (pAdEasy™ by Stratagene). Meanwhile, a GST-L1 (glutathione-S-transferase-L1) fusion protein was made for polyclonal antibody production. The expression of the HPV16 L1 protein by the adenoviral vector was studied with transient transfections of HEK293 cells. Finally, the adenoviruses unable to replicate were produced in HEK293 cells (packaging cells) with the Stratagene adenoviral vector, pAdEasy™.

Key words : HPV-16, L1, recombinant adenovirus, cervical cancer, anti-HPV vaccine.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
1.1 Les virus du papillome humain (HPV)	1
1.2 Les HPV et le cancer	8
1.3 Immunité naturelle anti-HPV	12
1.4 Épidémiologie	15
1.5 Vaccin anti-HPV	18
2. OBJECTIFS	23
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	25
3.1 Détermination du type de HPV [211, 236]	25
3.1 a) Échantillons	25
3.1 b) Examen histologique	25
3.1 c) Préparation et vérification des matrices d'A.D.N.	25
3.1 d) PCR spécifique pour HPV	26
3.1 e) Séquençage direct	26
3.1 f) Méthode deux-tiers	26
3.1 g) Alignement des séquences	27
3.1 h) Analyse statistique des données	27
3.2 Construction des plasmides	29
3.2 a) Amplification du gène L1 par PCR	29
3.2 b) Construction des vecteurs p1674, p1960 et p1961	31
3.3 Culture cellulaire	34
3.4 Vérification de l'expression du gène de la protéine L1 sous le contrôle du promoteur CMV	35
3.4 a) Transfections transitoires	35

3.4 b) Vérification des extraits cellulaires par immunobuvardage	35
3.5 Production des adénovirus recombinants	36
3.6 Production des protéines de fusion et des anticorps polyclonaux de lapin anti-GST-L1	37
4. RÉSULTATS	38
4.1 Élaboration d'un test diagnostique de haute sensibilité pour la détection de tous les types de HPV	38
4.2 Détermination du type de HPV	42
4.3 Construction des plasmides p1960 et p1961	46
4.4 Production de la protéine de fusion GST-L1	48
4.5 Vérification de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GST-L1	50
4.6 Vérification de l'expression du gène de la protéine L1 sous le contrôle du promoteur CMV	52
5. DISCUSSION	54
6. RÉFÉRENCES	60

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure 1. Organisation génomique des HPV	3
Figure 2. Infection de l'épithélium par le HPV	7
Figure 3. Répartition globale des HPV oncogènes dans le cancer du col de l'utérus.	17
Figure 4. Schéma de la méthode deux-tiers	28
Figure 5. Stratégie pour l'amplification du gène de la protéine L1 de HPV16 à partir du plasmide pHPV16	30
Figure 6. Construction du plasmide p1674	32
Figure 7. Répartition des 691 échantillons parmi les 10 catégories de diagnostique histologique	43
Figure 8. Détermination du type de HPV le plus fréquemment retrouvé dans les tumeurs	45
Figure 9. Construction des plasmides p1960 et p1961	47
Figure 10. Production de la protéine de fusion GST-L1	49
Figure 11. Vérification de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GST-L1	51
Figure 12. Expression du gène de la protéine L1 du HPV16 sous le contrôle du promoteur immédiat/précoce de CMV	53
Table I. Nombre d'isolats de HPV par type de HPV[211]	41

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS :

A.D.N. : acide désoxyribonucléique
°C : degré Celsius
CIN : *cervical intraepithelial neoplasia*
CMV : cytomégalovirus
CTL : *cytotoxic T lymphocyte*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
E : *early protein*
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
F : fragment
GST : glutathione-S-transférase
HEK : *human embryonic kidney*
HPS : haematoxylin-phloxine-safran
HPV : *human papillomavirus*
IgA : immunoglobuline de classe A
IgG : immunoglobuline de classe G
IPTG : isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
kb : kilobase
kDa : kilodalton
L : *late protein*
mm : millimètre
mM : milli molaire
ng : nanogramme
ORF : *open reading frame*
p53 : protéine 53
pb : paire de bases

PCR : *polymerase chain reaction*

PCR-DS : *polymerase chain reaction direct sequencing*

pRb : protéine du rétinoblastome

SDS : *sodium dodecylsulfate*

SDS-PAGE : *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SV40 : *simian virus type 40*

TBT-T : *tris-buffered saline-Tween 20*

µg : microgramme

µL : microlitre

µm : micromètre

URR : *upstream regulatory region*

VLP : *virus-like particules*

WT : *wild type*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Wagner Yotov pour son aide. Je dis un merci particulier à Sylvie Cloutier, Juan Carlos Feoli, Leila Esmailzadeh, Nadine Zarka et Benoît Bessette pour leurs conseils, leur soutien et leurs rires sans lesquels je n'aurais pu tenir.

Grands mercis également à ma famille pour leurs encouragements et à la Famille Myriam pour leur soutien spirituel qui m'aura permis d'aller si loin.

1. INTRODUCTION

1.1 LES VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN (HPV)

Les virus du papillome humain (HPV) sont des petits virus non-enveloppés [1-3] à A.D.N. circulaire double brin [1, 3, 4] d'environ 8kb [1-3, 5]. Habituellement (peut varier selon le type de HPV), un seul brin est transcriptionnellement actif [6, 7]. Les HPV ont un diamètre de 45 à 55nm [2, 3, 8, 9] et l'A.D.N. est encapsidé dans 72 capsomères [3, 10] qui sont disposés en forme d'icosaèdre [2, 3]. Ils ont un tropisme pour les cellules épithéliales [11-13].

Au départ, les HPV faisaient partie de la sous-famille des papillomavirus de la grande famille des *papovaviridae* [3, 4,14-16]. Cette famille comptait également la sous-famille des *polyomaviridae*. Les *papovaviridae* sont reconnus comme étant des virus pouvant immortaliser les cellules [3, 14]. Ils ont un A.D.N. double brin et ils se répliquent dans le noyau [15]. Maintenant, les virus du papillome (PV) ont leur propre famille, la famille des *papillomaviridae* [17, 18]. Les PV, en plus d'infecter les humains, peuvent infecter les chevaux, les chiens, les bovins, les rats, les souris, les lapins, les moutons, les cerfs, les daims, les singes, les oiseaux et les tortues [2-3]. Ils sont spécifiques pour les espèces [19].

La spécificité de l'hôte permet un premier classement des différents PV. Ceux qui nous intéressent ici sont ceux pouvant infecter les humains, les HPV. À ce jour, plus de 120 génotypes différents de HPV ont été répertoriés [2]. Un nouveau type de HPV est identifié quand, suite au séquençage, il est montré que la séquence du gène de la protéine L1 est homologue à moins de 90% avec celle d'un autre type de HPV. Si l'homologie est entre 90% et 98%, nous sommes en présence de sous-types et si l'homologie est supérieure à 98%, ce sont des variants du même type [3, 15, 19, 20].

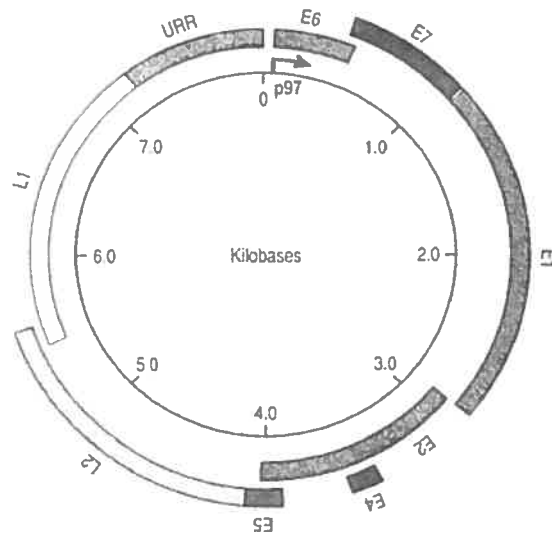
Les HPV peuvent aussi être classés selon leur tropisme. Ils infectent soit la peau (HPV1 et HPV14 donnent les verrues, HPV5 et HPV8 donnent l'épidermodysplasie verruciforme), soit les muqueuses anogénitales (comprennent le

col de l'utérus, la vulve, le vagin, le pénis et l'anus) ou oropharyngées [2, 21]. Malgré cette différence, les HPVs infectent tous des cellules épithéliales [2, 3, 14, 16, 22].

Finalement, on les classe également selon leur potentiel oncogénique [2]. Les différents types de HPV causent, au niveau des cellules épithéliales, des lésions bénignes ou des lésions malignes [12, 23, 24]. Les types de HPV qui sont associés aux lésions bénignes, sont dits à faible risque (HPV6 et HPV11 causent les condylomes génitaux) alors que ceux qui sont associés aux lésions malignes sont dits à haut risque (HPV16 et HPV18 sont associés à la carcinogenèse du col de l'utérus) [25-32]. Cette dernière catégorie comprend également les types de HPV considérés de risque intermédiaire comme les HPV31, 33, 35 et 51 qui sont retrouvés dans les lésions anogénitales [2, 33].

Le génome de HPV est composé de 8 régions codantes (ORF) qui se trouvent sur un seul des deux brins d'A.D.N. [2, 3, 6, 7]. De plus, le génome possède une région non codante (*long control region* ou LCR) qui contient les séquences régulatrices de la transcription et l'origine de la réplication (voir figure 1).

Le LCR compte pour environ 10% du génome de HPV (400 à 1000 nucléotides) [2, 12, 16, 34, 35] et plusieurs facteurs de transcriptions cellulaires peuvent venir s'y lier [2, 36-51]. Le LCR est situé entre l'ORF L1 qui code pour une protéine tardive et l'ORF E6/E7 qui code pour des protéines précoces. Les 8 ORF encodent 8 protéines, 6 étant impliquées dans la réplication et la transcription de l'A.D.N. ainsi que dans la transformation des cellules (E1 à E7) et les deux autres ORF encodent pour les protéines tardives L1 et L2 qui forment la capsid du virus [52].



Source : Park TW, Fujiwara H, Wright TC (1995). *Cancer* 76 (10 suppl.), 1202-13. [53]

Figure 1. Organisation génomique des HPV. Les HPV ont un génome circulaire de 8kb [2, 3, 6, 7] qui contient 6 régions codant pour des protéines précoces qui servent essentiellement à la multiplication du virus (E1 à E7), 2 régions codant pour les protéines tardives qui forment la capsid du virus (L1 et L2) [52] et un LCR (ou URR : *upstream regulatory region*), une région d'environ 400 paires de bases [2, 12, 16, 34, 35] en amont de l'origine de réplication qui contient des sites de liaison pour des activateurs et des inhibiteurs de la transcription [2, 36-51, 53]

La protéine E1, en plus de lier l'A.D.N. à l'origine de réplication, lie et hydrolyse l'ATP [54]. Elle a une activité hélicase ATP-dépendante [55-62] qui est essentielle pour la réplication des PV [60] et elle interagit avec la sous-unité α de l'A.D.N polymérase cellulaire [63]. La protéine précoce E2 sert à la réplication et à la modulation de la transcription du génome viral [16, 64]. La protéine E1 lie la protéine E2. En hétérodimère, ces deux protéines permettent à l'épisome viral d'être stable dans la cellule [55-61, 65]. L'hétérodimère permet également l'initiation de la réplication de l'A.D.N. viral [60, 66-68] en se liant à une séquence de l'origine de réplication qui possède un site de liaison pour la protéine E1 [61] qui est flanqué de plusieurs sites de liaison pour la protéine E2. Ces sites de liaison et ces protéines sont importants pour le virus, car des mutations dans les uns comme dans les autres causent une diminution ou même l'arrêt de la réplication virale. Les protéines E2 peuvent former des homodimères. Les homodimères de la protéine virale E2 stimulent la réplication de l'A.D.N. viral [68-70] et ils modulent la transcription des ORF des protéines E6 et E7 en bloquant leur expression [64, 71-73]. Quand il y a des mutations dans l'ORF de E2 ou sur le site de liaison de la protéine dans le LCR il y a une augmentation de l'activité d'immortalisation du virus [74] puisque les protéines E6 et E7 sont impliquées dans le processus d'immortalisation et de transformation cellulaire dans les cellules infectées. La protéine virale E6 lie la protéine cellulaire p53, ce qui mène cette dernière à la dégradation [25] par les protéosomes [75, 76]. La protéine virale E6 agit en coopération avec la protéine virale E7 pour l'immortalisation des cellules [36]. La protéine E7, quant à elle, forme un complexe avec la protéine cellulaire pRb [77-79].

La protéine E4 permet la production des particules virales en facilitant l'encapsulation du génome ainsi qu'en favorisant la diffusion et la libération des virions par la destruction du réseau de filaments de cytokératine. La protéine E4 est exprimée différemment selon le type de la lésion. Elle est fortement exprimée dans les lésions cutanées comme les verrues palmaires et plantaires tandis que l'expression est plutôt basse dans les lésions des muqueuses [2, 80, 81].

Finalement, la protéine virale précoce E5 est une protéine hydrophobe surtout localisée au niveau de l'appareil de Golgi et au niveau de la membrane plasmique [82]. La protéine E5 de HPV16 peut former un complexe avec le récepteur EGF (*epidermal growth factor*) et avec le récepteur PDGF- β (*platelet-derived growth factor*) qui sont des protéines transmembranaires [83, 84]. On la trouve aussi associée au complexe des jonctions GAP [85, 86]. Elle aussi, comme les protéines E6 et E7, est impliquée dans les processus d'immortalisation et de transformation des cellules infectées.

Les protéines tardives L1 et L2 sont des protéines d'environ 55kDa et d'environ 75kDa respectivement [12]. La protéine L1 est la protéine majeure de la capsid [12, 16]. La protéine virale L1 a la capacité de s'auto-assembler pour former une capsid virale. Ces capsides virales vides formées par des protéines virales L1 sont appelées particules ressemblant à des virus ou VLP (*virus-like particles*) [2, 3, 12]. La protéine L2 (protéine mineure de la capsid) peut lier l'A.D.N. viral et elle le positionne correctement dans la capsid. Avec la protéine L1, la protéine L2 permet l'assemblage du virus et la stabilisation de la capsid [87].

L'infection par des HPV s'effectue en quelques étapes. Tout d'abord, l'infection se produit au niveau des cellules basales ou parabasales du tissu épithélial et le cycle de multiplication du HPV est étroitement relié à la différenciation cellulaire (voir figure 2) [2, 3, 5, 16, 22, 88, 89]. Pour que les virus puissent avoir accès à la couche basale ou parabasale, il faut qu'il y ait eu un traumatisme des muqueuses ou une blessure de la peau [3, 5].

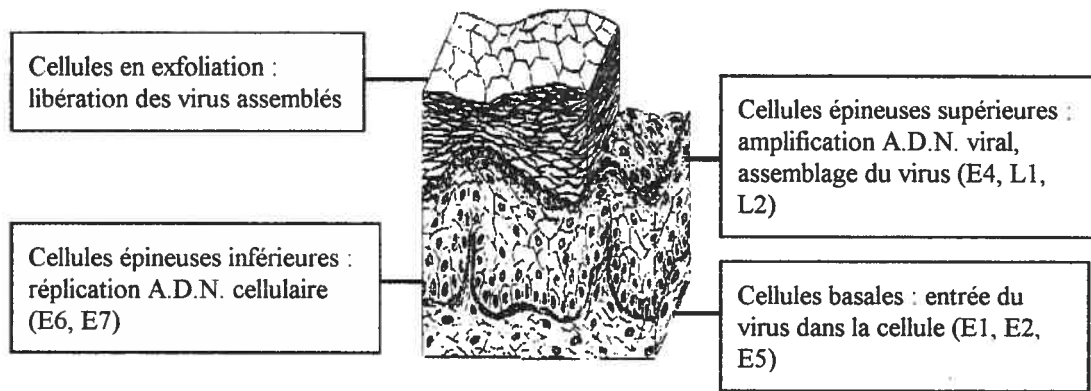
Normalement, dans les cellules squameuses de l'épithélium (ou kératinocytes), seulement quelques cellules de la couche basale prolifèrent et sortent du cycle cellulaire pour terminer leur différenciation (les cellules différenciées ne se divisent plus). À mesure que les cellules progressent dans les couches de l'épithélium, d'autres cellules non différenciées viennent les remplacer au niveau de la couche basale [5]. Quand les kératinocytes sont différenciés, leur A.D.N. ne se réplique plus et ils ne se

divisent plus. Finalement, les kératinocytes matures atteignent la couche supérieure de l'épithélium et ils sont exfoliés [5].

Au moment de l'infection des cellules par HPV, les protéines L1 et L2 interagissent avec la surface de la cellule hôte pour faciliter l'entrée de l'A.D.N. viral [90-92]. On suppose que les récepteurs cellulaires pour les HPV fassent partie de la famille des intégrines ($\alpha_6\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$) [2]. L'équipe de McMillan a montré que la sous-unité α_6 et les VLP sont co-localisés à la surface des cellules basales [93]. Le ligand naturel de α_6 , la lamine, bloque l'attachement des VPL. De plus, les cellules qui n'expriment pas α_6 sont incapables de lier HPV.

Quand l'A.D.N. viral est dans la cellule, les premières protéines virales à être transcrites sont les protéines E1, E2 et E5 qui se lient à l'A.D.N. viral afin d'en activer la réplication [5, 55-61, 65-67]. Ensuite, dans la couche inférieure des cellules épineuses, la réplication de l'A.D.N. cellulaire est favorisée, car les protéines virales E6 et E7 y sont exprimées. Les protéines virales E6 et E7 interfèrent avec les mécanismes cellulaires qui contrôlent le cycle cellulaire de l'hôte. Ainsi, la synthèse de l'A.D.N. est réactivée même si la cellule a commencé sa différenciation et les protéines cellulaires de la réplication sont utilisées pour faciliter la réplication de l'A.D.N. viral [94, 95].

Les protéines E4, L1 et L2 sont exprimées dans la couche supérieure des cellules épineuses en même temps qu'il y a amplification de l'A.D.N. viral et assemblage du virus [3, 80, 96-97]. Les virions arrivés à maturité sont libérés par les cellules en exfoliation (squames) [5, 52, 80].



Source : <http://www.apprentoile.u-bordeaux2.fr/wderm/fig001.htm> [98]

Figure 2. Infection de l'épithélium par le HPV. L'infection se fait au niveau des cellules basales [2, 3, 5, 16, 22, 88, 89] grâce à l'interaction entre les protéines de la capsid virale (L1 et L2) et la cellule [2, 90-93]. Une fois que le virus se trouve dans la cellule, les protéines virales E1, E2 et E5 sont synthétisées [5, 55-61, 65-67]. Dans la couche inférieure des cellules épineuses, l'expression des protéines virales E6 et E7 permet et stimule la réplication de l'A.D.N. cellulaire [94, 95]. Quand la cellule est rendue dans la couche supérieure des cellules épineuses, les protéines E4, L1 et L2 sont synthétisées, l'A.D.N. viral est amplifié et les virus sont assemblés [3, 80, 96-97]. Ce n'est que lors de la desquamation que les virus complets sont relâchés [5, 52, 80].

1.2 LES HPV ET LE CANCER

La connaissance des PV est relativement récente. Dans les années 1930 à 1950, Rous et ses collaborateurs ont isolé un virus d'une infection de lapin. C'était le virus du papillome du lapin (*cottontail rabbit papillomavirus* ou CRPV) [12]. Rous a été le premier à parler du potentiel carcinogène des PV. En 1935, il a rapporté que des papillomes causés par le CRPV ont progressé jusqu'au carcinome [99]. En 1949, c'est l'agent responsable des verrues qui est isolé par Strauss et ses collaborateurs. C'est un HPV [100]. En 1959, l'équipe de Olsen a induit une tumeur au niveau de la vessie chez un bovin grâce aux BPV (*bovine papillomavirus*) trouvés dans les papillomes de la peau [101]. Par la suite, Ho et Evans ont induit des carcinomes chez un lapin grâce à l'A.D.N. purifié de CRPV et de l'A.D.N. extrait de papillomes ou de carcinomes induits par CRPV [102]. Plus tard, on s'est aperçu que ce n'était pas seulement les CRPV qui pouvaient causer le cancer et en 1970, une hypothèse est formulée par zur Hausen et ses collaborateurs: les PV joueraient un rôle significatif dans l'étiologie du cancer du col de l'utérus [103, 104]. En fait, l'association entre le cancer du col de l'utérus et des facteurs reliés à l'activité sexuelle est suggérée depuis les années 1980. À ce moment, différents facteurs de risques sont identifiés : le fait d'avoir plusieurs partenaires sexuels et commencer jeune à avoir des relations sexuelles [105]. Les tests effectués pour démontrer cette hypothèse ont permis d'identifier plusieurs types et sous-types de HPV [106, 107]. Dans les années 1980, le HPV6 et le HPV11 ont été isolés de verrues génitales [108, 109]. Par la suite, les HPV16 et HPV18 ont été isolés à partir de biopsies du cancer du col de l'utérus [110, 111].

La relation ou l'association entre une infection par HPV et le cancer du col de l'utérus a été reconnue pour la première fois par Miesels et ses collaborateurs [112]. Ils avaient observé que des anomalies morphologiques causées par l'effet cytopathique d'une infection par un HPV étaient souvent accompagnées d'un cancer du col de l'utérus. Plus tard, la virologie moléculaire a permis de démontrer que l'A.D.N. de

HPV était présent dans près de 70% à 80% des carcinomes du col de l'utérus [29]. Avec l'avènement de nouvelles techniques de dépistage du HPV, une étude de Walboomers a déterminé que la prévalence de HPV dans 932 cas de col de l'utérus était de 99,7% [28]. La même prévalence a été obtenue avec des échantillons de cancer du col de l'utérus récoltés à travers le monde [114]. L'identification de ces HPV a été faite grâce à l'utilisation de diverses techniques de PCR [28, 115, 116].

Malgré ce pourcentage très élevé, il fallait vérifier que ce n'était pas uniquement parce que les cellules malades étaient plus susceptibles à l'infection par HPV que les cellules saines. Il fallait s'assurer que les cellules étaient d'abord infectées par HPV et qu'ensuite elles développaient le phénotype de malignité. Des études épidémiologiques ont été conduites avec des femmes cytologiquement normales. Elles ont montré que l'infection par HPV précède le développement des lésions pré-cancéreuses du col de l'utérus [117-119].

Il a été démontré que les kératinocytes humains pouvaient être immortalisés en les transfectant avec de l'A.D.N. de HPV et que les gènes ayant un potentiel transformant étaient les gènes précoces E6 et E7 de HPV [120]. Ces gènes, lorsqu'ils proviennent de HPV à risque élevé, peuvent immortaliser des kératinocytes primaires humains, alors qu'ils en sont incapables quand ils proviennent de HPV à faible risque [36, 121-125]. Ces HPV à faible risque sont surtout reliés aux lésions bénignes (condylomes, papillomes et dysplasies légères). S'ils sont retrouvés dans les lésions malignes, ils sont alors associés avec un HPV oncogène [114]. Parmi les HPV à risque élevé retrouvés dans les lésions malignes, les types 16 et 18 sont retrouvés dans au moins 70% des cancer du col de l'utérus dans le monde entier. Les types 31, 33, 35, 52, 58 et 59 sont également fortement associés au cancer du col de l'utérus [28, 126, 127].

Les protéines virales E6 et E7 des HPV à risque élevé peuvent immortaliser différentes sortes de cellules humaines [15, 36, 123-125]. Elles peuvent le faire seules, mais ensemble, elles y arrivent plus efficacement [36, 124, 128]. Les protéines virales

E6 et E7 sont des protéines qui stimulent la croissance cellulaire [129]. Pour immortaliser les cellules infectées, elles lient des protéines cellulaires codées par les gènes suppresseurs de tumeur, p53 et pRb (protéine du rétinoblastome) respectivement [79, 130, 131]. Les protéines E6 et E7 des HPV à risque élevé ont une plus grande affinité pour p53 et pRb comparativement aux protéines E6 et E7 des HPV à faible risque [5, 75].

La protéine p53 est une protéine qui arrête le cycle cellulaire au point de contrôle entre les phases G1 et S du cycle cellulaire s'il y a eu des mutations lors de la réplication du génome [132]. Quand la protéine virale E6 s'y lie, elle induit sa dégradation [25] par la voie d'ubiquitination [25, 75, 76, 130, 133] qui mène aux protéosomes. Il peut donc y avoir accumulation de mutations dans l'A.D.N. des cellules issues de la division des cellules infectées [134, 135]. De plus, ces cellules montrent de l'instabilité génomique [136, 137].

Quant à pRb, elle se lie au facteur de transcription cellulaire E2F et l'empêche d'agir sur les promoteurs contrôlant la transcription de gènes impliqués dans la division cellulaire. Dans les cellules qui ne sont pas infectées par HPV, la forme hypophosphorylée de pRb est liée au facteur de transcription cellulaire E2F. Quand pRb est hyperphosphorylée, E2F est relâchée et elle peut aller lier l'A.D.N. pour activer la transcription. La liaison de la protéine virale E7 à pRb a le même effet sur pRb que l'hyperphosphorylation : le facteur de transcription est libre d'aller lier l'A.D.N. pour favoriser la transcription des gènes régulant la prolifération cellulaire [12, 25, 79, 130, 131, 138-144]. Le contrôle du cycle cellulaire est dérégulé, ce qui cause une prolifération cellulaire incontrôlée [145].

Un élément qui favorise le développement du cancer du col de l'utérus, est l'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte. Normalement, le génome de HPV est sous la forme d'un épisode dans la cellule. Dans les lésions avancées et les tumeurs invasives, le génome de HPV est intégré au génome de la cellule infectée. Lors de l'intégration, l'A.D.N. de HPV est coupé au niveau du gène de la protéine E2

et cette protéine n'est plus synthétisée. Puisque la protéine virale E2 a comme fonction de réprimer l'expression des protéines virales E6 et E7 [146], quand elle n'est plus exprimée suite à l'intégration du génome viral au génome cellulaire, l'expression des protéines virales E6 et E7 est augmentée [15]. Ainsi, la capacité d'immortalisation du HPV qui infecte la cellule est accrue.

1.3 IMMUNITÉ NATURELLE ANTI-HPV

Les infections génitales par un HPV ne s'étendent pas à tout le corps, mais restent localisées dans les muqueuses [147]. Toutefois, le système immunitaire réussit à éliminer la plupart de ces infections sans qu'il n'en reste aucune séquelle visible [148, 149]. Une infection par un HPV ne provoque pas seulement une réponse immunitaire systémique, mais surtout une réponse immunitaire des muqueuses qui peut être constatée par le développement des IgA sécrétoires, des IgG et des IgA [3, 150, 151]. Les IgA sécrétoires préviennent l'absorption des virus en bloquant leur adhésion aux cellules alors qu'ils sont encore dans la lumière des voies anogénitales [152]. Si le virus réussit à pénétrer dans la cellule, il est alors protégé des anticorps par la cellule qu'il infecte pendant qu'il se réplique. Ensuite, la progression de l'infection par HPV16 est liée à l'intégration du génome de HPV dans les chromosomes qui mène à la perte de l'expression du gène de L1 ce qui fait que la surveillance immunitaire anti-L1 n'est plus d'une grande utilité [28, 153]. De plus, après une première infection par HPV, les anticorps sont induits lentement. L'apparition des anticorps prend en moyenne 8 mois après la détection de l'A.D.N. d'un HPV pour la première fois et chez quelques personnes infectées l'apparition des premiers anticorps peut même prendre quelques années [118, 154]. Ainsi, il est peu probable que seuls les anticorps neutralisants puissent permettre l'élimination complète de l'infection par HPV [3, 150, 155, 156].

Les interférons (INF) et les IgA sécrétoires constituent probablement la première ligne de défense contre le HPV lors de l'invasion du col de l'utérus. Les INF relâchés par les cellules infectées par un HPV lient les récepteurs des cellules voisines induisant la production de protéines antivirales qui sont activées si le virus entre dans ces cellules voisines. Ces protéines fonctionnent probablement en inhibant les protéines virales ou la synthèse d'acides nucléiques limitant ainsi la propagation de l'infection virale. Les INF agissent également de façon à inhiber la croissance

cellulaire et comme immunomodulateurs. Par exemple, ils peuvent induire la production du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et augmenter l'activité des cellules NK (*natural killer*) [156].

Les facteurs immunologiques cellulaires (cellules NK et lymphocytes T cytotoxiques spécifiques pour un antigène (CTL)) auraient un rôle important à jouer dans le contrôle des infections par HPV puisqu'il y a augmentation de l'incidence des tumeurs associées avec HPV chez les personnes dont l'immunité cellulaire a été compromise [157-162].

Salmon et ses collaborateurs ont montré que chez le lapin infecté par des CRPV, la régression de l'infection est influencée par la variabilité génétique des virus et par le polymorphisme du CMH [2, 163].

D'autres études ont montré que les CTL infiltraient les lésions bénignes qui régressaient naturellement menant ainsi à la résolution de la maladie [164-169].

Des CTL contre les protéines E6 et E7 sont retrouvées dans les CIN III (*cervical intraepithelial neoplasia*) et les cancers du col de l'utérus de façon marquée au site d'exposition des antigènes, dans les tumeurs elles-mêmes et dans le système lymphatique local [170, 171].

Les patients ayant subi une greffe rénale à qui ont été prescrits des niveaux de médicaments associés spécifiquement à un mal fonctionnement de la réponse des CTL ont souvent des verrues génitales causées par un HPV [155].

La progression des lésions de bas grade vers à grade plus élevé est plus fréquente chez les patientes ayant un faible niveau de CD4. Par exemple, parmi les patients allant subir ou ayant subi une transplantation rénale, 70% des femmes HPV-positives ont un frottis normal (sans anomalie cytologique) avant la transplantation tandis qu'après la transplantation, seulement 40% des femmes HPV-positives ont un frottis normal [172].

Un point important sur la réponse immunitaire générée par une infection par un HPV génital est le fait que l'endroit où est induite la réponse immunitaire, le col

de l'utérus, soit sujet à des fluctuations hormonales dues au cycle menstruel (le niveau hormonal peut affecter l'activité CTL et les conditions locales des cytokines vont aussi influencer la sorte de réponse immunitaire générée) [173].

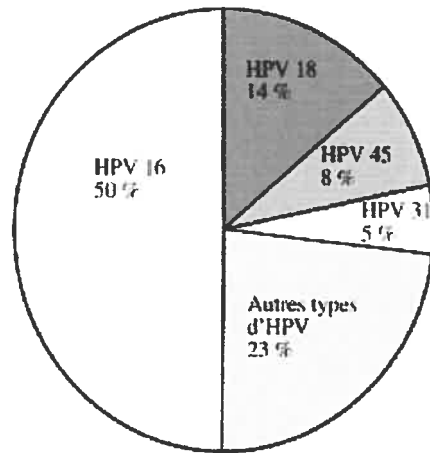
1.4 ÉPIDÉMIOLOGIE

Les infections par des HPV génitaux frappent plus de 50% des femmes actives sexuellement [14, 118, 174]. Les femmes sont infectées par un ou plusieurs types de HPV génitaux. Les infections du col de l'utérus liées au HPV comptent pour environ 15% des infections par HPV. Ce pourcentage varie en fonction de l'âge. Le niveau d'infection est plus élevé chez les femmes de moins de 25 ans par rapport aux femmes plus âgées [2, 175]. Il y a un deuxième pic chez les femmes ménopausées [176]. Après le pic du niveau d'infection par HPV chez les femmes de moins de 25 ans, il y a un pic d'incidence de CIN entre 25 à 35 ans et un pic d'incidence du cancer du col de l'utérus entre 55 et 65 ans [177]. La période de latence entre l'infection et le développement d'un CIN dure quelques années et la progression jusqu'au cancer du col de l'utérus prend encore 20 à 30 ans de plus [178]. La durée moyenne d'une infection à HPV chez les jeunes femmes est de seulement 8 mois avec une persistance de 30% un an après le début de l'infection et de 9% après deux ans [179]. La persistance de l'infection par un HPV à risque élevé est fortement reliée au développement et à la progression de lésions précancéreuses [117-119, 180-182].

Parmi les infections du col de l'utérus, de 50% à 75% sont causées par des HPV à risque élevé [183, 184]. De plus, 3% des femmes vont avoir des lésions du col de l'utérus détectables par colposcopie, biopsie ou examen cytologique. La plupart de ces lésions sont de bas grade, mais de 1% à 1,5% sont des lésions précancéreuses de haut grade et plus de 1/1000 sont des cancers [14].

En plus de la variation des niveaux d'infection par HPV selon l'âge des femmes, il y a aussi une variation entre les pays. Par exemple, une étude en Allemagne menée avec 20 161 femmes a montré que la prévalence était de 8,8% [177], alors qu'au Japon, on l'estime être entre 10% et 15% [185]. Parmi les femmes du Canada, la prévalence pour le HPV est d'environ 18% [186].

Dans le monde, il y a environ 500 000 nouveaux cas de cancers du col de l'utérus chaque année [1, 115, 187]. Ces nouveaux cas sont surtout dans les pays en voie de développement [188] (80% des nouveaux cas [3]), ce qui en fait, au niveau mondial, le septième cancer le plus fréquent et le troisième chez la femme [189]. Par année, environ 230 000 femmes meurent du cancer du col de l'utérus. Dans les pays en voie de développement, il est la première cause de mortalité liée au cancer chez la femme [187]. Aux États-Unis seulement, il y a eu 12 800 nouveaux cas de cancer du col de l'utérus et 4 600 morts en l'an 2000 [190-192]. Plus de 50% des cancers de la vulve, du pénis et de l'anus et plus de 20% des cancers de la bouche, du larynx et du nez contiennent un HPV anogénital à risque élevé. Presque 10% de tous les cancers à travers le monde sont liés à ces infections [12]. Plus particulièrement, les HPV16 et HPV18 (HPV à risque élevé) sont retrouvés respectivement dans 40% à 60% et dans 10% à 20% de tous les cas de cancer du col de l'utérus et ils sont également retrouvés dans d'autres types de cancers anogénitaux [16, 193]. Ces pourcentages varient selon l'endroit dans le monde. En Europe, près de 70% des cancers du col de l'utérus sont associés à HPV16. En Asie du Sud-Est, HPV18 est présent avec une fréquence d'environ 32%. En Amérique Centrale et du Sud, HPV39 et HPV59 sont présents dans près de 5% des cancers du col de l'utérus alors qu'on ne les retrouve que très rarement dans la population mondiale. Pour les HPV31 et HPV33, ils comptent pour plus de 10% des types impliqués dans la carcinogenèse en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. En Amérique du Nord et en Afrique, HPV45 est détecté en moyenne dans 13% des lésions malignes [114].



Source : Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K.V. (1995) *J Natl Cancer Inst* 87, 796–802 [114].

Figure 3. Répartition globale des HPV oncogènes dans le cancer du col de l'utérus. À travers le monde, HPV16 est le type de HPV le plus fréquemment retrouvé avec 50% des cas de cancer du col de l'utérus. Ensuite viennent HPV18 avec 14%, HPV45 avec 8% et HPV31 avec 5%. Finalement, les autres types de HPV comptent pour 23% des cas de cancers du col de l'utérus [114].

1.5 VACCIN ANTI-HPV

En 1990, une équipe de chercheurs a mis au point une méthode de dépistage de différents génotypes de HPV par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) se basant sur de courtes régions homologues qui sont conservées parmi les différents génotypes de HPV qui avaient été séquencés à cette date [194]. Cette méthode a permis la mise en place d'un programme de dépistage qui est relativement efficace, mais qui est coûteux [181, 195-202]. Par conséquent, il est difficile d'implanter le dépistage dans les pays en voie de développement. De plus, les hommes qui jouent un rôle très important dans la transmission du virus, ne participent habituellement pas à ces programmes de dépistage des HPV.

Une méthode pour combattre les maladies causées par les virus est l'utilisation des vaccins anti-viraux. Les vaccins peuvent être prophylactiques ou thérapeutiques. Le vaccin thérapeutique vise à éliminer l'infection déjà établie, qu'elle ait causé des lésions bénignes ou malignes. Dans le cas du HPV, pour produire un tel vaccin, il faut arriver à provoquer une réponse immunitaire contre les protéines E6 et E7 [203]. À ce stade, le génome viral est souvent intégré au génome de la cellule hôte et les protéines L1 et L2 ne sont plus exprimées [204]. Stimuler le système immunitaire pour qu'il reconnaisse les protéines virales L1 et L2 serait inutile. Par contre, en utilisant les protéines virales E6 et E7 comme antigènes, on stimule le système immunitaire de façon à ce qu'il reconnaisse les cellules infectées. En effet, les cellules infectées synthétisent ces deux protéines virales qui participent à la formation des tumeurs. Ce sont elles qui sont responsables de «l'immortalité» des cellules infectées. En fait, des essais cliniques sont présentement en cours pour un vaccin contre E7 de HPV16. Ces essais sont réalisés chez des patientes ayant un cancer avancé du col de l'utérus et le vaccin est produit avec des peptides de HPV16. Ce vaccin thérapeutique pourrait permettre de diminuer la gravité des infections (empêcherait les tumeurs de progresser), mais il ne pourrait pas prévenir l'infection [205].

Le vaccin prophylactique vise la prévention des infections virales. Le plus grand succès de cette stratégie a été l'éradication de la variole. Le vaccin prophylactique permet de rendre le système immunitaire apte à neutraliser le virus avant qu'il n'entre dans les cellules de l'hôte. Pour faire un tel vaccin, il faut présenter à l'organisme une substance immunogène qui pourra stimuler les lymphocytes T, car les CTL jouent un rôle très important dans la résistance aux HPV. La production d'anticorps doit aussi être stimulée (réponse de type B). Pour un tel traitement, il s'agit de présenter les protéines L1 et/ou L2 au système immunitaire, parce que les deux protéines tardives sont les protéines présentes sur la capsidie du virus. Les protéines L1 et L2 seront les protéines reconnues par le système immunitaire [206]. Pour faire ce vaccin, L1 est préférée à L2, parce qu'elle est naturellement présente en plus grande quantité sur la capsidie virale.

Évidemment, ces deux approches ne visent pas la même clientèle. Le vaccin prophylactique est utile pour les personnes les plus exposées au HPV. Une cible potentielle pour combattre, par la vaccination prophylactique, le cancer du col de l'utérus causé par le HPV serait les jeunes femmes au sommet de leurs activités sexuelles. Quant au vaccin thérapeutique, il sert aux personnes présentant déjà des lésions causées par le HPV.

Plusieurs approches ont été évaluées afin de trouver la méthode la plus efficace pour développer un vaccin contre HPV. Les virus HPV ne peuvent pas être cultivés facilement. Donc, des virions inactivés de HPV ne pourraient pas être utilisés pour la préparation des vaccins anti-HPV, parce qu'ils ne peuvent être produits en assez grande quantité, même pour les essais sur les animaux. Présentement, des vaccins sont développés avec des protéines individuelles de HPV sous forme de particules semblables à des virus (VLP) [147, 207], de protéines de fusion [208, 209] et de peptides [147, 210]. La plupart de ces vaccins visent les verrues (causées par HPV à faible risque) et non les lésions cancéreuses au niveau du col de l'utérus. Malheureusement, la réponse immunitaire contre les protéines individuelles est moins

prometteuse pour la prévention des infections par les HPV parce que : 1) la réponse immunitaire est premièrement de type B (anticorps circulants) et l'immunité de type T n'est pas fortement induite (l'immunité de cellules T est beaucoup plus efficace contre les virus) [211]; 2) les protéines ne sont pas efficaces pour une immunisation des muqueuses (en général, les protéines doivent être injectées à quelques reprises et l'injection induit une réponse systémique de type B (surtout des IgG circulants) qui n'est pas efficace dans la prévention des infections par les HPV [3, 150, 156]; 3) la préparation des protéines individuelles et de leurs complexes n'est pas facile à implanter à grande échelle pour la production industrielle de vaccin.

Un moyen beaucoup plus prometteur pour développer un vaccin anti-HPV serait l'utilisation de virus recombinants. Les avantages de cette approche sont : 1) les virus recombinants, même si défectifs, peuvent imiter une infection virale; 2) le vaccin pourrait être appliqué sur des muqueuses; 3) les virus recombinants sont plus immunogènes que les protéines individuelles; 4) l'immunité de type T est fortement induite [212, 213].

Les adénovirus recombinants, jusqu'à ce jour, ont surtout servi à la thérapie génique. Ils causent une réponse immunitaire élevée ce qui se traduit par une élimination des cellules transduites après 2 à 3 semaines [212-214], ils sont faciles à concentrer par ultracentrifugation, leur génome ne s'insère pas dans le génome des cellules infectées, ils ne causent pas de lésions cancéreuses.

Les adénovirus ont été découverts en 1953 [215]. Ce sont des virus à A.D.N. linéaire double brin d'environ 30 kb à 35 kb [216, 217]. À ce jour, 49 sérotypes humains ont été classés dans six sous-groupes (A à F) selon leurs propriétés d'héماغlutination. Les types les mieux caractérisés sont les types 2 et 5 du sous-groupe C [214]. Les adénovirus ne provoquent pas de maladies sévères chez l'être humain [218, 219], mais ils provoquent le développement d'anticorps neutralisants chez les personnes infectées qui gardent une immunité cellulaire et humorale pendant une longue période de temps [220, 221]. Comme les adénovirus sont des virus non

enveloppés, ils sont plus stables dans l'environnement que les virus enveloppés. Cette stabilité fait d'eux un outil intéressant pour le développement de vaccins.

Lors de l'encapsidation du génome adénoviral, 5% du génome peut être encapsidé efficacement [217, 222]. Seul, ce 5% n'est pas très intéressant, mais il est possible de remplacer des gènes adénoviraux par un gène servant à stimuler le système immunitaire pour le développement d'un vaccin.

Au départ, les adénovirus ont été développés pour la thérapie génique. Le sérotype le plus utilisé comme vecteur adénoviral est l'adénovirus humain de sérotype 5. Pour le rendre déficient, il a été modifié génétiquement. Pour rendre l'adénovirus 5 déficient, les régions de gènes E1 et E3 de l'adénovirus ont été délétées [223]. La région E1 est essentielle pour la réplication virale [214, 223, 224]. Par conséquent, les adénovirus pour lesquels cette région est délétée ne peuvent pas se répliquer dans les cellules normales. Pour ce qui est de la région E3, elle encode pour sept polypeptides qui n'ont pas tous une fonction connue [225]. Pour l'adénovirus humain de sérotype 5, différentes régions de E3 sont impliquées dans la liaison avec les molécules du CMH de classe I, dans la modulation de la lyse cellulaire par TNF et dans la régulation négative du récepteur EGF sur les cellules hôtes [226-228]. La délétion des régions E1 et E3 permet, en plus de rendre l'adénovirus déficient, de faire de l'espace pour insérer des gènes étrangers. Ainsi, jusqu'à 7,5 kb d'A.D.N. étranger peuvent être insérés dans le vecteur. Puisque la région E1 est essentielle pour la réplication virale, des cellules procurant cette région *in trans* est nécessaire pour la production d'adénovirus recombinants. C'est le cas pour les cellules HEK293 (cellules de rein d'embryon humain), une lignée cellulaire dans laquelle les gènes de la région E1 de l'adénovirus de sérotype 5 est exprimée de façon stable [229].

De plus, l'utilisation (avec succès) de vecteurs adénoviraux pour le développement de vaccins a été rapportée [230-232]. Des gènes ont été exprimés par des vecteurs adénoviraux comme l'antigène de surface de l'hépatite B, les glycoprotéines de VSV, les protéines *gag*, *pol* et *env* du VIH, la glycoprotéine B du

virus Herpes simplex, les glycoprotéines F et G du virus respiratoire syncytial, les glycoprotéines du virus de la rage et les glycoprotéines F et HN du parainfluenza de type III [220, 221, 233, 234]. Les études utilisant ces virus recombinants dans les modèles animaux ont montré qu'ils pouvaient induire une réponse immunitaire.

2. OBJECTIFS

L'objectif principal de cette étude a été d'effectuer les premières étapes d'élaboration d'un vaccin prophylactique contre les infections par les virus HPV (par conséquent, contre le cancer du col de l'utérus) puisqu'un tel vaccin n'est pas disponible présentement. Il existe quelques vaccins thérapeutiques étudiés dans des essais cliniques, mais pas encore de vaccin visant à prévenir l'infection par ce virus. Pour développer un vaccin anti-HPV, nous avons décidé d'utiliser un adénovirus recombinant. Le système qui a été utilisé est le vecteur adénoviral pAdEasy™ développé par Stratagene. [223, 235]

Le travail a été divisé en différentes étapes :

- 1) Nouveau test diagnostique. Les études diagnostiques et épidémiologiques ont été également orientées vers le développement d'un test amélioré de détection de HPV qui augmentera la sensibilité du diagnostic moléculaire de HPV. Ce test permettra la détection de tous les types de HPV de même que le suivi des sujets vaccinés et non vaccinés [211, 236].
- 2) HPV pour le vaccin. Tout d'abord, des études diagnostiques et épidémiologiques ont été nécessaires afin de déterminer précisément contre quel type de HPV diriger le vaccin. Plusieurs types de HPV à risque élevé sont responsables des tumeurs du col utérin, mais selon les régions du globe, un ou quelques types en particulier prédominent. [186, 211].
- 3) Clonage. Le gène de la protéine L1 du virus choisi a du être inséré dans un vecteur navette contenant le promoteur immédiat/précoce du cytomégalovirus (CMV) ainsi qu'un signal de polyadénylation provenant de SV40. Une fois ce clonage terminé, des bactéries électro compétentes ont du être cotransfectées par électroporation avec le vecteur navette contenant le gène de la protéine L1 et le vecteur pAdEasy-1.
- 4) Production des particules virales. Suite à la sélection du clone désiré, le virus recombinant portant le gène L1 de HPV doit être produit en grande quantité. Cette production est faite par transfection transitoire des cellules d'encapsulation avec le

clone de l'étape précédente afin de produire les adénovirus recombinants pour le vaccin.

5) Parallèlement, des anticorps polyclonaux de lapins anti-L1 ont été générés car il n'y avait que des anticorps monoclonaux de disponibles.

J'ai participé aux étapes 1 et 2 et j'ai réalisé les étapes du clonage, de la production des particules virales et de la réalisation des anticorps polyclonaux.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 DÉTERMINATION DU TYPE DE HPV [211, 236]

3.1 a) Échantillons

Au Centre Mère-Enfant de l'Université de Montréal, 691 échantillons de patients ont été analysés. Les patients étaient des femmes et des enfants (il n'y avait pas d'homme) âgés de moins d'un an jusqu'à 72 ans, la moyenne d'âge étant de 26,1 ans. De plus, ils appartenaient à différents groupes sociaux et ethniques et provenaient de différentes régions du Québec. Ces échantillons ont été sélectionnés car ils présentaient un potentiel d'infection par un HPV. Ils provenaient de différents tissus : utérus, vulve, peau péri-anale, peau (sauf peau péri-anale), vagin, larynx, pharynx, épiglotte, trachée, muqueuse orale (incluant langue et uvule) et endomètre.

3.1 b) Examen histologique

Un examen histologique a été fait afin d'établir le diagnostique des différentes lésions d'où les échantillons ont été prélevés. Pour ce faire, une fixation avec la formaline a été réalisée, suivie d'un encastrage avec la paraffine et d'une coloration avec HPS (Haematoxylin-Phloxine-Safran).

3.1 c) Préparation et vérification des matrices d'A.D.N.

À partir de ces échantillons, des matrices d'A.D.N. ont été préparées. Deux sections d'échantillons encastrés avec la paraffine de 5 μ m d'épaisseur ont été placées dans un tube pour micro-centrifugeuse avec 200 μ L de solution contenant 300 μ g/ μ L de Protéinase K, 0,5% de Tween-20, 50mM de Tris-HCl, pH 8,5 et 1mM d'EDTA. Le mélange a par la suite été incubé à 66°C pendant 3 heures (ou toute la nuit). L'enzyme a par la suite été dénaturée (10 min. à 95°C) et après une centrifugation, le surnageant a été recueilli. Il a servi de matrice pour l'amplification par PCR.

3.1 d) PCR spécifique pour HPV

Un PCR spécifique pour le HPV a été réalisé avec les amorces consensus GP5+ (1106_F : 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC-3', où Y=T ou C) et GP6+ (1246_R: 3'-GAAA-AATAAACTGTAAATCATATTC-5') afin d'amplifier les parties correspondantes de la protéine L1 de HPV selon différentes publications [236-240]. L'enzyme utilisée est la *Taq* polymérase avec une étape de dénaturation de 4 min. à 94°C suivie de 40 cycles: 1 min. de dénaturation à 94°C, 1 min. d'appariement à 50°C et 30 sec. d'élongation à 72°C. Pour terminer, l'extension finale s'est faite à 72°C pendant 4 min. Les régions consensus des amorces MY09/MY11 (MY09 (1515_R) : 3'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-5' et MY11 (1064_F) : 5'-GCMCAGGGWCAT-AAYAATGG-3') ont été utilisées selon les protocoles déjà publiés (enzyme *Taq* polymérase, 4 min. de dénaturation à 94°C suivies de 40 cycles : 30 sec. de dénaturation à 95°C, 30 sec. d'appariement à 55°C et 1 min. d'élongation à 75°C) [237].

3.1 e) Séquençage direct

Du séquençage direct a également été effectué avec le kit de «Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing» (Amersham Canada, Baie d'Urfé, Québec). Les instructions fournies par la compagnie ont été suivies. La matrice utilisée à cette étape était 1,5µL de produit de PCR non purifié obtenu à l'étape précédente. Le séquençage a été fait avec l'amorce GP6+ (25 ng par réaction).

3.1 f) Méthode deux-tiers (figure 4)

Une autre partie du travail a consisté en une première amplification par PCR avec les amorces GP5+/GP6+ (mêmes conditions qu'en 3.1d). Ensuite, les échantillons qui ont donné un PCR positif, ont été séquencés directement avec l'amorce GP6+. Ceux qui ont donné un résultat négatif ont été amplifiés avec les amorces MY09/MY11 (mêmes conditions qu'en 3.1d). Les échantillons qui n'étaient toujours pas amplifiés après ce deuxième PCR ont été rapportés comme ayant une

absence de HPV détectable par cette méthode. Par contre, ceux qui ont donné un résultat positif ont été réamplifiés avec les amorces GP5+/GP6+. Le produit de cette amplification a été séquencé directement avec l'amorce GP6+. Cette méthode dite deux-tiers [236] a permis d'obtenir une plus grande sensibilité pour la détection de HPV.

3.1 g) Alignement des séquences

Enfin, les alignements de séquences ont été réalisés grâce à deux outils, tout d'abord le serveur BLAST du service en ligne de GenBank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Par la suite, une méthode plus rapide a été développée [240] grâce à une mini-base de données maison de HPV.

3.1 h) Analyse statistique des données

L'analyse statistique des données a été obtenue selon la méthode de distribution binomiale décrite par Goldstein [242].

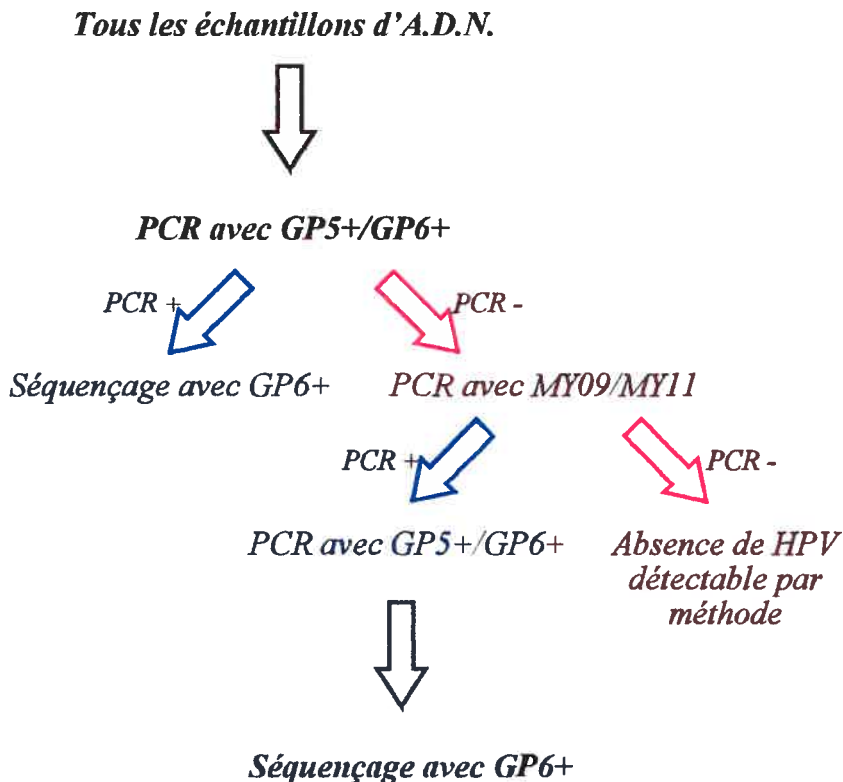


Figure 4. Schéma de la méthode deux-tiers. Tous les échantillons d'A.D.N. ont d'abord été amplifiés avec les amorces GP5+/GP6+. Les échantillons pour lesquels cette amplification était positive ont été séquencés avec l'amorce GP6+. Ceux pour lesquels l'amplification était négative ont été amplifiés une seconde fois, mais avec les amorces MY09/MY11. Suite à cette deuxième amplification, les échantillons qui n'ont pas été amplifiés ont été classés comme ayant une absence de HPV détectable par cette méthode. Les échantillons qui ont été amplifiés ont été réamplifiés avec les amorces GP5+/GP6+. Le produits de chacune de ces réamplifications a été séquencé avec l'amorce GP6+.

3.2 CONSTRUCTION DES PLASMIDES

3.2 a) Amplification du gène L1 par PCR

Dans un premier temps, le gène L1 a été amplifié à partir du plasmide pHPV-16 (ATTC). Ce plasmide contient le génome complet de HPV16, mais il est coupé par le vecteur phagique pBluescript SK⁻ à l'intérieur du gène de la protéine L1. Le gène de la protéine L1 de HPV16 a été amplifié une première fois avec deux paires d'amorces : les amorces L1_F.NOT (ATA AGA ATG C↓GG CCG CCA GGG TCT CCA CAA TAT ACA) et L1_30R (GTG ACC CCG TTT CCT AG↓G GGT ACA TGG TTA) ainsi que L1_R (GCT CTA GAC ATA CAA TAC TTA CAG CTT ACG T) et L1_30F (CAC TGG GGC AAA G↓GA TCC CCA TGT ACC AAT). La séquence soulignée dans les amorces L1_30F et L1_30R sont des sites de restriction reconnus par BamHI. Celle soulignée dans L1_F.NOT est le site de restriction de l'enzyme NotI. Toutes ces amorces viennent de Sigma® Genosys. Pour la première amplification, deux tubes ont été utilisés. Le premier contenait les amorces L1_F.NOT et L1_30R et le deuxième, L1_R et L1_30F. Les mêmes conditions ont été utilisées pour ces trois PCR : enzyme *Taq* polymérase, 35 cycles avec 30 sec. d'élongation à 94°C, 1 min. d'appariement à 53°C et 1 min. 10 sec. d'élongation à 72°C.

Les fragments obtenus ont été migrés sur gel d'agarose 1%. Les amorces L1_F.NOT et L1_30R ont donné des fragments de 652 pb (F652) et les amorces L1_R et L1_30F, de 1 035 pb (F1035). Les bandes ont été isolées sur un gel d'agarose 1% à faible point de fusion (Boehringer Mannheim). Le gel a été fondu et l'agarose a été digérée avec l'enzyme agarase (Boehringer Mannheim). Par la suite, une extraction au phénol suivie d'une extraction au chloroforme (24:1) alcool isoamyl ont permis de purifier les deux fragments d'A.D.N..

Pour lier les deux fragments afin d'obtenir le gène complet de la protéine L1 de HPV16, un deuxième PCR a été effectué avec les fragments F652 et F1035. Les amorces L1_F.NOT et L1_R ont été utilisées (mêmes conditions que les trois PCR précédents). Le gène de la protéine L1 a ensuite été complètement séquencé.

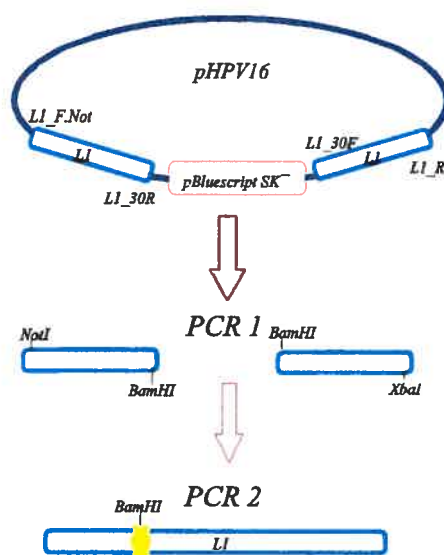


Figure 5. Stratégie pour l'amplification du gène de la protéine L1 de HPV16 à partir du plasmide pHPV16. Dans ce plasmide, le gène de la protéine L1 est interrompu par les séquences de pBluescript SK⁻ au niveau d'un site de restriction pour l'enzyme BamHI. Pour régénérer le gène complet et intact, un premier PCR sur la matrice de pHPV16 a été effectué avec 2 paires d'amorces : L1_F.Not (NotI) et L1_30R (BamHI) ainsi que L1_30F (BamHI) et L1_R. Entre parenthèses, se trouve indiqué le site de restriction présent dans chacune des amorces. Ainsi, le site de restriction BamHI qui était perdu a pu être reconstitué. Ce premier PCR a permis d'obtenir un fragment d'environ 650 pb et un autre d'environ 1,05 kb. Pour le second PCR, les 2 fragments ont été amplifiés ensemble avec la paire d'amorces L1_F.Not et L1_R.

3.2 b) Construction des vecteurs p1674, p1960 et p1961

Le vecteur p1674 est constitué du plasmide pGEX-4T-3+PRIM1 qui contient le gène pour la protéine de la glutathione-S-transférase (GST) et de la protéine L1 de HPV16. Pour construire le plasmide p1674, le plasmide pGEX-4T-3+PRIM1 (le vecteur) a été digéré avec les enzymes de restriction XmaI et NotI. Par cette digestion, le gène PRIM1 a été enlevé du plasmide. L'insert a été obtenu en digérant le gène de la protéine L1 obtenu à l'étape 3.2 a) avec les enzymes de restriction XmaI et NotI (voir figure 5). Les clones positifs ont été identifiés par PCR avec les amorces GST-FN1 (GGCTGGCAAGCCACGTTTG) et L1_30R (*Taq* polymérase, 35 cycles : 30 sec. de dénaturation à 94°C, 30 sec. d'appariement à 55°C et 45 sec. d'élongation à 72°C). Pour les clones positifs, une bande d'environ 720 pb était attendue.

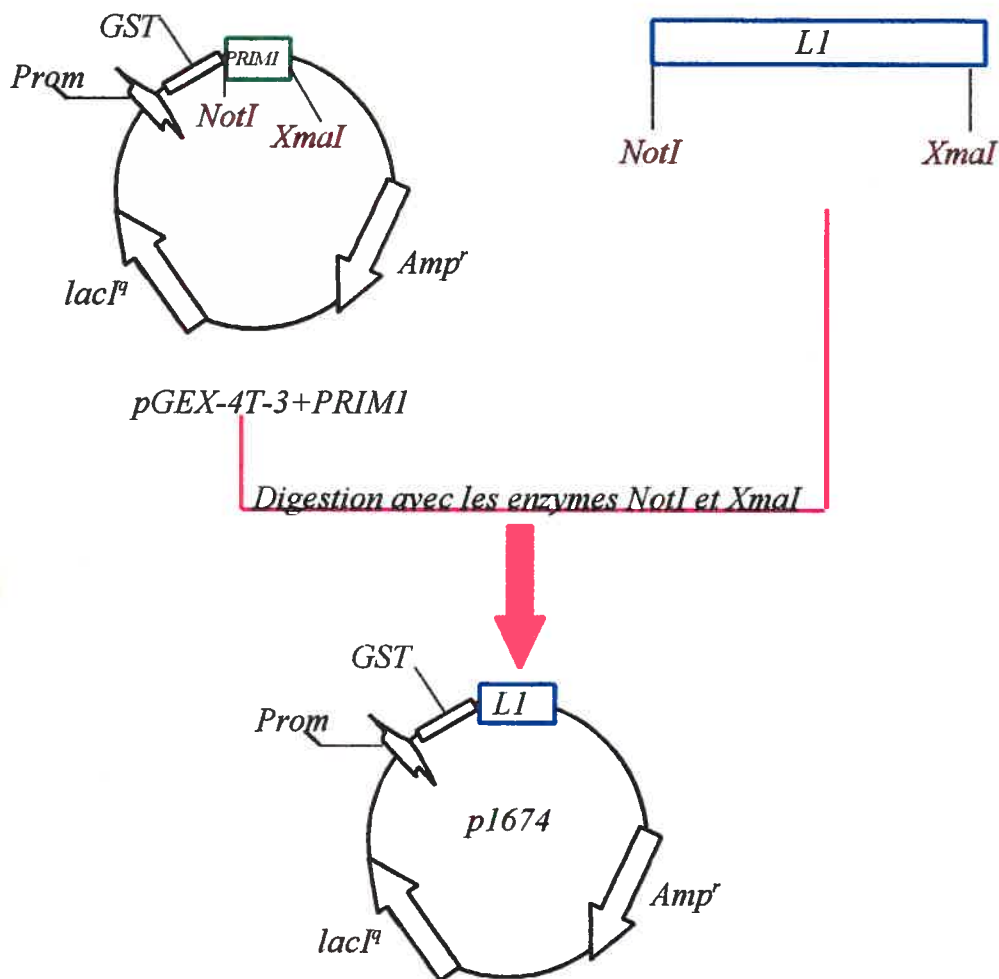


Figure 6. Construction du plasmide p1674. Le vecteur (le plasmide pGEX-4T-3+PRIM1) et l'insert (le gène de la protéine L1 de HPV16) ont été digérés avec les enzymes de restriction *NotI* et *XmaI*. Les digestions du plasmide pGEX-T4-3+PRIM1 ont permis d'enlever le gène de la protéine PRIM1 pour y insérer le gène de la protéine L1.

Le vecteur p1960 est un vecteur navette qui contient le promoteur immédiat/précoce de CMV et le signal de polyadénylation de SV40 entre lesquels le gène d'intérêt (L1) est inséré. Le vecteur navette a été fourni avec le système de vecteur adénoviral pAdEasy™ de Stratagene [223, 235]. Pour la construction, le vecteur a été digéré avec les enzymes de restriction EcoRV et NotI. Le gène de la protéine L1 a été digéré avec l'enzyme XbaI. Le bout cohésif laissé par cette digestion a été rempli avec le fragment Klenow de l'A.D.N. polymérase. Une digestion avec l'enzyme NotI a suivi le remplissage. Les clones positifs ont été identifiés par PCR avec les amorces HPV_1506R (GGAAACTGATCTAGGTCT) et HPV_1195F (CTTTAAGGAGTACC-TACG) (*Taq* polymérase, 35 cycles : 30 sec. de dénaturation à 94°C, 30 sec. d'appariement à 55°C et 45 sec. à 72°C) et par digestion enzymatique avec l'enzyme NotI.

Finalement, le vecteur p1961 est le vecteur adénoviral obtenu suite à la co-transfection du vecteur p1960 avec le vecteur pAdEasy-1 dans les bactéries électro-compétentes BJ 5183 de Stratagene. Pour obtenir ce plasmide p1961, le protocole de la compagnie Stratagene pour le système de vecteur adénoviral pAdEasy™ a été suivi (conditions d'électroporation : 200Ω, 2,5kV et 25μF).

Pour sélectionner le vecteur p1961, une digestion avec l'enzyme de restriction PacI était proposée dans le protocole de la compagnie afin d'identifier un clone positif. Cette digestion doit donner un fragment d'environ 30kb et un autre de 3kb si la recombinaison homologue a lieu entre les bras de recombinaison homologue. Un PCR a aussi été effectué avec les amorces pAdEasy1_32 413F (GCTATGCTAACCA-GCGTAGC) et p1959_4546R (GATGCGGTATTTTCTCCTTACG) (*Taq* polymérase, 35 cycles : 30 sec. de dénaturation à 94°C, 30 sec. d'appariement à 55°C et 2 min. à 45 sec. d'élongation à 72°C).

3.3 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules d'encapsulation HEK293 ont été cultivées dans le DMEM (GibcoBRL®) auquel a été ajouté du sérum de veau fœtal (Wisent, Inc.) à une concentration de 15% et une solution d'antibiotique/antimycotique (GibcoBRL®) : pénicilline G (200 U/mL), sulfate de streptomycine (200 U/mL) et amphotéricine B (0,5 µg/mL). Les cellules HEK293 ont été cultivées à 37°C à 5% de CO₂, dans des plaques de 6 puits de 35 mm et dans les plaques de 100 mm.

3.4 VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE L1 SOUS LE CONTRÔLE DU PROMOTEUR CMV

3.4 a) Transfections transitoires

Afin de s'assurer que la protéine L1 soit bel et bien exprimée lorsque son gène est sous le contrôle du promoteur immédiat/précoce de CMV, une série de transfections transitoires de cellules HEK293 a été effectuée. Les cellules à 80% de confluence ont été mises en contact 3h avec l'agent de transfection qui était la LipofectAmine™ de GibcoBRL® et 8µL d'A.D.N. avant que le milieu sans sérum ne soit changé. Trois jours après la transfection, les cellules ont été lavées avec une solution de NaCl 0,9%, puis récoltées avec 400µL tampon de chargement au SDS 1X.

3.4 b) Vérification des extraits cellulaires par immunobuvardage

12µL (environ 10 µg de protéines) des extraits cellulaires totaux ont par la suite été chargés sur un SDS-PAGE 9%. Suite au transfert des protéines présentes sur le gel sur une membrane de nitrocellulose, celle-ci a été placée à 4°C toute la nuit dans une solution de lait/TBS-T 5%. Le premier anticorps était l'anticorps polyclonal de lapin anti-GST-L1 (dilution de 1/200 dans la solution de lait/TBS-T 5%). Le deuxième anticorps était un anticorps monoclonal de souris anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma®). L'anticorps était toujours dilué dans la même solution de lait/TBS-T 5%, mais cette fois avec une dilution de 1/5000.

3.5 PRODUCTION DES ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS

Quand le plasmide recombinant positif a été sélectionné, il a servi à transformer les bactéries XL10-Gold. Ces bactéries sont déficientes pour l'endonucléase et pour la recombinaison. Cette étape permet d'obtenir l'A.D.N. du plasmide recombinant (p1961) en grande quantité. Afin de préparer le plasmide pour la transfection, p1961 a été digéré avec l'enzyme de restriction *PacI* afin de dégager les séquences terminales répétées inversées gauche et droite (LITR et RITR). Pour que l'A.D.N. adénoviral puisse être répliqué et transcrit, il doit être linéaire et la RITR et la LITR doivent être libres.

La transfection avec p1961 digéré par *PacI* s'est faite dans les cellules HEK293. Pour la transfection, les cellules étaient à environ 80% de confluence et 8µg d'A.D.N. ont été utilisés.

Quand les cellules transfectées ont commencé à s'arrondir et à se détacher de la plaque, elles ont été récoltées avec une solution de PBS. Pour poursuivre la préparation du stock primaire d'adénovirus, les cellules ont subi quatre séries de gel/dégel (bain de glace sèche/méthanol et bain à 37°C). Les débris cellulaires ont ensuite été récoltés par micro centrifugation à 12 000 X g pendant 10 min. Le surnageant qui contient le stock primaire d'adénovirus a été conservé à -80°C.

3.6 PRODUCTION DES PROTÉINES DE FUSION ET DES ANTICORPS POLYCLONAUX DE LAPIN ANTI-GST-L1

Les protéines de fusion ont été obtenues en suivant le protocole fourni par la compagnie Pharmacia. Les bactéries *Epicurian coli XL2-Bleu MRF' ultra competent* (Stratagene) ont été stimulées à l'IPTG pendant 4 h à 30°C. Les extraits bactériens ont été passés sur une colonne d'affinité de glutathione-sépharose. La colonne d'affinité a retenu les protéines de fusion GST-L1 et a permis leur purification. L'élution s'est faite avec 2mL de tampon d'élution à la glutathione préparé selon le protocole de Pharmacia. Il y a eu incubation à la température de la pièce pendant 15 min. L'incubation avec 2 mL de tampon d'élution a été faite 2 autres fois pour un total de 3 éluions. Avant l'injection, la concentration en protéines a été évaluée par un test de Bradford. Ensuite, un SDS-PAGE 9% a été fait afin de vérifier que la protéine isolée soit de la taille attendue. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

Pour l'immunisation, 500µg de protéines GST-L1 non digérées en émulsion 1:1 avec l'adjuvant complet de Freund ont été injectés à un lapin. Pour récolter les anticorps anti-GST-L1, le lapin a subi 2 prélèvements suivis d'un saignement final.

4. RÉSULTATS

4.1 ÉLABORATION D'UN TEST DIAGNOSTIQUE DE HAUTE SENSIBILITÉ POUR LA DÉTECTION DE TOUS LES TYPES DE HPV

Une étude portant sur plus d'une centaine d'échantillons a permis l'élaboration d'un test de dépistage des HPV, un test rapide et efficace. De façon générale, les tests de dépistage du HPV se basent sur la détection de l'A.D.N. viral. Ces tests utilisent les immunobuvardages de type Southern, les dot blots, l'hybridation *in situ*, le PCR et l'hybridation en solution [243]. Les méthodes de détection du HPV par PCR sont les plus sensibles et elles permettent la détection de l'A.D.N. du HPV, même si une seule copie est intégrée dans le génome de la cellule hôte [243]. Le PCR peut être utilisé de différentes façons. En utilisant des amorces consensus (ou universelles), il est possible de détecter plusieurs (peut-être même tous) types de HPV infectant la région ano-génitale [202, 236, 238, 244]. Des amorces spécifiques pour un type de HPV en particulier peuvent également être utilisées. Dans ce cas, un seul type de HPV peut être amplifié par la réaction.

Les amorces consensus pour les HPV ont été développées à partir du gène de la protéine L1. Deux paires d'amorces consensus sont abondamment utilisées, les amorces MY09/MY11 [245] et GP5/GP6 [202, 236, 244]. Quand le PCR sert à la détection et à la détermination du type de HPV, une combinaison de PCR doit utiliser des amorces consensus et des amorces spécifiques à un type de HPV [246]. Dans ce cas, un seul type de HPV peut être détecté. Une autre possibilité est de faire suivre le PCR qui permet la détection de la présence du HPV par une analyse avec digestion, par des enzymes de restriction, du fragment amplifié [247].

Dans cette étude, comme beaucoup d'échantillons devaient être analysés, l'utilisation des enzymes de restriction pour l'identification des types de HPV n'a pas été retenue. Le PCR a quand même été utilisé pour permettre la détection des échantillons infectés par un HPV et pour amplifier les séquences appartenant au HPV.

Par contre, pour déterminer le type de HPV présent dans les échantillons, les produits de PCR ont directement été amplifiés (PCR-DS). Cette méthode est plus fiable. Elle minimise les erreurs de classification et permet de déterminer le type des HPV présents, que ce soit des HPV de type connu ou des nouveaux types de HPV. Une seule réaction de séquençage est nécessaire.

L'identification d'un nouveau type de HPV requiert une étape de séquençage. Jusqu'à maintenant, les nouveaux types étaient découverts par amplification par PCR d'échantillons cliniques. Suite à ce PCR, un clonage suivait et ce clone était séquencé [248-252]. Cette façon de procéder n'est pas très utile pour les laboratoires de diagnostic des hôpitaux. Le clonage n'est pas une technique employée régulièrement et c'est une technique qui est longue. De plus, toute cette procédure est coûteuse et les fragments de PCR ne sont pas la meilleure source pour effectuer un clonage. Les fragments ainsi obtenus sont polymorphiques à cause des erreurs qui surviennent lors de l'incorporation des nucléotides à cause des polymérases thermostables.

La grande limitation du séquençage direct, jusqu'à maintenant, était la piètre qualité des réactions de séquençage faite à partir de la matrice des fragments de PCR. Les réactions s'arrêtaient prématurément à cause de la structure secondaire. Dans notre cas, des didésoxynucléotides marqués au [α -³³P] ont été utilisés. Avec ces didésoxynucléotides, même s'il y a des produits de séquençage où une terminaison non spécifique a eu lieu, ils n'apparaissent pas à la fin, parce qu'ils ne sont pas marqués. Seulement les produits qui sont terminés avec les [α -³³P]-didésoxynucléotides montreront une bande visible suite à l'exposition du gel. En plus, le cycle de séquençage est fait à une température plus élevée ce qui contribue à la diminution de la terminaison non-spécifique des réactions [253].

Tous les échantillons ont été testés par le PCR-DS. Il y a d'abord eu la détection de HPV par PCR avec les amorces GP5/GP6 suivie du séquençage direct avec l'amorce GP6. Les mêmes échantillons ont été testés par PCR avec les amorces MY09/MY11 pour la détection de HPV et ces PCR aussi ont été suivi du séquençage avec l'amorce GP6. Tous les échantillons ont finalement été repris pour faire une

analyse qui combinait les deux premières façons de faire. Cette expérience nous a permis de constater qu'aucune des deux paires d'amorces ne pouvait remplacer complètement l'autre.

Suite aux résultats obtenus, une méthode dite «*two-tier*» a été développée. Pour la première étape, tous les échantillons ont été testés avec les amorces GP5/GP6 pour la présence de HPV. Les échantillons positifs ont été séquencés avec l'amorce GP6. Les échantillons négatifs ont été amenés à une autre étape où ils ont été testés avec les amorces MY09/MY11. Parmi ces échantillons, ceux qui ont donné un résultat positif ont été ramenés à la première étape, c'est-à-dire qu'ils ont été réamplifiés avec les amorces GP5/GP6 et séquencés avec l'amorce GP6 (j'ai participé à cette étape de séquençage). Pour ce qui est des échantillons qui ont encore donné un résultat négatif suite à cette deuxième amplification, ils ont été considérés comme étant négatifs pour la présence de HPV. Pour l'analyse des 691 échantillons, cette méthode a permis de cataloguer les 691 échantillons dans 47 types de HPV dont deux nouveaux types de HPV [235, 239, 240].

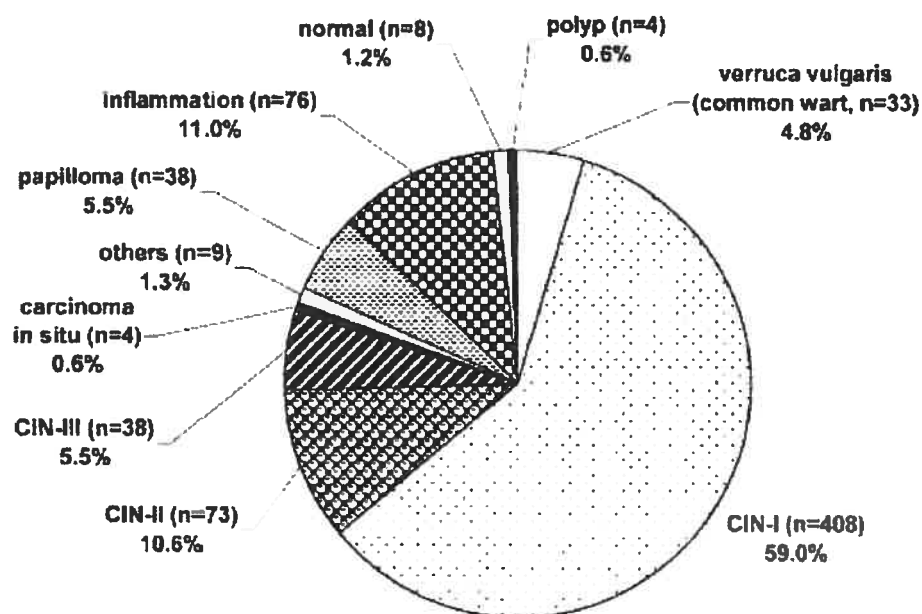
TABLE I. Nombre d'isolats de HPV par type de HPV*[211]

	Nombre d'isolats			
	Infection simple	Co-infection	Total	
<i>Risque élevé</i>				
HPV16	94	12	106	19.96%
HPV18	15	2	17	3.20%
HPV31	22	2	24	4.52%
HPV33	17	0	17	3.20%
HPV35	8	0	8	1.51%
HPV39	4	1	5	0.94%
HPV45	4	2	6	1.13%
HPV51	6	1	7	1.32%
HPV52	4	5	9	1.69%
HPV56	15	3	18	3.39%
HPV58	12	3	15	2.82%
HPV59	3	1	4	0.75%
HPV66	10	4	14	2.64%
HPV68	2	1	3	0.56%
<i>Total de risque élevé</i>	216	37	253	47.65%
<i>Faible risque</i>				
HPV6	102	12	114	21.47%
HPV11	35	2	37	6.97%
HPV40	3	0	3	0.56%
HPV42	11	4	15	2.82%
HPV43	3	3	6	1.13%
HPV44	0	1	1	0.19%
<i>Total de faible risque</i>	154	22	176	33.15%
<i>Risque inconnu</i>				
AF012461	2	3	5	0.94%
CP6108	2	1	3	0.56%
CP8304	3	2	5	0.94%
han831	1	0	1	0.19%
HPL1831	1	0	1	0.19%
HPV1a	1	0	1	0.19%
HPV2/2a	14	2	16	3.01%
HPV3	0	1	1	0.19%
HPV7	4	0	4	0.75%
HPV13	2	0	2	0.38%
HPV15	0	1	1	0.19%
HPV27	1	0	1	0.19%
HPV28	0	1	1	0.19%
HPV32	3	1	4	0.75%
HPV53	6	2	8	1.51%
HPV54	4	1	5	0.94%
HPV55	3	2	5	0.94%
HPV57	8	0	8	1.51%
HPV62	1	2	3	0.56%
HPV67	7	1	8	1.51%
HPV70	1	1	2	0.38%
HPV73	0	1	1	0.19%
JC9710	2	1	3	0.56%
JC9813	0	4	4	0.75%
L1AE10(hanHD25)	1	0	1	0.19%
MM7	1	1	2	0.38%
MM8	0	4	4	0.75%
<i>Autre</i>	0	2	2	0.38%
<i>Total de risque inconnu</i>	68	34	102	19.21%
<i>Total de HPV</i>	438	93	531	100.00%

*Les données ont été obtenues séparément pour des infections simples, doubles ou triples. Les quatre types les plus fréquents de chaque groupe de risque sont en caractère gras.

4.2 DÉTERMINATION DU TYPE DE HPV

Avant de débiter le développement d'un vaccin contre le HPV, il était essentiel de déterminer contre quel type de HPV, exactement, devait être dirigé ce vaccin. Pour ce faire, 691 échantillons de différentes lésions provenant de patients du Centre Mère-Enfant de l'Université de Montréal ont été analysés. Sur ces échantillons, un PCR-DS a été réalisé afin d'identifier ceux où il y avait véritablement infection par HPV et pour déterminer le type de HPV présent dans l'échantillon. Un diagnostic histologique a aussi été posé pour déterminer le type de lésion de chacun des échantillons. Ces échantillons ont pu être distribués dans 10 catégories différentes : verrue vulgaire, polype, inflammation, papillome, échantillon normal, carcinome *in situ*, CIN de grade I, II et III ainsi que la catégorie autre.

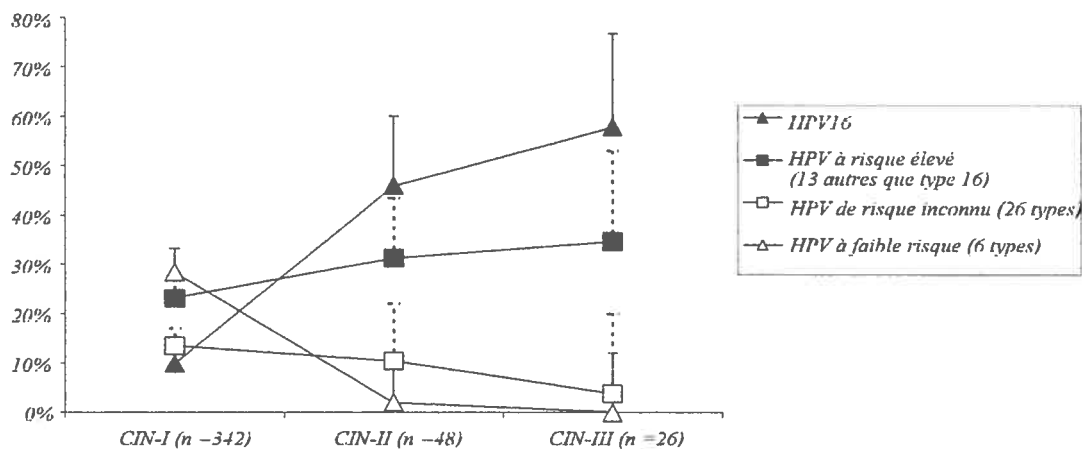


Source : Feoli-Fonseca, J.C., Oligny, L.L., Brochu, P., Simard, P., Falconi, S., Yotov, W.V. (2001) *J. Med. Virol.* **63**, 284-92. [211]

Figure 7. Répartition des 691 échantillons parmi les 10 catégories de diagnostic histologique. Les données incluent les échantillons provenant du col de l'utérus (554) aussi bien que les échantillons ne provenant pas du col de l'utérus (137).

Comme le vaccin à développer doit servir à prévenir le cancer du col de l'utérus, nous étions intéressés par les différents types de HPV présents dans les échantillons de CIN I, II et III. Grâce au séquençage direct de ces échantillons, les types de HPV ayant infecté chacune des lésions d'où provenaient ces échantillons a pu être déterminé. À la figure 8, les types ont été regroupés en 4 catégories. Il y a tout d'abord 6 types de HPV à faible risque, 26 types de HPV dont le risque est inconnu, 13 types de HPV à risque élevé (sauf le type 16) et finalement, le HPV16 qui est un HPV à risque élevé.

Sur cette figure, il est possible de constater que les HPV à faible risque sont les plus fréquemment retrouvés dans les lésions CIN de grade I et qu'à mesure que les grades augmentent, leur présence diminue par rapport aux autres types. En fait, leur présence est pratiquement nulle au niveau des CIN de grade III. Pour ce qui est des 26 types de HPV pour lesquels le risque n'est pas connu, ils semblent suivre la même tendance que les HPV à faible risque, mais d'une façon un peu moins significative. Les 13 types (autre que le HPV16) de HPV à risque élevé sont relativement moins présents que les HPV à faible risque au niveau des CIN de grade I, mais cette présence relative augmente pour le CIN de grade II et reste environ au même niveau pour le CIN de grade III. Finalement, le HPV16 est le type le moins présent au niveau du CIN de grade I. En revanche, la proportion du nombre d'infection par ce type de HPV par rapport au nombre d'infection par les autres types de HPV fait un bond considérable pour être majoritaire au niveau des CIN de grade II. Cette proportion augmente encore pour le CIN de grade III.



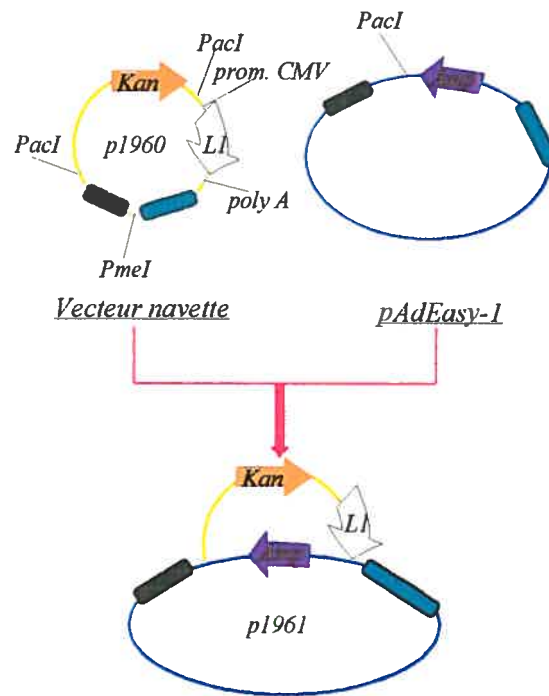
Source : Feoli-Fonseca, J.C., Oligny, L.L., Brochu, P., Simard, P., Falconi, S., Yotov, W.V. (2001) *J. Med. Virol.* **63**, 284-92. [211]

Figure 8. Détermination du type de HPV le plus fréquemment retrouvé dans les tumeurs. Suite à un examen histologique de spécimens de lésions récoltés sur des patients du Centre Mère-Enfant de l'Université de Montréal, les CIN de grade I, II et III ont été testés par PCR-DS pour la présence de HPV. Cette technique a également permis de déterminer le type des virus présents dans les lésions. Les HPV ont été regroupés en quatre catégories : à faible risque (6 types), de risque inconnu (26 types), à risque élevé (13 types autres que HPV16) et HPV16. Le niveau de détection pour chacun des types a été déterminé pour chacun des grades de CIN. Les barres verticales représentent la moitié supérieure des intervalles de confiance 95%.

4.3 CONSTRUCTION DES PLASMIDES P1960 ET P1961

Après avoir déterminé que le HPV-16 est le type le plus fréquemment retrouvé dans les CIN de grade III et avoir régénéré le gène de la protéine L1 de HPV16 présent dans le plasmide pHPV-16 de ATCC, le gène de la protéine L1 a été inséré dans le vecteur navette du système de vecteur adénoviral pAdEasy™ de Stratagene. Le clone sélectionné a donné une bande de PCR d'environ 310 pb (amorces HPV_1195F et HPV_1506R) et une bande, suite à la digestion avec l'enzyme de restriction NotI, d'une taille d'environ 9 kb. C'est le plasmide p1960.

Le plasmide p1960 (vecteur navette + gène de la protéine L1 de HPV16) a ensuite été digéré avec l'enzyme de restriction PmeI. La digestion avec PmeI avait pour but de faciliter la recombinaison homologue de p1960 avec le plasmide pAdEasy-1 lors de la co transfection des bactéries électro compétentes. La recombinaison homologue permet la génération du plasmide recombinant p1961. Ce dernier, une fois digéré avec l'enzyme PacI, a donné des bandes à environ 3 kb et 30 kb. De plus, afin de s'assurer que le gène de la protéine L1 était bien présent et dans le bon sens, un PCR avec les amorces pAdEasy1_32 413F et p1959_4546R a été réalisé et a donné la bande attendue d'environ 1,2 kb.



Source : Hosfield, T., Eldridge, L. *Stratagene Strategies* 13, 100-2. [223]

Figure 9. Construction des plasmides p1960 et p1961. Dans un premier temps, le plasmide p1960 a été construit en insérant le gène de la protéine L1 de HPV16 au niveau du site de polyclonage (entre le promoteur CMV et le signal de polyadénylation de SV40) du vecteur navette. Afin de construire le plasmide p1961, p1960 a été digéré avec l'enzyme de restriction PmeI ce qui a permis la libération des bras de recombinaison homologue. Des bactéries électro compétentes ont été transfectées avec p1960 digéré et pAdEasy-1. Les clones obtenus ont été vérifiés par digestion avec l'enzyme PacI afin de sélectionner le clone désiré, le plasmide p1961.

4.4 PRODUCTION DE LA PROTÉINE DE FUSION GST-L1

Après avoir testé plusieurs anticorps monoclonaux provenant de différentes compagnies, nous avons réalisé qu'aucun ne fonctionnait. La décision a alors été prise de produire des anticorps polyclonaux anti-L1. Afin d'obtenir ces anticorps polyclonaux anti-L1 de HPV16, le gène de la protéine L1 a été inséré dans le plasmide pGEX-4T-3+PRIM1 pour donner le plasmide p1674. Les clones désirés ont été sélectionnés par PCR avec les amorces GST-FN1 et L1_30R. Une bande d'environ 720 pb a été obtenue. Le plasmide p1674 a servi à la transformation des bactéries *Epicurian coli XL2-Bleu MRF' ultra competent*. Les bactéries transformées ont été lysées par sonication et les extraits ont été préparés selon le protocole fourni par Pharmacia. Les protéines de fusions GST-L1 ont été éluées de la colonne. Sur la figure 10, on voit différentes fractions recueillies lors de l'éluion de la protéine de la colonne d'affinité. La première ligne de migration représente la protéine GST sauvage. Elle a un poids moléculaire d'environ 27 kDa. La fraction 0 ne semblait pas contenir de protéine lors du test de Bradford qui a été effectué avant de faire le SDS-PAGE. Cette fraction a été utilisée comme contrôle. La fraction 5 contient une protéine de la bonne taille, i.e. environ 84 kDa (GST : 27 kDa; L1 : 57 kDa). La bande à 27kDa montre que la protéine de fusion GST-L1 a été clivée. Les fractions 4 et 6 semblaient contenir des protéines lors du test de Bradford. Suite à leur migration, des bandes d'environ 27 kDa (poids de GST sauvage) sont observées. Ces bandes indiquent la présence de protéines dans ces fractions. Les protéines présentes dans les fractions 4 et 6 se sont dégradées ou ont été clivées. La dégradation et le clivage arrivent fréquemment avec les protéines de fusion GST-X et ils ne représentent pas un véritable problème. Certains groupes utilisent, avec succès, des peptides beaucoup plus courts pour immuniser les lapins [254]. Les fractions 10 et 11 semblaient également contenir des protéines lors du test de Bradford, alors elles ont été migrées avec les autres pour vérification. Les autres fractions qui n'ont pas été migrées sur ce gel n'avaient pas donné un résultat positif à la présence de protéine lors du test de Bradford.

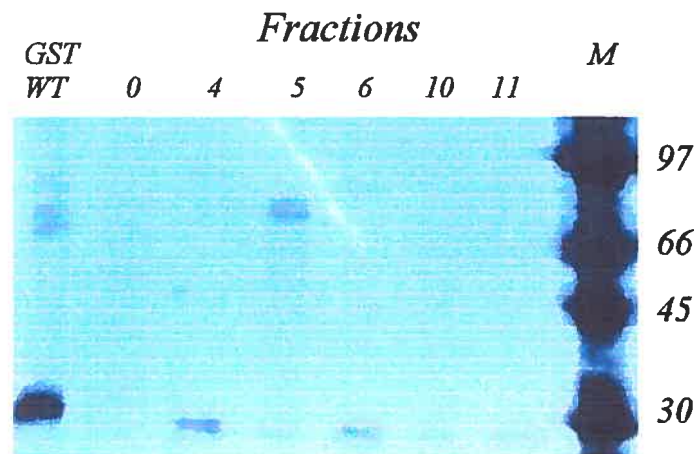


Figure 10. Production de la protéine de fusion GST-L1. Suite à l'élution d'une colonne d'affinité, plusieurs fractions ont été recueillies et quelques unes ont été migrées sur SDS-PAGE afin de déterminer le poids moléculaire des protéines présentes. Dans la première ligne de migration, il y a la protéine GST sauvage et dans la dernière, le marqueur de poids moléculaire. Entre les deux se trouvent différentes fractions récoltées.

4.5 VÉRIFICATION DE L'ANTICORPS POLYCLONAL DE LAPIN ANTI-GST-L1

La protéine de fusion GST-L1 a servi à l'immunisation d'un lapin pour qu'il produise des anticorps polyclonaux anti-GST-L1. Afin de s'assurer de la qualité des anticorps, un immunobuvardage de type Western (Western blot) a été réalisé (voir figure 11). La fraction 5 (la même qu'à la figure 10) a été remigrée. À côté, la protéine GST-FA1 (~45 kDa) a également été migrée. La protéine de fusion GST-FA1 était une protéine disponible au laboratoire. La protéine FA1 (~17 kDa) est une protéine liant les acides gras. Elle a permis de voir que les anticorps polyclonaux de lapin anti GST-L1 pouvaient reconnaître la partie GST des protéines présentes sur la membrane de nitrocellulose. Les anticorps polyclonaux ont reconnu, dans la première ligne de migration, des protéines de différents poids moléculaires (~84 kDa, ~70 kDa, ~55 kDa, ~45 kDa et ~28 kDa). La bande à ~84kDa pourrait correspondre à la protéine de fusion GST-L1, la bande à ~28kDa, à la protéine GST seule et les bandes entre les deux à des protéines dégradées. Nous pensons que la bande à ~55kDa soit la protéine L1 seule. Il en est de même dans la seconde ligne de migration, sauf que seulement deux bandes apparaissent : 45 kDa et 28 kDa. Sur la ligne de migration GST-FA1, les anticorps polyclonaux de lapin anti GST-L1 ont reconnu la partie GST de la protéine GST-FA1.

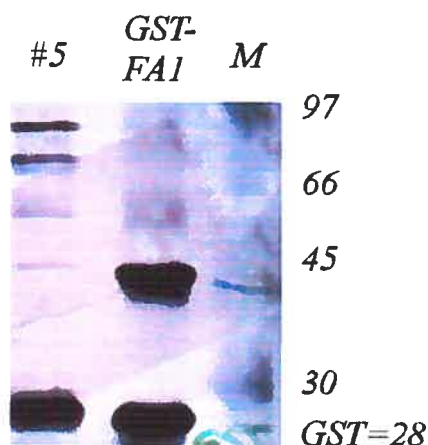


Figure 11. Vérification de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GST-L1. Pour s'assurer de la qualité de l'anticorps polyclonal obtenu du lapin, un SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage de type Western ont été effectués. La fraction 5 (ligne de migration de gauche sur la figure 10) obtenue lors de l'élution de la colonne d'affinité de glutathione-sépharose a été utilisée, de même que la protéine GST-FA1 comme contrôle pour la présence d'anticorps. L'anticorps primaire est l'anticorps polyclonal de lapin anti-GST-L1 dilué dans une solution de lait/TBS-T 5% (dilution 1:200). Le second anticorps est un anticorps monoclonal de souris anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline dans une dilution de 1:1500 dans une solution de lait/TBS-T 5%.

4.6 VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE L1 SOUS LE CONTRÔLE DU PROMOTEUR CMV

Avant de procéder à la production des adénovirus recombinants, nous avons démontré que le gène de la protéine L1, dans le contexte de notre plasmide p1960 où le gène est sous le contrôle du promoteur immédiat/précoce de CMV, soit bien exprimé. Préalablement, nous avons réalisé un test avec un plasmide contenant le gène de la protéine à fluorescence verte (GFP). Ce test a permis de déterminer qu'il fallait utiliser 8µg d'A.D.N. pour réaliser les transfections. Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide p1959 qui est le vecteur navette du système de vecteur adénoviral de pAdEasy™ ou avec le plasmide p1960 qui est ce même vecteur navette, mais auquel nous avons ajouté le gène de la protéine L1. Un immunobuvardage de type Western a été effectué avec les extraits cellulaires. À la figure 12, l'anticorps polyclonal de lapin anti-GST-L1 a reconnu une bande à environ 60 kb dans le puits où les cellules HEK293 avaient été transfectées par le plasmide p1960 (vecteur navette qui contient le gène de la protéine L1 de HPV16). Par contre, cette protéine ne semble pas être là pour la transfection faite avec le plasmide p1959 (vecteur navette ne contenant pas le gène de la protéine L1 de HPV16). Cette bande à environ 60 kb correspond à la taille attendue de la protéine L1 de HPV16 qui est d'environ 57 kDa. Le gène de la protéine L1 de HPV16 peut donc être exprimé dans les cellules HEK293 quand il est sous le contrôle du promoteur immédiat/précoce de CMV.

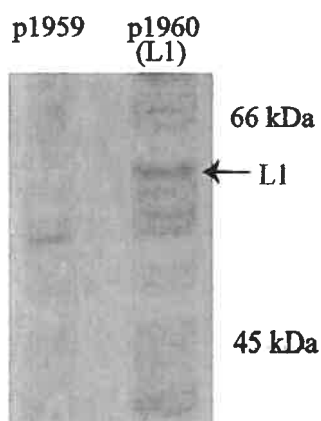


Figure 12. Expression du gène de la protéine L1 du HPV16 sous le contrôle du promoteur immédiat/précoce de CMV. Les extraits cellulaires des cellules HEK293 ont été étudiés par immunobuvardage de type Western. Ces cellules avaient été transfectées avec le plasmide p1959 (vecteur navette qui ne contient pas le gène de la protéine L1) ou avec le plasmide p1960 (vecteur navette + L1). Suite à la migration sur SDS-PAGE, un transfert sur membrane de nitrocellulose a été fait. L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal de lapin anti-GST-L1 dilué dans une solution de lait/TBS-T 5% (dilution 1:200). L'anticorps secondaire est un anticorps monoclonal de souris anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline. Cet anticorps a également été dilué dans une solution de lait/TBS-T 5%, mais dans une dilution 1:5000.

5. DISCUSSION

Nos études sur les HPV menées avec des échantillons provenant de biopsies de 691 patients constituent la plus grande étude de séquençage de HPV et aussi la seule de cette envergure avec des spécimens d'Amérique du Nord [211, 236, 239, 240, 242-248, 255]. Au cours de ces études nous avons élaboré une nouvelle procédure de diagnostique pour les infections par HPV nommée «*two-tier method*». Cette procédure procure un test diagnostique d'une plus grande sensibilité à l'A.D.N. des HPV et elle permet la détection d'un plus grand nombre de types de HPV. Elle permet également la détection des différents types dans le cas des infections doubles et triples. Le type de HPV le plus fréquemment retrouvé au niveau des CIN de grade élevé a été déterminé pour la population québécoise. Contrairement à l'Indonésie où le HPV18 arrive en tête de liste pour le développement des tumeurs [249], au Québec, c'est le HPV16 qui est le type le plus fréquemment retrouvé dans les lésions précancéreuses et les tumeurs. Selon certaines études, la stratégie de vaccination contre HPV pour prévenir le cancer du col de l'utérus devrait inclure obligatoirement HPV16 et HPV18 [242, 256, 257]. Parmi la population québécoise, le HPV18 n'arrive qu'au troisième ou quatrième rang pour le développement des lésions précancéreuses du col d'utérus au Québec. De plus, un autre groupe canadien a trouvé que le niveau de HPV18 était plus bas que celui de HPV13 et celui de HPV56 [258]. Ainsi, pour le Québec, la stratégie de vaccination visant HPV16 et HPV18 n'est pas la meilleure. Au niveau de l'Amérique du Nord, une étude a démontré que HPV16 était présent dans environ 58% des tumeurs du col de l'utérus. Pour ce qui est de HPV18, il n'était présent que dans un peu moins de 16% des tumeurs du col de l'utérus [114]. Un vaccin ciblé sur le HPV16 seulement semble être le plus pertinent, parce que le HPV16 est retrouvé dans plus que 60 % des lésions précancéreuses du col de l'utérus au Québec. Les autres types de HPV de risque élevé, quant à eux, sont responsables chacun pour moins de 15 % de tous les CIN. Éventuellement, selon les résultats obtenus avec la vaccination prophylactique contre HPV16, d'autres types de HPV de haut risque pourraient être

ajoutés afin d'augmenter le pourcentage de femmes protégées contre le cancer du col de l'utérus.

Une fois que le type HPV16 a été sélectionné comme étant le type le plus pertinent pour le développement du vaccin anti-HPV, nous avons commencé le travail sur le vaccin recombinant. Dans un premier temps, nous avons reconstruit le gène de la protéine L1 de HPV16 à partir d'un clone partiel déjà disponible et de matériel de HPV16 de nos patients. L'intégrité du gène L1 dans le plasmide recombinant a été vérifiée par séquençage. Le gène complet a ensuite pu être utilisé pour la construction des plasmides p1674, p1960 et p1961.

Le plasmide p1674 a servi à produire la protéine de fusion GST-L1. Des anticorps polyclonaux de lapin générés contre L1 de HPV16 humain ont été obtenus grâce à notre protéine de fusion. Les anticorps anti-L1 commercialement disponibles présentement sont des anticorps monoclonaux. Dans nos essais, ces anticorps monoclonaux ont démontré beaucoup de réactivité non spécifique aux différentes protéines des cellules eukaryotes. Nos anticorps anti-L1 nous ont permis d'avoir un outil différent pour la détection des protéines L1 sauvage et recombinante.

Pour développer un vaccin, différents moyens peuvent être employés. Pour les vaccins anti-HPV, les virus inactivés ne seraient pas un choix judicieux, car les HPV ne peuvent pas être produits en cultures cellulaires ou dans les animaux dans des quantités suffisamment grandes pour permettre l'essai du vaccin sur les modèles animaux, même les plus petits.

Des groupes ont décidé de développer un vaccin anti-HPV à partir de VLP. Les essais cliniques de ce vaccin anti-HPV16 ont démontré que ce vaccin permet la production des IgA sériques et des IgG [259]. La vaccination permet aussi la production de lymphocytes B et de CTL. [263] La production des CTL est importante, car les CTL ont un rôle important à jouer dans la protection contre les HPV. Par

contre, il n'est pas fait mention des IgA sécrétoires qui sont importants pour neutraliser le virus avant son entrée dans les cellules. De plus, au cours de ces essais cliniques certains participants à l'étude ont éprouvé de la douleur suite à l'injection intramusculaire du vaccin.[259] L'application intra-nasale d'un vaccin anti-HPV16 en vaporisateur permettrait d'éviter la douleur causée par l'injection et de stimuler les IgA sécrétoires.

D'autres ont décidé d'utiliser des protéines de HPV. Cette alternative est intéressante. La production des vaccins faits de peptides n'est pas dispendieuse. Par contre, ils peuvent être instables *in vivo* et le choix des séquences peptidiques est dépendante du génotype de HLA.

Les avantages des virus recombinants pour le développement d'un vaccin HPV sont : 1- ils peuvent imiter une infection naturelle de HPV quand ils sont appliqués sur l'épithélium; 2- la protéine de HPV est exprimée à partir de l'intérieur de la cellule infectée ou transduite donc plusieurs peptides vont être générés contre la ou les protéine(s) de HPV; 3- des protéines de plusieurs types de HPV pourraient être insérées dans le même vecteur; 4- les virus recombinants induisent les «T-helper» ainsi que la réponse des anticorps sécrétoires, deux réponses importantes pour la protection contre les HPV. 5- l'utilisation des adénovirus offre un autre avantage et c'est celui de la stabilité. Les adénovirus sont des virus non enveloppés qui sont, de façon générale, résistants aux éléments de l'environnement. Cependant, ils doivent être purifiés car dans les cellules d'encapsulation, une recombinaison homologe peut avoir lieu entre la séquence de l'adénovirus utilisée et la région E1 qui se trouve dans la cellule. De cette recombinaison résultent des adénovirus pouvant se répliquer.

Pour le développement, de notre vaccin anti-HPV, nous avons opté pour un virus recombinant à cause de ses avantages par rapport à l'induction du système immunitaire. Pour ce faire, le plasmide p1960 a permis de construire le plasmide p1961, le vecteur adénoviral servant à la production des particules virales. Quand le plasmide p1961 est obtenu, la production des adénovirus recombinants consiste

simplement à linéariser le plasmide p1961 avec l'enzyme de restriction *PacI*, ce qui permet de libérer les séquences terminales répétées inversées gauche et droite. Cette étape est essentielle à la production des adénovirus recombinants qui doivent avoir un A.D.N. linéaire pour pouvoir se répliquer. Ensuite, le plasmide linéarisé doit être introduit dans les cellules d'encapsulation de virus (telles les HEK293) afin de produire les virus défectifs. Les cellules d'encapsulation sont des cellules dans lesquelles sont exprimés de façon stable, des gènes de l'adénovirus. Ces gènes permettent la production d'adénovirus défectifs, des adénovirus qui ne contiennent pas les gènes exprimés par la cellule d'encapsulation et qui sont essentiels à sa réplication. Ces virus sont défectifs dans leur capacité de se reproduire, mais ils peuvent «transduire» les cellules humaines normales. Ils peuvent donc pénétrer la cellule en introduisant leur génome dans le cytoplasme et ensuite dans le noyau de la cellule hôte où ils restent sous forme d'épisome.

Dans plusieurs systèmes, les cellules d'encapsulation sont co-transfectées avec l'A.D.N. de l'adénovirus et un plasmide contenant le gène d'intérêt. Dans ces systèmes, une recombinaison homologue est nécessaire à l'intérieur de la cellule d'encapsulation. De plus, l'A.D.N. de l'adénovirus est simplement digéré avant la co-transfection par une enzyme de restriction qui reconnaît un site de restriction dans la région E1 de l'A.D.N. adénoviral. Ainsi, une partie de la région E1 est toujours présente dans l'A.D.N. du vecteur adénoviral et elle peut participer à une recombinaison homologue avec la région E1 présente dans la cellule d'encapsulation plutôt qu'avec le plasmide dans lequel a été inséré le gène d'intérêt. La recombinaison homologue entre l'A.D.N. de l'adénovirus digéré et la région E1 présente dans la cellule d'encapsulation a pour effet de donner des adénovirus pouvant se répliquer. Cette méthode nécessite plusieurs isolations sur plaque pour purifier les adénovirus défectifs. Dans le système que nous avons utilisé, la recombinaison homologue est réalisée dans *E. coli*. Ainsi, le génome adénoviral complet n'est jamais utilisé et l'étape de purification est beaucoup moins fastidieuse.

Avant de commencer la production des adénovirus recombinants, nous avons vérifié l'expression de la protéine L1 par transfection avec le plasmide p1960. Suite à la transfection des cellules HEK293 avec le plasmide p1960, l'extrait cellulaire a été étudié par immunobuvardage de type Western. Afin de s'assurer que la bande d'environ 57 kDa soit bel et bien la protéine L1, les anticorps polyclonaux anti-GST-L1 auraient pu être purifiés afin d'obtenir les anticorps reconnaissant seulement la protéine L1. Sinon, plus simplement, des anticorps anti-L1 obtenus en immunisant le lapin avec la protéine L1 seule suite au clivage de la protéine de fusion GST-L1 avec la thrombine. L'utilisation des anticorps monoclonaux anti-L1 disponibles est aussi une possibilité, mais les tests effectués lors d'autres essais ont montré que ces anticorps ne reconnaissent pas ma protéine L1 de HPV16, probablement à cause d'un problème de conformation de l'épitope.

Pour la continuité du projet, il faudrait produire une assez grande quantité de virus défectifs afin de procéder aux tests des vaccins sur les souris. Les souris ne sont qu'une étape préliminaire afin d'évaluer la réponse immunitaire induite par le vaccin, car aucun PV n'a été isolé des souris. Ainsi, il est impossible d'évaluer sur les souris si le vaccin procure une véritable protection. Même si les adénovirus sont spécifiques pour les espèces qu'ils infectent, les HPV sont capable de transduire les cellules épithéliales de souris et des adénovirus défectifs contre d'autres maladies ont été testées pour chez les souris [260, 261].

Ce vaccin sera sous forme d'un vaporisateur afin de permettre une application intra-nasale et ainsi stimuler le système immunitaire des muqueuses. Différents volumes de solution saline contenant différentes quantités de virus seront déposés dans les deux narines. Suite à la vaccination, l'expression de L1 pourrait être vérifiée par cryosection aux jours 0, 7, 14, 21 et 28. L'expression de L1 devrait être à son maximum aux jours 7 et 14 et au jour 28, elle devrait être absente. L'application intra-nasale est préférée, car elle permet la production d'IgA et d'IgG dans les voies

vaginales. Selon une étude réalisée par un groupe ontarien, l'immunisation intrapéritonéale induit seulement la production d'IgG. Ces IgG proviendraient uniquement du sérum des souris et des muqueuses des voies vaginales [262]. Comme l'infection se produit au niveau des muqueuses vaginales, il est primordial que ce soit les anticorps qui s'y trouvent qui soient stimulés et non les anticorps sériques qui ne permettraient pas d'offrir une protection contre une infection par le HPV16.

6. RÉFÉRENCES

- 1- Pisani, P., Parkin, D.M., Ferlay, J. (1995). Estimate of the worldwide mortality from eighteen major cancer in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int. J. Cancer* **55**, 891-903.
- 2- Riethmuller, D., Schaal, J.P., Mougin, C. (2002) Épidémiologie et histoire naturelle de l'infection génitale à papillomavirus humain. *Gynecol Obstet Fertil* **30** (2), 139-46.
- 3- Garland, S.M. (2002) Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology* **34**, 213-24.
- 4- Matthews, R.E.(1979) Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirol* **12**(3-5):129-296.
- 5- Davidson, E.J., Kitchener, H.C., Stern P.L. (2002) The Use of Vaccines in the Prevention and Treatment of Cervical Cancer. *Clin Oncol* **14** (3), 193-200.
- 6- Chen, E.Y., Howley, P.M., Levinson, A.D., Seeburg, P.H. (1982) The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* **299**(5883), 529-34.
- 7- Danos, O., Katinka, M., Yaniv, M. (1982) Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* **1**(2), 231-6.
- 8- Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., Orth, G. (1977) Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol* **21**(3), 1205-9.
- 9- Pfister, H., zur Hausen, H. (1978) Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1. *Med Microbiol Immunol* **166**(1-4), 13-9.
- 10- Finch, J.T., Klug, A. (1965) The structure of viruses of the papilloma-polyoma type 3. Structure of rabbit papilloma virus, with an appendix on the topography

- of contrast in negative-staining for electron-microscopy. *J Mol Biol* **13**(1), 1-12.
- 11- Howley, P.M. (1996) In *Fields Virology* (Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M., eds) Vol 2, 3e Éd., Lippincott Raven publishers, Philadelphie, pp2045-76.
- 12- zur Hausen, H. (1996) Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim.Biophys Acta* **1288**, F55-F78.
- 13- Wiklund, L., Sokolowski, M., Carlsson, A., Rush, M., Schwartz, S. (2002) Inhibition of translation by UAUUUUAU and UAUUUUUUAU motifs of the U-rich RNA instability element in the HPV-1 late 3'UTR. *J Biol Chem* **277**(43), 40 462-71.
- 14- Jenkins, D. (2001) Diagnosing human papillomavirus : recent advances. *Curr Opin Infect Dis* **14** (1), 53-62.
- 15- Furumoto, H., Irahara, M. (2002) Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *J Med Invest* **49**(3-4), 124-33.
- 16- Brentjens, M.H., Yeung-Yue, K.A., Lee, P.C., Tyring, S.K. (2002) Human papillomavirus: a review. *Dermatol clin* **20** (2), 315-31.
- 17- de Villiers EM. (2001) Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* **12**, 57–63.
- 18- Howley PM, Lowy DR.(2001) Papillomaviruses and their replication. In : *Fields virology* Knipe, D.M., Howley, P.M., editors., vol.2 Philadelphia: Lipincott, Williams, and Wilkins; p. 2197-229
- 19- Galloway DA. (1999) Biology of genital human papillomaviruses. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparling PF, *et al.*, editors. *Sexually Transmitted Diseases*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; p.335–46.
- 20- Richart, R.M., Masood, S., Syrjanen, K.J., Vassilakos, P., Kaufman, R.H., Meisels, A., Olszewski, W.T., Sakamoto, A., Stoler, M.H., Vooijs, G.P., Wilbur, D.C. (1998) Human papillomavirus IAC task force summary. *Acta Cytol* **42**, 50-8.

- 21- Giannoudis, A., Van Duin, M., Snijders, P.J.F., Herrington, C.S. (2001) Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br J Cancer* **84**, 1058–63.
- 22- Stanley MA. (1994) Virus-keratinocyte interactions in the infectious cycle. In: Stern PL, Stanley MA, eds. *Human Papillomaviruses and Cervical Cancer*. Oxford: Oxford University Press; p. 116–31.
- 23- Schiffman, M.H., Bauer, H.M., Hoover R.N., Glass, A.G., Cadell, D.M., Rush, B.B., Scott, D.R., Sherman, M.E., Kurman, R.J., Wacholder, S., Stanton, C.K., Manos, M.M. (1993) Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl Cancer Inst.* **85**, 958-64.
- 24- Stoler, M.H. (1996) A brief synopsis of the role off human papillomavirus in cervical carcinogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175**, 1092-8.
- 25- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P.M. (1990) The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-36.
- 26- (1997) National Institutes of Health Consensus Development Conference statement on cervical cancer. April 1-3 1996. *Gynecol. Oncol.* **66**, 351-61.
- 27- Meisels, A., Morin, C. (1981) Human papillomavirus and cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* **12**, S111-23.
- 28- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Munoz, N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**, 12-9.
- 29- zur Hausen, H., Schneider, A. (1987) The role of papillomaviruses in human anogenital cancer. In : *The papovaviridae, Vol 2 : Papillomaviruses*, P.M Howley and N.P. Salzman, eds. New York : Plenum, pp 245-63.

- 30- Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., zur Hausen, H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-4.
- 31- Smotkin, D., Wettstein, F.O. (1986) Transcription of human papillomavirus-type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 4680-4.
- 32- Yee, C.L., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C.C., Schlegel, R., Howley, P.M. (1985) Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* **119**, 3261-6.
- 33- Eron, L. (1992) Human papillomaviruses and anogenital disease. In: *Infectious diseases Philadelphia* Gorbach, S., Bartlett, J., Blacklow, N., editors.: WB Saunders; p. 852.
- 34- Arrand, J. (1994) Molecular genetics of human papillomaviruses. In: Stern PL, Stanley MA, eds. *Human Papillomaviruses and Cervical Cancer: Biology and Immunology*. Oxford: Oxford University Press; p. 28-40.
- 35- Pfister, H., Fuchs, P.G. (1987) Papillomaviruses: particles, genome organization and proteins. In: *Papillomaviruses and Human Disease*. Syrjanen K, Gissmann L, Koss LG, eds. Berlin: Springer-Verlag; p. 1-18.
- 36- Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., Schlegel, R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**(10), 4417-21.
- 37- Munger, K., Phelps, W.C. (1993) The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* **1155**(1), 111-23.
- 38- von Knebel Doeberitz, M., Rittmüller, C., zur Hausen, H., Durst, M. (1992) Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* **51**(5), 831-4.

- 39- Chan, W.K., Klock, G., Bernard, H.U. (1989) Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* **63**(8), 3261-9.
- 40- Gloss, B., Yeo-Gloss, M., Meistererst, M., Rogge, L., Winnacker, E.L., Bernard, H.U. (1989) Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res* **17**(9), 3519-33.
- 41- Offord, E.A., Beard, P. (1990) A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* **64**(10), 4792-8.
- 42- Mack, D.H., Laimins, L.A. (1991) A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci US A* **88**(20), 9102-6.
- 43- Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M., Howley, P. (1992) Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol* **66**(6), 3740-8.
- 44- Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.D., zur Hausen, H. (1992) Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* **11**(12), 4607-17.
- 45- May, M., Dong, X.P., Beyer-Finkler, E., Stubenrauch, F., Fuchs, P.G., Pfister, H. (1994) The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* **13**(6), 1460-6.
- 46- Bauknecht, T., Jundt, F., Herr, I., Oehler, T., Delius, H., Shi, Y., Angel, P., zur Hausen, H. (1995) A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* **69**(1), 1-12.

- 47- Hoppe-Seyler, F., Butz, K. (1992) Activation of human papillomavirus type 18 E6-E7 oncogene expression by transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Res* **20**(24), 6701-6.
- 48- Hoppe-Seyler, F., Butz, K. (1993) A novel cis-stimulatory element maps to the 5' portion of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region and is functionally dependent on a sequence-aberrant Sp1 binding site. *J Gen Virol* **74** (Pt 2), 281-6.
- 49- Hoppe-Seyler, F., Butz, K., zur Hausen, H. (1991) Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol* **65**(10), 5613-8.
- 50- Garcia-Carranca, A., Thierry, F., Yaniv, M. (1988) Interplay of viral and cellular proteins along the control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* **62**, 4321-30.
- 51- Turek, L.P. (1994) The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Viral Res* **44**, 305-56.
- 52- Zhou, J., Frazer, I.H. (1996) Papovaviridae : capsid structure and capsid protein function. *Papillomavirus Reviews : Current Research on Papillomaviruses*. Leeds Univesity Press, 93-100
- 53- Park, T.W., Fujiwara, H., Wright, T.C. (1995) Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* **76** (10 suppl), 1902-13.
- 54- Seo, Y.S., Muller, F., Lusky, M., Gibbs, E., Kim, H.Y., Phillips, B., Hurwitz, J. (1993) Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7), 2865-9.
- 55- Dixon, E.P., Pahel, G.L., Rocque, W.J., Barnes, J.A., Lobe, D.C., Hanlon, M.H., Alexander, K.A., Chao, S.F., Lindley, K., Phelps, W.C. (2000) The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* **270**, 345-5

- 56- Frattini, M.G., Lim, H.B., Laimins, L.A. (1996) In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 3062-7.
- 57- Rocque, W.J., Porter, D.J., Barnes, J.A., Dixon, E.P., Lobe, D.C., Su, J.L., Willard, D.H., Gaillard, R., Condreay, J.P., Clay, W.C., Hoffman, C.R., Overton, L.K., Pahel, G., Kost, T.A., Phelps, W.C. (2000) Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Protein Expr Purif* **18**, 148-59.
- 58- Sarver, N., Rabson, M.S., Yang, Y.C., Byrne, J.C., Howley, P.M. (1984) Localization and analysis of bovine papillomavirus type 1 transforming functions. *J Virol* **52**, 377-88.
- 59- Titolo, S., Pelletier, A., Sauve, F., Brault, K., Wardrop, E., White, P.W., Amin, A., Cordingley, M.G., Archambault, J. (1999) Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* **73**, 5282-93.
- 60- Ustav, M., Stenlund, A. (1991) Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* **10**, 449-57.
- 61- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P., Stenlund, A. (1991) Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* **10**, 4321-9.
- 62- Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., Lim, D.A., Nohaile, M., Botchan, M. (1993) The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(11), 5086-90.
- 63- Bonne-Andrea, C., Santucci, S., Clertant, P., Tillier, F. (1995) Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. *J Virol* **69**(4), 2341-50.

- 64- Bouvard, V., Storey, A., Pim, D., Banks, L. (1994) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J* **13**(22), 5451-9.
- 65- Liu, J.S., Kuo, S.R., Broker, T.R., Chow, L.T. (1995) The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2 and E2c proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* **270** (45), 27283-91.
- 66- Sedman, J., Stenlund, A. (1995) Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *EMBO J* **14** (24), 6218-28.
- 67- Sedman, T., Sedman, J., Stenlund, A. (1997) Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* **71** (4), 2887-96.
- 68- Chiang, C.M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T.F., Broker, T.R., Chow, L.T. (1992) Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5799-803.
- 69- Sverdrup, F., Khan, S.A. (1994) Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol* **68**(1), 505-9.
- 70- Chow, L.T., Broker, T.R. (1994) Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* **37**(3-4), 150-8.
- 71- Cripe, T.P., Haugen, T.H., Turk, J.P., Tabatabai, F., Schmid, P.G. 3rd, Durst, M., Gissmann, L., Roman, A., Turek, L.P. (1987) Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* **6**(12):3745-53.
- 72- Phelps, W.C., Howley, P.M. (1987) Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol* **61**(5):1630-8.
- 73- McBride, A.A., Romanczuk, H., Howley, P.M. (1991) The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* **266**(28), 18411-4.

- 74- Romanczuk, H., Howley, P.M. (1992) Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7), 3159-63.
- 75- Scheffer, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M.. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
- 76- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7), 2563-7.
- 77- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A., Harlow, E. (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**(6178), 124-9.
- 78- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E., Livingston, D.M. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**(2), 275-83.
- 79- Dyson, N., Howley, P.M., Münger, K., Harlow, E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-6.
- 80- Doorbar, J. (1996). The E4 proteins and their role in the viral life cycle. *Papillomaviruses Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. Leeds University Press, Leeds, 31-38.
- 81- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., Crawford, L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824.
- 82- Burkhardt, A., Willingham, M., Gay, C., Jeang, K.T., Schlegel, R. (1989) The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* **170**(1), 334-9.

- 83- Hwang, E.S., Nottoli, T., Dimaio, D. (1995) The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* **211**(1), 227-33.
- 84- Cohen, B.D., Goldstein, D.J., Rutledge, L. Vass, W.C., Lowy, D.R., Schlegel, R., Schiller, J.T. (1993) Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol* **67**, 5303-11.
- 85- Conrad, M., Bubb, V.J., Schlegel, R. (1993) The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* **67**(10), 6170-8.
- 86- Finbow, M.E., Pitts, J.D. (1993) Is the gap junction channel--the connexon--made of connexin or ductin? *J Cell Sci* **106** (Pt 2), 463-71.
- 87- Mouglin, C., Bernard, B., Lab, M. (1997) Biologie des infections à papillomavirus: I. Caractéristiques générales. *Ann Biol Clin* **55**, 555-63.
- 88- Bedell, M.A., Hudson, J.B., Golub, T.D., Turyk, M.E., Hosken, M., Wilbanks, G.D., Laimins, L.A. (1991) Amplification of human papillomavirus in vitro is dependent of epithelial differentiation. *J Virol* **65**, 2254-60.
- 89- Chow, L. T. et Broker, T. R. (1997). Small DNA tumor viruses. *Viral Pathogenesis*. Lippincot-Raven, Philadelphia, 267-301.
- 90- Roden, R. B., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D. R. et Schiller, J. T. (1994). Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J. Virol.* **68**, 7260-6.
- 91- Qi, Y.M., Peng, S.W., Hengst, K., Evander, M., Park, D.S., Zhou, J., Frazer, I.H. (1996) Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein. *Virology* **216** (1), 35-45.
- 92- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K., McMillan, N.A.J. (1997) Identification of the alpha(6) integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71** (3), 2449-56.

- 93- McMillan, N.A., Payne, E., Frazer, I.H., Evander, M. (1999) Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **261**, 271–9.
- 94- Crook, T., Vousden, K.H. (1996) HPV oncoprotein function. In: *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. Lacey C, ed. Leeds: Leeds University Press; p. 55–60.
- 95- Zur Hausen, H., Rosl, F. (1994) Pathogenesis of cancer of the cervix. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 623.
- 96- Stoler, M.H., Rhodes, C.R., Whitbeck, A., Wolinsky, S.M., Chow, L.T., Broker, T.R. (1992) Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* **23**, 117–28.
- 97- Durst, M., Glitz, D., Schneider, A., zur Hausen, H. (1992) Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* **189**(1), 132–40.
- 98- Université Victor Segalen Bordeaux 2. Pathologies courantes en Dermatologie Vénérologie au Bénin. URL : <http://www.apprentoile.u-bordeaux2.fr/wderm/fig001.htm>
- 99- Rous, P.J.B. (1935) The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas. *J Exp Med* **62**, 523-48.
- 100- Syrjanen, K., Syrjanen, S. (2000) Historical overview of papillomavirus research: papillomavirus infections in human pathology, New York: John Wiley & Sons Ltd; p.1.
- 101- Olsen, C., Pamukcu, A.M., Brobst, D.F., Kowalczyk, T., Satter, E.T., Price, J.M. (1959) A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Res* **19**, 779-82.
- 102- Ito, Y., Evans, C.A., (1961) Induction of tumors in domestic rabbits with nucleic acid preparations from partially purified Shope papilloma virus and from extracts of the papillomas of domestic and cottontail rabbits. *J Exp Med* **114**, 485-91.

- 103- zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., Bornkamm, G.W. (1974) Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* **13**(5), 650-6.
- 104- zur Hausen, H. (1976) Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **36**(2 pt 2), 794.
- 105- Martin, C.E. (1967) Epidemiology of cancer of the cervix. II. Marital and coital factors in cervical cancer. *Am J Public Health Nations Health* **57**(5), 803-14.
- 106- Gissmann, L., Pfister, H., Zur Hausen, H. (1977) Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* **76**(2), 569-80.
- 107- Orth, G., Favre, M., Croissant, O. (1977) Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* **24**(1), 108-20.
- 108- Gissmann, L., zur Hausen, H. (1980) Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). *Int J Cancer* **25**(5), 605-9.
- 109- Gissmann, L., Diehl, V., Schultz-Coulon, H.J., zur Hausen, H. (1982) Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* **44**(1), 393-400.
- 110- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., zur Hausen, H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci US A* **80**(12), 3812-5.
- 111- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* **3**(5), 1151-7.
- 112- Miesels, A., Fortin, R. (1976) Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* **20**, 505-9.
- 113- zur Hausen, H., Schneider, A. (1987) The role of papillomaviruses in human anogenital cancer. *The papillomaviruses* **2**, 245-63.
- 114- Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K.V. (1995) Prevalence of

- human papillomavirus in cervical cancer : a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* **87**, 796-802.
- 115- Sherlaw-Johnson, C., Jenkins, D., Gallivan, S. (1997) Evaluating cervical cancer screening programmes for developing countries. *Int J Cancer* **72**, 210-6.
- 116- World Health Organisation IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomaviruses. Lyons: IARC;1995.
- 117- Koutsky, L.A., Holmes, K.K., Critchlow, C.W., Stevens, C.E., Poavonen, J., Beckmann, A.M., DeRouen, T.A., Gallaway, D.A., Vernon, D., Kiviat, N.B. (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* **327**, 1272-8.
- 118- Ho, G.Y.F., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C.J., Burk, R.D. (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J M* **338**, 423-8.
- 119- Remmink, A.J., Walboomers, J.M.M., Helmerhorst, T.J., Voorhorst, F.J., Rozendaal, L., Risse, E.K., Meijers, C.J., Kenemans, P. (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**, 306-11.
- 120- Herrington, C.S. (1994) Human papillomaviruses and cervical neoplasia. I : Virology, classification, pathology and epidemiology. *J Clin Pathol* **47**, 1066-72.
- 121- Münger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M., Zacny, V.L. (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**, 7888-98.
- 122- Mantovani, F., Banks, L. (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**, 7874-87.

- 123- Barbosa, M.S., Vass, W.C., Lowy, D.K., Schiller, J.T. (1991) In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* **65**, 292-8.
- 124- Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., Schiller, J.T. (1989) HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* **8**, 3905-10.
- 125- Kaur, P., McDougall, J.K. (1989) HPV-18 immortalization of human keratinocytes. *Virology* **173**, 302-10.
- 126- zur Hausen, H. (2001) Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 252-3.
- 127- International Agency for Research Cancer. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans*. Vol 64. Human papillomaviruses. Lyon: IARC, 1995.
- 128- McDougall, J.K. (1994) Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**, 101-19.
- 129- Mansur, C.P., Androphy, E.J. (1993) Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1155**(3), 323-45.
- 130- Werness, B.A., Levine, A.J., Howley, P.M. (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76-9.
- 131- Münger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Harlow, E., Howley, P.M. (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* **8**, 4099.
- 132- Lin, D., Shields, M.T., Ullrich, S.J., Appella, E., Mercer, W.E. (1992) Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(19), 9210-4.
- 133- Xu, C., Meikrantz, W., Schlegel, R., Sager, R. (1995) The human papillomavirus 16E6 gene sensitizes human mammary epithelial cells to apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7829-33.

- 134- White, A.E., Livanos, E.M., Tlsty, T.D. (1994) Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* **8**, 666-7.
- 135- Liu, X., Han, S., Baluda, M.A., Park, N.H. (1997) HPV oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human keratinocytes. *Oncogene* **14**, 2347-53.
- 136- Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., Tlsty, T.D. (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* **70**(6), 923-35.
- 137- Yin, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C., Wahl, G.M. (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70**(6), 937-48.
- 138- Crook, T., Vousden, K.H. (1992) Properties of p53 mutations detected in primary and secondary cervical cancers suggest mechanisms of metastasis and involvement of environmental carcinogens. *EMBO J.* **11**, 3935-40.
- 139- Crook, T., Tidy, J.A., Vousden, K.H. (1991) Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and transactivation. *Cell* **67**, 547-56.
- 140- Woodworth, C.D., Cheng, S., Simpson, S., Hamacher, L., Chow, L.T., Broker, T.R., DiPaolo, J.A. (1992) Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. *Oncogene* **7**, 619-26.
- 141- Wrede, D., Tidy, J.A., Crook, T., Lane, D.P., Vousden, K.H. (1991) Expression of RB and p53 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines. *Mol. Carcinogen.* **4**, 171-5.
- 142- Dyson, N., Guida, P., Munger, K., Harlow, E. (1992) Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* **66**(12), 6893-902.

- 143- Tommasino, M., Adamczewski, J.P., Carlotti, F., Barth, C.F., Manetti, R., Contorni, M., Cavalieri, F., Hunt, T., Crawford, L. (1993) HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* **8**(1), 195-202.
- 144- Phelps, W.C., Yee, C.L., Münger, K., Howley, P.M. (1988) The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**, 539-47.
- 145- Chellappan, S., Kraus, V.B., Kroger, B., Munger, K., Howley P.M., Phelps, W.C., Nevins, J.R. (1992) Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(10), 4549-53.
- 146- Bernard, B.A., Bailly, C., Lenoir, M.C., Darmon, M., Thierry, F., Yaniv, M. (1989) The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* **62**, 2994-3002.
- 147- Duggan-Keen, M.F., Brown, M.D., Stacey, S.N., Stern, P.L. (1998). Papillomavirus vaccines. *Frontiers in Bioscience* **3**, D1192-D1208.
- 148- Schiffman, M.H. (1994) Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. In: Zur Hausen H, ed. *Human Pathogenic Papillomaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin: Springer Verlag; p. 55-81.
- 149- Syrjanen, K.J. (1996) Natural history of genital human papillomavirus infections. In: Lacey C, ed. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. Leeds: Leeds University Press; p. 189-206.
- 150- Wang, Z., Hansson, B. G., Forslund, O., Dillner, L., Sapp, M., Schiller, J. T., Bjerre, B., Dillner, J. (1996). Cervical mucus antibodies against human papillomavirus tupe 16, 18, and 33capsids in relation to presence of viral DNA. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 3056-62.

- 151- Underdown, B.J., Mestecky, J. (1994) Mucosal immunoglobulins. In : *Handbook of mucosal immunology*. P.C. Ogra, J. Mesteck, M.E. Lamm, W. Strober, J.R. McGhee, and J. Bienenstock, eds. Boston : Academic Press, Inc.; p. 79.
- 152- Anderson, A.O. Peripheral and mucosal immunity: critical issues for oral vaccine design. www.geocities.com/artnsience/crossregulation.html
- 153- Shirasawa, H., Tomita, Y., Sekiya, S., Takamizawa, H., Simizu, B. (1987) Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol* **68** (Pt 2), 583-91.
- 154- Carter, J.J., Koutsky, L.A., Wipf, G.C., Christensen, N.D., Lee, S.K., Kuypers, J., Kiviat, N., Gallaway, D.A. (1996) The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis* **174**, 927-36.
- 155- Lutzner, M.A. (1985) Papillomavirus lesions in immunodepression and immunosuppression. *Clin Dermatol* **3**(4), 165-9.
- 156- Kirnbauer, R., Hubbert, N.L., Wheeler, C.M., Becker, T.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T. (1994) A virus-like particle enzyme-linked-immunosorbent - assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type-16. *J Nat Cancer Inst* **86**(7), 494-9.
- 157- Tindle, R.W., Frazer, I.H. (1990) Immunology of anogenital human papillomavirus (HPV) infection. *Aust. NZJ Obstet Gynecol* **30**(4), 370-5.
- 158- Halpert, R., Fruchter, R.G., Sedlis, A., Butt, K., Boyce, J.G., Sillman, F.H. (1986) Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* **68**, 251-8.
- 159- Petry, K.U., Scheffel, D., Bode, U., Gabrysiak, T., Kochel, H., Kupsch, E., Glaubitt, M., Niesert, S., Kuhnle, H., Schedel, I. (1994) Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* **57**, 836-40.

- 160- Frazer, I.H., Medley, G., Crapper, R.C., Brown, T.C., MacKay, R. (1986) Association between anorectal dysplasia, human papillomavirus and HTLV III infection in homosexual men. *Lancet* **ii**, 657-60.
- 161- Kiviat, N.B., Critchlow, C.W., Holmes, K.K., Kuypers, J., Sayer, J., Dunphy, C., Surawicz, C., Kirby, P., Wood, R., Daling, J.R. (1993) Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. *AIDS* **7**(1), 43-9.
- 162- Seck, A.C., Faye, M.A., Critchlow, C.W., Mbaye, A.D., Kuypers, J., Woto-Gaye, G., Langley, C., De, E.B., Holmes, K.K., Kiviat, N.B. (1994) Cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection among Senegalese women seropositive for HIV-1 or HIV-2 or seronegative for HIV. *Int J STD AIDS* **5**(3), 189-93.
- 163- Salmon, J., Croissant, O., Nonnenmacher, M., Orth, G., Breitburd, F. (1999) Regression or persistence and malignant conversion of rabbit viral papillomas are linked to the HLA DR-DQ haplotype and the papillomavirus strain. In : 17th International Papillomavirus Conference, Charleston, SC, USA, 155.
- 164- Ferrera, A., Olivo, A., Alaez, C., Melchers, W.J., Gorodezky, C. (1999) HLA DQA1 and DQB1 loci in Honduran women with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma and their relationship to human papillomavirus infection. *Hum Biol* **71**, 367-79.
- 165- Syrjanen, K., Nurmi, T., Mantyjarvi, R., Ilonen, J., Syrjanen, S., Surcel, H.M., *et al.* (1996) HLA types in women with cervical human papillomavirus lesions prospectively followed up for 10 years. *Cytopathology* **7**, 99-107.
- 166- Breitburd, F., Ramoz, N., Salmon, J., Orth, G. (1996) HLA control in the progression of human papillomavirus infections. *Semin Cancer Biol* **7**, 359-71.
- 167- Okabayashi, M., Angell, M.G., Christensen, N.D., Kreider, J.W. (1991) Morphometric analysis and identification of infiltrating leucocytes in regressing and progressing Shope rabbit papillomas. *Int J Cancer* **49**(6), 919-23.

- 168- Coleman, N., Birley, H.D.L., Renton, A.M., Hanna, N.F., Ryaite, B.K., Byrne, M., Taylor-Robinson, D., Stanley, M.A. (1994) Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* **102**, 768–74.
- 169- Vardy, D.A., Baadsgaard, O., Hansen, E.R., Lisby, S., Vejlsgaard, G.L. (1990) The cellular immune response to human papillomavirus infection. *Int J Dermatol* **29**(9), 603–10.
- 170- Man, S. (1998) Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. In: *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Accession number txt001smc. ISSN 1462–3974.
- 171- Evans, E.-M., Man, S., Evans, A.S., Borysiewicz, L.K. (1997) Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* **57**, 2943–50.
- 172- Broker, T.R., Jin, G., Bragg, S.M. (1999) Molecular epidemiology of HPV infections of the female genital tract in renal transplant candidates/recipients and HIV-positive patients. In : 17th International Papillomavirus Conference, Charleston, SC, USA, :15.
- 173- White, H.D., Crassi, K.M., Givan, A.L., Gonzalez, J.L., Memoli, V.A., Green, W.R., Wira, C.R. (1997). CD3(+) CD8(+)CTL activity within the human female reproductive tract - influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J. immunol.* **158**, 3017-27.
- 174- Bauer, H.M., Ting, Y., Greer, C.E., Chambers, J.C., Tashiro, C.J., Chimera, J., Reingold, A., Manos, M.M. (1991) Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* **265**(4), 472-7.
- 175- de Villiers, E.M., Wagner, D., Schneider, A., Wesch, H., Miklaw, H., Wahrendorf, J., Papendick, U., zur Hausen, H. (1987) Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* **2**(8561), 703-6.

- 176- Burk, R.D., Kelly, P., Feldman, J., Bromberg, J., Vermund, S.H., Dettovitz, J.A., Landesman, S.H. (1996) Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* **23**, 333-41.
- 177- de Villiers, E.M., Wagner, D., Schneider, A., Wesch, H., Munz, F., Miklaw, H., zur Hausen, H. (1992) Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: results of a 5-year follow-up study. *Gynecol Oncol* **44**(1), 33-9.
- 178- zur Hausen, H. (1986) Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* **2**(8505), 489-91.
- 179- Moscicki, A.B., Shiboski, S., Broering, J., Powell, K., Clayton, L., Jay, N., Darragh, T.M., Brescia, R., Kanourtz, S., Miller, S.B., Stone, J., Hanson, E., Palefsky, J. (1998) The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* **132**, 277-84.
- 180- Nobbenhuis, M.A.E., Walboomers, J.M.M., Helmerhorst, J.M., Nobbenhuis, M.A., Walboomers, J.M., Helmerhorst, T.J., Rozendaal, L., Remmink, A.J., Risse, E.K., van der Linden, H.C., Voorhorst, F.J., Kenemans, P., Meijer, C.J. (1999) Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *The Lancet* **354**, 20-5.
- 181- Rozendaal, L., Walboomers, J.M., van der Linden, J.C., Voorhorst, F.J., Kenemans, P., Helmerhorst, T.J., van Ballegooijen, M., Meijer C.J. (1996) PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int.J.Cancer* **68**, 766-9.
- 182- Hopman, E.H., Rozendall, L., Voorhorst, F.J., Walboomers, J.M., Kenemans, P., Helmerhorst, T.J., (Rozendaal) (2000) High risk human papillomavirus in

women with normal cervical cytology prior to the development of abnormal cytology and colposcopy. *Br J Obs & Gynae* **107**, 600-4.

- 183- Koutsky, L.(1997) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* **102**, 3-8.
- 184- Koutsky, L., Kiviat, N.B.(1999) Genital human papillomaviruses. In: *Sexually Transmitted Diseases*. Holmes K, Mardh P, Sparling P, *et al.* ed. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; pp. 347-60.
- 185- Nishikawa, A., Fukushima, M., Shimada, M., Yamakawa, Y., Shimano, S., Kato, I., Fujinaga, K. (1991) Relatively low prevalence of human papillomavirus 16, 18 and 33 DNA in the normal cervixes of Japanese women shown by polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* **82**(5), 532-8.
- 186- Rohan, T., Mann, V., McLaughlin, J., Harnish, D.G., Yu, H., Smith, D., Davis, R., Shier, R.M., Rawls, W. (1991) PCR-detected genital papillomavirus infection: prevalence and association with risk factors for cervical cancer. *Int J Cancer* **49**, 856-60.
- 187- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D.M. (2001) GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.1. IARC Cancer Base No. 5. Lyon: IARC Press,. <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>
- 188- Munoz, N., Bosch, F.X. (1996) The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. *Bulletin Pan-American Health Organisation* **30**, 362-77.
- 189- Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. (1993) Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* **54**, 594-606.
- 190- Lawson, H., Henson, R., Bobo, J., Kaeser, M. (2000) Implementing recommendations for the early detection of breast and cervical cancer among low-income women. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep* **49**, 37.
- 191- Patnick, J. (2000) Cervical cancer control in Europe. *CME Journal of Gynecologic Oncology* **5**, 8-10.

- 192- Division of STD Prevention. Prevention of genital HPV infection and sequelae: report of an external consultants' meeting. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1999.
- 193- Souza, D.W., Armento, D. (1999). Novel cloning method for recombinant adenovirus construction in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **26**, 502-8.
- 194- Snijders, P.J.F., van den Brule, A.J.C., Schrijnemakers, H.F.J., Snow, G., Meijer, C.J.L.M., Wallboomers, J.M.M. (1990). The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *Journal of General Virology* **71**, 173-81.
- 195- Sigurdsson, K. (1993). Effect of organised screening on the risk of cervical cancer. Evaluation of screening activity in Iceland. *Int. J. Cancer* **54**, 563-70.
- 196- Cox, J.T. (1995) HPV DNA testing: clinical boon or boondoggle? *Lancet* **346**, 717-9.
- 197- Kaufman, R.H., Adam, E., Icenogle, J., Lawson, H., Lee, N., Reeves, K.O., Irwin, J., Simon, T., Press, M., Uhler, H., Entman, C., Reeves, W.C. (1997) Relevance of human papillomavirus screening in management of cervical intraepithelial neoplasia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **176**, 87-92.
- 198- Kaufman, R.H., Adam, E., Icenogle, J., Reeves, W.C. (1997) Human papillomavirus testing as triage for atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions: sensitivity, specificity, and cost-effectiveness. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **177**, 930-6.
- 199- Kim, S.J. (1996) Screening and epidemiological trends in cervical cancer. *J.Obstet.Gynaecol.Res* **22**, 621-7.
- 200- Lorincz, A.T. (1996) Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J.Obstet.Gynaecol.Res* **22**, 629-36.
- 201- Lorincz, A.T. (1996) Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet.Gynecol.Clin.North Am.* **23**, 707-30.

- 202- Jacobs, M.V., de Roda, H., van den Brule, A.J., Snijders, P.J., Meijer, C.J., Walboomers, J.M. (1995) Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* **33**, 901-5.
- 203- Tuting, T., Zorina, T., Ma, D.I., Wilson, C.C., De Cesare, C.M., De Leo, A.B., Lotze, M.T., Storkus, W.J. (1997) Development of dendritic cell-based genetic vaccines for cancer. *Adv Exp Med Biol* **417**, 511-8.
- 204- Coutlee, F., Shah, K.V., Rader, J.S., Currie, J.L., Viscidi, R.P. (1991). 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 the solution hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 968-74.
- 205- van Driel, W.J., Rensing, M.E., Kenter, G.G., Brandt, R.M., Krul, E.J., van Rossum, A.B., Schuurin, E., Offringa, R., Bauknecht, T., Tamm-Hermelink, A., van Dam, P.A., Fleuren, G.J., Kast, W.M., Melief, C.J., Trimbos, J.B. (1999). Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma : clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur. J. Cancer* **35**, 946-952.
- 206- Roden, R.B., Weissinger, E.M., Henderson, D.W., Booy, F., Kirnbauer, R., Mushinski, J.F., Lowy, D.R., Schiller, J.T. (1994) Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **68**, 7570-4.
- 207- Christensen, N.D., Reed, C.A., Cladel, N.M., Han, R., Kreider, J.W. (1996). Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* **70**, 960-5.
- 208- Lacey, C.J., Thompson, H.S., Monteiro, E.F., O'Neill, T., Davies, M.L., Holding, F.P., Fallon, R.E., Roberts, J.S. (1999). Phase IIa safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts. *J. Infect. Dis.* **179**, 612-8.
- 209- Tindle, R.W. (1996). Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 643-50.

- 210- McNeil, C. (1997). HPV vaccine treatment trials proliferate, diversify. *J. Natl Cancer Inst.* **89**, 280-1.
- 211- Feoli-Fonseca, J.C., Oigny, L.L., Brochu, P., Simard, P., Falconi, S., Yotov, W.V. (2001) Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach. *J. Med. Virol.* **63**, 284-92.
- 212- Yang, Y., Wilson, J. M. (1995) Clearance of adenovirus-infected epatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo. *J Immunol* **155**, 2564–70.
- 213- Yang, Y., Su, Q., Wilson, J. M. (1996) Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J Virol* **70**, 7209–12.
- 214- Walther, W., Stein, U. (2000) Viral vectors for gene transfer : A review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* **60**(2), 249-71.
- 215- Enders, J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., *et al.* (1956) ‘Adenovirus’ group name proposed for newrespiratory tract viruses. *Science* **124**, 119-20.
- 216- Graham, F. L. and Prevec, L. (1995) Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* **3**, 207–220.
- 217- Morrow, C.D., Novak, M.J., Ansardi, D.C., Porter, D.C., Moldoveanu, Z. (1999) Recombinant viruses as vectors for mucosal immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **236**, 255-75.
- 218- Ballay, A., Levrero, M., Buendia, M.A., Tiollais, P., Perricaudet, M. (1985) *In vitro* and *in vivo* synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenovirus. *EMBO J* **4**, 3861-5.
- 219- Karlsson, S., Van Doren, K., Schweiger, S.G., Nienhuis, A.W., Gluzman, Y. (1986) Stable gene transfer and tissue-specific expression of a human globin gene using adenoviral vectors. *EMBO J* **5**, 2377-85.

- 220- Smith, C.A., Woodruff, L.S., Kitchingman, G.R., Rooney, C.M. (1996) Adenovirus-pulsed dendritic cells stimulate human virus-specific T-cells responses in vitro. *J Virol* **70**, 6733-40.
- 221- Ertl, H.C.J., Xiang, Z. (1996) Novel vaccine approaches. *J Immunol* **156**, 3579-82.
- 222- Ghosh-Choudhury, G., Haj-Ahmad, Y., Graham, F.L. (1987) Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J* **6**, 1733-39.
- 223- Hosfield, T., Eldridge, L. Generate adenovirus vectors in *E.coli* by homologous recombination with the AdEasy™ adenoviral vector system. *Stratagene* **13**, 100-3.
- 224- Robbins, P.D., Ghivizzani, S.C. (1998) Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacol Ther* **80** (1), 35-47.
- 225- Yeh P, Perricaudet, M. (1997) Advances in adenoviral vectors : from genetic engineering to their biology. *FASEB J* **11**(8), 615-23.
- 226- Paabo, S., Nilsson, T., Peterson, P.A. (1986) Adenoviruses of subgenera B, C, D, and E modulate cell-surface expression of major histocompatibility complex Class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **83**, 9665-9.
- 227- Gooding, L.R., Elmore, L.W., Tollefson, A.E., Brady, H.A., Wold, W.S. (1988) A 14 700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**, 341-6.
- 228- Krajcsi, P., Tollefson, A.E., Anderson, C.W., Wold, W.S. (1992) The adenovirus E3 14.5-kilodalton protein, which is required for down-regulation of the epidermal growth factor receptor and prevention of tumor necrosis factor cytolysis, is an integral membrane protein oriented with its C terminus in the cytoplasm. *J. Virol.* **66**, 1665-73.
- 229- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.

- 230- Elahi, S.M., Shen, S.H., Talbot, B.G., Massie, B., Harpin, S., Elazhary, Y. (1999). Recombinant adenoviruses expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus induce humoral and cellular immune responses. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 159-66.
- 231- Papp, Z., Babiuk, L.A., Baca-Estrada, M. E. (1999). Antigen-specific cytokine and antibody isotype profiles induced by mucosal and systemic immunization with recombinant adenoviruses. *Viral. Immunol.* **12**, 107-16.
- 232- Xiang, Z.Q., Pasquini, S., Ertl, H.C. (1999). Induction of genital immunity by DNA priming and intranasal booster immunization with a replication-defective adenoviral recombinant. *J. Immuno.* **162**, 6716-23.
- 233- Davis, A.R, Kostek, B., Mason, B.B., Hsiao, C.L., Morin, J., Dheer, S.K., Hung, P.P. (1985) Expression of hepatitis B surface antigen with a recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 7560-4.
- 234- Dewar, R.L., Natarajan, V., Vasudevachari, M.B., Sakzman, N.P. (1989) Synthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins encoded by a recombinant adenovirus. *J Virol* **63**, 129-36.
- 235- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl Acad Sci USA* **95**, 2509-14.
- 236- Feoli-Fonseca, J.C., Oligny, L.L., Fillion, M., Brochu, P., Simard, P., Russo, P.A., Yotov, W.V.(1998) A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detecting and typing human papillomaviruses in pathological specimens. *Diagn Mol Pathol* **7**, 317-23.
- 237- Bauer, H.M., Greer, C.E., Manos, M.M. (1992) Determination of genital human papillomavirus infection by consensus PCR amplification. In : Herrington C.S., McGee, J.O., editors. *Diagnostic molecular pathology : a practical approach. vol II. Cell and tissue genotyping.* Oxford : IRL Press at Oxford University Press. 131-52.

- 238- de Roda, H., Walboomers, J.M., van den Brule, A.J., Meijer, C.J., Snijders, P.J. (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76**, 1057-62.
- 239- Jacobs, M.V., Snijders, P.J., van den Brule, A.J., Helmerhorst, T.J., Meijer, C.J., Walboomers, J.M. (1997) A general primer GP5+/GP6+-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* **35**, 791-5.
- 240- Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D., et al. (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* **7**, 209-14.
- 241- Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D., et al. (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* **7**, 209-14.
- 242- Goldstein, E. (1971) *Biostatistics : an introductory text*. Toronto : The Macmillan Company.
- 243- Troungos, C., Horti, M., Kittas, C. (1995) A rapid method for the screening and typing of high risk HPVs using molecular biology techniques. *Anticancer Res* **15**, 2045-8.
- 244- Bernard, H.U., Chan, S.Y., Manos, M.M., Ong, C.K., Villa, L.L., Deluis, H., Peyton, C.L., Bauer, H.M., Wheeler, C.M. (1994) Identification and assesment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nuclotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* **170**, 1077-85.
- 245- de Villiers, E.M., Lavergne, D., McLaren, K., Benton, E.C. (1997) Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* **73**, 356-61.

- 246- Longuet, M., Cassonet, P., Orth, G. (1996) A novel genital human papillomavirus (HPV), HPV type 74, found in immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol* **34**, 1859-62.
- 247- Ong, C.K., Bernard, H.U., Villa, L.L. (1994) Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of Amazonian Indians. *J Infect Dis* **170**, 1086-8.
- 248- Peyton, C.L., Jansen, A.M., Wheeler, C.M., Stewart, A.C., Peto, J., Xavier Bosch, F., Munoz, N., Teyssie, A.R., Toroella, M., Wabinga, H.R. (1994) A novel human papillomavirus sequence from an international cervical cancer study. *J Infect Dis* **170**, 1093-5.
- 249- Astori, G., Arzese, A., Pipan, C., de Villiers, E.M., Botta, G.A. (1997) Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using L1 consensus primers and restriction fragment length polymorphism. *Virus Res* **50**, 57-63.
- 250- Feoli-Fonseca, J.C., Oligny, L.L., Filion, M., Brochu, P., Russo, P.A., Yotov, W.V.(1998) Direct human papillomavirus HPV sequencing method yields a novel HPV in a human immunodeficiency virus-positive Quebec woman and distinguishes a new HPV clade. *J Infect Dis* **178**, 1492-6.
- 251- Feoli-Fonseca, J.C., Oligny, L.L., Filion, M., Simard, P., Russo, P.A., Yotov, W.V.(1998) JC9813-A putative novel human papillomavirus identified by PCR-DS. *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 63-7.
- 252- Trofatter, K.F.J. (1997) Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med* **102**, 21-7.
- 253- Shamanin, V., Delius, H., de Villiers, E.M. (1994) Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. *J Gen Virol* **75**, 1149-56.
- 254- Tsitsilonis, O.E., Stoeva, S., Echner, H., Balafas, A., Margomenou, L., Katsoulas, H.L., Troy, D.J., Voelter, W., Papamichail, M., Lymberi, P. (2002) A skeletal

- muscle troponin T specific Elisa based on the use of an antibody against the soluble troponin T (16-31) fragment. *J Immunol Methods* **268**, 141-8.
- 255- Feoli-Fonseca, J.C., Oligny, L.L., Yotov, W.V.(1999) New method for automatic identification and typing of single and multiple super-imposed human papillomavirus sequences. *Diagn Mol Pathol* **8**, 216-21.
- 256- Borysiewicz, L.K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G.W., Westmoreland, D., Evans, A.S., Adams, M., Stacey, S.N., Boursnell, M.E., Rutherford, E., Hikling, J.K., Inglis, S.C. (1996) A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* **347**, 1523-7.
- 257- McNeil, C. (1997) HPV vaccine treatment trials proliferate, diversify. *J Natl Cancer Inst* **89**, 280-1.
- 258- Coutlee, F., Gravitt, P., Richardson, H., Hankins, C., Franco, E., Lapointe, N., Voyer, H. (1999) Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the ligne blot assay: The Canadian Women's HIV study group. *J Clin Microbiol* **37**, 1852-7.
- 259- Harro, C.D., Pang, Y.-Y.S., Roden, R.B.S., Hildesheim, A., Wang, Z., Reynolds, M.J., Mast, T.C., Robinson, R., Murphy, B.R., Karron, R.A., Dillner, J., Schiller, J.T., Lowy, D.R. (2001) Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* **93**, 284-92.
- 260- Gallichan, W.S., Rosenthal, K.L. (1996) Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract. *Virology* **224**, 487-97.
- 261- Gonin, P., Oualikene, W., Fournier, A., Eloit, M. (1996) Comparison of the efficacy of replication-defective adenovirus and Nyvac poxvirus as vaccine vectors in mice. *Vaccine* **14**, 1083-7.

- 262- Gallichan, W.S., Rosenthal, K.L. (1995) Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* **13**, 1589-95.
- 263- Pinto, L.A., Edwards, J., Castle, P.E., Harro, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Wallace, D., Kopp, W., Adelsberger, J.W., Baseler, M.W., Berzofsky, J.A., Hildesheim, A. (2003) Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 in Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles. *J Infect Dis* **188**, 327-38.

