

Université de Montréal

Évolution de la charge virale et de l'intégration de HPV-16 dans les maladies  
précancéreuses du col utérin

Par  
Julie Fontaine

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise es sciences (M.Sc)  
en Microbiologie

2004

©Julie Fontaine, 2004



W

4

U58

2005

V.068

**Direction des bibliothèques**

**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:  
Évolution de la charge virale et de l'intégration de HPV-16 dans les maladies  
précancéreuses du col utérin

Présenté par:  
Julie Fontaine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Cécile Tremblay : Président-rapporteur

Dr François Coutlée : Directeur de recherche

Dr Guy Lemay : Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le virus du papillome humain de type 16 (HPV-16) est associé au développement de lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin. Parmi les femmes infectées, seulement quelques unes développeront des lésions qui peuvent subir une progression néoplasique. L'intégration de l'ADN viral dans le génome humain a été définie comme un événement clé dans le processus d'oncogenèse du HPV-16. De plus, la charge virale est un marqueur potentiel pour dépister les femmes susceptibles de développer des maladies du col utérin.

Le but de la présente étude est de décrire les charges totales et intégrées de HPV-16 mesurées chez 83 femmes (65 séropositives pour le VIH et 18 séronégatives pour le VIH). Nous tenterons ensuite d'établir une association avec les grades de lésions cervicales obtenus par cytologie et histologie, avec la persistance des infections et avec le degré d'immunité des participantes (taux de lymphocytes T CD4+). La charge virale de HPV-16 a été évaluée par un protocole de PCR en temps réel, ciblant le gène humain  $\beta$ -globine et les gènes viraux E6 et E2, incluant l'utilisation de contrôles internes afin de déceler la présence d'inhibiteurs dans les échantillons cliniques.

Les charges virales totales et intégrées de HPV-16 sont plus élevées chez les femmes ayant des lésions cervicales de haut grade ( $p < 0.05$ ). Cependant nous avons trouvé un degré important de chevauchement entre les valeurs de charges virales mesurées dans les lésions de haut et bas grade, ce qui en diminue la valeur clinique et rend difficile la classification des patientes selon leur risque de progression néoplasique. Les participantes ayant une charge virale supérieure à  $10^7$  copies HPV-16/ $\mu$ g d'ADN humain ont une infection plus prolongée que celles ayant une charge virale inférieure à  $10^7$  copies HPV-16/ $\mu$ g d'ADN humain. Nous n'avons démontré qu'une faible association entre le taux de lymphocytes T CD4+ et la charge virale de HPV-16, suggérant une évasion de l'immunité cellulaire par HPV-16.

**Mots-clés :** Virus du papillome humain, charge virale, intégration, PCR quantitatif en temps réel.

## ABSTRACT

Human papillomavirus type 16 (HPV-16) is associated with the development of precancerous and cancerous diseases of the uterine cervix. Among all women infected by HPV-16, some of them will develop lesions that will eventually progress to higher grades and lead to cancer. Integration of viral DNA in the human genome has been defined as a key event in HPV-16 oncogenesis. Furthermore, HPV-16 viral load has been considered as a potential tool for the identification of women at risk for the development of cervical diseases.

The objective of this study was to describe the HPV-16 total and integrated loads from 83 women (65 HIV-seropositive and 18 HIV-seronegative). We then tried to establish an association between viral load and the grade of cervical lesions obtained both by cytology and histology with persistence of infection and with the status of the immune system of the participants (CD4+ lymphocytes counts). HPV-16 viral load was evaluated by real-time PCR assays targeting the human gene  $\beta$ -globin and the viral genes E6 and E2, and including the use of internal controls to assess for the presence of PCR inhibitors in the clinical samples.

Total and integrated loads of HPV-16 were higher in women with high grade cervical lesions than in normal women ( $p < 0.05$ ). However, a large overlap was observed between the viral load values measured in low and high grade lesions, and made it difficult to consider viral load as a clinical tool to identify women at risk of developing precancerous lesions. HPV-16 infections remained longer in women with an HPV-16 viral load higher than  $10^7$  copies of HPV-16/ $\mu\text{g}$  human DNA than in women with a viral load below  $10^7$  copies of HPV-16/ $\mu\text{g}$  human DNA. A weak association was found between CD4+ cell counts and HPV-16 viral load, suggesting immune evasion by HPV-16.

**Keywords:** Human papillomavirus, viral load, integration, quantitative real time PCR.

## PRÉSENTATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

### Présentations par affiche

#### **Concordance of HPV-16 Viral Load Estimated With Real-Time PCR Assays against Different Genomic Areas in Women with Squamous Intraepithelial Lesions**

Julie Fontaine, C. Hankins, K. Pourreaux, J. Lefevre, H. Voyer, The Canadian Women's HIV Study Group, F. Coutlée

The CACMID Annual Meeting, Montréal, 2-5 novembre 2003

#### **Évolution de la charge virale et de l'intégration d'HPV-16 dans les maladies précancéreuses du col utérin**

Julie Fontaine, C. Hankins, K. Pourreaux, J. Lefevre, H. Voyer, The Canadian Women's HIV Study Group, F. Coutlée

Département de Microbiologie et Immunologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, and Department of Epidemiology and Biostatistics, McGill University, Montréal, Québec

Congrès des étudiants du centre de recherche du CHUM, Montréal, janvier 2004

#### **Association entre la charge totale et intégrée de HPV-16 et la présence de lésions anales intra épithéliales**

Julie Fontaine<sup>1</sup>, Joel Palefsky<sup>2</sup>, Danielle Rouleau<sup>1</sup>, Maria da Costa<sup>2</sup>, Jean Marc Trépanier<sup>1</sup>, Georges Ghattas<sup>3</sup>, Guy Allaire<sup>4</sup>, Eduardo Franco<sup>5</sup>, François Coutlée<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CHUM-Hôpital Notre-Dame, département de microbiologie et immunologie, University of California San Francisco, department of laboratory medicine, <sup>3</sup>CHUM-Hôpital Notre-Dame, département de gastro-entérologie, <sup>4</sup>CHUM-Hôpital Notre-Dame, département de pathologie, <sup>5</sup>McGill University, department of oncology

Congrès des étudiants, FRSQ-SIDA et maladies infectieuses, Montréal, février 2004

## Présentations orales

### **High viral loads of HPV-16 E6 and HPV-16 integrated forms are associated with anal intraepithelial lesions**

Julie Fontaine\*<sup>1</sup>, Joel Palefsky<sup>2</sup>, Danielle Rouleau<sup>1</sup>, Maria da Costa<sup>2</sup>, Jean Marc Trépanier<sup>1</sup>, Georges Ghattas<sup>3</sup>, Guy Allaire<sup>4</sup>, Eduardo Franco<sup>5</sup>, Francois Coutlée<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CHUM-Hôpital Notre-Dame, département de microbiologie et immunologie, University of California San Francisco, department of laboratory medicine, <sup>3</sup>CHUM-Hôpital Notre-Dame, département de gastro-entérologie, <sup>4</sup>CHUM-Hôpital Notre-Dame, département de pathologie, <sup>5</sup>McGill University, department of oncology

21<sup>st</sup> Papillomavirus international conference, Mexico, février 2004

### **In HIV-seropositive men, increased HPV-16 viral loads and HPV-16 integrated forms are associated with anal intraepithelial lesions**

Fontaine\*, J Palefsky, D Rouleau, M daCosta, JM Trépanier, G Ghattas, S Vézina, P Coté, M Poliquin, J MacLeod, G Allaire, E Franco, F Coutlée. CHUM, Cliniques Actuel et Quartier Latin, MUHC, Montréal

13<sup>e</sup> conférence annuelle sur la recherche contre le VIH et le SIDA, Montréal, 13-16 mai 2004

### **Prix des présentations orales en recherche clinique**



## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Présentations à des congrès scientifiques.....	v
<u>Présentations par affiche</u> .....	v
<u>Présentations orales</u> .....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
<u>Article</u> .....	viii
<u>Discussion</u> .....	viii
<u>Annexe</u> .....	viii
Liste des figure.....	ix
<u>Revue de littérature</u> .....	ix
<u>Article</u> .....	x
<u>Discussion</u> .....	x
<u>Annexe</u> .....	x
Liste des abréviations.....	xi
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Revue de littérature.....	3
1. Le virus du papillome humain.....	
1.1. Historique.....	3
1.2. Classification.....	3
1.3. Organisation génomique.....	5
1.4. Tropisme cellulaire.....	6
1.5. Réplication.....	7
2. Infection par le virus du papillome humain.....	
2.1 Épidémiologie.....	10
2.2 Histoire naturelle.....	11
2.3 Association avec le cancer.....	13
3. Progression néoplasique.....	
3.1 Perturbation du cycle cellulaire.....	16
3.2 Facteurs viraux.....	18
3.3 Facteurs de l'hôte.....	24
3.4 Facteurs environnementaux.....	29
4. Co-infection par VIH et HPV.....	
4.1 Immunosuppression.....	31
4.2 Interactions entre VIH et HPV.....	33
4.3 Trithérapie.....	33
5. Les mesures de charge virale.....	
5.1 Méthodes basées sur l'amplification de signal : Hybrid Capture™.....	35
5.2 Méthodes basées sur l'amplification génomique.....	36
Hypothèses et objectifs.....	39
<u>Déclaration de l'étudiant concernant l'article contenu dans ce mémoire</u> .....	41
Article.....	42
Discussion.....	84
Conclusions.....	94
ANNEXE.....	96
Bibliographie.....	99

## **LISTE DES TABLEAUX**

### Article

#### Table I:

Median HPV-16 total viral load, episomal load and integrated load in cervicovaginal lavages from women with various grades of SIL.

#### Table II:

Median HPV-16 total viral load, episomal load and integrated load in cervicovaginal lavages from women with various grades of CIN.

#### Table III:

Evolution of HPV-16 total viral load in women without disease or progressing disease in 15 women with colposcopic evaluations.

#### Table IV:

HPV-16 viral load in cervicovaginal lavages of isolates from different lineages based on LCR sequencing.

### Discussion

#### Tableau 1:

Concordance des résultats de biopsie et de cytologie.

### Annexe

#### Tableau 1:

Courbes de titration de plasmide pHPV16 intact et ayant subi une digestion au niveau du gène E2.

## LISTE DES FIGURE

### Revue de littérature

#### Figure 1:

Le génome de HPV-16  
Source : web2.deu.edu.tr

#### Figure 2:

Cycle de réplication des papillomavirus et différenciation cellulaire.  
Source: Howley, P.M. and Lowy, D.R., Papillomaviruses and their replication,  
Dans: *Fundamental Virology* fourth edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001  
(107) (traduction)

#### Figure 3:

Histoire naturelle des infections aux papillomavirus  
Modifié de : Crum CP. Female genital tract. P.1033 Dans: Robbins SL, Cotran RS,  
Kumar V. *Pathologic basis of disease*, 5<sup>th</sup> edition, Saunders Company, 1994. (108)

#### Figure 4:

Lésions précurseur du carcinome cervical  
Modifié de: Shah, Keerti V. and Howley, Peter, M., Papillomaviruses, Dans: *Fields  
Virology* Volume 2, Third Edition, Lippincott Raven, 1996. (109)

#### Figure 5:

Perturbations du cycle cellulaires par les protéines virales E6 et E7.  
Source : Southern et al., 2000 (77)

#### Figure 6 :

Utérus et zone de transformation de l'épithélium.  
Source : Aho, 2002.

#### Figure 7 :

Quantification sur le Light Cycler™  
Source : www.roche-applied-science.com

## Article

### Figure 1:

Duration of HPV-16 infection in women infected with more or less than 10,000,000 copies of HPV-16 DNA in cervicovaginal lavages.

## Discussion

### Figure 1:

Synthèse du contrôle interne pour HPV-16.

## Annexe

### Figure 1:

Courbe de titration de la cible génomique virale E6.

### Figure 2:

Courbe de titration de la cible génomique virale E2

### Figure 3:

Courbe de titration d'ADN génomique humain.

### Figure 4:

Nombre de copies de E2 et E6 dans les mélanges de pHPV16 intact et linéarisé.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Arg :Arginine

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

ASCUS : Abnormal Cytology of Undetermined Significance

CDK: Cyclin dependent kinas

CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia

CTL: Cytotoxic T lymphocyte

EGF: Epidermal Growth Factor

FasL: Fas ligand

GRE: Glucocorticoid response element

HAART: Highly active antiretroviral therapy

HDAC: Histone deacetylase

HLA: Human Leukocyte Antigen

HPV: Human Papillomavirus

HSIL: High Grade Squamous Intraepithelial Lesions

hTERT: Human Telomerase Reverse transcriptase

IARC: International Agency for Research on Cancer

IL: Interleukine

INF : Interféron

LCR: Long control region

LSIL: Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions

MARs : Matrix Attachment Regions

ml: millilitre

µl: microlitre

NF: Nuclear Factor

NK : Natural Killer

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : paire de bases

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

Pro : Proline

Rb : retinoblastoma

RFC : replication factor C

RPA : replication protein A

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

TNF : Tumor necrosis factor

TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

VIH: Virus d'immunodéficience humaine

## DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à Simon, mon amour, que je tiens à remercier pour son précieux soutien au cours des dernières années. Je le dédie également à mes parents, Gilles Fontaine et Denise Larrivée, qui m'ont toujours appuyée et épaulée.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche pour son aide malgré un horaire très chargé et pour la liberté accordée. Je remercie également Hélène Voyer et Pierre Forest pour leur aide technique tout au long de ma maîtrise. Finalement, je remercie mes amis Julie Lajoie, Jonas Lefèvre, Joséphine Aho et Igal Ifergan, pour leur présence et pour avoir su me faire décrocher de temps en temps.



## INTRODUCTION

En Amérique du Nord, les infections causées par le virus du papillome humain (HPV) sont les infections transmissibles sexuellement les plus courantes. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, environ 75% de la population nord-américaine est infectée par HPV. Ces infections sont généralement transitoires et asymptomatiques, mais peuvent progresser à un stade précancéreux et éventuellement cancéreux. En effet, le HPV est la cause du cancer du col utérin, et est associé avec plusieurs autres cancers ano-génitaux (7). Le cancer du col est le deuxième cancer en importance chez la femme mondialement, et on rapporte 510 000 cas chaque année, dont 80% dans les pays en voie de développement (OMS) en raison du manque de dépistage systématique.

Compte tenu du fait qu'une minorité des femmes infectées par HPV développent des maladies précancéreuses et cancéreuses, plusieurs facteurs de progression ont été proposés. Les facteurs viraux étudiés incluent le type de HPV, la persistance de l'infection, une charge virale élevée et l'intégration de l'ADN viral dans le génome humain, défini comme un événement crucial du processus d'oncogénèse. Ces facteurs exercent une action synergique avec des facteurs de l'hôte et de son environnement.

En raison des méthodologies utilisées ou des population étudiées, plusieurs études précédentes portant sur la charge virale des HPV dans des échantillons cliniques ont obtenu des résultats conflictuels, mettant en doute la validité de ce marqueur épidémiologique (16;32;73;81;82;87). Toutefois, des protocoles quantitatifs ont été élaborés afin de mesurer la charge virale de différents types de HPV (32;51-53;67;). Nous considérons donc, dans cette étude, la charge virale totale et intégrée du HPV-16 comme marqueur important pour l'identification des femmes susceptibles de développer des maladies précancéreuses du col utérin. Nous tentons d'établir l'association entre la charge virale totale et intégrée et le grade des

lésions, la persistance des infections et l'état du système immunitaire des participantes à l'étude (taux de lymphocytes T CD4+). La nature longitudinale de l'étude a permis de recueillir plus d'un échantillon par patiente, permettant d'évaluer la durée de certaines infections. Quatre-vingt-trois femmes infectées par HPV-16 sont incluses dans le présent travail de recherche. Soixante-cinq d'entre elles sont séropositives pour le VIH et 18 sont séronégatives.

Préalablement au travail de recherche en soi, cet ouvrage débute par une description exhaustive des connaissances actuelles sur les HPV, avec l'emphase sur HPV-16. Une première section traite de la biologie moléculaire du virus. Les volets suivants décrivent les caractéristiques physiologiques et épidémiologiques des infections causées par HPV, de la progression néoplasique et des co-infections avec le VIH. Une description des études sur la charge virale et des limites des méthodes utilisées par le passé nous conduit par la suite à nos hypothèses de travail et à l'élaboration des méthodes de PCR quantitatif utilisées pour les confirmer. Nous décrirons finalement dans un article les associations établies entre le grade des lésions cervicales des participantes à l'étude, la charge virale, la durée de l'infection et l'état du système immunitaire des participantes.

## REVUE DE LITTÉRATURE

### 1. Le virus du papillome humain

#### 1.1. Historique

La nature infectieuse des verrues vulgaires est soupçonnée depuis plusieurs siècles, mais ne fût démontrée qu'en 1907. Des verrues humaines ont été transmises d'une personne à une autre par l'intermédiaire de filtrats acellulaires de verrues (108). Toutefois, ce n'est qu'en 1933 que Richard Shope a décrit le premier Papillomavirus, le « cotton tail rabbit papillomavirus » (CRPV), agent étiologique de la papillomatose cutanée chez le lapin, établissant en même temps la nature oncogénique des papillomavirus (108).

Les connaissances sur les papillomavirus ont par la suite évolué très lentement. Les infections par les papillomavirus nécessitant la différenciation complète des cellules, les études *in vitro* ont donc été peu nombreuses, et ce n'est que très récemment qu'il a été possible d'induire des facteurs de différenciation des cellules en culture.

#### 1.2. Classification

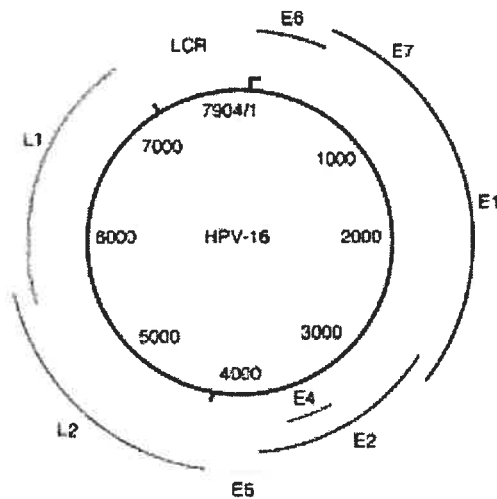
Les papillomavirus, les polyomavirus et le « Simian Virus 40 » ou SV40 forment la famille des *papovaviridae*. Les caractéristiques communes de ces virus incluent un virion de petite taille non enveloppé, une capsid de forme icosaédrique, un génome d'ADN circulaire double brin et une réplication nucléaire. Toutefois, des études plus récentes ont révélé des différences génomiques et morphologiques entre ces virus, et les papillomavirus sont maintenant reconnus comme une sous-famille

des *papovavirus*. En effet, les papillomavirus et les polyomavirus ont des différences considérables quant à la taille des virions (55 nm et 40 nm respectivement) et des génomes (8000 pb et 5000 pb respectivement), l'organisation génomique et le mode de transcription.

Puisque les infections par les papillomavirus sont spécifiques à l'hôte et ne franchissent pas la barrière des espèces, un premier niveau de classification est fait en fonction de l'hôte. Les papillomavirus sont ensuite classés par types. Autrefois, les méthodes d'analyse étaient plus limitées qu'aujourd'hui et les génotypes des papillomavirus étaient classifiés selon des méthodes d'hybridation d'ADN. Les nouveaux types étaient alors définis comme ayant moins de 50% d'hybridation en phase homogène avec un type connu de papillomavirus (11).

L'avènement de différents outils d'analyse génétique a permis une classification plus rapide et précise des papillomavirus. Bien qu'on observe un haut degré d'homologie quant à leur organisation génomique et la fonction des cadres de lecture, le polymorphisme des séquences nucléotidiques a rendu possible la distinction entre les différents types, sous-types et variants de papillomavirus. Cette distinction est faite en fonction du degré d'homologie de séquence de la région L1 des isolats viraux. Selon le « Papillomavirus Nomenclature Committee », deux types différents de HPV présentent moins de 90% d'homologie, tandis que des sous-types partagent entre 90 et 98% d'homologie. Les variants sont définis comme des isolats d'un même type ayant plus 98% d'homologie pour les séquences codantes et plus de 95% pour les séquences régulatrices (96). Il est à noter que les différents variants ne sont pas sujet à recombinaison génétique (101;102).

### 1.3. Organisation génomique



**Figure 1:** Le génome de HPV-16  
L'organisation génomique des papillomavirus est similaire à celle de HPV-16.

Source : web2.deu.edu.tr

Le génome des papillomavirus est constitué d'ADN double brin circulaire d'une longueur d'environ 8000 paires de bases. Les différents types de papillomavirus ont une organisation génomique très conservée, tant au niveau de la séquence nucléotidique que de la localisation et la fonction des cadres de lecture. Les cadres de lectures des papillomavirus ont été classifiés en tant que régions précoce (ou E pour *early*) et tardive (ou L pour *late*) selon leur localisation dans le génome et la fonction des protéines encodées.

Typiquement, les protéines encodées par la région précoce (E1 à E8) sont requises pour la réplication virale, la transcription et la transformation cellulaire. E1 forme un complexe avec E2 afin de former l'initiateur de réplication de l'ADN viral. E2 possède également la fonction de régulateur de transcription. Sous sa forme entière, E2 lie l'ADN viral dans la région promotrice de E6 et E7 afin d'activer la transcription. Toutefois, on retrouve plus fréquemment dans les cellules E2 sous une forme tronquée à laquelle il manque le domaine d'activation, qui agit par conséquent comme répresseur. Les protéines E6 et E7 nécessitent une attention particulière en raison de leur potentiel de transformation cellulaire. E6 lie la protéine cellulaire p53, ce qui entraîne l'ubiquitination et la dégradation subséquente de p53, tandis

qu'E7 inactive la protéine Rb (retinoblastoma). Les gènes E6 et E7 de HPV-16 sont sous le contrôle du promoteur p97 situé dans la portion 3' de la région LCR, et sont régulés par la protéine virale E2 (83). E4 est impliquée dans la destruction du réseau de cytokératines, et E5 est une protéine mitogène qui interagit avec des récepteurs de facteurs de croissance. Les protéines encodées par la région tardive du génome virale, L1 et L2, sont des protéines structurales qui forment la capsid des virions.

La région non-transcrite, ou LCR, de HPV-16 est cruciale pour l'expression des protéines virale. Cette région contient des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription cellulaires, notamment AP-1, SP-1, NF-1, Oct-1, TEF-1 et YY1 (91). On y retrouve également la boîte TATA, site d'initiation de la transcription de l'ADN. La présence d'un GRE ou élément de réponse aux glucocorticoïdes dans le LCR peut également affecter la transcription des gènes viraux (19). Des complexes formés par un glucocorticoïde et son récepteur modulent l'expression génique au niveau transcriptionnel en liant les GRE et en régulant la synthèse des ARN messagers.

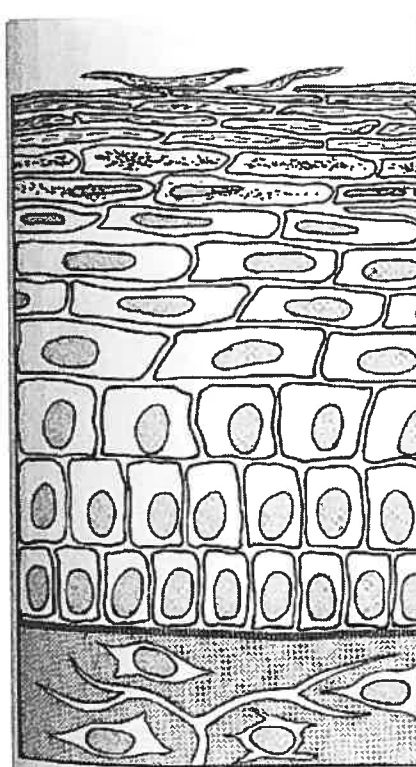
#### **1.4. Tropisme cellulaire**

Bien que les papillomavirus puissent se lier à plusieurs types de cellules, ces virus démontrent un tropisme cellulaire restreint aux cellules basales de l'épithélium squameux. Ces cellules, qui subissent une différenciation complète, sont les seules à pouvoir supporter une infection productive par les papillomavirus. Toutefois, différents types de papillomavirus affichent un tropisme tissulaire pour l'épithélium muqueux ou cutané.

La protéine virale L1, protéine majeure de la capsid très conservée entre les types de papillomavirus, interagit avec une protéine cellulaire pour permettre l'entrée du virus dans les cellules (62). Le récepteur cellulaire des papillomavirus

demeure inconnu mais des interactions entre L1 et intégrine  $\alpha 6$  ont été démontrées et il a été postulé que cette protéine puisse être le récepteur des papillomavirus (23). L'expression de l'intégrine  $\alpha 6$  n'étant pas spécifique aux cellules épithéliales, l'utilisation possible de ce récepteur n'est pas à l'origine du tropisme cellulaire des papillomavirus. Toutefois, on retrouve dans la portion centrale du LCR de HPV-16 un élément « enhancer » actif uniquement dans les cellules épithéliales (19).

### 1.5. Réplication



	DIFFÉRENTIATION DES KÉRATINOCYTES	REPRODUCTION DES PAPILOMAVIRUS
	<b>Couche cornée</b>	
Mue		Diffusion des virions
	<b>Couches granuleuses</b>	
Cornification, dégénération nucléaire, agrégation de kératine		Virions matures
	<b>Couches malpighiennes supérieures</b>	
Production de kératines		Assemblage des virions, protéines L1 et L2 amplification génomique végétative protéine pécoce E4 koilocytose des kératinocytes
	<b>Couches malpighiennes inférieures</b>	
Production de kératines		Protéines E6 et E7 Protéines précoces E1, E2, E4 et E5
	<b>Couche transitoire</b>	
Kératines 1 et 10 Division cellulaire		Site alternatif d'infection Protéines précoces E1, E2 et E5
	<b>Cellules souches basales</b>	
Division occasionnelle Production de kératines		Primo-infection, réplication productive Protéines précoces E1, E2 et E5
	<b>Membrane basale</b>	
	<b>Derme</b>	
	Tissu conjonctif (collagène) fibroblastes, lymphocytes, endothélium vasculaire	

**Figure 2 :** Cycle de réplication des papillomavirus et différenciation cellulaire. La réplication virale est étroitement liée à la différenciation de l'épithélium squameux.

Traduit de : Howley, P.M. and Lowy, D.R., Papillomaviruses and their replication  
Dans: *Fundamental Virology* fourth edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001  
(107)

## Expression des protéines précoces

Les papillomavirus infectent les cellules épithéliales basales non différenciées, et un cycle de réplication complet requiert la différenciation cellulaire. Les protéines précoces sont exprimées dans les couches basales et intermédiaires de l'épithélium (19). La transcription des gènes est contrôlée par la région LCR, qui lie plusieurs facteurs de transcription viraux et cellulaires. La protéine virale E2 est un facteur de transcription important, et peut réguler à la hausse ou à la baisse la transcription des gènes viraux. La forme entière de E2, qui comprend un domaine de liaison à l'ADN lié à un domaine de transactivation, agit en tant qu'activateur du promoteur p97. Il s'ensuit donc l'expression des oncoprotéines E6 et E7. La forme tronquée de E2, retrouvée plus fréquemment dans les cellules infectées que la forme entière, ne possède pas de domaine de transactivation et agit donc en tant que répresseur.

L'expression des protéines E4, E6 et E7 est également dépendante de la différenciation cellulaire, possiblement en raison de l'expression différentielle des facteurs de transcription cellulaires dans les couches de l'épithélium. En effet, il a été démontré chez HPV-31b que l'expression de E6 et E7 dans les différentes couches de l'épithélium est orchestrée avec l'expression de AP1. AP1 est un hétérodimère formé des facteurs Jun et Fos, et l'expression de Jun est plus importante dans les couches basales de l'épithélium (49). Or, le LCR des papillomavirus contient des sites de liaison à AP1, qui est un facteur impliqué dans la transcription des gènes viraux. De plus, on retrouve dans le LCR de HPV-16 un site de régulation adjacent au site de liaison à AP-1 qui pourrait être associé à la transcription des gènes dépendante de la différenciation cellulaire (19). Ce site se lie à Epc-1/skn-1, qui est un facteur de transcription exprimé dans les cellules épithéliales et dont le patron d'expression correspond à celui des gènes précoces des papillomavirus.



## Expression des protéines tardives

Les protéines L1 et L2 ne sont produites que dans les couches superficielles et différenciées de l'épithélium, où les virions sont assemblés et relâchés. Cette expression réduite aux cellules différenciées est possiblement due à des séquences inhibitrices des ARNm tardifs. Ces séquences interagissent avec des protéines cellulaires et répriment l'expression des protéines en inhibant la traduction et en promouvant la dégradation des ARN messagers (104). Une de ces séquences est localisée dans la région 3' non traduite de l'ARNm de L1, et une autre se trouve dans la région codante de L1 (84). Il s'agit de séquences riches en AU qui ont une certaine homologie avec les éléments riches en AU des ARNm instables ou traduits à des niveaux très bas.

## Réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN viral, qui débute dans les couches intermédiaires de l'épithélium, est initiée par le complexe formé par les protéines virales E1 et E2 (19). E1 possède la fonction d'hélicase et est requise pour le déroulement de l'ADN double brin et pour le recrutement de la polymérase à l'origine de réplication (19). La réplication de l'ADN viral requiert la polymérase cellulaire  $\alpha$ , les facteurs cellulaires RPA, PCNA, RFC (47), et les topoisomérases I et II (12).

Dans les cellules basales divisées activement, le virus synthétise de l'ADN une fois par cycle de réplication afin de se propager dans les cellules lors de leur division. C'est ce qu'on appelle le stage non productif de la réplication virale. Le stage productif, qui a lieu dans les cellules différenciées, correspond à la production d'ADN viral en grande quantité ainsi qu'à la production des protéines tardives qui formeront les virions (26).

Nécessitant l'action des molécules impliquées dans la réplication cellulaire, la réplication de l'ADN viral requiert l'induction de la phase S du cycle cellulaire (25). La protéine virale E7 permet aux cellules de passer outre le point de transition G<sub>1</sub>/S en liant et en inactivant les protéines de la famille Rb, causant la libération de E2F et par conséquent le début de la phase S (59). Une activation induite de E2F est normalement contrecarrée par l'activation de p53 qui vise à induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Les HPV oncogènes empêchent ce mécanisme grâce à la protéine virale E6, qui lie p53 et en cause l'ubiquitination puis subséquemment la dégradation par le protéasome. Les HPV non-oncogènes induisent également la prolifération cellulaire, causant l'apparition de verrues. Toutefois, puisque ces types de HPV semblent moins efficaces à bloquer les mécanismes d'apoptose (85), les particules virales sont relâchées lors de la desquamation des kératinocytes morts.

## 2. Infection par le VPH

### 2.1 Épidémiologie

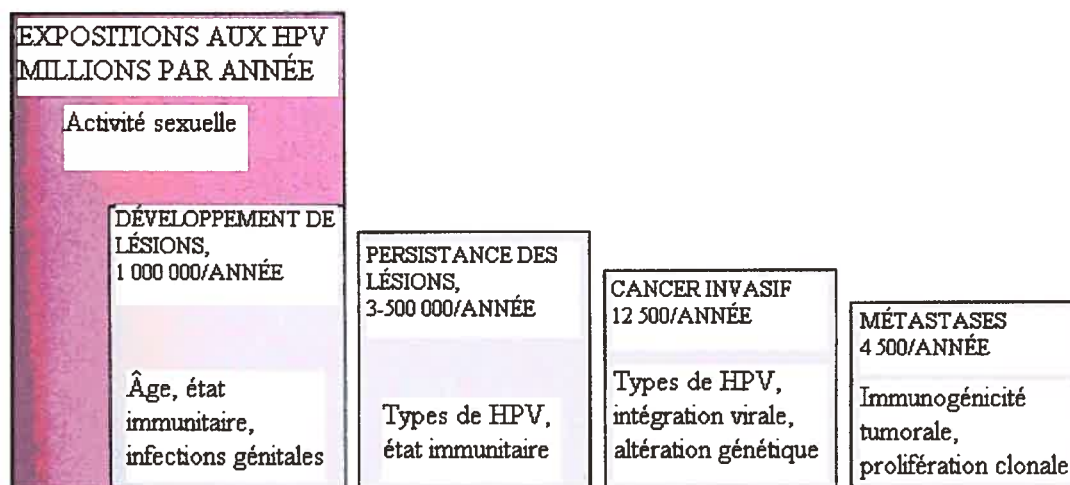
Étant le deuxième cancer en importance chez la femme à l'échelle mondiale, le cancer du col utérin fait environ 510 000 victimes chaque année, dont plus de 80% dans les pays en voie de développement. En effet, on rapporte chaque année 68 000 nouveaux cas de cancer en Afrique, 77 000 en Amérique latine et 245 000 en Asie. En l'absence de dépistage systématique, les infections causées par les HPV demeurent non détectées, et le développement de cancer invasif est presque inévitablement mortel. Ainsi, on rapporte chaque année 288 000 décès dus au cancer du col utérin (Organisation Mondiale de la Santé, 2004).

Au Canada, l'implémentation de programmes de dépistage constitue une mesure préventive efficace contre le cancer, expliquant sa basse fréquence. En effet,

le dépistage de lésions non cancéreuses de bas et haut grade rend possible une intervention préventive qui consiste en le prélèvement de la lésion, et prévient donc la progression à un stade cancéreux. Depuis l'introduction du test de Papanicolaou en 1943, le taux de mortalité due au cancer du col utérin a diminué de plus de 70%. Ce cancer se situe donc maintenant au douzième rang des cancers diagnostiqués chez la femme. En 2002, 1480 nouveaux cas étaient détectés, et 410 décès ont été associés au cancer du col (Santé Canada).

HPV-16, le type à haut risque le plus fréquent au Canada, est présent dans environ 50% des infections au niveau du col utérin. Ce type de HPV comporte cinq branches phylogénétiques distinctes, notamment les variants européens, asiatiques, asiatiques-américains, africains-1 et africains-2. La distribution géographique de ces variants reflète l'évolution des HPV avec les humains, ainsi que les premières vagues de migration et de colonisation (101).

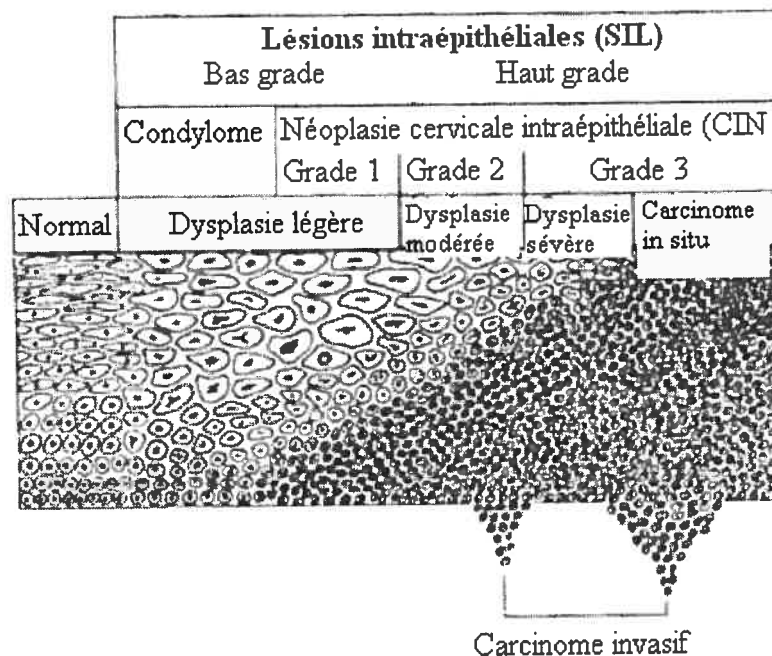
### 3.2 Histoire naturelle



**Figure 3** : Histoire naturelle des infections aux papillomavirus.

Modifié de: Crum CP. Female genital tract. p.1033 Dans: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease*, 5<sup>th</sup> edition, Saunders Company, 1994. (108)

Bien que les infections aux papillomavirus soient très fréquentes, la majorité d'entre elles sont transitoires. Ainsi, le plus grand nombre d'infections est retrouvé chez les femmes âgées d'entre 15 et 25 ans, représentant le début de l'activité sexuelle, mais diminue avec l'âge, reflétant possiblement l'acquisition d'immunité. La durée des infections est généralement spécifique au type de HPV, mais peut être influencée par différents facteurs (discutés plus bas). Les infections causées par HPV-16 sont généralement d'une durée plus grande que celle des infections causées par les types non-oncogènes (100). Parmi toutes les femmes infectées par des HPV, seulement certaines développeront des lésions cervicales intraépithéliales de bas grade (LSIL ou CIN-1). De façon générale, les lésions régressent spontanément, mais dans certains cas d'infection persistante, on observe un risque augmenté de progression des lésions. Les femmes développent alors des lésions intraépithéliales de haut grade (HSIL ou CIN2-3) (72). Le grade des lésions développées est déterminé selon la proportion de l'épaisseur de l'épithélium qui est transformé, tel qu'illustré dans la figure 4. L'appellation SIL est utilisée pour référer à l'évaluation des cellules obtenues par lavage ou frottis, tandis que l'appellation CIN réfère au résultat de biopsie.



**Figure 4 :** Lésions précurseurs de carcinome cervical. La dysplasie est évaluée selon la proportion de l'épaisseur de l'épithélium qui est transformée.

Modifié de: Shah, Keerti V. and Howley, Peter, M., Papillomaviruses  
 Dans: *Fields Virology* Volume 2, Third Edition, Lippincott Raven, 1996. (109)

Les lésions de CIN2-3 sont considérées comme le stade précurseur immédiat au cancer du col. Certaines de ces lésions donneront lieu à un carcinome *in situ*, puis éventuellement un cancer invasif. Bien que les papillomavirus possèdent le pouvoir de transformer et d'immortaliser les cellules, une infection par un type de HPV oncogène n'est pas une cause suffisante pour engendrer la transformation complète des cellules. Certains co-facteurs, discutés plus bas, exercent une action synergique avec les HPV dans le processus d'oncogenèse, qui peut prendre plusieurs années. En raison des programmes de dépistage systématique dans les pays développés, le taux d'incidence de cancer invasif est évalué à moins de 1% des infections par un type de HPV à haut risque (41).

Dans plusieurs cas, une infection est causée par plusieurs types de HPV. Toutefois, ce phénomène est plus fréquent chez les patients séropositifs pour le VIH que chez les individus séronégatifs (54). Néanmoins, un seul type est souvent à l'origine d'une lésion pré cancéreuse ou cancéreuse, car une lésion monoclonale peut émerger d'une lésion polyclonale. En effet, les lésions de haut grade sont souvent de nature monoclonale, et sont associées avec un risque augmenté de progression néoplasique (86).

### 2.3 Association avec le cancer

D'un point de vue historique, le cancer du col est considéré depuis plusieurs décennies comme une maladie transmissible sexuellement. Plusieurs agents pathogènes ont été proposés pouvant être à l'origine de cette maladie, tels la syphilis, la gonorrhée et l'herpès. Ce n'est que durant les années 80 qu'un lien entre

les papillomavirus et le cancer du col a été établi, et on reconnaît aujourd'hui l'association entre les papillomavirus et les cancers ano-génitaux (7).

Le virus du papillome humain est maintenant accepté en tant qu'agent étiologique du cancer du col utérin. En raison des évidences biologiques et épidémiologiques, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a, en 1995, reconnu les HPV de types 16 et 18 comme agents cancérogènes (64). Les HPV à haut risque sont donc des causes nécessaires mais non suffisantes pour le développement de cancer du col utérin.

Les critères utilisés par l'IARC en 1995 pour évaluer un lien de causalité entre les HPV et le cancer du col furent les critères de Bradford-Hill : la force, la consistance et la spécificité de l'association, l'association temporelle, une relation dose effet ou gradient biologique, la plausibilité biologique et l'impact sur le cancer en traitant ou prévenant l'infection. Afin d'évaluer la validité de ces critères et leur application dans le cas précis des papillomavirus, Bosch et coll. (7) ont conjugué un grand nombre d'études épidémiologiques.

En premier lieu, une forte association est plus susceptible de présenter un lien de cause à effet qu'une faible association, qui est souvent le résultat de biais non détectés. Ainsi, on détecte de l'ADN des types de HPV à haut risque dans 99,7% des cas de cancers du col utérin, tandis que la maladie ne se développe pas en l'absence du virus (64). Une certaine consistance est retrouvée dans cette association entre les HPV et le cancer du col, qui est maintenue dans plusieurs études internationales. En combinant les résultats de 50 études épidémiologiques, Bosch et collaborateurs (7) ont effectivement démontré une association entre HPV et le cancer du col utérin dans différentes populations depuis 1985. Bien qu'une maladie telle que le cancer du col soit un phénomène complexe, l'association entre les papillomavirus est dite spécifique, en raison du fait que certains types précis de HPV sont associés au développement de lésions cancéreuses particulières telles l'épithélioma, ou carcinome cutané, du col utérin.

L'association temporelle réfère au fait que l'exposition à l'agent doit absolument avoir lieu avant le diagnostique pour qu'un lien causal puisse être établi. Ceci est illustré par le fait que beaucoup de jeunes femmes sont infectées par HPV mais qu'on retrouve la majorité des cas de carcinome chez les femmes de plus de 30 ans. Plusieurs études ont suivi des femmes normales jusqu'à l'apparition de lésions cervicales de haut grade, et ont pu démontrer la présence d'ADN de HPV préalablement à l'apparition de lésions (7).

Le gradient biologique, soit la charge virale augmentant en fonction du degré de dysplasie des cellules, a été très controversé dans les premières études de cohorte sur HPV. Il est néanmoins généralement accepté comme facteur de risque de développement de lésions cervicales précancéreuses (voir la section sur les facteurs viraux de progression néoplasique et la section sur les mesures de charges virales).

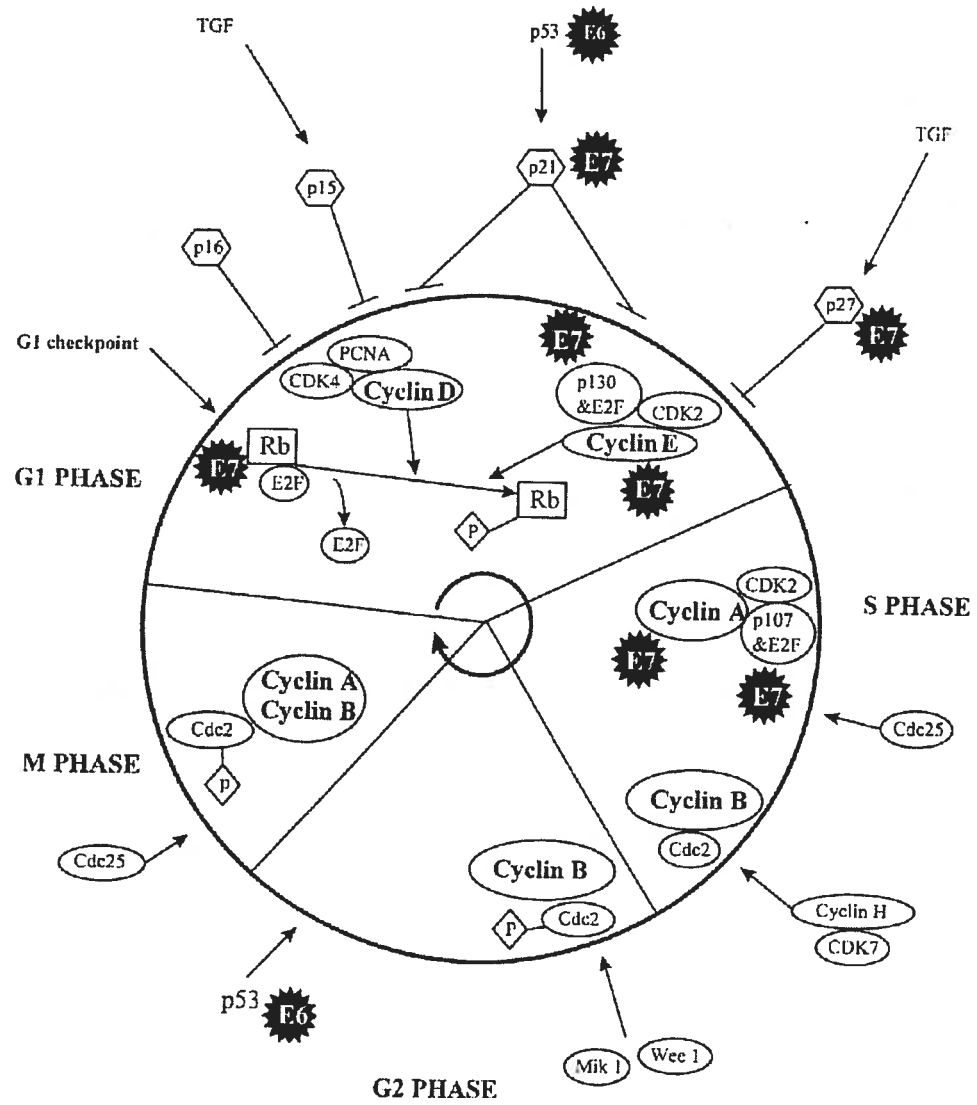
La plausibilité biologique du lien entre HPV et le cancer du col utérin est illustrée par la capacité inhérente des papillomavirus de transformer les cellules. Les mécanismes impliqués sont expliqués plus en détails dans la section « Perturbation du cycle cellulaire ». Les observations faites *in vitro*, chez des animaux et chez des humains sont cohérentes avec les notions théoriques de perturbation du cycle cellulaire.

### 3. Progression néoplasique

#### 3.1 Perturbation du cycle cellulaire

Les types de HPV à haut risque possèdent le potentiel d'immortaliser et de transformer les cellules qu'ils infectent. Ces fonctions sont conférées par les oncoprotéines virales E6 et E7. En phase G1 du cycle cellulaire, un point de restriction détermine si le cycle peut se poursuivre normalement ou doit arrêter. Dans les cellules qui entrent en phase S, la phosphorylation de pRB résulte en la libération de E2F, ce qui permet la synthèse de l'ADN et la continuation subséquente du cycle cellulaire. Ce mécanisme a lieu par l'entremise de la phosphorylation ou déphosphorylation de cyclines par les CDK's (cyclin dependent kinases) à des moments cruciaux du cycle cellulaire. Lors d'une infection par un papillomavirus, la protéine virale E7 lie le régulateur pRB. E2F est donc libéré en l'absence de phosphorylation de pRB, ce qui induit l'entrée des cellules en phase S. E7 interfère également avec les autres mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, augmentant notamment la quantité de cycline E également responsable de la transition G1/S (59). Lors d'une telle activation, p53 est normalement activé, causant une augmentation de l'expression de p21, un inhibiteur des complexes cycline/CDK qui peut agir à plusieurs étapes du cycle cellulaire, entraînant son arrêt. Toutefois, l'inactivation de p21 par E7 permet la progression du cycle cellulaire (77). Afin d'inhiber l'apoptose alors normalement induite, la protéine virale E6 lie p53 et stimule sa dégradation protéolytique par la voie de l'ubiquitination(71). Par conséquent, l'action synergique de E6 et E7 induit la transformation et la prolifération des cellules, tel que schématisé dans la figure 5 (page suivante).





**Figure 5 :** Perturbations du cycle cellulaire par les protéines virales E6 et E7.

Source : Southern et al. 2000 (77)

E6 possède également la capacité d'activer le gène hTERT qui code pour l'enzyme télomérase (89). Cet enzyme est un complexe ribonucléoprotéique, composé d'une matrice d'ARN et d'une transcriptase inverse, qui est spécialisé dans la synthèse des télomères, répétitions d'ADN non codant situées aux extrémités des chromosomes. En temps normal, l'enzyme télomérase est inactive, ce qui résulte en un raccourcissement progressif des chromosomes lors de chaque cycle de réplication de l'ADN cellulaire, et une entrée en sénescence de la cellule (90). La télomérase, fréquemment activée dans les cellules cancéreuses, vient contrer le phénomène de raccourcissement des chromosomes.

E5 est une protéine mitogène qui agit au niveau des voies de transduction des signaux. Localisée à la membrane cellulaire, E5 augmente l'activation des signaux du récepteur du facteur de croissance épidermique et active l'expression du facteur de transcription c-jun via la voie dépendante de *ras*. De plus, E5 interfère avec les mécanismes d'apoptose dépendants de TRAIL et FasL (42).

### **3.2 Facteurs viraux**

#### **Type de HPV**

Des facteurs viraux les plus susceptibles d'influencer une progression néoplasique, les types de HPV présents dans l'infection sont particulièrement importants. Parmi plus de 100 types de HPV caractérisés, 40 infectent le tractus ano-génital (17). Ces types sont classifiés selon leur potentiel oncogénique comme étant des types à haut risque ou des types à faible risque. Les types à faible risque sont associés avec la formation de verrues génitales et de maladies intraépithéliales de bas grade, tandis que les types à haut risque ont été définis comme agents causatifs des cancers ano-génitaux (7). On retrouve 16 types de HPV oncogènes,

soit les types 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, et 82. Parmi ces 16 types, les types 16 et 18 sont les plus fréquents.

### **Modifications épigénétiques**

Comme l'ADN humain, l'ADN de HPV-16 est sujet à la méthylation des motifs CpG, réprimant l'expression de certains gènes. Cette répression est faite soit en bloquant l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs, soit en recrutant un complexe de protéines qui attirent et activent HDAC1, causant la désacétylation et la condensation de la chromatine. La méthylation des dinucléotides CpG de HPV-16 a lieu dans la région promotrice de E6, et interfère avec la transcription des gènes E6 et E7. Il a été démontré que dans certains spécimens cliniques, on retrouve l'ADN viral méthylé surtout dans les spécimens normaux et LSIL, et que la méthylation diminue durant la progression aux stades précancéreux et cancéreux (3). Il est toutefois incertain si la méthylation de l'ADN de HPV est un mécanisme de défense de la cellule qui reconnaît l'ADN viral comme étranger, où s'il s'agit d'un phénomène propre aux papillomavirus, qui permet l'établissement d'une infection de longue durée. Comme la région L1 est également sujette à méthylation, il peut également s'agir d'un mécanisme qui vise à coordonner l'expression des gènes précoces et des gènes tardifs.

### **Persistance**

La majorité des infections causées par les papillomavirus sont transitoires, mais certains facteurs peuvent favoriser la persistance des infections (8). La durée d'une infection peut donc être un élément important pour l'évaluation du risque de progression néoplasique (72). En effet, les individus ayant une infection persistante par un type de HPV à haut risque ont un risque plus élevé de développer des HSIL, lésions précurseurs du carcinome *in situ* (72).

La persistance d'une infection peut être influencée par des variations génomiques des HPV. Dans les cas de HPV-16 et HPV-18, les variants non européens persistent et causent des lésions cervicales pré cancéreuses plus fréquemment que les variants européens (93). Certains polymorphismes du gène E6 peuvent également être associés à une persistance accrue des infections causées par HPV-16. Une substitution d'une thymine pour une guanine au nucléotide 350 a été associée, dans une étude, avec une infection persistante et un risque élevé de carcinome du col utérin (55).

### **Charge virale**

Une charge virale élevée représente une réplication virale productive contrairement à l'intégration qui cause la prolifération cellulaire. La charge virale des HPV pourrait donc influencer la persistance d'une infection, déjà définie comme un facteur de risque de dysplasie. La charge virale des papillomavirus étant un facteur de risque potentiel dans la progression des lésions, son importance demeure toutefois controversée en raison des résultats conflictuels obtenus lors des différentes études effectuées. Une association entre les charges virales et le degré de dysplasie a été démontrée adéquatement pour HPV-16 uniquement (53;82). D'autres études mesurant les charges virales de plusieurs types à la fois ou d'autres types que HPV-16 ont obtenu des résultats conflictuels ou peu concluants (31;32;73;82). Il peut donc s'agir d'une association qui est spécifique à certains types de HPV, ou d'une variation attribuable aux méthodes utilisées et aux populations étudiées lors des différentes études.

Certaines études qui utilisent la méthode Hybrid Capture™ (décrite plus bas dans la section « Mesures de charges virales ») parviennent à évaluer le risque des patientes de développer des maladies pré-cancéreuses et cancéreuses du col utérin (32), mais il s'agit d'une association non-linéaire. Bien que permettant de déceler la

présence de SIL, le chevauchement entre les valeurs de charge virale obtenues est tel qu'il est parfois impossible de distinguer les LSIL des HSIL (13;16;29;32). Le test Hybrid Capture ne comprend pas de normalisation pour la quantité de cellules présentes dans les échantillons, et les plages de valeurs de charges virales mesurées ne sont pas aussi étendues que ce qu'on retrouve normalement dans les échantillons cliniques (16;32;81). De plus, il s'agit d'un test qui n'est pas spécifique aux types de HPV, mais détecte plusieurs types sans distinction.

Plusieurs études qui utilisent des méthodes de PCR quantitatif sont plus précises, car le PCR permet d'inclure une normalisation pour la charge cellulaire des échantillons, de même qu'une détection d'inhibiteurs spécifiques aux différentes paires d'amorces utilisées (32;51;52;73;87) (les méthodes de PCR quantitatif sont décrites plus bas dans la section « Mesure de charges virales »). Ces études sont généralement reproductibles, et parviennent à établir une association entre la charge virale, le grade des lésions observées, et le risque de développement de lésions. Il existe néanmoins un chevauchement des charges virales entre les grades faibles et élevés des maladies précancéreuses. Jusqu'à maintenant, seulement deux études ont démontré la présence d'inhibiteurs spécifiques aux différentes réactions de PCR et l'importance d'utiliser les contrôles internes pour chacune de ces réactions (51;52).

Dans plusieurs cas d'infections causées par HPV-16, le nombre de copies de génome viral augmente de façon significative en fonction du grade des anomalies de l'épithélium squameux. Ceci est observé à la fois chez différents individus d'une cohorte, et dans plusieurs prélèvements d'un même individu chez qui une progression des lésions est observée (53;82). Bien que démontrée dans une étude incluant un faible nombre de participants, une association a été établie entre les variations de charge virale de HPV et la progression ou la régression des lésions (87). Le risque de développement de lésions augmente selon la charge virale, et les femmes ayant une charge virale élevée sont à risque de développer des HSIL, lésions précurseurs du cancer du col utérin (73). Toutefois, le développement de HSIL n'est pas toujours accompagné par des charges virales élevées (56;103). Une étude

prospective effectuée en Suède (103) a évalué l'association entre la charge virale de HPV-16 et le risque de développer un cancer du col utérin. Non seulement une charge virale élevée représente un facteur de risque de développement de HSIL, mais peut également prédire le développement de carcinome *in situ* plusieurs années avant le diagnostique.

D'autre part, une lésion de haut grade peut souvent être entourée de lésions de bas grade. Des cellules provenant de plusieurs lésions de différents grades peuvent ainsi être prélevées et influencer les mesures de charges virales, ce qui peut en restreindre l'utilité en tant qu'outil clinique (75).

Des variations génomiques des HPV peuvent être à l'origine d'une réplication virale plus ou moins active, surtout si elles sont localisées dans la région régulatrice du génome viral. Les variants asiatiques-américains ont ainsi une charge virale moins élevée que les variants européens au niveau du col utérin (93).

### **Intégration dans le génome humain**

Le génome des papillomavirus peut être retrouvé dans les cellules à la fois sous forme d'épisome, où il peut être répliqué activement, et intégré dans le génome de l'hôte. Dans les cancers, on retrouve l'ADN de HPV-16 à la fois sous forme épisomale et sous forme intégrée, ce qui n'est pas le cas des autres types de HPV (22;38).

Plusieurs sites d'intégration dans le génome humain ont été décrits, mais aucun site unique n'a été démontré de façon définitive. L'intégration résulte invariablement en une linéarisation du génome viral causée par une délétion dans le gène E2. La protéine E2 n'étant plus exprimée et le génome étant linéarisé, le virus devient ainsi incompetent quant à sa réplication mais augmente son potentiel de transformation cellulaire. Puisque le promoteur de E6 et E7 n'est plus sous le

contrôle de E2, l'expression de ces protéines est accrue, ce qui favorise la progression néoplasique (15). De plus, une augmentation de la stabilité des ARN messagers de E6 et E7 a été observée dans des cas où l'ADN viral était intégré (40). Ainsi, l'intégration confère un avantage de croissance aux cellules infectées, et a donc été définie comme un événement-clé dans le développement du cancer du col utérin, qui survient tôt dans le processus de transformation cellulaire. En effet, une étude épidémiologique démontre qu'on retrouve des formes intégrées de HPV-16 dans les lésions de bas grade, soit bien avant les changements morphologiques caractéristiques du cancer (27). Cette équipe a donc défini l'intégration de HPV-16 dans le génome comme un point de non-retour dans l'histoire naturelle de l'infection, qui indique le développement futur de HSIL (27). L'intégration du génome de HPV-16 dans le génome humain est également liée à l'agressivité de tumeurs cervicales (4). Le stade de maladie et la durée avant une progression sont donc associés à la présence d'ADN de HPV intégré dans le génome humain (57).

Des « nuclear matrix attachment regions » (MARs) qui influencent possiblement l'activité du promoteur p97 ont été identifiés chez HPV-16. Un des MARs est situé dans le premier tiers (5') du LCR, l'autre surplombe la séquence codante du gène E6 (78). Les MARs, en vertu de leur affinité pour la matrice nucléaire, servent de point d'ancrage de la chromatine à la matrice et mènent la machinerie de transcription à proximité des séquences régulatrices. Pour HPV-16, un de ces segments contient des sites de liaison pour le facteur de transcription cellulaire CDP/Cut, qui réprime le promoteur de E6 (3). CDP/Cut réprime la transcription des gènes en empêchant l'accès des facteurs de transcription aux séquences promotrices ou en activant l'histone désacétylase HDAC1. L'ADN est ainsi inaccessible à la machinerie de transcription. Il a été proposé que lors de l'intégration de l'ADN viral dans le génome humain, cette répression due à CDP/Cut est perdue en raison d'un des MAR qui agit comme stimulateur de transcription (3).

En raison de la dégradation de p53 médiée par la protéine E6 (71), les cellules perdent la capacité d'induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose.

Advenant des erreurs de réplication, les dommages causés à l'ADN demeurent ainsi non réparés. Puisque l'infection par un type de HPV à haut risque n'est pas une cause suffisante dans le développement du cancer du col utérin, des mutations dans le gène p53 peuvent agir de pair avec les HPV pour induire une transformation maligne. Ainsi, il a été démontré que dans certains cas d'infections causées par des HPV à haut risque, on retrouve un plus haut taux de mutations dans le gène de p53 que chez les individus non infectés, et que ce taux se trouve augmenté dans les cas de HSIL et de carcinome in situ (20).

L'intégration du génome de HPV-16 est souvent accompagnée d'instabilités chromosomiques, particulièrement d'anomalies numériques (38;68). Des cas de tétraploïdie ont été démontrés dans des lésions de haut grade, et des cas d'aneuploïdie ont été démontrés dans des cas de cancer (38). La relation temporelle entre l'intégration et l'induction d'anomalies chromosomiques peut sembler confuse. Toutefois, une étude semble indiquer que l'intégration du génome viral exerce un effet négatif sur la stabilité des chromosomes, et serait donc une cause des anomalies observées plutôt qu'une conséquence (68). Bien qu'effectuée *in vitro*, cette étude utilise des cellules provenant de femmes infectées par HPV-16 souffrant de LSIL, qui ont été cultivées et dans lesquelles HPV-16 a été répliqué. Les niveaux de protéines virales exprimées reflètent donc le cours d'une infection réelle contrairement à ce qui aurait été obtenu par transfection. Plusieurs passages ont permis au génome viral de s'intégrer au génome humain, et des lésions ont par la suite été simulées via l'infection de la peau de souris nues (68).

### 3.3 Facteurs de l'hôte

L'infection par un type de HPV à haut risque est une cause nécessaire mais non suffisante pour le développement du cancer du col utérin. Certains facteurs de l'hôte et de son environnement peuvent jouer un rôle considérable. Il est toutefois à



noter que l'action de ces facteurs n'est pas indépendante de celle des HPV, dont le lien avec le cancer du col a déjà été défini. Ils sont donc à considérer en tant que cofacteurs.

### **Facteurs génétiques**

En premier lieu, l'importance des facteurs génétiques tels le polymorphisme des HLA de classe II a été démontrée. Dans différents groupes ethniques, l'allèle HLA-DQB1\*03 (ou DQ3) est apparemment lié à un risque élevé de cancer du col utérin, tandis que l'allèle HLA-DRB1\*13 est plus fréquemment retrouvé chez des femmes saines (58). Dans la population caucasienne, l'allèle DRB1\*1501 représente un risque élevé de développement de carcinome, et une association avec une charge virale élevée de HPV-16 a été démontrée chez les porteurs de l'haplogroupe DRB1\*1501-DQB1\*0602 (5;58). On retrouve une association similaire dans la population africaine avec l'allèle DRB1\*1503 (58). Toutefois, la répartition non équivalente des allèles dans les différentes populations rend difficile l'interprétation des résultats obtenus dans ce type d'études.

Puisque les lymphocytes T cytotoxiques jouent un rôle important dans la défense contre les papillomavirus, le polymorphisme des HLA de classe I a également été étudié en tant que facteur de risque. Certains allèles peuvent être associés avec des différences d'importance dans la réponse des CTLs contre les HPV. Ainsi, l'allèle HLA-A\*02 semble avoir un effet inducteur tandis qu'on attribue à l'allèle HLA-B\*15 un effet protecteur (105).

Différents allèles de p53 ont possiblement une influence sur le risque de progression néoplasique, en raison de l'affinité du lien de cette protéine avec E6. En effet, le polymorphisme du codon 72 de p53 a été associé avec une susceptibilité différente à la dégradation par l'ubiquitine (79). p53Arg serait ainsi lié à un risque plus élevé de cancer du col que p53Pro (sauvage) dans des cas d'infections par

certaines variantes de HPV-16 (88;106). L'agressivité des tumeurs cervicales est accrue chez les homozygotes p53Arg/Arg (36). Toutefois, la difficulté de reproduire ces résultats, possiblement due à une répartition différente des allèles de p53 ou des variants de HPV-16 dans les différentes populations étudiées, met un doute sur l'importance du polymorphisme de p53 (9).

### **Réponse immunitaire**

Lors d'une infection par un HPV, la réponse immune prévalente est une réponse cellulaire dans laquelle s'infiltrent des lymphocytes T cytotoxiques, des cellules NK et des macrophages. Chez une personne immunocompétente, cette réponse résulte souvent en l'élimination de l'infection. Cette réponse peut être altérée par des facteurs comme le polymorphisme génétique des HLA, tel que discuté plus haut, ou par une immunosuppression primaire ou secondaire, telle une infection par le VIH (discuté plus bas dans la section « Co-infections par VIH et HPV »). La réponse cellulaire est modulée par plusieurs cytokines, notamment interleukine-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) et interféron (IFN).

Certaines cytokines produites lors d'une infection virale interagissent directement avec les HPV. D'une part, il a été proposé que TNF $\alpha$  et IL-1 exercent une action inhibitrice sur la transcription des gènes des HPV (48). IL-1 et TNF $\alpha$  stimulent l'expression de NF-IL6, qui lie la région LCR de HPV-16 et réprime l'expression des gènes viraux précoces (48). Ces cytokines inhibent également la prolifération des cellules de l'épithélium en temps normal. D'autre part, il a été démontré in vitro que la sécrétion d'IL-1 et TNF $\alpha$  stimule la prolifération des cellules immortalisées par HPV-16 ou HPV-18 et des cellules dérivées de carcinome cellulaire (98). Cette stimulation résulte d'une surexpression de l'amphiréguline qui, en activant le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGF), promeut la croissance des cellules épithéliales transformées. L'expression d'amphiréguline est

plus importante dans les tissus cancéreux que dans l'épithélium normal, ce qui explique possiblement l'absence de stimulation des cellules normales.

### **Âge**

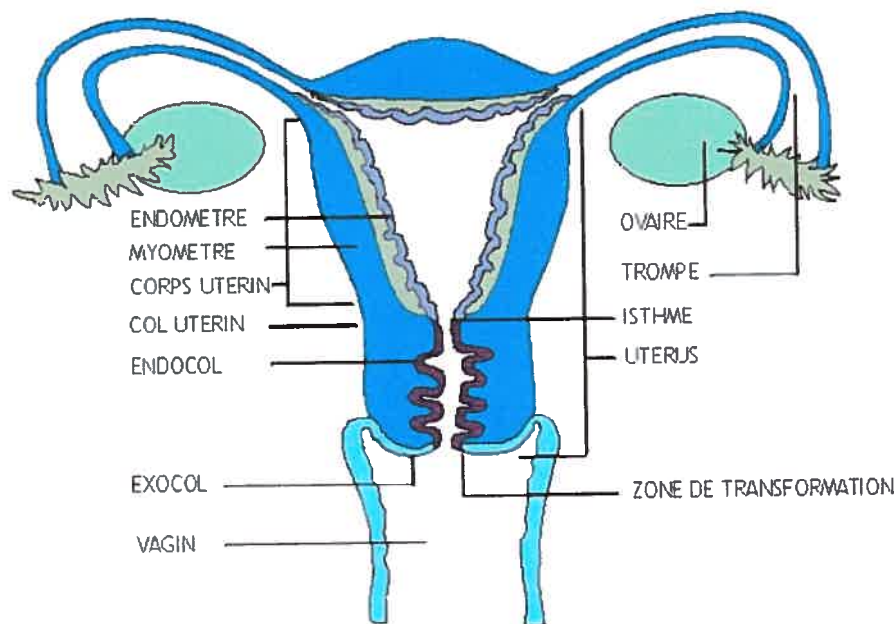
L'âge est un facteur physique non négligeable pouvant être lié au développement de cancer du col utérin. La présence de HPV dans le col utérin est plus fréquente chez les femmes au début de la vie sexuelle et diminue par la suite avec les années. Ce phénomène peut refléter l'acquisition d'une immunité protectrice spécifique due à l'exposition initiale au virus. Toutefois, l'incidence de cancer du col utérin est plus élevée chez les femmes de plus de 40 ans, ce qui peut indiquer que les événements successifs requis pour la transformation néoplasique, suivant l'acquisition d'une infection persistante, peuvent s'échelonner sur une période de 10 à 20 ans.

### **Activité sexuelle**

Des facteurs liés au comportement peuvent influencer sur l'incidence de cancers du col utérin. Étant donné le mode de transmission des papillomavirus, l'activité sexuelle a été démontrée comme étant un facteur de risque important mais indirect. La majorité des lésions cervicales étant transitoires, la présence de HPV dans le col utérin corrèle souvent avec un changement récent de partenaire sexuel, et la séropositivité pour HPV dépend du nombre de partenaires sexuels, reflétant l'exposition cumulative à différents types de HPV (44). L'âge à la première relation sexuelle et le comportement sexuel du ou des partenaires peuvent également avoir un impact sur le développement de maladies du col utérin. Plus l'activité sexuelle débute précocément, plus le risque de développer des pathologies cervicales est élevé.

## Grossesses

Chez les femmes enceintes, les concentrations d'oestrogènes et de progestérone augmentent tout au long de la grossesse, pour atteindre un niveau maximal dans les dernières semaines. Or, ces hormones agissent sur le LCR en influençant positivement la réplication des HPV. De plus, on attribue à ces hormones l'altération de la jonction entre l'épithélium squameux et la couche sous-jacente (dans la zone de transformation de l'épithélium). Ce phénomène appelé ectopie augmente l'exposition des cellules basales aux papillomavirus et augmente ainsi le risque d'infection. Ainsi, un nombre élevé de grossesses portées à terme est associé à un risque augmenté de néoplasie (63).

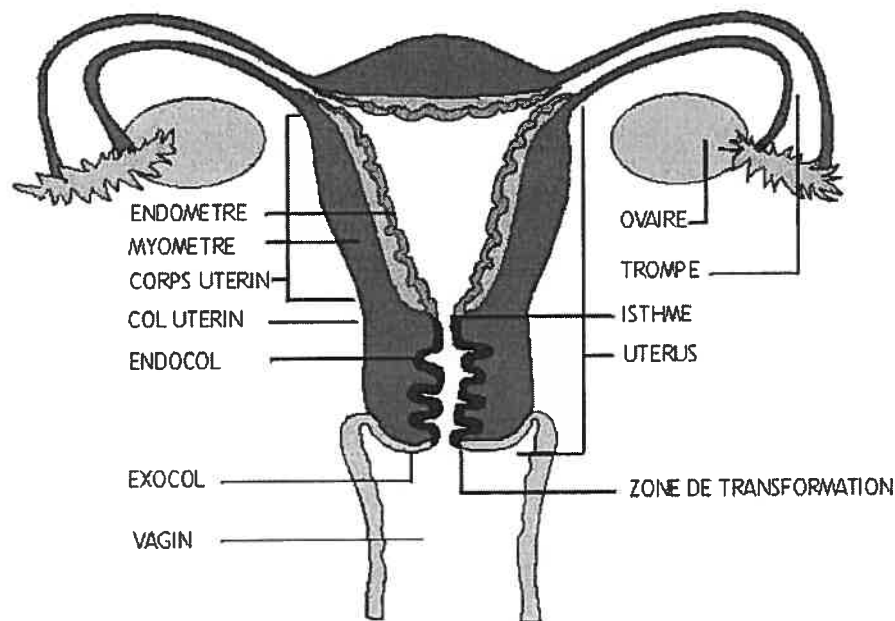


**Figure 6 :** Utérus et zone de transformation de l'épithélium.  
La zone de transformation constitue la jonction entre l'endocol et l'exocol.

Source : Aho, 2002.

## Grossesses

Chez les femmes enceintes, les concentrations d'oestrogènes et de progestérone augmentent tout au long de la grossesse, pour atteindre un niveau maximal dans les dernières semaines. Or, ces hormones agissent sur le LCR en influençant positivement la réplication des HPV. De plus, on attribue à ces hormones l'altération de la jonction entre l'épithélium squameux et la couche sous-jacente (dans la zone de transformation de l'épithélium). Ce phénomène appelé ectopie augmente l'exposition des cellules basales aux papillomavirus et augmente ainsi le risque d'infection. Ainsi, un nombre élevé de grossesses portées à terme est associé à un risque augmenté de néoplasie (63).



**Figure 6 :** Utérus et zone de transformation de l'épithélium.  
La zone de transformation constitue la jonction entre l'endocol et l'exocol.

Source : Aho, 2002.

### 3.4 Facteurs environnementaux

#### Contraceptifs oraux

Certains éléments de l'environnement peuvent agir en tant que cofacteurs pour le développement de lésions cervicales. En premier lieu, l'utilisation de contraceptifs oraux semble augmenter le risque de développement de carcinome de l'épithélium squameux, en raison de l'augmentation des protéines E6 et E7 causée par les oestrogènes et progestérones (43). Toutefois, cette association demeure discutable et incertaine, et peut être confondue avec l'activité sexuelle, qui constitue le mode de transmission des papillomavirus (50).

#### Activité du partenaire

L'activité sexuelle des partenaires masculins peut également augmenter le risque d'exposition des femmes aux HPV oncogènes, augmentant ainsi la possibilité de développer des maladies précancéreuses et cancéreuses au niveau du col utérin. En effet, les hommes qui ont plusieurs partenaires sexuelles sont fréquemment des porteurs de HPV, ce qui augmente le risque d'infection causée par des HPV chez la femme (6).

#### Tabagisme

Plusieurs études épidémiologiques démontrent une relation entre le tabagisme et une augmentation de l'incidence de HSIL et de cancers du col utérin (14;70). Le risque de développer des HSIL ou un carcinome *in situ* augmente chez les fumeuses en fonction du nombre de paquets-années d'exposition au tabac. De plus, Giuliano et coll. (30) ont démontré une persistance accrue des HPV à haut risque chez les fumeuses comparativement aux non-fumeuses, et que les femmes qui fument depuis plus de six ans ont une probabilité moindre d'éradiquer une infection.

Ce phénomène s'explique par une baisse de l'immunité cervicale, traduite par une diminution notable des cellules NK et des cellules de Langerhans, cellules dendritiques immatures impliquées dans la défense de l'épithélium (30).

Certains constituants de la cigarette tels le goudron, la nicotine et la cotinine (métabolite de la nicotine) sont retrouvés dans la muqueuse cervicale des fumeuses. Ces substances participent possiblement à la transformation maligne des cellules, expliquant l'incidence augmentée de carcinome *in situ* chez les fumeuses. De plus, le benzopyrène présent dans le tabac forme un métabolite actif qui lie l'ADN et induit des mutations. Ce métabolite est retrouvé dans les cellules épithéliales cervicales des fumeuses.

### **Antioxydants**

Les habitudes alimentaires des individus sont des facteurs à considérer dans le risque de dysplasie cervicale. Bien que controversée parce que très peu étudiée, il semble exister une association négative entre la quantité d'antioxydants obtenus dans l'alimentation et le risque de développement de cancer. On reconnaît des effets protecteurs à certains antioxydants tels l'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine C et vitamine E, respectivement), tandis qu'une dose trop faible de ces vitamines accentue le risque de dysplasie chez les femmes infectées par HPV (37). L'effet protecteur de ces antioxydants est dû à la neutralisation des radicaux libres pouvant avoir un effet nocif sur les cellules.

### **Agents infectieux : *Chlamydia trachomatis***

Certains agents transmissibles sexuellement autres que les papillomavirus ont été suggérés comme cofacteurs potentiels dans le développement du cancer du col utérin, mais seule une association avec *Chlamydia trachomatis* a été démontrée. Une

infection antérieure avec cet agent augmente le risque de développer un carcinome de l'épithélium squameux du col utérin chez les femmes infectées par un type oncogène de HPV (2;46;76;94). Une étude multicentrique a également démontré une relation dépendante de la dose, donc un risque augmentant proportionnellement avec le titre sérologique de *Chlamydia trachomatis* (76). Bien qu'il s'agisse d'une bactérie intracellulaire qui infecte potentiellement les mêmes cellules que les papillomavirus, aucune interaction directe entre les deux agents n'a été démontrée (76). Toutefois, *Chlamydia trachomatis* induit des changements métaplasiques dans la zone de transformation de l'épithélium, favorisant le développement de lésions cervicales chez les femmes infectées par HPV (61;76). *Chlamydia trachomatis* possède également des mécanismes d'inhibition de l'apoptose différents de ceux des papillomavirus, ainsi contribuant à la carcinogénèse (24;76). En effet, le relâchement du cytochrome c de la membrane mitochondriale est inhibé, ainsi que la voie des caspases (24). De plus, certaines cytokines inflammatoires produites durant une infection à chlamydia peuvent produire des espèces réactives de l'oxygène qui causent des dommages à l'ADN et favorisent une transformation néoplasique (39;76).

#### 4. Co-infection par VIH et HPV

##### 4.1 Immunosuppression

Les infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont un effet certain sur les infections par les HPV. En premier lieu, le VIH cause la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, entraînant une baisse substantielle de l'immunité cellulaire. Cette diminution dans la défense immunitaire augmente le risque de développement de lésions précurseurs du cancer du col utérin (1;22;45;66).



De plus, la sévérité des pathologies développées est accrue chez les personnes séropositives pour le VIH, et les lésions sont plus difficiles à traiter car elles sont souvent récurrentes (54;60). Selon Palefsky et coll. (66), le risque de développer des pathologies au niveau du col utérin est augmenté chez les femmes ayant un taux de cellules T CD4+ inférieur à 200 cellules par  $\mu$ l ou une virémie VIH supérieure à 20 000 copies d'ARN viral par ml de plasma. Un stade avancé d'immunosuppression serait donc une des causes des maladies du col utérin. Ces maladies semblent être dues à une réactivation de HPV latents ou à une persistance accrue d'une infection déjà présente plutôt qu'à des infections nouvellement acquises (1). Une infection par le VIH peut donc influencer l'histoire naturelle d'une infection causée par HPV en augmentant la persistance des infections, l'apparence et le taux de progression des lésions cervicales, et en diminuant le taux de régression spontanée des LSIL (60). De plus, on détecte chez les femmes séropositives un plus grand nombre de types de HPV que chez les femmes séronégatives, ce qui pourrait être dû à une baisse de l'immunité spécifique contre certains types de HPV chez les personnes immunosupprimées (54). Par conséquent, on retrouve chez les personnes séropositives une plus grande incidence et une prévalence accrue des infections par des papillomavirus.

D'un autre côté, on retrouve une faible association entre l'incidence des infections causées par HPV-16 et l'état du système immunitaire (taux de lymphocytes T CD4+) des patientes séropositives pour le VIH (80). Étant le type le plus fréquent dans la population générale, sa prévalence diminue chez la population positive pour le VIH relativement aux autres types de HPV. En d'autres termes, la prévalence et l'incidence des infections causées par HPV-16 semblent indépendantes des taux de lymphocytes T CD4+. Cela pourrait refléter une évasion du système immunitaire par HPV-16, ce qui pourrait également expliquer sa haute fréquence et sa persistance dans la population générale (80). Ces résultats sont toutefois controversés, car une association entre la charge virale de HPV-16 et les taux de lymphocytes T CD4+ a été démontrée par le passé, bien qu'elle demeure faible (53;95). Les études futures sur la charge virale de types autres que 16 permettront

de mieux préciser l'association entre la charge virale et le niveau d'immunité des individus.

## 4.2 Interactions entre VIH et HPV

Le virus de l'immunodéficience humaine possède la capacité d'infecter les cellules épithéliales des muqueuses génitales (99). Ces cellules étant les cibles des papillomavirus, une co-infection peut avoir lieu et engendrer des interactions directes entre le VIH et les papillomavirus. En effet, il a été démontré *in vitro* que l'infection par le VIH induit une augmentation de l'expression des E1 et L1 de HPV (21). Cette augmentation peut être due à un effet promoteur de la protéine Tat (21), ou à une interaction des ARNm avec Rev (84). Dolei et coll. (21) ont également observé une augmentation de la transcription de E1 et L1 en réponse à IL-6 (produite suivant l'infection par le VIH-1 de cellules HeLa).

## 4.3 Trithérapie

Depuis 1996, les personnes séropositives pour le VIH sont traitées par un régime de trithérapie antirétrovirale composé d'inhibiteurs de protéase et d'inhibiteurs de réplication virale. On observe généralement chez ces individus une diminution de la virémie VIH et une augmentation des lymphocytes T CD4+. Une telle restauration du système immunitaire est parvenue à réduire de 75% les décès dus à des complications liées au SIDA. La réponse contre les HPV étant de nature cellulaire, cette restauration de l'immunité cellulaire devrait aider à réduire les charges de HPV et à diminuer l'importance des lésions cervicales (35;60). Ces principes demeurent toutefois très controversés, puisqu'on n'observe pas toujours de régression de lésions cervicales chez les patientes sous trithérapie antirétrovirale et

que lorsque des effets sont observés, ces derniers sont souvent modestes (18;33). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que la restauration de l'immunité systémique ne reflète pas le statut de l'immunité locale cervicale, ou qu'il existe un délai avant la restauration de l'immunité cervicale. Il se peut également que tous les agents opportunistes ne soient pas affectés de façon équivalente. De plus, une récente étude suggère une évasion immunitaire de HPV-16 et d'autres types phylogénétiquement apparentés (80). Ces données corroborent celles obtenues par d'autres études qui n'observent aucune diminution des infections cervicales et anales causées par HPV chez les patients ayant suivi la trithérapie avec succès (69). D'autre part, les lésions cervicales étant récurrentes et difficiles à traiter chez les personnes infectées par le VIH, on observe un plus haut taux de succès des microchirurgies chez les patients sous trithérapie (18).

Il a également été proposé que la trithérapie exerce un effet antiviral direct sur les HPV, qui serait à l'origine de la régression de dysplasie qui est parfois observée chez les patients. Cet effet a été démontré chez le virus de l'herpès 8 (HHV8) et pourrait possiblement s'appliquer aux papillomavirus (34).

## 5. Les mesures de charge virale

Tel que mentionné plus haut, la charge virale des HPV peut s'avérer un outil clinique efficace, étant donné qu'une charge élevée d'un type oncogène est associée à un plus haut degré de dysplasie. Les premières études de charge virale ont été très peu concluantes, étant donné la nature semi quantitative et la faible sensibilité des techniques utilisées. Il est également difficile de mesurer l'intégration avec ces méthodes, car il s'avère souvent difficile de discerner les formes intégrées des formes épisomales dans une infection mixte.

## 5.1 Méthodes basées sur l'amplification de signal : Hybrid Capture™

Plusieurs méthodes quantitatives ont été développées, qui permettent d'affirmer que la charge virale des HPV est un marqueur épidémiologique important. Ainsi, le test Hybrid Capture™ de Digene est basé sur l'hybridation du génome viral avec une sonde d'ARN. Les hybrides sont ensuite détectés par des anticorps anti ADN-ARN auxquels une phosphatase alcaline est liée, permettant l'amplification du signal obtenu. Le signal est détecté par la dégradation d'un substrat de dioxétane par la phosphatase. La réaction produit de la lumière qui est mesurée en terme d'unités relatives de lumière. Ce test s'avère très efficace et reproductible. Toutefois, le seuil de détection du test est plus élevé que la quantité de HPV présente dans beaucoup d'échantillons cliniques, pouvant mener à des résultats faussement négatifs. On peut obtenir, avec le test Hybrid Capture™, une quantification précise entre  $5 \times 10^4$  et  $5 \times 10^7$  copies d'une cible, ce qui ne correspond pas toujours à ce qu'on retrouve dans les échantillons (10). De plus, le test a été élaboré afin de détecter et quantifier plusieurs types de HPV simultanément. Or, comme l'association entre la charge virale et le degré de dysplasie est spécifique au type de HPV et n'a été démontrée que pour HPV-16 (32;82), les résultats obtenus avec ce test sont peu concluants. En outre, le test Hybrid Capture™ ne comprend aucune mesure de la quantité des cellules contenues dans les échantillons, ce qui peut influencer les mesures de charges virales puisque les cellules transformées sont collectées plus facilement (82). Certains considèrent néanmoins ce test valide afin de classifier les patientes selon un risque élevé ou faible de développer des lésions cervicales précancéreuses (32).

## 5.2 Méthodes basées sur l'amplification génomique

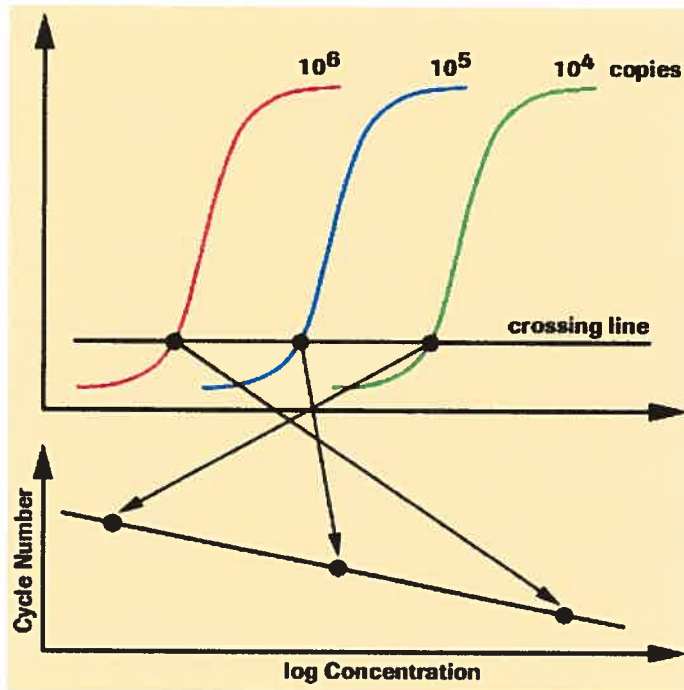
### PCR quantitatif

De nouvelles méthodes de quantification basées sur l'amplification de la cible se sont avérées plus efficaces et plus sensibles afin de déterminer le nombre de copies de cible contenues dans un spécimen. Ainsi, Swan et coll. (82), qui ont effectué une des premières études de charge virale avec des types de HPV oncogènes, ont observé une augmentation significative de la charge virale de HPV-16 de patientes en fonction du degré de dysplasie. Le test élaboré par Swan, avant le développement du PCR en temps réel, consiste en un PCR conventionnel incluant l'utilisation de sondes fluorogènes, suivi d'une lecture de fluorescence par spectrométrie. Ce test permet de détecter aussi peu que 100 copies d'une cible par test. Il s'agit d'un test sensible et reproductif, mais qui évalue les quantités de cible selon le signal obtenu à la fin du PCR, et donc ne tient pas compte des différences d'efficacité de l'amplification.

### PCR en temps réel

Le PCR en temps réel est un PCR qui détecte un signal généré par une sonde fluorogène à chaque cycle d'amplification, ce qui permet l'élaboration d'une courbe lors de la génération des amplicons. La phase exponentielle de la courbe débute au cycle où on commence à détecter l'amplicon, nommé le « Crossing Point » (Cp) ou « Crossing Threshold » (Ct) et qui est directement lié à la quantité de cible présente initialement dans la réaction. Les quantifications sont faites en fonction d'une courbe standard sur laquelle sont positionnés les différents points de la courbe de quantification. La fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité d'ADN générée par le PCR, mais la quantité mesurée représente celle présente dans

l'échantillon au début de la réaction. La fluorescence est détectée par une unité optique à l'intérieur de l'appareil, ce qui assure la reproductibilité des résultats obtenus.



**Figure 7 :** Quantification sur le LightCycler™. Amplification d'une courbe de titration et génération d'une courbe standard.

Source : [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)

Les tests de PCR en temps réel sont très sensibles et peuvent détecter aussi peu que 10 copies d'une cible. Ils trouvent leur utilité dans les études prospectives, où on peut observer une modification de la charge virale des HPV correspondant à une progression ou une régression de lésions, plusieurs mois avant l'événement (87). De plus, il est possible avec cette méthode de déceler des formes intégrées de HPV dans une infection mixte (65;67).

Une des limites du PCR est la possibilité d'être modulé par des inhibiteurs présents dans les échantillons cliniques. De natures diverses, les inhibiteurs affectent différemment les réactions de PCR. Ils sont toutefois détectables grâce à l'utilisation de contrôles internes (51;52). Il s'agit d'une séquence amplifiable avec

les mêmes amorces que la cible et selon les mêmes paramètres, mais dont la région entre les séquences des deux amorces est différente pour des fins de détection. Si une quantité connue de contrôle interne est ajoutée à une réaction de PCR en présence d'un échantillon clinique, et qu'on ne détecte pas cette quantité, le PCR est considéré comme étant inhibé. On peut pallier au problème des inhibiteurs en diluant les spécimens, ce qui a pour effet de diluer également les inhibiteurs, ou en purifiant l'ADN ou l'ARN des échantillons.

## HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Par le passé, une association a été démontrée entre la charge virale de HPV-16 et le développement de lésions cervicales précancéreuses et cancéreuses (73;82;87;103). Puisque HPV-16 est le type oncogène le plus fréquemment retrouvé dans la population, la charge virale de ce type semble un outil clinique et épidémiologique important dans la prévention du cancer du col utérin. Toutefois, les premières études de charges virales effectuées ont été très peu concluantes. On peut attribuer ces résultats à la nature semi quantitative des tests utilisés et au manque de normalisation du contenu cellulaire des échantillons. La présence d'inhibiteurs dans les échantillons cliniques peut également avoir influencé les résultats. Les nouveaux tests de PCR quantitatifs en temps réel permettent une quantification précise et reproductible des papillomavirus. Ainsi, suite à l'élaboration d'un test de PCR en temps réel, nous sommes en mesure d'évaluer les charges virales de HPV-16 dans une cohorte de patientes. Le protocole élaboré inclut une normalisation du contenu cellulaire des échantillons et l'utilisation de contrôles internes afin de détecter la présence d'inhibiteurs. Une augmentation de la charge virale de HPV-16 devrait être observée selon le grade des lésions cervicales.

En raison de la nature prospective de notre étude, nous pouvons tenter d'évaluer le lien entre la charge virale et la durée d'une infection. En effet, une réplication virale active semble plus susceptible de causer une infection persistante. De plus, les variations de charges virales observées lors du suivi des participantes devraient corrélérer avec une progression ou une régression des lésions cervicales.

Les femmes recrutées pour cette étude, le « Canadian Women's HIV Study Group », sont des femmes séropositives ou qui présentent un risque de contracter une infection par le VIH. Nous tenterons donc d'évaluer d'éventuelles associations entre la charge virale de HPV-16 et l'état du système immunitaire des patientes (taux de cellules T CD4+). Une évasion du système immunitaire par HPV-16 ayant été



suggérée, on peut s'attendre à ne retrouver qu'une faible association avec la charge virale de HPV-16 (80). Par contre, il semble y avoir une association négative entre les lymphocytes T CD4+ et les autres types de HPV oncogènes. Une immunosuppression sévère peut donc influencer l'histoire naturelle des lésions chez les femmes ayant des infections par les autres types de HPV (80). Par conséquent, il devrait être possible d'observer une augmentation du grade des lésions cervicales en fonction d'une baisse du taux de lymphocytes T CD4+.

D'autre part, l'intégration du génome des HPV dans le génome humain a été définie comme un événement clé dans le processus d'oncogénèse des papillomavirus. La délétion du gène E2 résulte en une augmentation de l'expression des oncoprotéines E6 et E7. Il est possible, par le protocole de PCR en temps réel élaboré, de détecter la présence de formes virales intégrées dans des infections où on retrouve à la fois des formes épisomales et des formes intégrées, et ainsi de quantifier la charge de virus intégré. La charge de virus intégré devrait, tout comme la charge virale, augmenter selon le grade de lésions cervicales, puisqu'elle représente le pouvoir transformant du virus.

## Déclaration de l'étudiant concernant l'article contenu dans ce mémoire

J'ai participé à la conception du projet en mettant au point et en validant le protocole de PCR quantitatif en temps réel et en concevant les contrôles internes utilisés. J'ai également effectué les tests quantitatifs sur les échantillons de la cohorte à l'étude ainsi que l'analyse univariée des résultats obtenus. J'ai participé à l'analyse multivariée et à la rédaction de l'article scientifique en collaboration avec le Dr François Coutlée.

Ce manuscrit a été soumis à AIDS après quelques modifications.

## ARTICLE

### **HPV-16 viral load of episomal and integrated forms are associated with grade of cervical intraepithelial lesions and duration of HPV-16 infection in HIV-seropositive and seronegative women**

Running Head: HPV-16 viral load and integration in HIV-infected women

Julie Fontaine<sup>1,2</sup>, Catherine Hankins<sup>3,4</sup>, Marie-Hélène Mayrand<sup>1</sup>, Jonas Lefevre<sup>1</sup>, Deborah Money<sup>5</sup>, Anita Rachlis<sup>6</sup>, Karina Pourreaux<sup>4</sup>, Alex Ferenczy<sup>7</sup>, The Canadian Women's HIV Study Group, and François Coutlée<sup>1,2,3</sup>.

1- Laboratoire de Virologie Moléculaire, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada.

2- Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada.

3- Departments of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Medicine, and Oncology, McGill University, Montreal, Que., Canada.

4- Direction de la Santé Publique de Montréal-Centre, Institut National de Santé Publique du Québec, Montréal, Qué., Canada.

5- Department of Obstetrics and Gynecology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

6- Department of Epidemiology and Biostatistics, University of Toronto, Toronto,

Ont., Canada

7- Department of Pathology and Obstetrics & Gynecology, McGill University and the Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, Que., Canada

The Canadian Women's HIV Study Group includes the following investigators from across Canada. Halifax: Janet Conners, Rob Grimshaw, David Haase, Lynn Johnston, Wally Schlech, Arlo Yuzicappi-Fayant. Hamilton: Stephen Landis, Fiona Smaill. London: Tom Austin, Ole Hammerberg, Ted Ralph. Montréal: François Coutlée, Julian Falutz, Alex Ferenczy, Catherine Hankins, Marina Klein, Louise Labrecque, Normand Lapointe, Richard Lalonde, John Macleod, Grégoire Noël, Chantal Perron, Jean-Pierre Routy, and Emil Toma. Ottawa: Claire Touchie, Garry Victor. Québec: Louise Coté, Hélène Senay, Sylvie Trottier. Saskatoon: Kurt Williams. Sherbrooke: Alain Piché. Sudbury: Roger Sandre. Toronto: Louise Binder, Donna Keystone, Anne Phillips, Anita Rachlis, Irving Salit, Cheryl Wagner, Sharon Walmsley. Vancouver: Paula Braitstein, David Burdge, Marianne Harris, Deborah Money, Julio Montaner.

Address correspondence to: François Coutlée, Département de Microbiologie et Infectiologie, Hôpital Notre-Dame du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke est, Montréal (Québec), H2L 4M1, Canada. Tel. 514-890-8000, 25162; fax: 514-412-7512



All participants provided written informed consent to participate. Ethics committees of each participating institution approved the Canadian Women's HIV Study protocol.

This study was supported by the Canadian Foundation for AIDS Research and by le Réseau FRSQ Maladies Infectieuses-SIDA. The Canadian Institutes for Health Research supports The Canadian Women's HIV Study cohort. F.C. is a chercheur national supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Conflict of interest disclosure: the authors do not have commercial or other associations that might pose a conflict of interest.

**Abstract (200 words)**

HPV-16 viral load of episomal and integrated forms was measured with real-time PCR assays in cervicovaginal lavages collected from 83 women (65 HIV-seropositive, 18 HIV-seronegative). Total, episomal and integrated HPV-16 loads were significantly greater for women with high-grade squamous intraepithelial lesions on cytology ( $p < 0.02$  for each comparison). HPV-16 total (OR 3.5, 95% CI 1.2 – 10.4;  $p = 0.02$ ), episomal ( $p = 0.02$ , OR 2.9, 95% CI 1.2-7.4) and integrated ( $p = 0.05$ , OR 1.6, 95% CI 1 – 2.6) loads were also significantly associated with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2-3, controlling for age, CD4 cell count and HIV status. For participants with a total HPV-16 load  $<10^7$  HPV-16 copies/ $\mu\text{g}$  cellular DNA, HPV-16 integrated load was significantly lower in normal women than in women with CIN2-3 ( $p=0.02$ ), while HPV-16 episomal load was similar ( $p=0.08$ ). HPV-16 infections lasted significantly longer ( $p=0.04$ ) than in women with  $\leq 10^7$  HPV-16 copies/ $\mu\text{g}$  DNA, independently of CD4 cell count, age, HIV status and race. Compared to European variants, HPV-16 Asian ( $p=0.04$ ) and African variants ( $p=0.03$ ) were infecting individuals at a lower viral load. In our cohort, higher HPV-16 episomal and integrated loads were associated with an abnormal cytology or biopsy-proven CIN, as well as with persistence of infection.

## Introduction

High-risk human papillomavirus (HPV) types cause squamous intraepithelial lesions (SIL) and cancer of the uterine cervix in HIV-seronegative and seropositive women [1, 2]. HPV-16 is the most frequently detected genotype in women without lesions and accounts for half of cervical cancers and high-grade SIL (HSIL) [3]. HIV infection is a consistent risk factor for anogenital HPV infection and SIL [4-7]. HPV infects up to 80% of HIV-infected women over two years [8].

Only a minority of women infected by HPV will develop persistent infections, a surrogate marker for cervical SIL and cancer [9, 10]. Several studies suggested that an increased HPV DNA viral load could be a candidate marker for persistent HPV infection [11], or for cervical SIL in HIV-seronegative [12-14] and seropositive women [15-18]. However, a prospective study casted doubts on the predictive value of HPV viral load for predicting HSIL in HIV-seronegative women [19].

HPV viral integration is considered to be a key event in the progression to HSIL and cancer [20, 21]. Although integration occurs randomly in the human genome, it usually results in the disruption of the E2 gene and uncontrolled expression of E6 and E7 genes [22]. Recently, several publications suggested that integration occurred at early stages of SIL [23-25]. There have been few studies designed to investigate the natural history of HPV viral load and integration in HIV-seropositive women measured with real-time PCR assays and controlling for the effect of PCR inhibition.

The value of HPV-16 viral load and integration in the screening for cervical lesions and persistence of infections remains unclear. We investigated further the

association between HPV-16 viral load and integration with real time PCR assays in a cohort study on the natural history of persistent HPV infection in a population of HIV-seropositive and seronegative women living in Canada. This study demonstrates that HPV-16 episomal and integrated loads were associated with grade of cervical disease and with the duration of infection. Asian-American variants were measured at lower quantities in clinical specimens. Specimens from women without lesions often contained integrated forms, impeding the potential usefulness of this virological marker as a clinical predictor for risk of progression.

### **Materials and methods**

*Study population and study design.* Samples were obtained from participants infected by HPV-16 enrolled in the Canadian Women's HIV Study, a cross-sectional and cohort study investigating relationships between HPV and HIV infections. As described elsewhere, between May 1993 and March 2002, 1055 women were enrolled and followed from sexually transmitted diseases (STD) clinics, primary care clinics, and outpatient HIV care clinics in Canada [26-28]. Women were eligible to participate if they provided written informed consent, were seropositive for HIV or were seronegative for HIV but at risk for STDs and accepted to have annual HIV serological tests [26, 28].

For all HIV-seropositive women upon study entry and at 6-month intervals, a standardized questionnaire was administered, CD4 blood count was measured, a Pap smear was obtained with a cytobrush and wooden Ayres spatula, vaginal tampon and cervicovaginal lavage (CVL) were obtained as described previously [26,27]. For



HIV-seronegative women, at inclusion and at 6-month intervals the study questionnaire was completed and vaginal tampons were obtained. CVL and Pap smears were collected at one-year intervals. Colposcopy and biopsy results were available to the study investigators.

Exfoliated cervical cell suspensions were processed as previously described [27]. Only CVLs were analyzed for HPV-16 viral load. CVLs were refrigerated within one hour and transported to a central laboratory on wet ice, to be centrifuged at 2,500 rpm for 10 min at 4°C and resuspended in 500 µl of 10 mM Tris-HCl [pH 8.2] [27]. Cell suspensions were thawed, lysed by addition of Tween 20 at a final concentration of 0.8% (v/v), digested with 250 µg/ml of proteinase K for 2 hours at 45°C, boiled for 10 min and stored at -70°C.

Of the 732 HIV-seropositive and 323 HIV-seronegative women screened for cervical infection by HPV at their initial study visits, 366 HPV-infected women (207 HIV-seropositive with a mean of follow-up of 27.3 months, 159 HIV-seronegative with a mean follow-up of 17.9 months) were followed prospectively for HPV persistence. The prevalence of HPV infection in The Canadian Women's HIV Study reached 67% as reported previously and nearly 29% of participants were infected with more than one HPV type [26]. Women recruited in the cohort had a median age of 32.5 years (range 16.5–77.3 years). The median CD4 count at entry was 300 cells/µl (range 1–1720 cells/µl). Determinants of HPV infection in HIV-seropositive women included a low CD4 count, younger age, inconsistent condom use and race as published previously [26].

For the current study, data were limited to HPV-16-positive participants. Of 1055 participants, 140 (13.3%) had at least one genital specimen containing HPV-16 DNA. Of the 948 samples obtained from the latter participants at enrollment and follow-up visits,  $\beta$ -globin gene could not be amplified in 15 (1.6%) samples, but this had no impact on classifying participants as having transient or persistent infection (definitions below). All women with persistent (n=40 with 203 completed visits, geometric mean of 4.6 visits/subject) or transient (n=27 for 131 completed visits, geometric mean of 5.1 visits/subject) HPV-16 infections were included in the current investigation (p=0.90). Seventy women could not be classified into persistent or transient infection (follow-up <12 months (n=50), because we detected an infection by HPV-16 at the last visit only (n=7), the interval between visits was too long (n=5), or because HPV-16 was detected in vaginal tampons (n=6) or biopsies only (n=2)). Seventeen specimens from 14 of the latter women for whom the nature of HPV-16 infection could not be determined were also selected and tested for HPV-16 viral load because of the availability of colposcopy results and to include at least one specimen from non-Caucasian participants.

*$\beta$ -globin and HPV DNA detection.* An aliquot of 5  $\mu$ l from each processed sample was amplified for  $\beta$ -globin DNA with PC04-GH20 [27].  $\beta$ -globin-negative samples were extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol.  $\beta$ -globin-positive samples (lysate or extracted DNA) were tested for the detection and typing of HPV DNA using the MY09-MY11-HMB01 consensus L1 PCR primers and type-specific probes [29]. Of the 5262 genital specimens collected for HPV screening at enrolment and follow-up visits (mean of 5.7 specimens per subject) from 732 HIV-

seropositive and 323 HIV-seronegative women, 104 (1.9%) failed to amplify  $\beta$  – globin and were thus considered inadequate for the viral load studies.

*Real time PCR for HPV-16 viral load and integration.* Internal controls (IC) for HPV-16 E6 and  $\beta$ -globin were generated as described previously for  $\beta$ -globin [30,31]. HPV-16 IC was synthesised by amplifying pSP65 with two pSP65-specific primers (underlined bases), to which primer sequences 16-E6-F and 16-E6-R [24] were appended at the 5'end (ci-16-E6-F: 5- GAG AAC TGC AAT GTT TCA GGA CCG AAT ACA CGG AAT TCG AGC T-3'(bp 1-20 of pSP65) and ci-16-E6-R: 5'-ATA GTT GTT TGC AGC TCT GTG CAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA-3' (bp 81-100 of pSP65)). Amplification of pSP65 with these primers generated a pSP65 fragment of 100 bp (versus 81 for HPV-16 E6 amplicons) flanked at both ends by sequences of primers used for HPV-16 E6 amplification that was purified as described initially [30,31].

Firstly, a fixed amount of 1000 copies of each purified IC was mixed in separate capillaries with 2  $\mu$ l of CVL lysate and tested in a Light Cycler PCR and detection system (Roche Molecular Systems), as previously described [30,31]. The presence of PCR inhibitors was suspected when the 1000 copies of internal control generated a signal corresponding to less than 700 copies for one or both internal controls, as explained in details in previous work [30]. Forty six samples containing inhibitors (inhibition of both internal controls for 4 samples, HPV-16 internal control inhibition only for 34 and  $\beta$ -globin IC inhibition only for 8) were retested with both internal controls after a one tenth dilution of lysate (n=38) or after DNA purification (n=8) with Master Pure (Epicentre). Two  $\mu$ l of processed sample without inhibition

were then tested for quantitation of HPV-16 E6 and E2 genes, and  $\beta$ -globin using hydrolysis probes as described previously [24]. The 16-E6-PRO probe (FAM-5'-CAG GAG CGA CCC AGA AAG TTA CCA CAG TT-3'-TAMRA) and primers 16-E6-F (5'-GAG AAC TGC AAT GTT TGA GGA CC-3') and 16-E6-R (5'-TGT ATA GTT GTT TGC AGC TCT GTG C-3') were utilised for HPV-16 E6 quantitation in duplicate reactions [24]. HPV-16 E2 gene was quantitated in duplicate capillaries using the fluorogenic probe 16-E2-PRO (FAM-5'-CAC CCC GCC GCG ACC CAT A-3'-TAMRA) and primers 16-E2-F (5'-AAC GAA GTA TCC TCT CCT GAA ATT ATT AG-3') and 16-E2-R (5'-CCA AGG CGA CGG CTT TG-3') [24]. For both assays, the twenty- $\mu$ l reaction mixture contained 1x DNA Master Hybridization Probe Mix containing the Fast Start *Taq* DNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals), 4 mM  $MgCl_2$ , 0.3  $\mu$ M of each HPV-16 primers, 50 nM of the fluorogenic probe and 2  $\mu$ l of processed sample. After *Taq* polymerase activation for 7 minutes at 95°C, the following cycling parameters were utilised: 95°C for 15s, 60C for 5s and 65°C for 60s, for 50 cycles. For  $\beta$ -globin DNA, each sample was amplified in duplicate capillaries with 50 nM of  $\beta$ -globin probe U62049, 0.3  $\mu$ M of primers U61992 and L62240, 4.5 mM  $MgCl_2$ , and 1x DNA Master Hybridisation Probe [13,30,31]. After *Taq* polymerase activation for 10 minutes at 95°C, the following cycling parameters were utilised: 95°C for 15s, 60C for 60s, for 50 cycles. Negative and positive controls ( $10^4$  copies of HPV-genes,  $10^3$  copies of ICs and  $2 \times 10^4$  copies of  $\beta$ -globin gene) were included.

To estimate HPV-16 viral loads, cycle threshold values were compared to that of external standards from a titration curve of HPV-16 DNA that was obtained by

serial ten-fold dilutions of an HPV-16 plasmid kindly provided by Prof. zur Hausen, in a fixed amount of 75 ng of human genomic DNA (Roche Molecular Biochemicals) in 10 mM Tris-HCl [pH 8.2]. Titration curves of human DNA were obtained by serial dilutions of a stock of human genomic DNA (Roche Molecular Biochemicals) in 10 mM Tris-HCl [pH 8.2]. HPV-16 E6 and E2 loads were expressed as the number of copies per  $\mu\text{g}$  of human DNA. The integrated HPV-16 viral load was calculated by subtracting the copy numbers of E2 (episomal) from the total copy numbers of E6 (integrated and episomal). HPV-16 viral loads were log-transformed.

*Molecular variant analysis by PCR-sequencing.* HPV-16 isolates from CVLs were further characterized by PCR-sequencing of a 364-bp segment within the LCR region containing HPV enhancer sequences [11]. The complete E6 gene was amplified and sequenced according to a published protocol [32]. Amplification reactions were performed on 5  $\mu\text{l}$  of processed sample with 2.5 units of Expand High Fidelity PCR enzyme (Boehringer Mannheim, Laval, Qc.). When amplified products generated faint bands on gel electrophoresis, 10 units of *Amplitaq* Gold DNA polymerase (Roche Molecular Systems, Mississauga, On.) were used instead of the Expand mixture. PCR-amplified HPV-16 amplicons were purified with the QIAquick gel extraction kit protocol (Quiagen Inc, Mississauga, Ont.). Direct double-stranded PCR-sequencing was performed with the fluorescent cycle-sequencing method (BigDye terminator ready reaction kit, Perkin-Elmer) on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer system. Sequence variations that had not been described previously were confirmed by a second PCR-sequencing reaction.

HPV-16 LCR and E6 DNA sequences were compared using the BLAST sequence analysis software from the Genetic Computer Group [33] to sequences of the prototypes (<http://hpv-web.lanl.gov>) and to the complete GenBank database [34]. Because the prevalence of each non-prototypic HPV-16 variant was low, the association between HPV-16 polymorphism and persistence could not be evaluated for each variant individually. The isolates were thus classified into two broad categories: prototype and non-prototype strains. Variants were also classified into one of the five lineages as described by Yamada et al. [35]. The E6 350GT variation was evaluated individually with persistence due to previous reports on its potential role in disease [36]. No isolate carried the 131G variation [37].

*Statistical Analysis.* Women with persistent HPV-16 infections provided 3 consecutive genital specimens containing the same HPV-16 variant during a period of at least twelve months [9,38,39]. Women were classified as having transient infection if they were infected for less than twelve months with HPV-16 and had at least one negative specimen following the HPV-16-positive samples. Some of the analyses as indicated in the text were limited to HIV-infected women due to the small number of HIV-seronegative women infected by HPV-16. Univariate analysis was first performed to identify factors significantly associated with SIL, colposcopy proven cervical intraepithelial neoplasia (CIN) or persistent infection using Fisher's exact test for categorical variables. In our dataset, several continuous variables of interest (baseline age, CD4 cell count, HPV-16 viral load, number of HPV types in samples, number of visits per participants, and duration of infection) were not normally distributed. Therefore, these variables were compared with the Mann-Whitney U

test. The HPV-16 viral loads were measured in specimens collected before biopsies were obtained by colposcopy, since they could alter viral load measures. The association between several variables and the presence or grade of SIL on cytology was assessed by considering only one specimen for each patient, at the visit with the highest grade of SIL. Correlation between HPV-16 viral load and age or CD4 cell count was measured with the Spearman rank correlation coefficient.

The association between HPV-16 viral load measures and grade of CIN was evaluated by logistic regression controlling for the confounding effects of age, race and CD4 cell count, with Odds Ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) calculated. No collinearity problem was identified when correlation between variables in the model were examined. The proportion of HPV-16 women remaining positive over time was analyzed by using the Kaplan-Meier method considering two groups of participants based on highest HPV-16 viral load measured ( $\geq 10^7$  and  $<10^7$  HPV-16 DNA copies per  $\mu\text{g}$  of cellular DNA), and significance of difference was assessed by the Log rank test. To study the effects of the highest HPV-16 viral load measured for each participant on duration of HPV-16 infection we performed Cox's proportional Hazard regression analyses, adjusting for age and CD4 counts considering a factored variable combining HIV status and CD4 counts (HIV-negative, HIV-positive with CD4  $>500$ ,  $200-500$ , and  $<200$  cells/ $\mu\text{l}$ ), measured at the visit where the highest HPV-16 viral load was obtained. The duration of infection was calculated as the time interval between the first and last HPV-16 positive specimen for women with at least two completed visits. Subjects were censored at their last

visit if still HPV-16-positive. All statistical tests were two-sided and considered being statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results

We first assessed the association between HPV-16 viral load and integration with the presence of SIL on cytology smears that had been obtained from 76 women infected with HPV-16 (48 with normal smears, 2 with ASCUS, 20 with LSIL and 6 with HSIL). For this purpose, we analyzed HPV-16 viral loads measured for each participant at the visit with the highest grade of SIL. The median age of the latter HPV-16-infected women was 29.6 years (mean 31.0 years; range of 18–63.3 years). The mean and the median CD4 cell count closest to the HPV-16-positive sample were measured for 53 HIV-seropositive women and reached 314 and 252 cells/ $\mu\text{l}$ , respectively (range 6–960 cells/ $\mu\text{l}$ ). A weakly significant negative correlation was obtained between CD4 cell count and highest HPV-16 load ( $R = -0.27$ ,  $p = 0.05$ ). We could not correlate HPV-16 viral load with plasma HIV viral load, since most participants had been recruited before the advent of HIV viral load testing. There was a strong correlation (coefficients from 0.82 to 0.97) between the total, episomal and integrated HPV-16 DNA copies measured in each sample ( $p < 0.0001$ ). As shown in Table I, the median viral load was significantly greater for women with LSIL or HSIL compared to normal women whether total, episomal or integrated HPV-16 loads were measured ( $p < 0.02$  for each comparison). Similar results were obtained when the first visit for each participant was analyzed (data not shown). Although HPV-16 loads were always greater for women with HSIL compared to LSIL, this difference



did not reach statistical significance ( $p > 0.10$ ). Controlling for age, HIV status and CD4 cell count, women with HSIL had higher HPV-16 viral load (total ( $p = 0.02$ ), episomal ( $p = 0.02$ ), integrated ( $p = 0.05$ )) than normal women. Age, CD4 cell count, co-infection with types other than 16, HAART, race and HIV status were similar between women with normal smears, LSIL or HSIL ( $p > 0.10$  for each comparison, data not shown).

Single cytology smear results may misclassify participants. Thirty-six women have had colposcopy with biopsy of suspicious lesion and an additional 13 women were considered to have normal cervixes on the basis of 4 consecutive normal cytology smears. These 49 women (38 HIV-seropositive, 11 HIV-seronegative) had a median age of 28.5 years (24.1-33.9) and a median CD4 cell count of 286 cells/ $\mu$ l (25%-75% quartiles of 212-388). Total, episomal and integrated HPV-16 viral loads in women with CIN2-3 were at least two logs greater than in normal women ( $p < 0.002$ ) (Table II). The difference between CIN 1 and normal women was the most significant when integrated HPV-16 DNA was considered (Table II). Although CIN 2-3 contained at least 10 times more HPV-16 DNA copies than CIN 1, this difference did not reach statistical significance ( $p > 0.06$ ). CD4 cell counts measured in women with CIN 2-3 (median of 160, 25%-75% quartiles of 80-290) were statistically lower than in normal women (286, 240-410;  $p = 0.04$ ). This difference was also obtained when CD4 cell counts were analyzed as a categorical variable (data not shown). When women with CIN 2-3 were compared to normal women, age (median of 23.2 versus 26.3 years), smoking (5 (50%) of 10 versus 8 (31%) of 26 were smokers), HIV status (8 (80%) of 10 versus 19 (73%) of 26 were HIV-seropositive), HAART (3

(30%) of 10 versus 2 (7.7%) of 26,  $p=0.12$ ), race (9 (90%) of 10 women versus 19 (73%) of 26 normal women were Caucasian) and infection by HPV types other than 16 (7 (70%) of 10 versus 16 (62%) of 26 women were infected by HPV types other than 16) were not significantly different ( $p>0.48$  for each comparison). When only HIV-seropositive women were considered, HPV-16 total, episomal and integrated viral loads were significantly higher for the 8 women with CIN 2-3 (total viral load: median of 7.54 HPV-16 copies/ $\mu\text{g}$  DNA, 25%-75% quartiles of 7.15–8.26; episomal viral load: median of 7.09, 25%-75% quartiles of 6.41–7.96; integrated viral load: median of 7.46, 25%-75% quartiles of 6.05–7.93) than for the 19 normal women (total viral load: median of 4.83, 25%-75% quartiles of 4.20–5.10;  $p=0.001$ ; episomal viral load: median of 4.58, 25%-75% quartiles of 3.53–4.54;  $p=0.001$ ; integrated viral load: median of 4.72, 25%-75% quartiles of 3.28–4.94;  $p=0.002$ ). Controlling for HIV status, CD4 cell count and age, total ( $p=0.02$ , OR 3.5, 95% CI 1.2–10.4), episomal ( $p=0.02$ , OR 2.9, 95% CI 1.2–7.4) and integrated ( $p=0.05$ , OR 1.6, 95% CI 1.1–2.6) HPV-16 viral loads remained significantly associated with CIN 2-3 while CD4 cell counts were not significant ( $p>0.17$ ). The same level of significance was found when only HIV-infected women were considered in multivariate analysis controlling for CD4 cell count and age (data not shown).

To investigate whether HPV-16 integrated load was associated with CIN 2-3 independently from total viral load, participants were classified according to the total HPV-16 load ( $<10^7$  and  $\geq 10^7$  HPV-16 copies/ $\mu\text{g}$  DNA). For participants with a lower total HPV-16 load, HPV-16 load of integrated forms in normal women was significantly lower than in women with CIN 2-3 while episomal HPV-16 load was

similar (Table II). No difference was demonstrated in women with a higher total HPV-16 load (data not shown). We also investigated whether as reported by another group, the amount of cells collected from the cervix was greater in women with CIN as opposed to women with normal cervix [13]. The median amount of cellular DNA collected per  $\mu\text{l}$  of processed CVLs from women with normal cervixes, CIN 1 and CIN 2-3 reached 0.011  $\mu\text{g}$  (range 0.003 – 0.026), 0.03 (range 0.012 – 0.063;  $p = 0.11$ ) and 0.052  $\mu\text{g}$  (range 0.030 – 0.159;  $p = 0.007$ ), respectively.

The association between HPV-16 viral load and HPV-16 persistence was then investigated. 133 CVLs collected from 67 women (50 HIV-seropositive, 17 HIV-seronegative) were analyzed for HPV-16 viral load. CD4 cell count closest to the first HPV-16-positive sample ranged from 6 to 960 cells/ $\mu\text{l}$  for 48 HIV-seropositive women (mean and median of 303 and 255 cells/ $\mu\text{l}$ , respectively). Forty six (68.6%) participants were Caucasian, 14 (20.9%) were from African descent, 2 (3.0%) were Asian, and 4 (6.0%) were Aboriginal women. Of the 21 women who received HAART during the study period while infected by HPV-16, 14 received treatment for more than one visit while HPV-16-positive.

Seven (17.5%) of 40 women with persistent infection and 10 (37.0%) of 27 women with transient infections were infected with non-prototype LCR variants ( $p = 0.09$ ). Six women with persistent infection and 8 with transient infection were infected by non-European LCR variants ( $p = 0.23$ ). Of the 40 women with persistent infections, 21 were infected by E6 variants with significant variations and 15 were infected by the E350G variant in comparison to 14 and 10 of 27 women with

transient infections, respectively ( $p>0.20$ ). Nine women (22.5%) with persistent and 2 women (7.4%) with transient infections were under HAART ( $p=0.18$ ).

From all 40 persistently infected women the first sample was analyzed, 2 samples were tested for 5, 3 were tested for 11, 4 were tested for 3 and up to 7 samples were tested for 5 participants. In 3 of 40 women with persistent infection, HPV-16 variants were different between visits [38]. For one participant, a specimen contained a mixture of two variants at one visit and one of these variants was detected in all consecutive specimens. Two women had sequential infections by two different variants with the last variant being detected for over 12 months afterwards. For all women with transient infections the first HPV-16-positive specimen was tested, 4 women had 2 samples tested and one had 3 samples tested. Age of participants ranged from 18.0 to 63.3 years (median of 28.1 years). The follow-up time for the 40 women with persistent infection (median 32.6 months; range 12.7–85.5 months) and 27 women with transient infection (median 29.3 months; range 14.4–74.1 months) was similar ( $p=0.49$ ), for a total of 15,663.3 woman-months of follow-up. The total number of completed visits were also similar for women with persistent (geometric mean of 4.7 (range 3-11)) and transient (geometric mean of 4.6 (range 3-10)) infections ( $p=0.90$ ). The 40 women with persistent HPV-16 infections had a geometric mean of 3.3 HPV-16-positive visits and the average period of HPV-16 positivity was 24.9 months (median 21.8; range 12.2 to 62 months). The 27 women with transient HPV-16 infections had a geometric mean of 1.4 HPV-16-positive visits and the average period of HPV-16 positivity was 3.8 months (median 0; range 0 to

11.4 months). Of the women with transient or persistent HPV-16 infections, 14 and 19 subjects had a colposcopy during follow-up, respectively.

When women with transient infections were compared to women with persistent infection, HPV-16 total viral load estimations were similar considering the first specimen tested for each women (5.62 (25%-75% quartiles of 4.75-7.4) versus 6.10 (25%-75% quartiles of 5.01-6.66) HPV-16 copies/ $\mu$ g DNA,  $p = 0.11$ ), the median viral load from all positive specimens per participant (5.82 (25%-75% quartiles of 4.80-7.10) versus 6.04 (25%-75% quartiles of 4.95-6.54) HPV-16 copies/ $\mu$ g DNA,  $p = 0.77$ ) or the highest HPV-16 load measured for each participant (6.04 (25%-75% quartiles of 4.95-6.67) versus 6.44 (25%-75% quartiles of 4.80 – 7.83) HPV-16 copies/ $\mu$ g DNA,  $p = 0.22$ ). When age, CD4 cell count and HIV status were controlled for in multivariate analysis, there was no association with persistence of the first HPV-16 viral load measured ( $p = 0.43$ , OR 1.1, 95% CI 0.8-1.5), median HPV-16 viral load ( $p = 0.25$ , OR 1.2, 95% CI 0.9 – 1.6) but the level of highest HPV-16 viral load measured was near significance ( $p = 0.07$ , OR 1.3, 95% CI 1.0-1.7).

Since the definition of persistent infection is arbitrary, we investigated whether the level of HPV-16 viral load could predict the duration of infection. We compared the duration of HPV-16 infection between women with the highest HPV-16 viral load  $\geq 10^7$  ( $n = 20$ ) and women with  $< 10^7$  ( $n = 47$ ) HPV-16 copies/ $\mu$ g DNA. This threshold was selected because it was near the median of all women with persistent or transient infections (median at 6.8) and had been associated with presence of lesions (see above). Women with  $\geq 10^7$  HPV-16 copies/ $\mu$ g human DNA were infected for a longer period of time than women with a lower viral load (Figure

1,  $p = 0.04$ ). In multivariate analysis, having  $\geq 10^7$  HPV-16 copies/ $\mu\text{g}$  DNA was significantly associated with a longer duration of infection ( $p = 0.01$ ) while CD4 count and HIV status ( $p = 0.26$ ), race ( $p=0.66$ ) and age ( $p = 0.25$ ) were not significant. Median HPV-16 viral load was also significantly associated with a longer duration of infection in multivariate analysis, ( $p=0.05$ ). Considering only HIV-seropositive women, the 32 women with low HPV-16 viral loads had a median duration of 13.5 months (25%-75% quartiles of 6-20.7 months) compared to 21.3 months (25%-75% quartiles of 10.4-34.3) for participants with higher HPV-16 viral loads ( $p=0.01$ ), controlling for age and CD4 cell count. The duration of HPV-16 infection was not significantly different between European and non-European variants (15.4 months versus 13.2 months,  $p = 0.62$ ) or between infections with E350T and E350G variants (13.5 versus 15.8,  $p = 0.64$ ). A limited number of women with persistent infection developed biopsy-proven CIN during the study, precluding the analysis of risk factors for lesion development (Table III). Normal women and women without progression had stable HPV-16 loads. The participant who developed carcinoma *in situ* showed a two log increase of HPV-16 viral load while the women who developed CIN 1 had a stable HPV-16 load. The analysis of association between persistent infection and lesion development was further complicated by the frequent occurrence of multiple type infections. Several women transiently infected by HPV-16 still developed CIN because they had persistent infection by other oncogenic types.

We then investigated whether HPV-16 polymorphism was associated with HPV-16 viral load. The comparison of median HPV-16 viral loads between

participants infected with Asian (n=3 women) or African (n=9 women) variants with women infected with European variants (n=58 women), revealed that lower HPV-16 loads were measured during infection by Asian variants (Table 5;  $p=0.04$ ). The three HIV-seropositive women infected by Non-European variants had a normal cytology. Eleven (92%) women infected by non-European variants were HIV-seropositive. There was no difference between CD4 cell counts measured in women infected by non-European (median of 227, 25%-75% quartiles 196-227 cells/ $\mu$ l) and European (median of 265, 25%-75% quartiles 188-375 cells/ $\mu$ l) variants ( $p=0.78$ ). The age of women infected with Asian variants (43 years, 25%-75% quartiles of 19.9–48.1) and European variants (28.1 years, 25%-75% quartiles of 23.3–33.8) was similar ( $p=0.37$ ).

We investigated whether HPV-16 E6 polymorphism could be responsible for lower viral loads measured for some HPV-16 variants due to primer or probe mismatch with HPV-16 sequences. Variation at nucleotide (nt) 109 was identified in African and European variants (4 isolates) and was located in the middle of the upstream primer. Variation at nt 131 occurred in the middle of the 16-E6-PRO probe and was found only in European variants. HPV-16 total loads measured for European variants with (25-75% quartiles of 4.1-6.6 HPV-16 copies/ $\mu$ g DNA) and without (25-75% quartiles of 5.0-6.9) the variation were similar ( $p=0.24$ ), suggesting that the variation did not have an impact on HPV-16 load estimations. Three variations (nt 132, 143 and 145) occurred concurrently in all African variants. The samples from the 9 women infected by the latter variants were retested with an HPV-16 E6 assay [40, 41] using a probe and primers that did not show any mismatch with the E6

sequence of the non-European variants. Ratios of HPV-16 E6 load with the latter assay and the original assay ranged from 0.4 to 2.2 (mean of  $1.3 \pm 0.6$ ). Using the viral load estimations obtained with the second assay, a lower total HPV-16 load was still obtained with non-European variants (data not shown). Finally, variation at nt 145 was found individually in Asian variants and was located in the middle of the probe. HPV-16 E6 load measured with the second assay above were similar to those obtained initially (mean of  $1.3 \pm 0.5$ ).

## **Discussion**

In this study, we have shown that a wide spectrum of HPV-16 viral load values can be measured in a population of sexually active women. The measures of episomal and integrated HPV-16 DNA were obtained by a truly quantitative assay that not only normalizes the amount of HPV-16 DNA against the quantity of host DNA collected but also screens for the presence of PCR inhibitors. Our work clearly shows that these two adjustments are mandatory. As reported previously by two groups, the cellular content of genital specimens was greater in women with high-grade cervical disease [13,42]. HPV-transformed cells may express fewer intercellular adhesion molecules on their surface and could possibly be sampled more readily than normal cells [13]. We had previously reported that inhibitors contained in genital sample lysates could selectively impede HPV-16 amplification [30]. Coamplification of HPV DNA and internal control for HPV, which uses the same primer binding sites but has a different intervening sequence, is the best means to measure the impact on the amplification of HPV DNA of inhibitors or competition by



other HPV types [43-45]. Several samples in this study contained inhibitors that would have altered our evaluation of HPV-16 or cellular DNA copies. The prospective design of our study allowed us to evaluate the role of HPV-16 viral load in persistence of infection. Several participants had colposcopy or repeated normal cytology smears over several years, permitting a more precise classification of participants. High HPV-16 load measured at the first visit for women who had subsequently progressive SIL could represent an increased risk of progressing to a higher grade SIL or currently having higher grade CIN underestimated by cytology. Our prospective design allowed analyzing HPV-16 load considering the highest grade of SIL or CIN to assess the association between grade of disease and HPV-16 viral load. A dedicated pathologist validated pathology results.

However, we recognise that our study has limitations. Most of the women recruited were infected by HIV and the others were at high risk for HIV infection. The short follow-up of several years did not allow encountering enough events (SIL or SIL progression) to measure the causal relationship between viral load and incident disease. Although some women were infected transiently by HPV-16, they evolved into SIL because of concurrent persistent infection by other oncogenic types. Our study was also limited by the small number of women with transient infections, explaining why known risk factors for persistence were not significant in our cohort. Nevertheless, we did obtain significant differences in viral loads between these groups. As mentioned in the result section, the presence in most women of multiple type infection did not allow investigating the association between HPV-16 persistence and lesions (see above)

To date, results obtained on the value of HPV DNA viral load in identifying women with cervical SIL remain controversial, and the role of viral load in disease progression is still debated [12-17,19,40,42,46-57]. While cervical carcinoma *in situ* has been found in women with consistently high HPV-16 viral loads, HSIL is not always predicted by high viral loads [12,13,19]. We have shown here with real time PCR assays controlling for cellular content and inhibition, that high total, episomal and integrated HPV-16 viral loads are associated with SIL or CIN. However, the important overlap of HPV-16 viral load values between normal women and women with SIL could be a limitation for the usefulness of viral load measurements at one visit in clinical practice, and could partly explain the inconsistencies between studies. The use of viral assays that did not control for cellular content and presence of PCR inhibitors could further explain these discrepancies. Moreover, the presence of CIN 1 surrounding CIN 3 lesions can alter HPV viral load estimations and restrict the clinical usefulness of this marker [58].

Several cross-sectional studies have examined the association between the HPV viral loads measured by Hybrid Capture and the presence of SIL. Several of these studies did not find a correlation between the amount of HPV DNA and the grade of cervical lesions [59-61]. Others reported that HSIL contained higher HPV DNA copy numbers, although for several studies there was such an important overlap between LSIL and HSIL that HPV viral load could not distinguish among women with or without HSIL [40,46-48,51,53-56,62]. One study that compared the Hybrid Capture and real-time PCR reported that although the first test did not include

normalisation for cellular load, it could still prove useful for determining the risk of developing SIL as being high or low [40].

Cuzick et al. showed that in women with cytological anomalies, higher levels of HPV DNA measured with a semi-quantitative PCR assay were strongly related to high-grade CIN [63]. When women were classified into two categories (low and high signals for HPV detection) on the basis of reactivity with PCR and Southern blot, risk for CIN was increased in women with a high signal [64]. One prospective cohort study demonstrated that detection of HPV with both PCR and Southern blot as opposed to detection by PCR only, correlated with persistence of SIL [65]. Another group obtained higher viral loads in prevalent cervical intraepithelial neoplasia than in incident cervical intraepithelial neoplasia [66]. In all these studies however, quantitative PCR techniques were not applied to control for PCR inhibition or cell content of samples that could modify viral load estimates.

Other studies using quantitative assays suggested that an increased HPV DNA viral load could be a candidate marker for the presence of cervical lesions [12-15,42, 49,50,53,57]. Cervical carcinoma *in situ* occurred in women with consistently high HPV-16 viral load [12]. HPV-16 viral load could predict the risk of cervical carcinoma *in situ* before detection of SIL on cytology smears [14]. Some have demonstrated a correlation between HPV viral load and grade of lesions that is dependent on HPV type [13, 40].

This is the third report using real-time PCR on HIV-seropositive women demonstrating an association between high viral loads and high-grade disease on cytology or histology [16, 18]. Eighth studies including our work have investigated

the HPV DNA viral load in genital secretions from HIV-infected women [15-18,50,67,68]. One study used the intensity of signal obtained with Southern blot hybridization to estimate HPV viral load; a strong signal was predictive of SIL in multivariate analysis (OR 3.5-33.7) [50]. A second study demonstrated that the amount of HPV DNA increased in HIV-negative and HIV-seropositive women with the presence and grade of cervical lesion [15]. Another study that used the Hybrid Capture and a semi-quantitative PCR assay in a cross-sectional study of 150 HIV-seropositive women [17], illustrates the difficulty estimating the HPV viral DNA copy number in clinical samples. A high PCR signal was associated with a higher risk of lesion (OR 2.1 – 614.5) while a higher signal by the Hybrid Capture was not [17]. A recent study using real-time PCR assays against several HPV types reported that higher HPV viral loads were measured in women with CD4+ counts below 200 cells/ $\mu$ l [18].

A weak negative correlation between the level of immunodeficiency and HPV-16 viral load was demonstrated in our cohort, as we had reported previously using a quantitative HPV-16 assay targeting L1 [16]. However, this weak correlation is in line with a recent report that demonstrated that HPV-16 incidence had the weakest association with CD4 cell count of all types studied [69]. Prevalent and incident HPV-16 infections are more weakly associated with immune status of HPV-seropositive than other HPV types, suggesting that HPV-16 could avoid or better avoid immune surveillance [69].

HPV-16 viral load reached higher peaks in women persistently infected. In addition to previous studies that demonstrated the association between high HPV

viral loads and persistence of infection [11,52], we also demonstrated that higher HPV-16 loads were predictive of a longer duration of infection controlling for other potential confounders. Infections in which replication generates higher levels of HPV-16 DNA copies will take longer before being eradicated. Integration of HPV DNA into the human genome is considered as a key event in cervical oncogenesis, due to the increased expression of oncoproteins E6 and E7 [21, 70]. The presence of integrated forms is difficult to quantitate due, as demonstrated here, to the frequent occurrence of episomal and integrated forms in the same sample [24,71]. Initial studies using insensitive tools detected integrated forms only in high-grade lesions or cervical cancer [21, 70]. More sensitive technologies have demonstrated the presence of integration in precancerous disease [23-25,72]. One study demonstrated that nearly half of 92 samples from young women with LSIL at cytology contained integrated HPV-16 forms [23]. Another group reported that all CIN lesions contained integrated forms. In the latter study, a higher load of integrated HPV-16 was associated with progression of CIN in a population of 24 patients. This is the first extensive report demonstrating integration in normal women. Although total and integrated viral loads were both associated with high grade SIL or CIN, we could demonstrate that in women with low total HPV-16 load, integrated HPV-16 was associated with CIN 2-3 while episomal load was not. This finding suggests that integrated viral load could represent in itself a marker to identify women at higher risk for high grade CIN. The presence of integration also modifies our model of HPV-induced carcinogenesis as discussed elsewhere [24]. Mixed forms of episomal

and integrated HPV-16 can be detected early during infection, before the presence of HPV-induced abnormality.

Our findings demonstrate that women infected by HIV, or at risk for HIV infection, are infected with higher HPV-16 viral loads, when they have significant cervical lesions, than women with normal cytology smears or normal cervixes. However, although this difference is statistically significant, it would not allow classifying our participants into higher risk categories because of the important overlap between those without lesion and those with HSIL. Prospective studies on a greater number of HPV-16 infected women are needed to better isolate the predictive value of integrated HPV-16 load versus total or episomal load for progression.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Mme Diane Gaudreault and Mme Diane Bronsard for processing genital samples. This study was supported by CANFAR and by The Réseau FRSQ SIDA-Maladies Infectieuses. The Canadian Institutes of Health Research supports The Canadian Women's HIV Study. F.C. is a chercheur national supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We would like to thank Fabrice Rouah for maintaining the data base.

Table I. Median HPV-16 total viral load, episomal load and integrated load in cervicovaginal lavages from women with various grades of SIL.

<b>SIL grade (no. women)</b>	<b>Log no. HPV-16 copies/<math>\mu</math>g DNA</b>		<b>Significance (p value)</b>
	<b>median</b>	<b>25-75% quartiles</b>	
<b>TOTAL HPV-16 LOAD</b>			
Normal (n=48)	5.10	3.82-6.28	Reference
LSIL (n=20)	6.88	4.94-7.54	0.006
HSIL (n=6)	8.28	6.38-8.61	0.005
<b>EPISOMAL HPV-16 LOAD</b>			
Normal (n=48)	4.61	3.38-6.15	Reference
LSIL (n=20)	6.63	4.50-7.39	0.004
HSIL (n=6)	7.99	6.38-8.40	0.001
<b>INTEGRATED HPV-16 LOAD</b>			
Normal (n=48)	4.77	3.59-5.68	Reference
LSIL (n=20)	6.10	4.61-7.09	0.02
HSIL (n=6)	7.95	4.77-8.19	0.02

Table II. Median HPV-16 total viral load, episomal load and integrated load in cervicovaginal lavages from women with various grades of CIN.

CIN grade (no. women)	Log no. HPV-16 copies/ $\mu$ g DNA		Significance (p value)
	median	25-75% quartiles	

### ALL WOMEN

#### **TOTAL HPV-16 LOAD**

Normal (n=27)	4.89	4.20-5.77	Reference
CIN 1 (n=13)	6.03	4.74-7.65	0.05
CIN 2-3 (n=10)	7.31	6.67-8.04	<0.001

#### **EPISOMAL HPV-16 LOAD**

Normal (n=27)	4.54	3.53-5.52	Reference
CIN 1 (n=13)	5.91	4.56-7.26	0.13
CIN 2-3 (n=10)	6.99	6.15-7.62	<0.001

#### **INTEGRATED HPV-16 LOAD**

Normal (n=27)	4.63	3.39-4.94	Reference
CIN 1 (n=13)	5.40	4.53-7.43	0.02
CIN 2-3 (n=10)	6.92	6.22-7.83	0.002



**WOMEN WITH TOTAL HPV-16 LOAD <math>10^7</math> HPV-16 DNA COPIES/ $\mu\text{g}$  DNA**

**EPISOMAL HPV-16 LOAD**

Normal (n=24)	4.53	3.53-5.52	Reference
CIN 1 (n=9)	4.59	4.25-5.91	0.62
CIN 2-3 (n=7)	6.15	5.88-6.24	0.08

**INTEGRATED HPV-16 LOAD**

Normal (n=24)	4.33	3.34-4.92	Reference
CIN 1 (n=9)	4.94	4.20-5.40	0.13
CIN 2-3 (n=7)	6.22	5.56-6.47	0.015

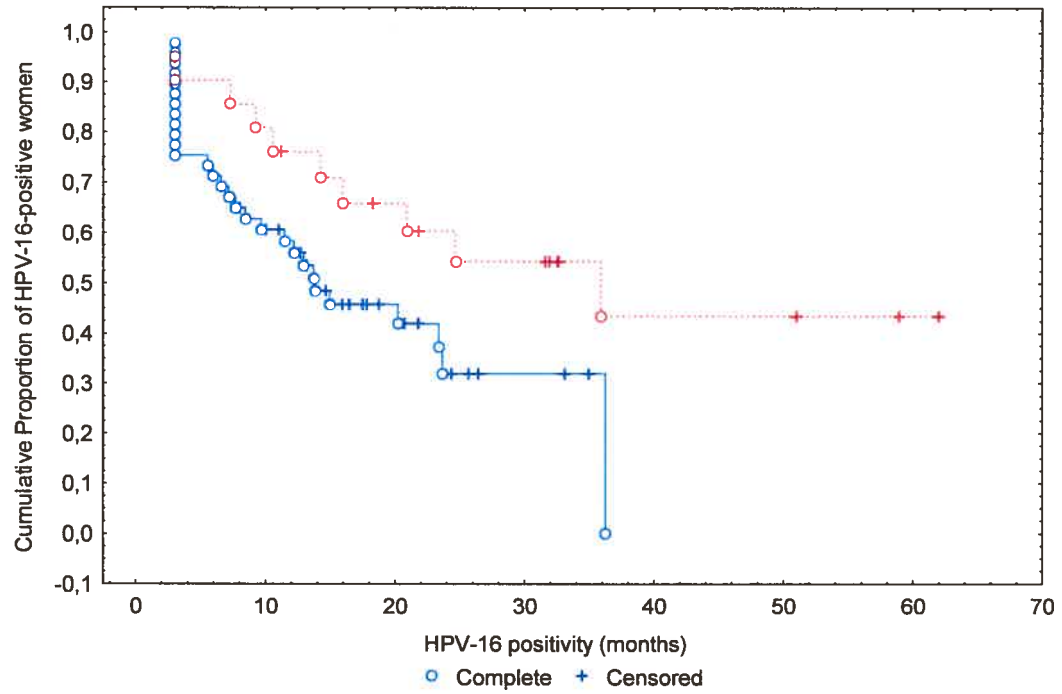
Table III. Evolution of HPV-16 total viral load in women without disease or progressing disease in 15 women with colposcopic evaluations.

<b>LESION OUTCOME</b>	<b>PERIOD OF FOLLOW-UP</b>	<b>HPV-16 VIRAL LOAD</b>
	<b>Month/year</b>	<b>First; last</b>
<b><u>NORMAL WOMEN</u></b>		
	1. 6/95 – 9/96	4.12; 3.27
	2. 10/95 – 6/97	3.70; 4.27
	3. 5/94 – 5/96	4.98; 4.85
	4. 11/94 – 12/96	5.52; 5.10
	5. 10/94 – 12.96	4.08; 4.69
	6. 3/96 – 7/97	3.87; 3.65
	7. 8.95 – 9.96	4.12; 3.27
	8. 12/98 – 6/00	5.03; 5.77
<b><u>PROGRESSION OF LESIONS</u></b>		
To CIS	9. 5/96 – 3/98	5.07; 7.17
To CIN 1	10. 11/95 – 5/97	6.09; 6.03
<b><u>PERSISTENCE OF LESIONS</u></b>		
CIN 1	11. 1/94 – 10/95	7.63 ; 7.11
CIN 1	12. 11/95 – 1/98	9.05 ; 7.65
CIN 1	13. 11/95 – 5/97	5.92 ; 6.02
CIN 1	14. 11/95 – 7.97	6.32 ; 6.50
CIN 3	15. 10/93 – 12/98	8.16 ; 8.07

Table IV. HPV-16 viral load in cervicovaginal lavages of isolates from different lineages based on LCR sequencing.

HPV-16 Variants (no. isolates)	Log no. HPV-16 copies/ $\mu$ g DNA		Significance (p value)
	median	25-75% quartiles	
European branch (n=57)	5.98	4.83 – 6.96	Reference
African branch (n=9)	5.09	4.98 – 6.54	0.028
Asian branch (n=3)	3.32	0 – 5.71	0.04

Figure 1. Duration of HPV-16 infection in women infected with more or less than 10,000,000 copies of HPV-16 DNA in cervicovaginal lavages.



## REFERENCES

1. **de Sanjose S, Palefsky J.** Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Research* 2002; 89:201-211.
2. **Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, and Shah KV.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55:244-265.
3. **Clifford GM, Smith JS, Aguado T, and Franceschi S.** Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British J Cancer* 2003; 89:101-105.
4. **Moscicki AB, Ellenberg JH, Vermund SH, Holland CA, Darragh T, Crowley-Nowick PA et al.** Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls - Impact of infection with human immunodeficiency virus. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 2000; 154:127-134.
5. **Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K et al.** Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 2000; 283:1031-1037.
6. **Jamieson DJ, Duerr A, Burk R, Klein RS, Paramsothy P, Schuman P et al.** Characterization of genital human papillomavirus infection in women who have or who are at risk of having HIV infection. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2002; 186:21-27.
7. **Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A et al.** Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Inf Dis* 2001; 184:682-690.
8. **Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, and Wright TC, Jr.** Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *New Engl J Med* 1997; 337:1343-1349.
9. **Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA et al.** Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama: Journal of the American Medical Association* 2001; 286:3106-3114.
10. **Ferenczy A, Franco EL.** Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncology* 2002; 3:11-16.

11. **Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T et al.** Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000; 81 Pt 12:2959-2968.
12. **Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PKE, Anderson PK, Ponten J et al.** Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355:2194-2198.
13. **Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER et al.** Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1030-1034.
14. **Josefsson AM, Magnusson PKE, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Anderson PK et al.** Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355:2189-2193.
15. **Womack SD, Chirenje ZM, Gaffikin L, Blumenthal PD, McGrath JA, Chipato T et al.** HPV-based cervical cancer screening in a population at high risk for HIV infection. *Int J Cancer* 2000; 85:206-210.
16. **Lefevre J, Hankins C, Pourreaux K, The Canadian Women's HIV study Group, and Coutlée F.** Human papillomavirus Type 16 viral load is increased in HIV-seropositive women with high-grade squamous intraepithelial lesions compared to those with normal cytology smears . *J Clin Microbiol* 2004; in press.
17. **Shah KV, Solomon L, Daniel R, Cohn S, and Vlahov D.** Comparison of PCR and Hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35:517-519.
18. **Weissenborn SJ, Funke AM, Hellmich M, Mallmann P, Fuschs PG, Pfister HJ et al.** Oncogenic Human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with High-grade cervical lesions are strongly elevated. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2763-2767.
19. **Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S et al.** Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002; 360:228-229.
20. **Hopman AHN, Smedts F, Dignef W, Ummulen M, Sonke G, Mravunac M et al.** Transition to high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 2004; 202:23-33.

21. **Cullen AP, Reid R, Champion M, and Lorincz AT.** Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasms. *J Virol* 1991; 65:606-612.
22. **Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, and Johansson B.** Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17:146-153.
23. **Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR et al.** Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 2003; 56:532-536.
24. **Peitsaro P, Johansson B, and Syrjanen S.** Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40:886-891.
25. **Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S et al.** Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:863-867.
26. **Hankins C, Coutlee F, Lapointe N, Simard P, Tran T, Samson J et al.** Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *Can Med Ass J* 1999; 160:185-191.
27. **Coutlée F, Hankins C, Lapointe N, Gill J, Romanowski B, Shafran S et al.** Comparison between vaginal tampon and cervicovaginal lavage specimens collection for detection of human papillomavirus DNA by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1997; 51:42-47.
28. **Hankins C, Lapointe N, Walmsley S, and The Canadian Women's HIV study Group.** Participation in clinical trials among women living with HIV in Canada. *Can Med Ass J* 1998; 159:1359-1365.
29. **Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T et al.** Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Inf Dis* 1994; 169:235-240.
30. **Lefevre J, Hankins C, Pourreaux K, Voyer H, The Canadian Women's HIV study Group, and Coutlée F.** Internal Controls for Quantitation of HPV-16 and  $\beta$ -globin DNA in Cervicovaginal Lavages. *J Virol Methods* 2003; 144:135-144.
31. **Lefevre J, Hankins C, Pourreaux K, The Canadian Women's HIV study Group, and Coutlée F.** Prevalence of selective inhibition of HPV-16 DNA amplification in cervicovaginal lavages. *J Med Virol* 2004; 72:132-137.

32. **van Duin M, Snijders PJF, Vossen MTM, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RHM et al.** Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81:317-325.
33. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-410.
34. **Myers GB, Bernard H-U, Delius H, Baker CC, Icenogle J, Halpern AL, and Wheeler C.** Human papillomavirus. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory. Publication LA-UR 95-3675. 1995. Los Alamos, N.M. Ref Type: Book, Whole
35. **Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX et al.** Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers - a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71:2463-2472.
36. **Giannoudis A, Herrington CS.** Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 2001; 193:295-302.
37. **Da Costa MM, Hogeboom CJ, Holly EA, and Palefsky JM.** Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Inf Dis* 2002; 185:1229-1237.
38. **Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, De et al.** Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3388-3393.
39. **Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A et al.** Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Inf Dis* 2001; 184:682-690.
40. **Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME et al.** A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2003; 12:477-484.
41. **Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, and Shah KV.** Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* 2003; 112:23-33.
42. **Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa et al.** Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003; 103:519-524.



43. **Wang AM, Mark DF.** Quantitative PCR. In PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis, M A , Gelfand, D H , Sninski, J J , White, T J eds 1989; academic press:70-75.
44. **Wang AM, Doyle MV, and Mark DF.** Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:9717-9721.
45. **Coutlée F, Mayrand MH, Provencher D, and Franco E.** The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. Clin Diag Virol 1997; 8:123-141.
46. **Giuliano AR, Papenfuss M, Brown de Gala EM, Feng J, Abrahamsen M, Denman C et al.** Risk factors for squamous intraepithelial lesions (SIL) of the cervix among women residing at the US-Mexico border. Int J Cancer 2004; 109:112-118.
47. **Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail C, Sautiere JL, Carbillet JP et al.** Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. Int J Cancer 2003; 106:396-403.
48. **Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M et al.** Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. British J Cancer 2001; 84:1616-1623.
49. **van Duin M, Snidjers PJF, Schrijnemakers HFJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MAE et al.** Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. Int J Cancer 2002; 98:590-595.
50. **Klein RS, Ho GYF, Vermund SH, Fleming I, and Burk RD.** Risk factors for squamous intraepithelial lesions on pap smear in women at risk for human immunodeficiency virus infection. Journal of Infectious Disease 1994; 170:404-409.
51. **Sherman ME, Schiffman M, and Cox JT.** Effects of age and Human Papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undetermined significance/low grade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS). J Natl Cancer Inst 2002; 94:102-107.
52. **Beskow AH, Gyllensten UB.** Host genetic control of HPV 16 titer in carcinoma *in situ* of the cervix uteri. Int J Cancer 2002; 101:526-531.

53. **Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, and Chu TY.** Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *International Journal of Gynaecology & Obstetrics* 2002; 76:41-47.
54. **Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, and Kurman RJ.** Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1995; 172:946-954.
55. **Hall S, Lorincz AT, Shah F, Sherman ME, Abbas F, Paull G et al.** Human papillomavirus DNA detection in cervical specimens by hybrid capture: correlation with cytologic and histologic diagnoses of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Gyn Oncol* 1996; 62:353-359.
56. **Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I, Petry U, Baur S, Kirchmayr R et al.** Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clinical & Diagnostic Virology* 1998; 10:49-56.
57. **Sun CA, Lai HC, Chang CC, Nieh S, Yu CP, and Chu TY.** The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gyn Oncol* 2001; 83:95-99.
58. **Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R et al.** Histopathologic extent of cervical intraepithelial neoplasia 3 lesions in the atypical squamous cells of undetermined significance low-grade squamous intraepithelial lesion triage study: implications for subject safety and lead-time bias. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2003; 12:1038-1044.
59. **Sun XW, Ferenczy A, Johnson D, Koulos JP, Lungu O, Richart RM et al.** Evaluation of the Hybrid Capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:1432-1437.
60. **Clavel C, Masure M, Putaud I, Thomas K, Bory JP, Gabriel R et al.** Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* 1998; 51:737-740.
61. **Clavel C, Bory JP, Rihet S, Masure M, Duval-Binninger I, Putaud I et al.** Comparative analysis of human papillomavirus detection by hybrid capture assay and routine cytologic screening to detect high-grade cervical lesions. *Int J Cancer* 1998; 75:525-528.

62. **Sigurdsson K, Arnadottir T, Snorraddottir M, Benediktsdottir K, and Saemundsson H.** Human papillomavirus (HPV) in an Icelandic population: correlation of HPV DNA to cytologic and histopathologic lesions and evaluation of treatment strategies. *Int J Gyn Cancer* 1996; 6:175-182.
63. **Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, and Anderson M.** Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *British J Cancer* 1994; 69:167-171.
64. **Ho GYF, Palan PR, Basu J, Romney SL, Kadish AS, Mikhail M et al.** Viral characteristics of human papillomavirus infection and antioxidant levels as risk factors for cervical dysplasia. *Int J Cancer* 1998; 78:594-599.
65. **Ho GYF, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P et al.** Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1365-1371.
66. **Schneider A, Zahm DM, Greinke C, Kirchmayr R, and Nindl I.** Different detectability of high-risk HPV in smears from incident and prevalent high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Gyn Oncol* 1997; 65:399-404.
67. **Serwadda D, Wawer MJ, Shah KV, Sewankambo NK, Daniel R, Li C et al.** Use of a hybrid capture assay of self-collected vaginal swabs in rural Uganda for detection of human papillomavirus. *J Inf Dis* 1999; 180:1316-1319.
68. **Vernon SD, Reeves WC, Clancy KA, Laga M, St.Louis M, Gary HE et al.** A longitudinal study of human papillomavirus DNA detection in human immunodeficiency virus type 1-seropositive and -seronegative women. *J Inf Dis* 1994; 169:1108-1112.
69. **Strickler HD, Palefsky JM, Shah KV, Anastos K, Klein RS, Minkoff H et al.** Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus-seropositive women. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1062-1071.
70. **Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E, and Krishna S.** Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76:2589-2593.
71. **Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, and Rose BR.** Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. *Int J Cancer* 2002; 97:868-874.
72. **Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A et al.** Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by

amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes.  
Cancer Res 1999; 59:6132-6136.

## DISCUSSION

La présente étude vise à démontrer l'importance de la charge virale de HPV-16 en tant que marqueur servant à identifier les femmes susceptibles de développer des lésions précancéreuses ou cancéreuses au niveau du col utérin. La cohorte étudiée, The Canadian Women's HIV Study Group, est constituée de femmes recrutées à travers le Canada, qui sont séropositives pour le VIH ou séronégatives mais qui présentent des risques de contracter des maladies transmissibles sexuellement. Pour les mesures de charges virales, nous avons obtenu 151 lavages cervico-vaginaux de 83 participantes dont l'infection par HPV-16 avait été démontrée au préalable. Des résultats de biopsie étaient également disponibles pour 50 participantes. Il a donc été possible d'évaluer la corrélation entre les résultats de cytologie et d'histologie, ainsi de minimiser de potentielles erreurs d'évaluation. Une comparaison des cytologies avec les résultats de biopsie suggère effectivement une sous-estimation du grade des lésions par cytologie, tel qu'illustré dans la table 1. L'étude de charge virale a donc été faite dans un premier lieu avec les résultats de cytologie, ensuite avec les résultats de biopsie. Toutefois, nous n'avons pu évaluer l'association entre les charges virales et les lésions histopathologiques qu'en mesurant la charge virale sur le lavage cervico-vaginal, n'ayant pas obtenu la biopsie elle-même. Cela pourrait avoir été un facteur d'erreur. Cependant, l'utilité de la charge virale réside principalement dans son utilisation pour le dépistage de lésions et non sur du matériel biopsique.

Cytologie	Résultats de biopsie				
	N	CIN1	CIN2-3	nd	total
N	55	7	2	13	77
ASCUS	3	0	1	2	6
LSIL	11	1	6	5	23
HSIL	4	3	0	1	8
total	73	11	9	21	<b>114</b>

Table 1 : Concordance des résultats de biopsie et de cytologie.

Le résultat de biopsie correspond au résultat de cytologie dans 54% des cas, si on considère que les ASCUS sont adéquats.

### Légende

ASCUS : Abnormal cytology of undetermined significance

LSIL: Low grade squamous intraepithelial lesion

HSIL: High grade squamous intraepithelial lesion

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

Il a également été possible, étant donné la nature prospective de l'étude, d'évaluer la présence d'infections incidentes, transitoires ou persistantes. Par contre, il a été difficile d'obtenir suffisamment de données pour établir des liens entre les variations de charges virales et la progression ou la régression de lésions cervicales, étant donné le suivi limité dans le temps des participantes. De plus, les tests de géotypage des spécimens dévoilent qu'une grande proportion des infections est causée par plusieurs types de HPV, ce qui peut potentiellement occulter les études du rôle spécifique de HPV-16 dans l'induction de lésions. Toutefois, puisque l'association entre la charge virale et le grade de lésions cervicales n'a été démontrée que pour HPV-16 (82) et que ce type est le plus prévalent dans notre cohorte, le choix d'étudier ce type semble approprié. Notre cohorte a d'ailleurs été instituée dans le but d'étudier la persistance de l'infection causée par HPV plutôt que l'évolution des lésions.

L'élaboration d'un test quantitatif doit tenir compte de tous les facteurs pouvant affecter la quantification ou l'amplification d'une cible donnée, notamment la présence d'inhibiteurs et les quantités de cellules humaines contenues dans les échantillons. Dans un premier temps, nous avons donc procédé à la détection d'inhibiteurs dans les échantillons cliniques par l'utilisation de contrôles internes. Les contrôles internes consistent en une séquence d'ADN qui n'a aucune homologie avec la cible à quantifier, excepté pour la séquence des amorces qui ont été ajoutées à chaque extrémité. La longueur et le contenu en nucléotides G et C doivent être similaires à ceux de la cible. Ainsi, les contrôles internes seront amplifiés par PCR selon les mêmes paramètres que la cible, tel qu'illustré dans la figure 1. Lors d'une co-amplification de la cible et du contrôle interne, il est possible de détecter la présence d'inhibiteurs, en détectant le contrôle interne à l'aide d'une sonde d'oligonucléotide spécifique. De natures diverses telles que des cristaux, des hormones ou des débris cellulaires, les inhibiteurs affecteront l'amplification du contrôle interne de la même façon que l'amplification de la cible (52). Ainsi, en ajoutant une quantité connue de contrôle interne à la réaction d'amplification, précédemment déterminé comme étant 1000 copies, l'évaluation du signal obtenu

par le PCR en temps réel indique la présence ou l'absence d'inhibiteurs (51) Si le signal est sous le seuil préalablement défini de 700 copies, on considère l'échantillon inhibé. Le seuil de 700 copies représente la moyenne attendue du nombre de copies de contrôle interne détectées moins trois fois l'écart type (52). L'utilisation des contrôles internes nous a permis d'affirmer que l'amplification des différentes cibles n'est pas affectée de façon égale, confirmant des résultats obtenus précédemment (51;52). En effet, nous avons observé une inhibition sélective de l'amplification des échantillons selon la paire d'amorces utilisée. Il importe donc d'élaborer des contrôles internes pour chacune des cibles à quantifier, tel que nous l'avons fait pour le gène viral E6 et le gène humain  $\beta$ -globine. Un échantillon dans lequel on retrouve de l'inhibition peut être dilué, ce qui rend l'inhibiteur en concentration négligeable pour affecter l'amplification. Lors de la première amplification, 46 échantillons ont présenté de l'inhibition et ont dû être dilués. L'amplification de HPV-16 seulement a été inhibée pour 38 échantillons, et pour 8 échantillons dans le cas de la  $\beta$ -globine. Quatre échantillons ont présenté de l'inhibition à la fois pour la  $\beta$ -globine et pour HPV-16.

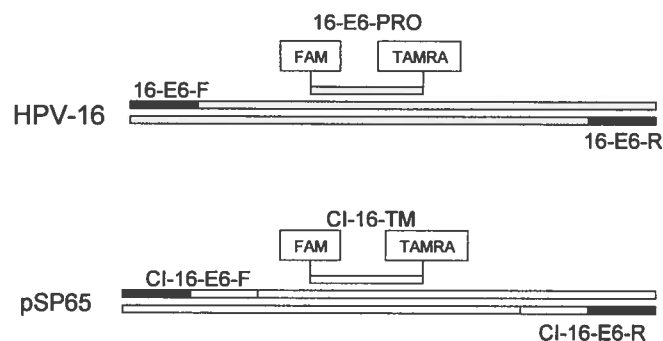


Figure 1: Synthèse du contrôle interne pour HPV-16.

Le plasmide pSP65 n'a aucune homologie pour HPV-16. Les amorces spécifiques pour HPV-16 ont été ajoutées à l'extrémité 5' des amorces spécifiques pour pSP65. pSP65 est donc amplifié avec les mêmes amorces que HPV-16 mais la sonde de détection doit être spécifique au plasmide.

Les cellules transformées par les papillomavirus ont un phénotype différent des cellules normales : l'expression de molécules d'adhésion intercellulaires est diminuée. Par conséquent, ces cellules sont exfoliées plus facilement. Ainsi, il a été rapporté que le nombre de cellules prélevées de lésions de haut grade est plus élevé que le nombre de cellules prélevées d'un col normal, soulignant l'importance d'évaluer la charge cellulaire des échantillons (73;82). Notre étude démontre effectivement que les spécimens de HSIL contiennent une charge cellulaire plus élevée que les spécimens normaux et de LSIL. Cette observation est basée sur la quantification d'une cible génomique humaine, soit le gène de la  $\beta$ -globine. Bien que certains échantillons contenus dans l'étude pouvaient contenir des cellules transformées, il n'a pas été possible, avec notre protocole de PCR en temps réel, de tenir compte de la présence probable de cellules hyper chromatiques. Cependant, les spécimens de carcinome *in situ*, qui peuvent contenir des instabilités chromosomiques n'ont pas été inclus dans l'étude, ce qui a permis de minimiser la marge d'erreur.

La charge virale des types de HPV oncogènes a été définie comme étant un facteur potentiel d'identification des lésions cervicales de haut grade. Cependant, les études précédentes ont obtenu des résultats conflictuels qui peuvent être dus aux différentes méthodes utilisées. Dans plusieurs études, on retrouve des carcinomes *in situ* chez les femmes qui ont constamment une charge virale élevée de HPV-16, mais les lésions cervicales de haut grade ne sont pas toujours accompagnées d'une charge virale élevée (56;82;103). Bien qu'une étude ait démontré que le test Hybrid Capture™ soit utile afin d'évaluer le risque de développer des lésions cervicales (32), plusieurs études utilisant cette méthode soutiennent que le chevauchement des charges virales entre les lésions de haut et bas grade est si large qu'il est impossible de déceler la présence ou l'absence de HSIL (13;16;29;32;81). Les résultats peu concluants obtenus lors des études utilisant la méthode Hybrid Capture sont possiblement attribués au manque de normalisation de charge cellulaire des échantillons. En outre, comme l'association entre la charge virale et les lésions du



col n'a été bien définie que pour HPV-16, le manque de spécificité du test pour un type de HPV particulier peut également être un facteur d'erreur (31;32;73;82). D'autres études utilisant des méthodes quantitatives ont observé une augmentation de la charge virale pour les lésions de haut grade, toutefois avec des chevauchements tels qu'il est parfois impossible de distinguer les HSIL des LSIL (56;82;103). Ces résultats sont possiblement expliqués par la présence d'inhibiteurs non détectés dans les échantillons lorsqu'une méthode d'amplification telle le PCR est utilisée pour quantifier HPV-16. Cependant, d'autres études utilisant un PCR quantitatif ou un PCR en temps réel en temps réel ont su démontrer une association entre la charge virale de HPV-16 et le grade de lésions cervicales (53;82;87). En premier lieu, Swan et coll. (82) ont évalué par PCR quantitatif les charges virales de quatre types de HPV à haut risque chez des femmes avec ou sans lésions cervicales. L'étude démontre une augmentation significative des valeurs de charges virales de HPV-16 selon le grade de lésions cervicales. Cette association n'est toutefois pas retrouvée chez les types 18, 31 et 45. À l'aide du PCR en temps réel, Lefèvre et coll. (53) ont également obtenu des valeurs de charges virales plus élevées chez les femmes ayant des lésions cytologiques de haut grade que chez les femmes normales. Malgré des associations significatives, on retrouve dans ces deux études des grandes plages de chevauchement entre les valeurs de charges virales obtenues pour les lésions de bas et haut grade, ce qui ne permet pas de déterminer des valeurs seuils prédiront le développement ou la progression de lésions. D'autre part, Van Duin a démontré dans une étude rétrospective qu'une charge virale élevée de HPV-16 semblait prédire le développement ou de la progression de lésions, tandis qu'une faible charge virale indiquerait la clairance de l'infection (87).

Les résultats obtenus dans notre étude démontrent une augmentation significative de la charge virale dans les spécimens de lésions de bas grade et de haut grade comparativement aux échantillons normaux. Une charge virale totale élevée (dans laquelle on tient compte à la fois des formes épisomales et intégrées) est donc associée à la présence de HSIL. Cette association est retrouvée en considérant à la fois les résultats de cytologie ( $p < 0.006$ ) ou de biopsie ( $p < 0.05$ ), malgré un faible

nombre d'échantillons provenant de lésions de haut grade (histologie: n=6, biopsie: n=10). Bien que les charges virales augmentent en fonction du stade de dysplasie, un important chevauchement est observé entre les valeurs obtenues pour les différents grades. De plus, nous n'avons pu démontrer d'association entre la charge épisomale de HPV-16 et le grade de lésions cervicales lorsque la charge virale totale est inférieure à  $10^7$  copies de HPV-16/ $\mu$ g d'ADN cellulaire. La charge virale intégrée pour les charges totales inférieures à  $10^7$  copies de HPV-16/ $\mu$ g d'ADN cellulaire, est la seule qui fut associée avec les lésions de haut grade contrairement à la charge épisomale. La charge épisomale est le reflet de la réplication virale productive tandis que la charge intégrée indique le potentiel transformant du virus. Par conséquent, la charge virale peut sembler un outil épidémiologique valable, mais pourra difficilement être utilisée en clinique car il est impossible d'évaluer le risque de développement de lésions en se basant uniquement sur l'obtention d'un spécimen. L'important chevauchement des charges virales obtenues des lésions de bas et haut grade peut également expliquer les contradictions des études précédentes, mettant en doute l'utilité de la charge virale dans l'évaluation des risques de cancer du col.

Bien que nous ayons prélevé plusieurs échantillons pour chacune des participantes, ces données ont été obtenues en utilisant seulement un échantillon pour chacune d'elles. En n'utilisant qu'un échantillon par patiente, nous avons voulu éviter d'introduire un biais en incluant plusieurs mesures d'un même phénomène retrouvé chez la même femme. En sélectionnant la visite à laquelle le plus haut grade a été observé, nous évitons d'étudier la charge virale pour des lésions qui sont actuellement évolutives. La charge virale ne serait alors pas le reflet d'une lésion actuelle mais serait en partie suggestive de son potentiel d'évoluer, ce qui a été corrigé en partie par la nature prospective de notre étude.

Une minorité des femmes infectées par HPV développeront des infections persistantes (8). La persistance a été définie comme un facteur de risque important dans le développement de lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin (72). Une charge virale élevée chez une femme sans lésion, qui révèle une réplication

virale active plutôt qu'une prolifération tumorale, peut être un facteur influençant la persistance d'une infection. Nous avons donc tenté d'évaluer l'association entre la charge virale et la persistance des infections causées par HPV-16. Dans la présente étude, une infection persistante a été définie comme étant 3 spécimens recueillis consécutivement d'une même participante, contenant le même variant de HPV-16, pour une période minimale de 12 mois. Nous n'avons pas été en mesure d'établir une association significative entre la charge virale et la persistance de HPV-16. Cependant, les charges virales des femmes ayant une infection persistante ont atteint des sommets plus élevés durant le suivi. La définition d'une infection persistante étant arbitraire, nous avons ensuite analysé l'impact d'une charge virale élevée sur la durée d'infection par une analyse de Kaplan Meier en considérant deux catégories de charges virales. Celles-ci ont été définies en fonction de la distribution de charges virales dans notre population, nous permettant d'obtenir un nombre de participantes similaire dans chacune des catégories, permettant l'analyse des résultats. Les données obtenues démontrent clairement qu'on retrouve une plus haute charge virale dans les infections de plus longue durée (article, figure 1). Ceci peut être expliqué par le fait qu'une réplication virale active interfère avec le processus de clairance virale, et qu'il est plus long d'éradiquer une plus grande quantité de virus ou d'ADN viral.

Les variations de charges virales ont été observées pour 15 femmes ayant obtenu plus d'un résultat de colposcopie ou au moins 4 résultats de cytologie normale (article, table III). Les femmes avec un col normal ont généralement une charge virale plus basse que les femmes qui avaient des lésions persistantes ou qui ont progressé à un grade supérieur. De plus, les femmes qui avaient constamment des lésions de haut grade avaient des charges virales supérieures à celles qui avaient des lésions de bas grade. La progression la plus importante de charge virale a été observée chez une patiente qui a développé un carcinome *in situ*. Toutefois, le manque de puissance de l'étude ne permet pas d'atteindre de conclusion définitive.

L'intégration de l'ADN viral dans le génome humain a été définie comme un événement crucial du processus d'oncogénèse des HPV. L'association entre l'intégration et l'oncogénèse est expliquée biologiquement par une délétion du gène E2, qui résulte en une expression non contrôlée des protéines E6 et E7, ce qui augmente le potentiel de transformation cellulaire. Toutefois, l'histoire naturelle de l'intégration de HPV-16 dans le développement de lésions cervicales précancéreuses demeure floue, car elle n'a pas été investiguée en profondeur avec des outils précis comme le PCR en temps réel, et n'a pas été étudiée chez les femmes normales (15;27). En raison de la présence concomitante d'épisomes et de formes intégrées, il est souvent difficile, avec des méthodes semi quantitatives, de déceler la présence de formes intégrées de HPV. L'utilisation d'un test de PCR quantitatif en temps réel utilisant une cible génomique qui demeure intacte durant l'intégration (E6) et une cible sujette à délétion (E2) a permis non seulement d'établir la nature des infections de la présente cohorte, mais aussi de mesurer la charge de HPV-16 intégré dans les échantillons obtenus. Ainsi, la présence de formes intégrées de HPV-16 dans des lésions cervicales de haut grade a été démontrée (67).

Dans la présente étude, on démontre clairement une augmentation de la charge intégrée dans les échantillons de lésions de haut grade et de bas grade, comparativement aux échantillons normaux. De plus, les lésions de haut grade conservent une charge intégrée supérieure à celle des échantillons normaux lorsque la charge virale est inférieure à  $10^7$  copies HPV/ $\mu$ g d'ADN humain. Cela va de pair avec notre hypothèse qui suggère qu'une haute charge intégrée puisse causer un niveau d'expression élevé des oncoprotéines E6 et E7, bien que l'expression protéique n'ait pas pu être mesurée dans la présente étude. Par contre, la présence de formes virales intégrées dans des échantillons normaux et de lésions de bas grade est contraire à l'hypothèse de départ identifiant l'intégration virale comme un marqueur de lésions précancéreuses de haut grade et de lésions cancéreuses. Cela indique que l'intégration de HPV-16 survient avant la présence de changements précancéreux, tel que rapporté précédemment dans le cas de lésions de bas grade, ce qui représente possiblement un point de non-retour dans la progression des lésions

(27). De même que pour la charge virale, on observe un chevauchement entre les charges intégrées des différents grades de lésions, rendant difficile l'utilisation d'un tel test comme outil clinique. Une étude faite avec des femmes recrutées au Canada et au Brésil (Ludwig-McGill cohort study), corrobore nos résultats : une charge élevée de virus intégré est associée à la présence de lésions cervicales (110). Cette étude démontre également la présence de formes intégrées dans les spécimens normaux, toutefois dans des proportions moins grandes que dans les spécimens de lésions cervicales. Tel que dans notre étude, l'association entre les lésions et la charge de virus intégré est plus forte pour les échantillons ayant une charge virale supérieure à  $10^7$  copies ADN de HPV-16/ $\mu\text{g}$  d'ADN humain. Cependant, cette étude n'inclut pas l'utilisation de contrôles internes afin de dépister de potentiels inhibiteurs, ce qui diminue en partie la puissance des analyses effectuées.

Certains variants de HPV-16 sont associés à la persistance des infections et à un risque élevé de développement de lésions (28;55;93). Néanmoins, l'étude comporte trop peu de spécimens de variants africains et asiatiques pour permettre d'évaluer la présence d'une telle association. Malgré le faible nombre de variants non européens, nous avons tout de même pu observer que les charges virales des variants asiatiques sont plus basses que les charges de variants européens. Cela va de pair avec des résultats publiés précédemment, démontrant des charges virales plus basses des variants asiatiques, influençant à la baisse la persistance des infections (93).

Plusieurs études portant sur la charge virale des papillomavirus ont été effectuées chez des femmes séropositives pour le VIH, mais seulement deux études utilisant un protocole de PCR en temps réel ont su démontrer une association entre la charge virale des HPV et le grade des lésions cervicales (53;95). Par le passé, certaines études ont démontré que les individus séropositifs pour le VIH ont des charges virales de HPV plus élevées que les individus séronégatifs pour le VIH (26;45;53;74;92;97). Nous n'avons pas été en mesure de déterminer la présence d'une telle association, étant donné le faible nombre de participantes séronégatives.

Peu d'études ont évalué les effets de l'immunosuppression causée par le VIH sur les infections causées par HPV. Deux études ont précédemment rapporté des charges virales de HPV supérieures chez les patients ayant un taux de lymphocytes T CD4+ inférieur à 200 cellules par  $\mu\text{l}$ , ce qui suggère un état avancé d'immunosuppression (66;95). La présente étude ne démontre qu'une très faible association entre le taux de lymphocytes T CD4+ et la charge virale de HPV-16, tel que rapporté précédemment (53). En effet, le niveau de corrélation négative trouvé alors était, quoique statistiquement significatif, très faible et n'a pas été retrouvé de façon constante dans les études subséquentes. Contrairement à notre hypothèse de départ voulant que l'état du système immunitaire des individus joue un rôle dans la défense contre les papillomavirus, une récente étude a démontré que l'association entre les lymphocytes T CD4+ et la prévalence et l'incidence des infections est plus faible pour HPV-16 que pour les autres types de HPV, suggérant une évasion du système immunitaire par HPV-16 (80). L'histoire naturelle des lésions cervicales et la charge virale de HPV-16 n'ont pu être évaluées en fonction d'une restauration du système immunitaire due au HAART, car les participantes à l'étude ont été recrutées avant les débuts de la trithérapie antirétrovirale.

## CONCLUSIONS

L'étude effectuée ici est basée sur l'utilisation d'un protocole de PCR en temps réel afin de mesurer les charges virales de HPV-16 dans des échantillons cliniques. Dans un premier temps, nous démontrons de façon claire la nécessité de normaliser le contenu cellulaire des échantillons, puis d'évaluer la présence d'inhibiteurs potentiels d'amplification. Il importe non seulement d'utiliser des contrôles internes, mais il faut en élaborer pour chacune des cibles à quantifier, étant donné l'inhibition différentielle de toutes les paires d'amorces utilisées. Il s'agit de deux facteurs très importants pouvant induire des erreurs considérables lorsque des tests purement quantitatifs sont effectués.

Un des objectifs principaux de l'étude était d'évaluer l'association entre la charge virale de HPV-16 des échantillons et le grade des maladies cervicales. La charge virale de HPV-16 augmente de façon significative lorsque le grade des lésions augmente. Toutefois, nous observons un tel chevauchement entre les valeurs de charges virales, qu'il est impossible d'évaluer le risque de progression ou développement de SIL uniquement avec l'obtention d'un spécimen. De tels chevauchements obtenus malgré l'utilisation d'un test quantitatif peuvent être à l'origine des controverses concernant l'utilité des charges virales en tant que marqueur épidémiologique. De plus, cela remet en question l'utilité des mesures de charges virales comme outil clinique. Les variations de charges virales durant un suivi à long terme pourraient être utiles et devraient être investiguées ultérieurement.

Nous avons obtenu des résultats similaires en mesurant la charge intégrée de HPV-16. L'utilité de l'intégration en tant que marqueur épidémiologique semble donc également controversée. La présence de formes intégrées de HPV-16 dans des échantillons normaux offre une autre vision du processus de carcinogénèse induite par les papillomavirus.

Bien que nous n'ayons pas démontré d'association significative entre la charge virale et la persistance de HPV-16 définie arbitrairement comme une infection durant plus d'un an, on peut observer une durée d'infection moindre chez les femmes qui ont une charge virale inférieure à  $10^7$  copies HPV/ $\mu$ g d'ADN humain. Cela suggère que la clairance virale est favorisée lors d'une réplication virale moins active, que les infections évaluées avec une basse charge virale commençaient déjà à être éradiquées, ou que la réplication virale était moindre car mieux contrôlée par le système immunitaire.

Nous avons démontré, lors de la présente étude, qu'une immunosuppression causée par une infection au VIH ne semble pas affecter les infections causées par HPV-16. Ces observations corroborent les données d'une étude précédente qui suggère une évasion du système immunitaire par HPV-16 (80).

L'ensemble des résultats de la présente étude semble indiquer que de tous les facteurs impliqués dans la progression des lésions cervicales, le plus significatif est la charge virale. Toutefois, les chevauchements observés rendent difficile l'évaluation du risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses.



## ANNEXE

1. Quantification des cibles génomiques virales et humaines selon des courbes standard

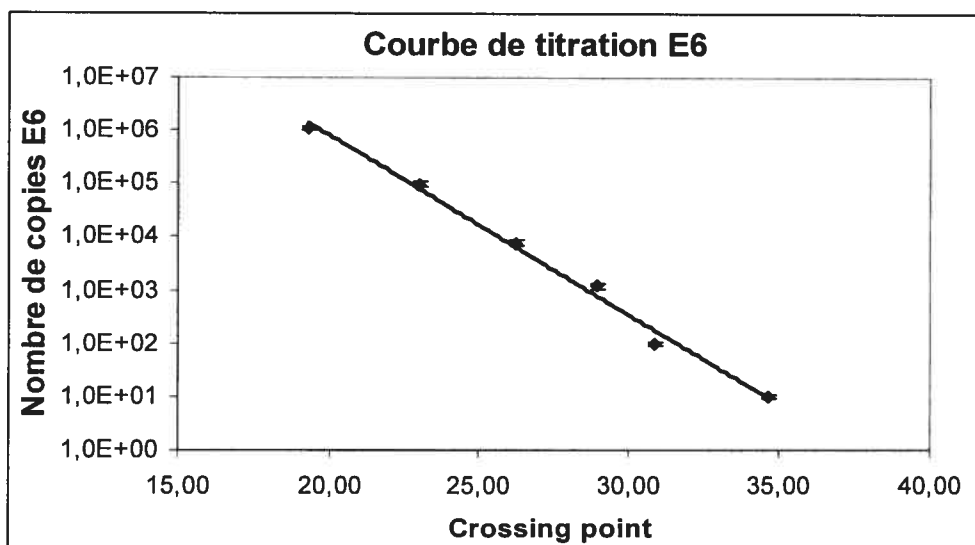


Figure 1: Courbe de titration de la cible génomique virale E6. Les différentes concentrations ont été testées en duplicata et dans 75 ng d'ADN génomique humain (Roche Molecular Biochemicals).

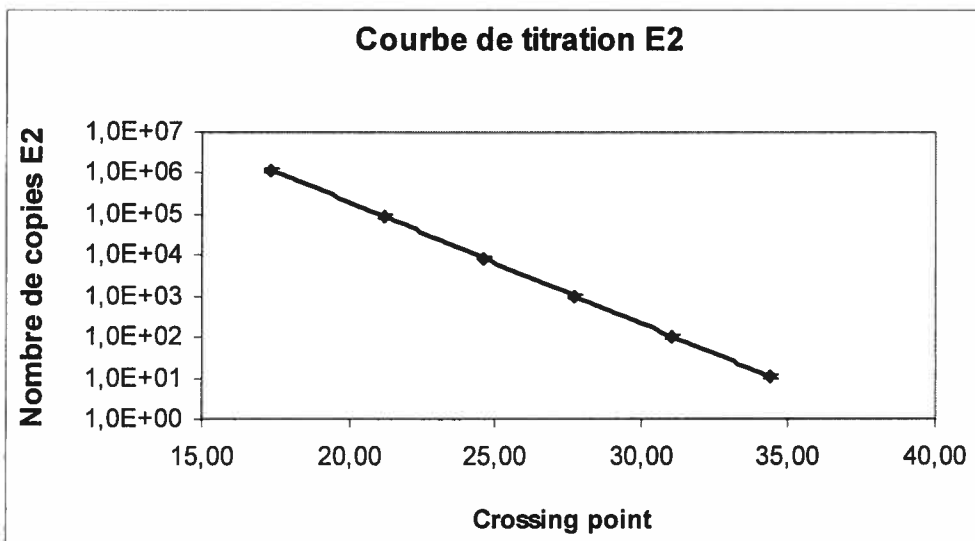


Figure 2: Courbe de titration de la cible génomique virale E2. Les différentes concentrations ont été testées en duplicata et dans 75 ng d'ADN génomique humain (Roche Molecular Biochemicals).

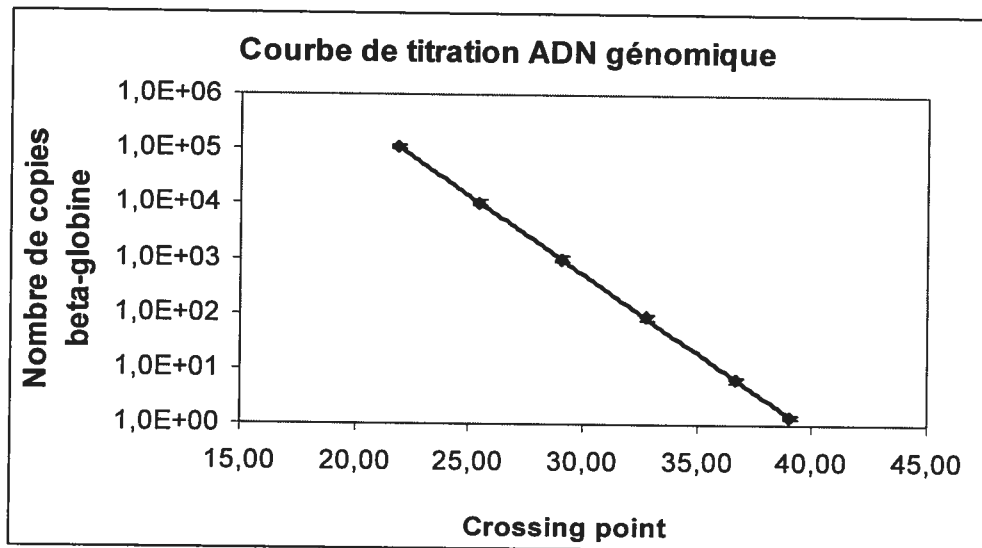


Figure 3: Courbe de titration d'ADN génomique humain (Roche Molecular Biochemicals). Les différentes concentrations ont été testées en duplicata.

## 2. Évaluation de la charge de HPV-16 intégrée au génome humain

En raison d'une délétion dans le gène viral E2, il est possible de mesurer la charge intégrée de HPV-16 en soustrayant la charge obtenue pour E2 à la charge E6 [67]. Bien que non spécifique, la délétion a fréquemment lieu dans la région centrale flexible liant le domaine de liaison à l'ADN au domaine d'activation. Puisque le gène E6 demeure intact durant l'intégration de l'ADN viral au génome humain, la valeur obtenue pour E6 représente la charge virale totale.

Afin de déterminer les quantités d'ADN viral intégré, des courbes de titration ont été faites, utilisant différentes quantités du plasmide pHPV16, qui contient tous les gènes de HPV-16. Afin de recréer des formes intégrées et des formes épisomales, le plasmide a subi une digestion enzymatique dans la région de E2 sujette à délétion. Le plasmide digéré a été amplifié en présence de plasmide intact, afin de toujours obtenir 1000 copies de E6 et un nombre croissant de copies de E2, selon les quantités données dans la table 1.

Plasmide intact (nombre de copies)	0	200	400	600	800	1000
Plasmide digéré (nombre de copies)	1000	800	600	400	200	0
E6 (nombre de copies)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
E2 (nombre de copies)	0	200	400	600	800	1000

Table 1. Courbes de titration de plasmide pHPV16 intact et ayant subi une digestion au niveau du gène E2.

L'expérience a été faite à 6 reprises, et la signification des différences a été obtenue par un test de t fait sur les valeurs moyennes obtenues. Les différences sont significatives au-delà de 20% de formes intégrées dans une infection. Il s'agit donc du seuil qui a été utilisé pour déterminer les charges intégrées.

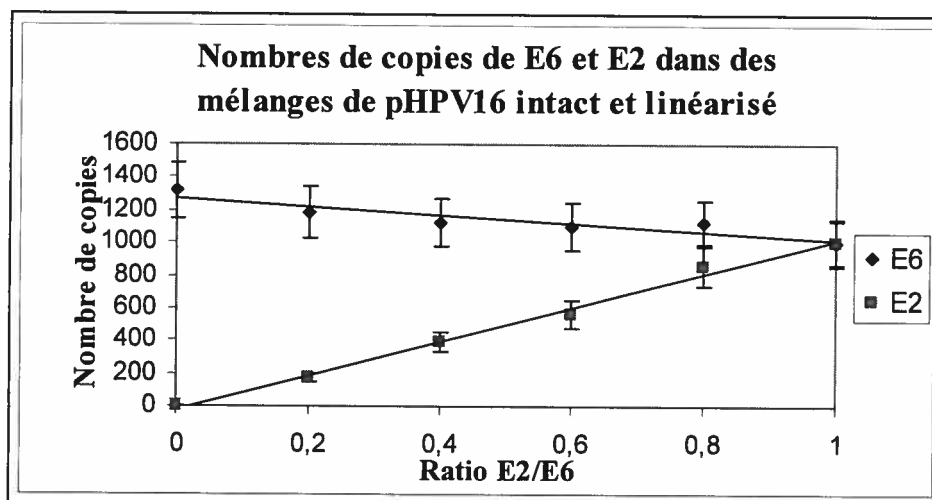


Figure 4: Nombre de copies de E2 et E6 dans les mélanges de pHPV16 intact et linéarisé.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A et al. Prevalence, Incidence, and Type-Specific Persistence of Human Papillomavirus in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Positive and HIV-Negative Women. *Journal of Infectious Diseases* 184, 682-690. 2001.
2. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and Risk for Development of Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Journal of the American Medical Association* 285, 47-51. 2001
3. Badal V, Chuang LSH, Tan EHH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM et al. CpG Methylation of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Cancer Cell Lines and in Clinical Specimens: Genomic Hypomethylation Correlates with Carcinogenic Progression. *Journal of Virology* 77, 6227-6234. 2003.
4. Badaracco G, Venuti A, Sedati A and Marcante ML. HPV16 and HPV18 in Genital Tumors: Significantly Different Levels of Viral Integration and Correlation to Tumor Invasiveness. *Journal of Medical Virology* 67, 574-582. 2002.
5. Beskow AH and Gyllesten UB. Host genetic control of HPV 16 titer in carcinoma in situ of the cervix uteri. *International Journal of Cancer* 101, 526-531. 2002.
6. Bosch FX, Castellsague X, Munoz N et al. Male Sexual Behaviour and Human Papillomavirus DNA: Key Risk Factors for Cervical Cancer in Spain. *Journal of the National Cancer Institute* 88, 1060-1067. 1996.
7. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ and Shah KV.. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology* 55, 244-265. 2002
8. Brisson J, Bairati I, Morin C, Bouchard C, Christen A, Bernard P et al. Determinants of Persistent Detection of Human Papillomavirus DNA in the Uterine Cervix. *The Journal of Infectious Diseases* 173, 794-799. 1996.
9. Calhoun ES, McGovern RM, Janney CA, Cerhan JR, Iturria SJ, Smith DI et al. Host Genetic Polymorphism Analysis in Cervical Cancer. *Clinical Chemistry* 48, 1218-1224. 2002.
10. Cavuslu S, Mant C, Starkey WG, Bible JM, Biswas C, Kell B et al. Analytic sensitivities of hybrid-capture, consensus and type-specific polymerase chain reactions for the detection of human papillomavirus type 16 DNA. *Journal of Medical Virology* 59, 319-324. 1996.

11. Chan SY, Delius H, Halpern AL and Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *Journal of Virology* 69, 3074-3083. 1995.
12. Chow LT and Broker TR. Papillomavirus DNA Replication. *Intervirolgy* 37, 150-158. 1994.
13. Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C and Lorenzato M. Human Papillomavirus Testing in Primary Screening for the Detection of High-Grade Cervical Lesions: a Study of 7932 Women. *British Journal of Cancer* 84, 1616-1623. 2001.
14. Coker AL, Bond SM, Williams A, Gerasimova T and Pirisi L. Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. *Cancer Detection and Prevention* 26, 121-128. 2002.
15. Cullen AP, Reid R, Campion M and Lörincz A. Analysis of the Physical State of Different Papillomavirus DNAs in Intraepithelial and Invasive Cervical Neoplasm. *Journal of Virology* 65(2), 606-612. 1991.
16. Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *International Journal of Cancer* 106, 396-403. 2003.
17. de Viliers EM. Taxonomic Classification of Papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 12, 57-63. 1995.
18. Del Mistro A, Bertorelle R, Franzetti M, Cattelan A, Torrisi A, Giordani MT et al. Antiretroviral Therapy and the Clinical Evolution of Humam Papillomavirus - Associated Genital Lesions in HIV-Positive Women. *HIV/AIDS* 38, 737-742. 2004.
19. Desaintes C and Demeret C. Control of Papillomavirus DNA Replication and Transcription. *Seminars in Cancer Biology* 7, 339-347. 1996.
20. do Horto dos santos OL, de Vasconcelos ME, de Salles Lopes APTA, de Paula FA and Calvacanti SMB. HPV 15 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *Sao Paulo Medical Journal* 121, 67-71. 2003.
21. Dolei A, Curreli S, Marongiu P, Pierangeli A, Gomes E, Bucci M et al. Human immuodeficiency virus infection in vitro activates naturally integrated human papillomavirus type 18 and induces synthesis of the L1 capsid protein. *Journal of General Virology* 80, 2937-2944. 1999.
22. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K and Wright TC. Incidence of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions in HIV-

- Infected Women. *Journal of the American Medical Association* 283(8), 1031-1037. 2000.
23. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K and McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology* 71, 2449-2456. 1997.
  24. Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM et al. Inhibition of Apoptosis in Chlamydia-infected Cells; Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release and Caspase Activation. *Journal of experimental medicine* 187, 487-496. 1998.
  25. Flores ER, Allen-Hoffmann L, Lee D and Lambert PF. The Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene Is Required for the Productive Stage of the Viral Life Cycle. *Journal of Virology* 74, 6622-6631. 2000.
  26. Flores ER and Lambert PF. Evidence for a Switch in the Mode of Human Papillomavirus Type 16 DNA Replication during the Viral Life Cycle. *Journal of Virology* 71, 7167-7179. 1997.
  27. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli M et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *Journal of Clinical Pathology* 56, 532-536. 2003.
  28. Giannoudis A, van Duin M, Snijders PJF and Herrington CS. Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *British Journal of Cancer* 84, 1058-1063. 2001.
  29. Giuliano AR, Papenfuss M, Brown de Gala EM, Feng J, Abrahamsen M and Denman C. Risk Factors for Squamous Intraepithelial Lesions (SIL) of the Cervix among Women Residing at the US-Mexico Border. *International Journal of Cancer* 109, 112-118. 2004.
  30. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harris R, Baldwin S, Papenfuss MR et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes and Control* 13, 839-846. 2002.
  31. Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R and Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods* 112, 23-33. 2003.
  32. Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME et al. A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12, 477-484. 2003.

33. Heard I, Palefsky JM and Kazatchkine MD. The impact of HIV antiviral therapy on human papillomavirus (HPV) infections and HPV-related diseases. *Antiviral Therapy* 9, 13-22. 2004.
34. Heard I, Schmitz V, Costagliola D, Orth G and Kazatchkine MD. Early regression of cervical lesions in HIV-seropositive women receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 12, 1459-1464. 1998.
35. Heard I, Tassie JM, Kazatchkine MD and Orth G. Highly active antiretroviral therapy enhances regression of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive women. *AIDS* 16, 1799-1802. 2002.
36. Hernadi Z, Szarka K, Sapy T, Keaszani Z, Veress G and Poka R. The prognostic significance of HPV-16 genome status of the lymph nodes, the integration status and p53 genotype in HPV-16 positive cervical cancer: a long term follow-up. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 110, 205-209. 2003.
37. Ho GYF, Palan PR, Basu J, Romney SL, Kadish AS, Mikhail M et al. Viral Characteristics of Human Papillomavirus Infection and Antioxidant Levels as Risk Factors for Cervical Dysplasia. *International Journal of Cancer* 78, 594-599. 1998.
38. Hopman AHP, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *Journal of Pathology* 202, 23-33. 2004.
39. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ and Gores GJ. Inflammatory Cytokines Induce DNA damage and Inhibit DNA repair in Cholangiocarcinoma Cells by a Nitric Oxide-dependent Mechanism. *Cancer Research* 60, 184-190. 2000.
40. Jeon S and Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92, 1654-1658. 1995.
41. Josefsson AM, Magnusson PKE, Ylalito N, Sörenson P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK et al. Viral load of human papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case control study. *Lancet* 355 2189. 2000.
42. Kabsch K and Alonso A. The Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Impairs TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in HaCaT Cells by Different Mechanisms. *Journal of Virology* 76, 12162-12172. 2002.
43. Kim CJ, Um SJ, Kim EJ, Park TC, Kim SJ, Namkoong SE and Park SE. Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous oestrogen in cervical cancer cells. *International Journal of Gynecological Cancer* 10, 157-164. 2000.

44. Kjellberg L, Wang Z, Wiklund F, Edlund K, Angström T, Lenner P et al. Sexual behaviour and papillomavirus exposure in cervical intraepithelial neoplasia: a population-based case-control study. *Journal of General Virology* 80, 391-398. 1999.
45. Klein RS, Ho GYF, Vermund SH, Fleming I and Burk RD. Risk Factors for Squamous Intraepithelial Lesions on Pap Smear in Women at Risk for Human Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases* 170, 1404-1409. 2004.
46. Koskela P, Anttila T, Björge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M et al. Chlamydia Trachomatis Infection as a Risk Factor for Invasive Cervical Cancer. *International Journal of Cancer* 85, 35-39. 2000.
47. Kuo SR, Liu JS, Broker TR and Chow LT. Cell-Free replication of the Human Papillomavirus DNA with Homologous Viral E1 and E2 Proteins and Human Cell Extracts. *Journal of Biological Chemistry* 269, 24058-24065. 1994.
48. Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tanizawa O and Hakura A. Regulation of Early Gene Expression of Human Papillomavirus Type 16 by Inflammatory Cytokines. *Virology* 200, 130-139. 1994.
49. Kyo S, Klumpp DJ, Inoue M, Kanaya T and Laimins LA. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *Journal of General Virology* 78, 401-411. 1997.
50. Lacey JV, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD et al. Oral Contraceptives as Risk Factors for Cervical Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 8, 1079-1085. 1999.
51. Lefèvre J, Hankins C, Pourreaux K, Voyer H, Coutlée F and The Canadian Women's HIV Study Group. Real-time PCR assays using internal controls for quantitation of HPV-16 and  $\beta$ -globin DNA in cervicovaginal lavages. *Journal of Virological Methods* 114, 135-144. 2003.
52. Lefèvre J, Hankins C, Pourreaux K, Voyer H, The Canadian Women's HIV Study Group and Coutlée F. Prevalence of Selective Inhibition of HPV-16 DNA Amplification in Cervicovaginal Lavages. *Journal of Medical Virology* 72, 132-137. 2004.
53. Lefevre J, Hankins C, Money D, Rachlis A, Pourreaux K, CWHS and Coutlée F. Human Papillomavirus Type 16 Viral Load Is Higher in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Women with High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Than in Those with Normal Cytology Smears. *Journal of Clinical Microbiology* 42. 2004. (in press)



54. Levi JE, Fernandes ., Tateno AF, Motta E, Lima LP, Eluf-Neto J and Pannuti CS. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecologic Oncology* 92, 225-231. 2004.
55. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, and Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *International Journal of Cancer* 69, 364-368. 1996.
56. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 360, 228-228. 2002.
57. Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J and Wojcikowski C. Human Papillomavirus Type 16 Status in Cervical Carcinoma Cell Dna Assayed by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 608-612. 2003.
58. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PSA, Franco EL, Villa LL and Petzl-Erler ML. Major Histocompatibility Complex Class II Polymorphisms and Risk of Cervical Cancer and Human Papillomavirus Infection in Brazilian Women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9, 1183-1191. 2000.
59. Martin LG, Demers GW and Galloway DA. Disruption of the G1/S Transition in Human Papillomavirus Type 16 E7-Expressing Human Cells Is Associated with Altered Regulation of Cyclin E. *Journal of Virology* 72, 975-985. 1998.
60. Minkoff H, Ahdieh L, Massad LS, Anastos K, Watts DH, Melnick S et al. The effect of highly active antiretroviral therapy on cervical cytologic changes associated with oncogenic HPV among HIV-infected women. *AIDS* 15, 2157-2164. 2001.
61. Moscicki AB, Burt VG, Kanowitz S, Darragh T and Shiboski S. The Significance of Squamous Metaplasia in the Development of Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions in Young Women. *Cancer* 85, 1139-1144. 1999.
62. Muller M, Gissmann L, Cristiano RJ, Sun XY, Frazer IH, Jenson AB et al. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *Journal of Virology* 69, 948-954. 1995.
63. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359, 1093-1101. 2002.
64. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology* 19, 1-5. 2000.

65. Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S and Kudo T. Rapid and Sensitive Detection of Physical Status of Human Papillomavirus Type 16 DNA by Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 863-867. 2002.
66. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P et al. Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection in Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV)-Positive and High-Risk HIV-Negative Women. *Journal of the National Institute of Cancer* 91, 226-236. 1999.
67. Peitsaro P, Johansson B and Syrjänen S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 886-891. 2002.
68. Pett MR, Lazawi WOF, Roberts I, Dowen S, Smith DI, Stanley MA and Coleman N. Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Keratinocytes. *Cancer Research* 64, 1359-1368. 2004.
69. Piketti C, Darragh TM, Heard I, Da Costa M, Bruneval P, Kazatchkine MD and Palefsky JM. High Prevalence of Anal Squamous Intraepithelial Lesions in HIV-Positive Men Despite the Use of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Sexually Transmitted Diseases* 31, 96-99. 2004.
70. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJLM, Snijders P, Bosch FX et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes and Control* 14, 805-814. 2003.
71. Scheffner R, Werness J, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM. The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promote the Degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136. 1990.
72. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA et al. Persistent Human Papillomavirus Infection as a Predictor of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of the American Medical Association* 286, 3106-3114. 2001.
73. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL and Franco EL. Viral Load as a Predictor of the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *International Journal of Cancer* 103, 519-524. 2003.
74. Shah KV, Solomon L, Daniel R, Cohn S and Vlahov D. Comparison of PCR and Hybrid Capture Methods for Detection of Human Papillomavirus in Injection Drug-using Women at High-Risk of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 517-519. 1997.

75. Sherman ME, Wnag SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R and Shiffman M. Determinants of Human Papillomavirus Load among Women with Histological Cervical Intraepithelial Neoplasia 3: Dominant Impact of Surrounding Low-Grade Lesions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12, 1038-1044. 2003.
76. Smith J, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines. *Journal of Infectious Diseases* 185, 324-331. 2002.
77. Southern SA and Herrington CS. Disruption of Cell Cycle Control by Human Papillomaviruses with Special Reference to Cervical Carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer* 10, 263-274. 2000.
78. Stünkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor MJ and Bernard HU. Nuclear Matrix Attachment Regions of Human Papillomavirus Type 16 Repress or Activate the E6 Promoter, Depending on the Physical State of Viral DNA. *Journal of Virology* 74, 2489-2501. 2000.
79. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393, 229-234. 1998.
80. Strickler HD, Palefsky JM, Shah KV, Anastos K, Klein RS, Minkoff H et al. Human Papillomavirus Type 16 and Immune Status in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Women. *Journal of the National Cancer Institute* 95, 1062-1071. 2003.
81. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP and Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 76, 41-47. 2002.
82. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER et al. Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *Journal of Clinical Microbiology* 37(4), 1030-1034. 1999.
83. Tan SH, Baker CC, Stunkel W and Bernard HU. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology* 305, 486-501. 2003.
84. Tan Wei, Felber BK, Zolotukhin AS, Pavlakis GN and Schwartz S. Efficient Expression of the Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in Epithelial Cells by Using rev and the Rev-Responsive Element of Human Immunodeficiency Virus or the cis-Acting Transactivation Element of Simian Retrovirus Type 1. *Journal of Virology* 69, 5607-5620. 1995.

85. Thomas Miranda and Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with BAK are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *Journal of General Virology* 80, 1513-1517. 1999.
86. Ueda Y, Enomoto T, Miyatake T, Ozaki K, Yoshizaki T, Kanao H et al. Monoclonal Expansion with integration of High-Risk type Human Papillomavirus is an Initial Step for Cervical Carcinogenesis; Association of Clonal Status and Human Papillomavirus Infection with Clinical Outcome in Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Laboratory Investigation* 80, 1517-1527. 2003.
87. Van Duin M, Snijders PJF, Schrijnemakers HFJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MAE et al. Human Papillomavirus 16 Load in Normal and Abnormal Cervical Scrapes: An Indicator of CIN II/III and Viral Clearance. *International Journal of Cancer* 98, 590-595. 2002.
88. Van Duin M, Snijders PJF, Vossen MTM, Klaassen E, Voorhost F, Verheijen RHM et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of General Virology* 81, 317-325. 2000.
89. Veldman T, Horikawa I, Barret JC and Schlegel R. Transcriptional Activation of the telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. *Journal of Virology* 75, 4467-4472. 2001.
90. Veldmann T, X Liu and Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proceedings of the National Academy of Science* 100, 8211-8216. 2003.
91. Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L and Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *Journal of General Virology* 80, 1035-1043. 1999.
92. Vernon SD, Reeves WC, Clancy KA, Laga M, St-Louis M and Gary HE. A Longitudinal Study of Human Papillomavirus DNA Detection in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Seropositive and -Seronegative Women. *Journal of Infectious Diseases* 169, 1108-1112. 1994.
93. Villa LL., Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T and Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology* 81, 2959-2968. 2000.
94. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, Angström T, Anttila T, Bergman F et al. A Population-Based Prospective Study of Chlamydia trachomatis Infection and Cervical Carcinoma. *International Journal of Cancer* 101, 371-374. 2002.

95. Weissenborn SJ, Funke AM, Hellmich M, Mallmann P, Fuschs PG and Pfister HJ. Oncogenic Human Papillomavirus DNA Loads in Human Immunodeficiency Virus-Positive Women with High-Grade Cervical Lesions Are Strongly Elevated. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2767. 2003.
96. Wheeler C. and Icenogle J. A Closer Look at Papillomavirus Variants. *Papillomavirus variants III*:45-46. 1995.
97. Womack SD, Chirenje ZM, Gaffikin L, Blumenthal PD, McGrath JA and Chipato T. HPV-based cervical cancer screening in a population at high-risk for HIV infection. *International Journal of Cancer* 85, 206-210. 2000.
98. Woodworth CD, McMullin E, Iglesias M and Plowman GD. Interleukin 1 $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92, 2840-2844. 1995.
99. Wu Zhiwei, Chen Z and Phillips DM. Human Genital Epithelial Cells Capture Cell-Free Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Transmit the Virus to CD4+ Cells: Implications for Mechanisms of Sexual Transmission. *The Journal of Infectious Diseases* 188, 1473-1482. 2003.
100. Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Lee SK et al. Acquisition and Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Variant Infection among a Cohort of Female University Students. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11, 343-351. 2002.
101. Yamada T, Manos MM, J Peto, Greer CE, Munoz N, Bosch FX and Wheeler CM. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Perspective. *Journal of Virology* 71, 2463-2472. 1997.
102. Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A and Jenison SA. Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in United States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6, L2 and L1 Coding Segments. *Journal of Virology* 69, 7743-7753. 1995.
103. Ylitalo N, Sørensen P, Josefsson AM, Magnusson PKE, Andersen PK, Pontén J et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355, 2194-98. 2000.
104. Zaho C, Tan W, Sokolowski M and Schwartz S. Identification of nuclear and cytoplasmic proteins that interact specifically with an-AU-rich cis-acting inhibitory sequence in the 3' untranslated region of human papillomavirus type 1 late mRNAs. *Journal of Virology* 70, 3659-3667. 1996.
105. Zehbe I, Mytilineos J, Wikström I, Henriksen R, Edler L and Tommassino M. Association Between Human Papillomavirus 16 E6 Variants and Human

LEukocyte Antigen Class I Polymorphism in Cervical Cancer of Swedish Women. *Human Immunology* 64, 538-542. 2003.

106. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Lutz E et al. p53 Codon 72 Polymorphism and Various Human Papillomavirus 16 E6 Genotypes Are Risk Factors for Cervical Cancer Development. *Cancer Research* 61, 608-611. 2001.

### **Manuels de référence**

107. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SE. *Fundamental Virology* fourth edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
108. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease*, 5<sup>th</sup> edition, Saunders Company, 1994.
109. Fields BM, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Virology*, Third Edition. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1996

### **Conférences**

110. Trevisan A, Schlecht NF, Mahmud SM, Ferenczy A, Villa LL and Franco EL, Role of integration of HPV-16 DNA in the natural history of cervical neoplasm, 21st International Papillomavirus Conference 2004, abstract no. 617

### **Sites internet**

Organisation mondiale de la santé  
<http://www.who.int>

Roche Applied Science  
[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)

<http://web2.deu.edu.tr>