

Université de Montréal

**Polymorphisme de la capside des papillomavirus appartenant à l'espèce
9 des alphapapillomavirus**

par
Gilbert Cornut

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de médecine

Manuscrit soumis à la Faculté des Études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Microbiologie et Immunologie

Août 2009

© Gilbert Cornut, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
**Polymorphisme de la capsidie des papillomavirus appartenant à l'espèce
9 des alphapapillomavirus**

présenté par :
Gilbert Cornut

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Lemay Ph.D.
président-rapporteur

François Coutlée MD
directeur de recherche

Denis Soulières MD
co-directeur de recherche

Caroline Alfieri Ph.D.
membre du jury

Résumés

The L1 gene encodes for the major capsid protein of human papillomaviruses (HPV). There is limited information on the polymorphism of L1 for types related to HPV-16. This report explores the polymorphism of L1 in phylogenetically-related types 31, 33, and 35 compared to HPV-16. Genital specimens collected from 732 HIV-seropositive and 323 HIV-seronegative women were screened for HPV DNA with consensus L1 PCR. Cervical samples positive for HPV-16 (n=74), -31 (n=78), -33 (n=37), and -35 (n=58) were further characterized by PCR-sequencing of the complete L1 gene. The number of nucleotide substitutions within L1 ranged from 19 for HPV-33 to 52 for HPV-31. The ratio of the number of variants/number of isolates tested was higher for HPV31 (56.4%, $p=0.05$) and HPV-35 (60.3%, $p=0.04$) compared to HPV-16 (40.5%), while this ratio was lower for HPV-33 (24.3%), although not significantly ($p=0.14$). The maximal distance between HPV variants was greater in the five putative surface-exposed loops of L1 than in sequences outside the loops ($p<0.01$). Synonymous variations were encountered in 1.7% (95% CI 1.1-2.3) of nucleotides inside the L1 loops and 2.4% (95% CI 1.2-3.7) of nucleotides outside the L1 loops. Non-synonymous variations were encountered in 1.8% (95% CI 1.1-2.5) of nucleotides within the L1 loops and 0.2% (95% CI 0-0.4) of nucleotides outside the loops. dN/dS ratios were below 1.0 in extra-loop and intra-loop regions, but they were lower in extra-loop regions. These results suggest that sequences within and outside the hypervariable loops of L1 were under selective constraint.

Key Words : HPV, capsid, polymorphism, cancer, vaccine, HPV-16

Le gène L1 encode pour la protéine majeure de la capside des papillomavirus humains (VPH). L'information relative au polymorphisme de L1 pour les types autres que VPH-16 est jusqu'ici limitée. Cet ouvrage explore le polymorphisme de L1 en comparant les séquences des types phylogénétiquement apparentés VPH-31, -33, -35 à VPH-16. Des spécimens génitaux recueillis de 732 femmes VIH-séropositives et 323 VIH-séronégatives ont été criblés à la recherche d'ADN de VPH par PCR consensus au niveau du gène L1. Les échantillons positifs pour VPH-16 (n=74), -31 (n=74), -33 (n=37) et -35 (n=58) étaient analysés par PCR-séquençage pour la totalité du gène L1. Le nombre de nucléotides substitués pour L1 variait de 19 pour VPH-33 à 52 pour VPH-31. Le rapport du nombre de variantes sur le nombre d'isolats testés était plus élevé pour VPH-31 (56.4%, p=0.05) et VPH-35 (60.3%, p=0.04) comparativement à VPH-16 (40.5%), alors que ce ratio était inférieur pour VPH-33 mais sans différence statistiquement significative (24.3%, p=0.14). La distance entre les variantes était plus grande à l'intérieur des cinq boucles présumément exposées à la surface de la protéine L1 que dans la séquence à l'extérieur (p<0.01). Des variations synonymes étaient observées chez 1.7% (95% CI 1.1-2.3) des nucléotides intra-boucles et 2.4% (95% CI 1.2-3.7) de ceux extra-boucles. Les variations non-synonymes étaient rencontrées pour 1.8% (95% CI 1.1-2.5) des nucléotides intra-boucles et 0.2% (95% CI 0-0.4) pour les nucléotides extra-boucles. Les ratios dN/dS étaient inférieurs à 1.0 pour les régions extra-boucles et encore davantage pour les régions intra-boucles. Ces résultats suggèrent que les séquences des régions hypervariables de L1 ont été sélectionnées positivement.

Mots clés : VPH, cancer, polymorphisme, vaccin, VPH-16

Table des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	iii
Chapitre I : Papillomavirus	1
1.1 Historique	1
1.2 Phylogénie	2
1.2.1 Classification	2
1.3 Méthodes de détection	4
Chapitre II : Infection.....	7
2.1 Tropisme.....	7
2.2 Mode de répllication	8
2.2.1 Organisation génomique.....	8
2.2.2 Établissement de l'infection	9
2.2.3 Stimulation de la prolifération	10
2.2.4 Amplification du génome	12
2.2.5 Encapsidation et relâche	12
2.3 Prévalence.....	12
2.4 Modes de transmission	14
Chapitre III : Pathologie.....	16
3.1 Infection non productive.....	16
3.2 Persistance de l'infection.....	16
3.3 Cancer du col de l'utérus	17
3.3.1 Prévalence du cancer du col de l'utérus.....	19
3.3.1.1 Infection au VPH chez femme VIH+.....	20
3.3.2 Facteurs de risque	22
3.3.2.1 Facteurs exogènes.....	22
3.3.2.2 Polymorphisme chez VPH-16	24
3.3.2.3 Polymorphisme pour les types autres que VPH-16	28
3.3.2.4 Facteurs endogènes.....	28
3.4 Autres cancers anogénitaux	30
3.5 Cancers associés	32
3.6 Autres pathologies	33
Chapitre IV : Capside virale	35
4.1 Protéine L1	35
4.1.1 Structure	36
4.2 Régions hypervariables.....	38
4.2.3 Polymorphisme chez VPH-31	39
4.3 Protéine L2	39
Chapitre V : Vaccin	41
5.1 Généralités.....	41
5.2 Administration	42
5.3 Efficacité	42
5.4 Risque de sélection	43
5.5 Immunité croisée	44
5.6 Perspectives	45
Objectifs et hypothèse.....	47
Article	49
Discussion.....	78
Perspectives de projets de recherche futurs pour l'étude du polymorphisme du VPH	90
Références.....	92

Liste des abréviations

AA :	Asiatique-Américain
ACIN :	<i>Anal canal intraepithelial neoplasia</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Af :	Africain
AP-1:	<i>Activator protein 1</i>
ARN :	Acide ribonucléique
ARNc :	Acide ribonucléique complémentaire
ASCUS:	<i>Atypical squamous cell of undetermined significance</i>
CCR-2:	<i>CC-chemokine receptor-2</i>
CD4:	<i>Cluster of differentiation 4</i>
Cdk:	<i>Cyclin dependant kinase</i>
CIN :	<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
E :	Européen
E6AP :	<i>E6 asociated protein</i>
EGF:	<i>Epidemial growth factor</i>
FDA:	<i>Federal drug agency</i>
GSK:	Glaxo Smith Kline
HAART:	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HLA:	<i>Human leukocyte antigen</i>
Hsc70:	<i>70-kDa heat-shock cognate protein</i>
HSIL :	<i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
Hsp70:	<i>Heat shock protein 70</i>
HSV :	<i>Herpes simplex virus</i>
IFN:	Interféron
Il:	Interleukine
LCR :	<i>Long control region</i>
LSIL :	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NF-1 :	<i>Nuclear factor I</i>
Oct-1 :	<i>Octamer binding factor-1</i>

ORF :	<i>Open reading frame</i>
Pap :	Papanicolaou
Pb:	Paires de bases
PML:	<i>Promyelocytic leukemia</i>
Rb:	Rétinoblastome
RFLP :	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SP-1:	<i>Specificity protein 1</i>
SV-40:	<i>Simian virus 40</i>
TEF-1 :	<i>Translation elongation factor 1</i>
TEF-1:	<i>Transcription enhancer factor-1</i>
TLR:	Toll-like receptors
TNF:	<i>Tumor necrosis factor</i>
tSNARE:	<i>Target-membrane-associated-soluble N-ethylmaleimide fusion protein attachment protein (SNAP) receptor</i>
UV:	Ultraviolet
VIH:	Virus de l'immunodéficience acquise humain
VLP:	<i>Virus like particle</i>
VPH :	Virus du papillome humain
YY1:	<i>Ying Yang-1</i>

Liste des figures

Figure I : Arbre phylogénétique basé sur l'alignement de la séquence de l'ORF de la protéine L1 de 118 types de VPH-6.....	3
Figure II : Illustration schématisée du génome circulaire de 7904 paires de bases de VPH-16.....	9
Figure III : Schématisation de l'expression des gènes viraux selon le programme de différenciation cellulaire.....	10
Figure IV : Événements médiés par les protéines E6 et E7 qui stimulent la progression du cycle de réplication cellulaire.....	11
Figure V : Prévalence des types de haut et de bas risque chez les femmes âgées de 15 à 59 ans.....	13
Figure VI : Les huit types de VPH les plus communs selon la région d'origine.....	19
Figure VII : Taux d'incidence et de mortalité standardisés pour l'âge par 100 000 femmes selon la région en 2002.....	20
Figure VIII : Incidence du cancer du pénis standardisé en fonction de l'âge pour les années 1993-1997.....	31
Figure IX : Représentation de la protéine L1.....	36
Figure X : Détails structuraux d'un capsomère de VPH.....	37
Figure XI : Alignement de la séquence de la protéine L1 des types de VPH de la famille $\alpha 9$	38
Figure XII : Représentation de la variabilité de la protéine L1 de 49 types de VPH.....	39

Chapitre I : Papillomavirus

1.1 Historique

Les premières hypothèses quant à l'association entre les pratiques sexuelles et le cancer du col de l'utérus remontent à l'année 1842 alors que Rigoni Stern, de Vérone en Italie, a remarqué la différence d'incidence de ce cancer entre les femmes mariées et les religieuses (293). Une observation semblable a été effectuée en 1901 pour les femmes juives qui a conduit à l'hypothèse erronée selon laquelle la circoncision diminuerait les risques d'induire le cancer du col de l'utérus chez la femme. Des études plus récentes associent plutôt ce phénomène à des facteurs génétiques (187). Jusqu'à l'avènement des techniques de biologie moléculaire modernes, les scientifiques étaient portés à croire que les agents infectieux responsables des infections transmises sexuellement telles que la syphilis, l'herpès ou la gonorrhée étaient la cause du cancer du col de l'utérus (234). Key Bricayne a, en 1973, soulevé l'hypothèse selon laquelle les papillomavirus pourraient être à l'origine de ce type de cancer, ce qui fut confirmé un an plus tard par des expériences conduites par zur Hausen (292, 294). Celles-ci ont consisté en l'hybridation d'ARNc provenant de verrues plantaires à de l'ADN extrait de tumeurs cervicales. La présence d'une hybridation croisée entre ces extraits d'acide nucléique suggérait un lien entre ces deux pathologies. La nature virale des verrues génitales et plantaires avait été révélée au début du XXe siècle. Un engouement pour ce domaine de recherche a mené à l'identification entre les années 1980-84 des quatre types de papillomavirus les plus fréquemment rencontrés, soit VPH-6, -11, -16 et -18 (26, 71, 80, 111). Depuis, les connaissances relatives au virus et aux pathologies qui lui sont imputées n'ont cessé de s'accumuler.

La contribution du modèle animal élaboré dans les années 1930, à la compréhension de la biologie des papillomavirus n'est pas à négliger. Dr Shope a induit la maladie chez le lapin à queue blanche (Cottontail rabbit) en leur inoculant l'agent infectieux contenu dans les tumeurs de lapins sauvages ayant développé des excroissances dues au papillomavirus. Ce modèle a notamment permis d'observer la progression de lésions

bénignes vers des lésions malignes. L'étude des papillomavirus bovins qui a débuté dans les années 1920 a aussi permis d'accumuler des informations relatives à cette classe de virus (293).

1.2 Phylogénie

Les papillomavirus étaient, avec les polyomavirus, regroupés dans la famille des *Papovaviridae* en raison de caractéristiques qui leur étaient communes. Hormis une capsid non enveloppée et un génome circulaire d'ADN double brin, les caractéristiques de ces deux types de virus sont fondamentalement différentes et leur étude approfondie a mené à la scission des *Papovaviridae*. Il a donc été convenu par le Comité international de taxonomie des virus qu'il en résulterait deux familles distinctes, soit les *Papillomaviridae* et les *Polyomaviridae* (70).

1.2.1 Classification

La variété d'hôtes infectés et le grand nombre de papillomavirus recensés nécessitent une classification rigoureuse et structurée. Depuis une quinzaine d'années, celle des papillomavirus repose sur la séquence du gène L1 en raison du fait que ce gène est le plus conservé à l'intérieur de la famille. Cette dernière est subdivisée en genres selon les regroupements taxonomiques, résultats de la formation d'un arbre phylogénétique à partir des séquences alignées de L1 (Figure I). Une identité inférieure à 60% est donc observée entre les genres. Le genre α regroupe les papillomavirus qui infectent préférentiellement la région ano-génitale des humains et des primates. Les genres β , γ , μ , et ν sont retrouvés dans les lésions cutanées humaines tandis que les autres genres sont retrouvés chez les animaux. Certains genres sont à leur tour séparés en espèces qui présentent entre 60 et 70% d'identité de séquence de L1. Le VPH-31 est inclus dans l'espèce 9 du genre α qui comprend également les types -16, -33, -35, 52, -58 et -67 (70). Une différence de séquence supérieure à 10% par rapport aux isolats jusqu'ici identifiés définit un nouveau

type, alors que le sous-type consiste en un isolat de séquence L1 divergeant entre 2 et 10%. Une différence inférieure à 2% identifie une variante (70).

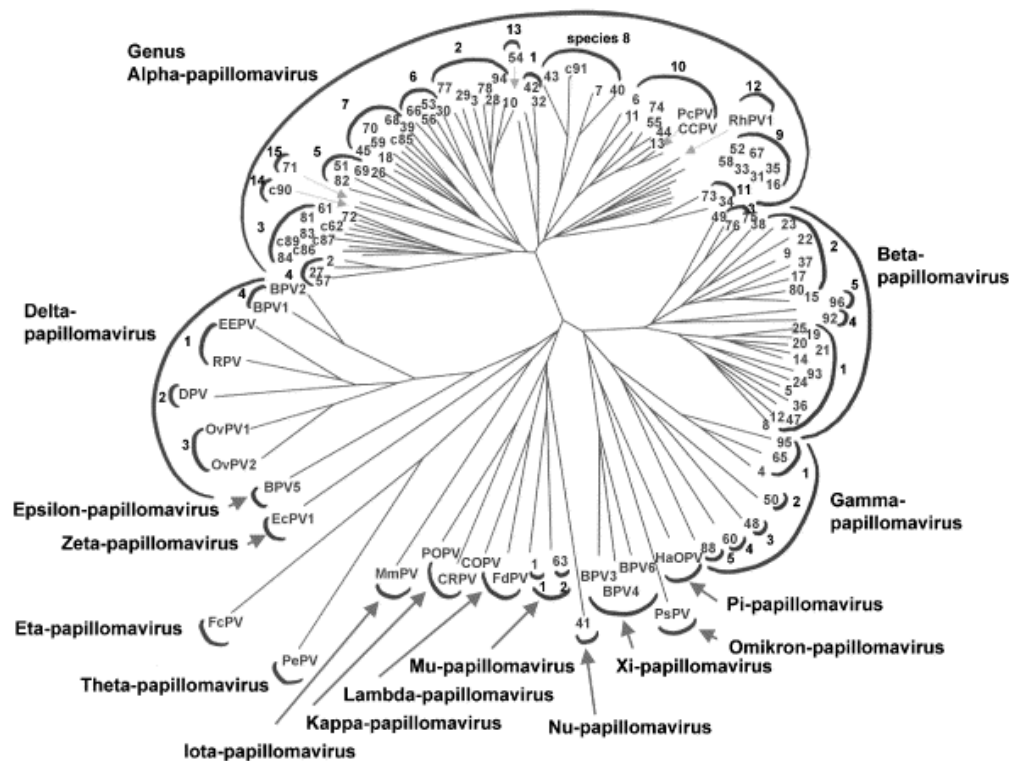


Figure I : Arbre phylogénétique basé sur l'alignement de la séquence de l'ORF de la protéine L1 de 118 types de VPH. Les demi-cercles extérieurs désignent un genre et ceux à l'intérieur délimitent une espèce. Chaque extrémité de branche identifie un type de papillomavirus; les types identifiés par un nombre infectent l'humain alors que les autres portent l'abréviation du type d'espèce qu'ils infectent.

La classification des VPH infectant préférentiellement la région ano-génitale de l'humain s'est fait en premier lieu en fonction de leur profil d'hybridation (216). Puis, en 1992, van Ranst a proposé un arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de la protéine E6 de 28 types de VPH et qui, somme toute, reflétait les observations faites au niveau clinique (265). Parmi les virus étudiés, un fort potentiel oncogénique a été attribué à 12 d'entre eux qui, avec les virus subséquentment découverts et qui leur sont apparentés, sont encore aujourd'hui considérés à haut-risque. Cette classification a été renforcée par une classification basée sur l'épidémiologie menée dans neuf pays où la fréquence des types de VPH dans les cancers du col utérin était investiguée (197). Les types -16, -18, -26, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -53, -56, -58, -59, -66, -68, -73 y ont

été considérés à haut-risque alors que les types -6, -11, 40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81 et CP6108 présentent un faible risque de progresser vers des lésions cancéreuses. Les types -34, -57, -62, -67, -83 n'ont pas été détectés et par conséquent n'ont pu être catégorisés dans cette publication. Ainsi les espèces $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ et $\alpha 9$ regroupent les types de VPH à haut-risque tandis que les espèces $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 8$, $\alpha 10$ et $\alpha 11$ comptent les types à bas-risque. Ces résultats concordent avec la classification de 1992 à l'exception des types -70 et -73. Récemment, la classification épidémiologique a été remise en question. Ses détracteurs allèguent que les méthodes de détection employées introduisent un biais en favorisant l'amplification de certains types au détriment de d'autres et que les infections avec plusieurs types sont mal évaluées. Ils préconisent plutôt la détection par buvardage de Southern qui, par contre, s'avère une méthode dont la faible sensibilité reste son talon d'Achille (181).

1.3 Méthodes de détection

Le potentiel oncogénique variant selon le type de papillomavirus rencontré dans la pratique clinique, son identification est devenue nécessaire afin d'évaluer le degré de risque posé à la santé humaine. Pour ce faire, différentes méthodes ont été mises de l'avant. La supériorité des techniques moléculaires en comparaison aux méthodes conventionnelles comme le test de Papanicolaou dans l'identification des lésions cervicales a été démontrée (185). Ces méthodes de génotypage reposent principalement sur l'amplification de séquences codantes pour la protéine L1 à partir de régions conservées. Les deux paires d'amorces les plus répandues pour la détection de génotypes ano-génitaux sont les paires PGMY, GP5+/GP6+ et SPF, les deux premières ayant été initialement décrites au début de la dernière décennie mais raffinées depuis.

Les premières amorces MY09/MY11 ont été mises au point alors que seulement cinq des vingt VPH les plus communs étaient identifiés (174). Les amorces consistaient alors en un mélange de 24 amorces dégénérées dont les proportions empiriques relatives résultaient en une reproductibilité approximative. L'amélioration introduite en 1994

réalisée par Hildesheim résidait principalement en l'addition de l'amorce HMB01 puis, en 2000, il y a eu amélioration de la polymérase employée et refonte complète des amorces (115, 130). Ces dernières n'étaient alors plus dégénérées et ce faisant, la proportion des cinq amorces sens et des treize amorces antisens était fixe et donc reproductible dans chaque mélange. Ce système qui porte le nom de PGMY09/11 a démontré son efficacité dans un contexte clinique (63).

La seconde paire d'amorce a été décrite par Snijders en 1990 et consistait en une paire d'oligonucléotides de 20 bases (249). L'élongation des amorces en 3' en 1995 a permis d'améliorer la sensibilité de 10 à 100 fois et le système a été rebaptisé GP5+/GP6+ (69). Un nouveau système du nom de BSGP5+/6+ dont l'efficacité a été démontrée sur des échantillons cliniques a été publié en 2008 (240). Il présente une sensibilité supérieure envers certains types par rapport au système antérieur. À l'image du modèle des amorces MY, un mélange de neuf amorces sens et de trois amorces antisens doit être ajouté à la réaction de PCR. Les amorces du modèle initial GP5+/GP6+ sont comprises dans ce mélange.

Une fois l'amplification accomplie, principalement trois avenues sont offertes pour l'étape de détection : le RFLP, le séquençage et l'hybridation à des sondes spécifiques (193). Le séquençage reste la méthode qui fournit les informations les plus précises, mais est aussi celle qui est la plus exigeante d'un point de vue manipulation. Le RFLP distingue les différents types en fonction des patrons de migration des fragments issus de la digestion enzymatique. Il semblerait que l'enzyme *HpyCH4V* soit particulièrement efficace (235). Plusieurs méthodes faisant appel à l'hybridation de sondes sont disponibles (193).

La seule méthode approuvée par la Food and Drug Administration américaine pour la détection des types à haut-risque se nomme Hybrid capture (15). Ce test conçu par Digene Corporation utilise un ensemble de sondes d'ARN spécifiques contre 13 génotypes qui, une fois appariées à l'ADN viral, forme des hybrides qui réagiront avec des anticorps spécifiquement dirigés contre la structure des hybrides d'ADN-ARN

formés par cette réaction d'hybridation. Des résultats faussement positifs résultant de la réactivité croisée des sondes avec des types non inclus dans le mélange de sondes sont cependant rencontrés (217).

Chapitre II : Infection

2.1 Tropisme

D'abord, les papillomavirus sont retrouvés chez pratiquement tous les vertébrés à sang chaud, mais la barrière des espèces délimite généralement leur spectre d'infection à un nombre restreint d'hôtes (70). Bien que les papillomavirus puissent interagir avec plusieurs types cellulaires, ils infectent exclusivement les cellules des épithéliums stratifiés, tant muqueux que squameux (195, 230). Le large spectre de cellules sur lesquelles le virus peut se lier résulterait de l'interaction primaire nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule via un récepteur largement répandu. Parmi les molécules candidates, il faut mentionner l' $\alpha 6$ -intégrine, les glycosaminoglycans et la laminine-5, mais le sulfate d'héparane reste le récepteur pour lequel le plus de preuves expérimentales sont accumulées, bien qu'il soit contesté (64, 142, 186, 213). L'identification précise du type de sulfate d'héparane en cause tend actuellement vers le syndecan-1 mais le rôle de plusieurs autres récepteurs, notamment de la famille des syndecans, restent à être approfondis (241). Une interaction secondaire avec un corécepteur comme l' $\alpha 6$ -intégrine pourrait expliquer qu'il ait été confondu avec le récepteur principal (142, 186, 243). Étant relativement répandus, des facteurs autres que l'interaction avec ce ou ces récepteurs doivent expliquer le tropisme cellulaire des papillomavirus. L'hypothèse selon laquelle l'environnement cellulaire influence également le tropisme pourrait expliquer la raison pour laquelle certains virus sont retrouvés exclusivement dans une région anatomique spécifique. En effet, un groupe a démontré que les régions régulatrices de deux virus ayant respectivement un tropisme pour les épithéliums muqueux et squameux, interagissent différemment avec les facteurs de transcription en fonction de l'origine de la lignée cellulaire (190).

2.2 Mode de réplication

2.2.1 Organisation génomique

Les VPH sont des virus d'ADN circulaire à double brin d'environ 8 kb (Figure II). L'expression de ces gènes et la réplication sont intimement liées au programme de différenciation des kératinocytes infectés par le virus (Figure III). Sa réplication et son assemblage ont lieu dans le noyau. Les protéines non-structurales E1, E2, E4, E5, E6, et E7 sont principalement exprimées dans les cellules non-différenciées ou en voie de différenciation et représentent 50% du génome du virus. Les protéines structurales L1 et L2 sont exprimées exclusivement dans les cellules différenciées et comptent pour 40% du génome. La portion restante du génome est occupée par le LCR (long control region), une région non-codante qui contient l'origine de réplication, le promoteur ainsi qu'une multitude de site de liaison pour des facteurs de transcription cellulaire (290). Des sites pour les régulateurs positifs AP-1, SP-1, NFI, Oct-1, TEF-1 ainsi que le régulateur négatif YY1 ont été identifiés. La protéine régulatrice virale E2 se lie au motif ACCG(N6)CGGT conservé entre les LCR des différents types de VPH. Pour VPH-16, la transcription de gènes précoces est assurée par le promoteur P97 (P99 pour VPH-31 et P105 pour VPH-18) positionné en amont d'E6 alors que le promoteur P670 situé au sein de E7 (P742 pour VPH-31) en fait tout autant pour les gènes tardifs (290). Le LCR, les régions précoces et tardives sont séparées par deux sites de polyadénylation. L'épissage alternatif peut mener à la production de 14 protéines différentes.

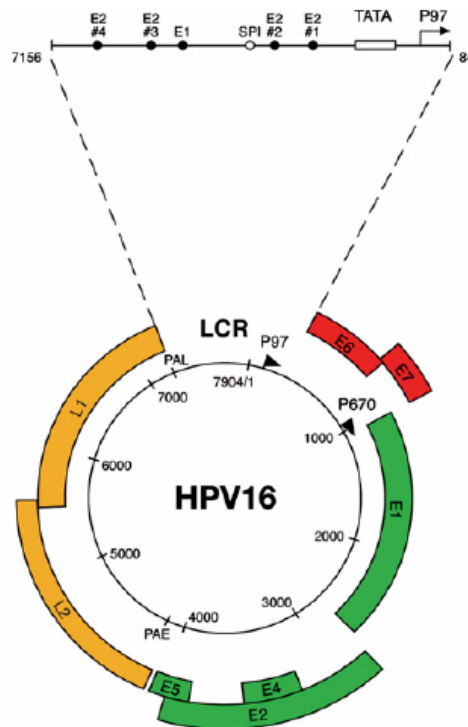


Figure II : Illustration schématisée du génome circulaire de 7904 paires de bases de VPH-16 avec ses deux promoteurs illustrés par des flèches noires. Les ORF précoces en rouge ou vert (E1, E2, E4, E5, E6 et E7) sont exprimés à partir des promoteurs P97 et P670 selon le stade de maturation de la cellule. Les ORF tardifs en jaune (L1 et L2) sont exprimés à partir du promoteur P670 suite à une modification du patron d'épissage et de polyadénylation passant du site de polyadénylation précoce (PAE) à tardif (PAL). Les sites de liaison des facteurs de transcription sont indiqués dans le LCR. (76)

2.2.2 Établissement de l'infection

La première étape permettant l'entrée des virus dans les cellules est la mise en contact de ceux-ci avec les cellules de la couche épithéliale basale. Un bris microscopique au niveau de la couche superficielle de cellules épithéliales fournit une brèche suffisante pour permettre au virus d'entrer en contact avec son récepteur sur la membrane cellulaire de la cellule basale. Tel que mentionné plus haut, le sulfate d'héparane des protéoglycans cellulaires servirait de récepteur alors que l' $\alpha 6$ intégrine pourrait faire office de corécepteur (142, 186). Suite à cette étape, les modes de pénétration sont variables entre

virus phylogénétiquement apparentés; VPH-16 pénètre la cellule via des vésicules de clathrines tandis que VPH-31 le fait par des caveolae (28). Le transport vers le noyau de la particule virale désassemblée dans l'endosome est assuré par la protéine L2. Une fois au noyau, l'établissement d'un épisode stable est possible. Les premières protéines exprimées proviennent des ORF E1 et E2 et sont essentielles à la réplication du génome viral. En premier lieu, la protéine E2 lie des régions palindromiques du LCR et mène au recrutement de la protéine E1. Cette dernière est une hélicase qui, une fois E2 dissociée du complexe, s'assemble en double hexamère. Sont alors amenées au complexe la polymérase α primase et la protéine de réplication A nécessaires à l'initiation de la réplication. Cette étape est synchronisée avec la phase S du cycle cellulaire. La protéine E2 assure également la ségrégation entre cellules filles des épisomes en les encrant aux chromosomes. VPH est présent à raison d'environ 10 à 200 épisomes par cellules infectées (76).

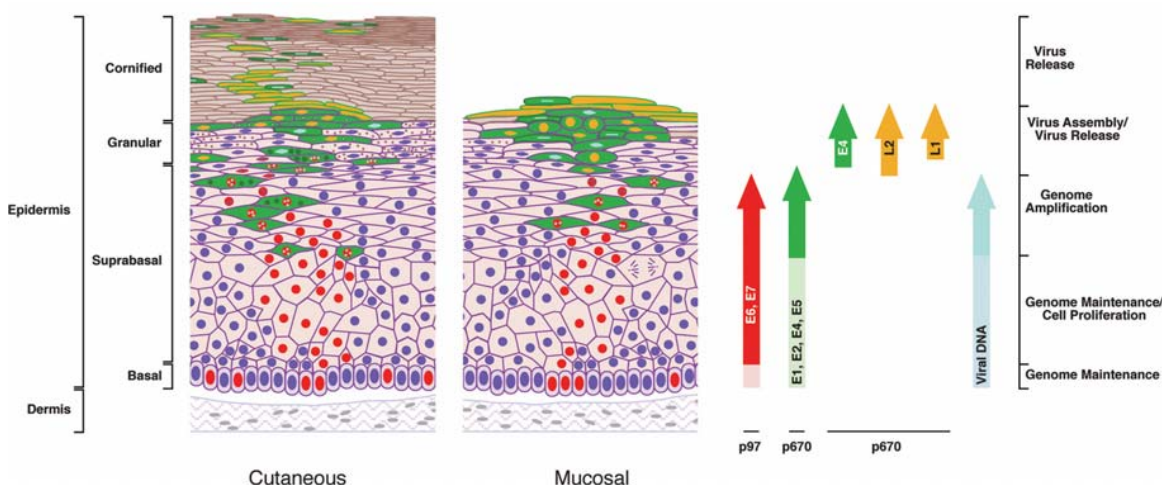


Figure III : Schématisation de l'expression des gènes viraux selon le programme de différenciation cellulaire. Les étapes de la multiplication du virus sont présentées à droite et les couches cellulaires à gauche. Les cellules exprimant E6 et E7 sont représentées en rouge. Celles en vert avec le noyau rouge expriment les gènes nécessaires à la réplication du génome. Les cellules en phase terminale de différenciation expriment les gènes viraux tardifs en jaune (76).

2.2.3 Stimulation de la prolifération

Une fois la pérennité du génome viral assurée dans la cellule, celui-ci complète son cycle de réplication. Étant dépendant du cycle de la cellule, le virus ne peut que se répliquer que par l'activation de celui-ci. Les protéines E6 et E7 jouent toutes deux un rôle prépondérant dans l'induction de la prolifération cellulaire (Figure IV). La seconde protéine interagit avec la protéine pRb de façon à ce que celle-ci libère le facteur de transcription E2F. Une fois disponible, ce facteur entraîne la cellule en phase S en stimulant des facteurs de réplication telles que les cyclines A et E. Également, l'action qu'exerce E7 sur les protéines p21, p27, certaines histones désacétylase ainsi que d'autres éléments du complexe transcriptionnel privilégie la progression du cycle cellulaire. L'action d'E6 agit de façon complémentaire et synergique à la protéine E7. En dirigeant p53 vers le protéasome via son ubiquitination, E6 contrecarre l'apoptose qui découlerait de l'action d'E7. E6 interagit également avec les protéines *Bak* et *Bax*, étendant ainsi son action anti-apoptotique à diverses voies de signalisation. Pour les virus considérés oncogéniques, E6 et E7 sont exprimés de façon polycistronique et présentent une activité accrue marquée face à leur partenaire cellulaire en comparaison avec les virus à bas risque (170).

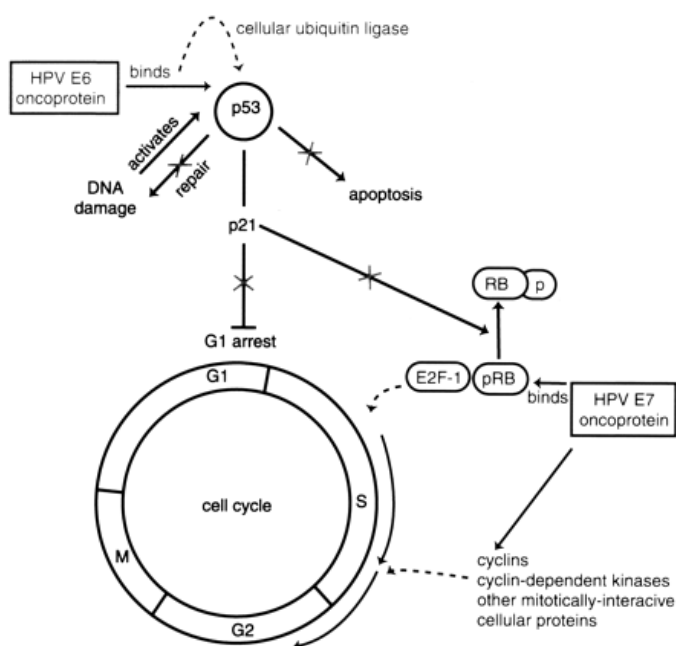


Figure IV : Événements médiés par les protéines E6 et E7 qui stimulent la progression du cycle de réplication cellulaire (33).

2.2.4 Amplification du génome

Des changements dans l'environnement cellulaire provoquent l'activation du promoteur dit dépendant de la différenciation cellulaire. Ceci entraîne une augmentation de la concentration des protéines requises pour la réplication. Encore une fois, les protéines E1 et E2 y sont impliquées et E4 et E5 le sont également. Cette dernière contribue à favoriser la réplication en modulant les voies de signalisation par le recyclage de l'EGF (epidermal growth factor). Quant à E4, elle éviterait l'accumulation nucléaire de la cycline B/Cdk2 qui mènerait autrement à la mitose (76).

2.2.5 Encapsidation et relâche

La protéine L2 est dirigée vers le noyau en vertu de ses deux signaux de localisation cellulaire en C- et N- terminal. Une fois relocalisée, elle s'associe avec les corps PML, eux qui favorisent également le recrutement de la protéine E2 complexée au génome viral. La fonction de ces agrégats de la protéine PML est encore mal connue mais un rôle dans la régulation de l'expression des gènes lui serait attribué (55). L1 se polymérise en capsomère dans le cytoplasme et est à son tour redirigé vers les corps PML suite à leur réorganisation induite par la protéine L2 (91). L'assemblage est alors amorcé notamment grâce à la contribution de la chaperonne cellulaire Hsp70. La relâche du virus est facilitée par la dégradation du réseau de kératine par E4 mais dépend principalement du programme naturel d'apoptose du kératinocyte (76). Ainsi, le virus est relâché dans le milieu extracellulaire sans induire la lyse de la cellule, ce qui aurait pour effet d'entraîner la libération de signaux pro-inflammatoires.

2.3 Prévalence

L'infection au VPH est l'infection transmise sexuellement la plus souvent diagnostiquée aux États-Unis. À tout moment dans ce pays, environ 20 millions d'individus sont

porteurs du virus. Avec 6,2 millions de nouveaux cas annuellement, il est estimé qu'entre 75 et 80% de la population sexuellement active sera exposé au VPH (42, 156, 260). Les individus âgés entre 15 et 24 ans présentent un risque accru d'infection ce qui concorde généralement avec le début de l'activité sexuelle (227). Une étude a démontré que le taux d'infection augmentait significativement avec chaque année de vie supplémentaire entre 14 et 24 ans, suivi d'un déclin non statistiquement significatif jusqu'au dernier groupe d'âge étudié, soit les femmes de 50 à 59 ans (Figure V) (79). Plusieurs études ont été menées prospectivement sur des adolescentes et ont estimé les taux cumulatif d'infection au VPH entre 64 à 82% pour celles qui étaient actives sexuellement (275).

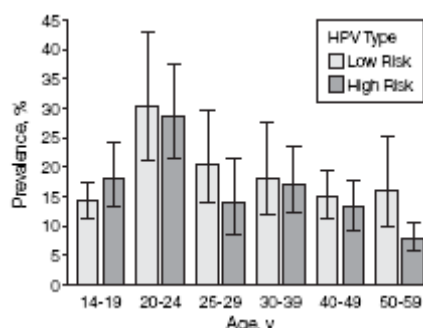


Figure V : Prévalence des types de haut et de bas risque chez les femmes âgées de 15 à 59 ans tel que recensé par le *National health and nutrition examination survey* en 2003-2004 sur un échantillon de femmes représentatif de la population américaine. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance de 95% (79).

Outre les adolescentes, les taux d'infection ont été évalués dans plusieurs autres groupes démographiques. D'abord, de 3 à 45% des enfants seraient infectés. Ces statistiques ont été avancées dans le cadre d'études menées respectivement en Suède et en Afrique du Sud en se basant sur la présence d'anticorps contre VPH (2, 176). Cette technique peut être biaisée en raison de la réactivité croisée des anticorps face à d'autres antigènes, d'autant plus que la réactivité face à la protéine E2 était plus marquée que contre la protéine de la capsid L1 dans l'une des deux études (176). Des études plus récentes tendent plutôt à estimer le taux d'infection des enfants aux alentours de 3% et soulignent l'importance de l'historique gynécologique maternelle qui peut se traduire par une transmission involontaire à l'enfant, mais recommandent tout de même au clinicien de considérer la possibilité d'abus sexuels (141, 199).

Le taux d'infection pour les hommes hétérosexuels est sensiblement le même que pour les femmes (14, 201). Cependant, le site de prélèvement au niveau des organes masculins et les différences de méthodes de détection employées expliquent la variabilité des taux de prévalence observés dans plusieurs études (78). En effet, il appert que les sites fournissant les meilleurs résultats pour la détection du VPH sont la verge ainsi que son extrémité alors que les échantillons d'urine, de sperme et ceux prélevés au niveau du scrotum ou de l'urètre sont moins fréquemment positifs. De plus, il semble qu'un homme et une femme en couple stable ne partagent pas nécessairement les mêmes types, bien que des résultats contradictoires aient été obtenus à ce sujet (14, 201). En ce qui a trait aux hommes séronégatifs pour le VIH ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes, un taux d'infection moyen cumulatif dans l'anus sur deux années de suivi de 57% est observé à travers tous les groupes d'âge (54). Ce contraste par rapport aux hétérosexuels où les jeunes de 14-24 ans sont plus fréquemment infectés que les autres groupes d'âge s'explique probablement en partie par les habitudes de ce groupe pour qui le nombre de partenaires reste élevé à travers le temps. En effet, les hommes de cette étude ont rapporté avoir eu un nombre de partenaires sexuels plus élevé que le nombre moyen rapporté par les femmes. Une proportion de 26% de ces hommes est porteuse de types à haut-risque. À l'opposé, les femmes ayant des relations avec d'autres femmes seraient moins à risque de contracter une infection au VPH (179). Malgré une forte association entre les relations hétérosexuelles antérieures et la présence de VPH, les femmes ayant eu exclusivement des relations sexuelles avec des femmes peuvent être infectées. Globalement, 30% d'entre elles seraient porteuses du virus, mais contrairement à la croyance répandue dans cette population, les cas des cancers du col sont rapportés et il est nécessaire d'être suivie annuellement par des tests de cytologie au même titre que les femmes hétérosexuelles (180).

2.4 Modes de transmission

Le mode de propagation du VPH le plus fréquent est le coït vaginal. Par contre, tous les types de contacts, nommément génital-génital, oro-génital, péno-anal et le simple fait de

toucher les organes génitaux, lors de relations sexuelles peuvent permettre la transmission du VPH (94). La présence de lésions liées au VPH chez l'enfant ou chez la fille préadolescente vierge peut, particulièrement dans certains contextes sociodémographiques, découler d'abus sexuels. Cependant, la transmission verticale entre la mère et l'enfant a été identifiée et conclure systématiquement à un cas d'abus en présence de lésions au VPH est erroné (177). De plus, la contraction de l'infection peut se faire via des objets inanimés, tels que des produits d'hygiène et des sous-vêtements, ainsi que par transmission horizontale chez l'enfant au moment de sa toilette ou de le langer (177).

L'utilisation du condom a été, dans certaines études, associé à un risque plus élevé d'infection, mais cette observation découle probablement du fait que l'utilisation du condom se fait généralement dans un contexte de relation avec un ou des partenaires plus souvent enclins à avoir eu de multiples partenaires (275).

Chapitre III : Pathologie

3.1 Infection non productive

Dans les cas où l'infection à VPH n'est pas éliminée, la persistance du virus augmente les risques de développer un cancer. La stimulation constante de la phase S du cycle cellulaire par la protéine E7 et l'abolition des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN contribuent à l'accumulation des mutations. L'élément-clé de la progression des lésions vers le cancer serait la perte de régulation de l'expression des protéines E6 et E7. Un génome viral intégré est davantage retrouvé dans les lésions pré-cancéreuses de haut-grade ou cancéreuses et implique souvent la perte de la région de l'ADN codant pour E2 qui exerce un contrôle suppressif sur l'expression des gènes E6 et E7. L'intégration en des sites préférentiels du génome humain pourrait contribuer à l'oncogenèse. Le VPH s'intègre plus fréquemment au niveau de sites fragiles du génome et peut entraîner des délétions autour du site d'intégration. Également, des oncogènes sont fréquemment retrouvés autour de ces sites (286). Les virus considérés à fort potentiel oncogénique présentent une protéine E7 avec une forte affinité pour pRb et une protéine E6 interagissant avec force avec p53 ainsi que la protéine d'ubiquitination E6AP. À l'inverse, les protéines E6 et E7 des virus à bas risque ne présentent pas de telles caractéristiques (76).

3.2 Persistance de l'infection

La majorité des infections au VPH sera résorbée par le système immunitaire et peu d'infections progresseront vers des lésions avancées. Une étude effectuée sur 20 000 femmes suivies sur dix ans a évalué à 7% la proportion des femmes qui développeront soit une lésion CIN3 ou un cancer du col (242). Bon nombre d'études ont abordé la différence de risque de progression vers des lésions entre les infections dites transitoires et celles considérées persistantes. La première est définie par la détection d'un spécimen positif ponctuel tandis que la seconde est reconnue par plus d'un spécimen positif

s'échelonnant sur une période de suivi généralement supérieure à 12 mois. La définition de l'infection persistante est plutôt arbitraire, mais tous s'entendent pour dire qu'elle est d'une durée de plusieurs années. La présence d'une infection persistante qui se résorberait avant le second échantillonnage reste le point faible de cette méthode car elle serait comptabilisée comme une infection transitoire. Les facteurs de risque associés à la persistance sont un âge supérieur à trente années, une co-infection au VIH, l'infection par un type à fort potentiel oncogénique et une infection par de multiples types (133). La persistance est un facteur clé dans la progression des lésions. Une étude en est venue à un risque relatif de développer une lésion cervicale de 10,19 pour les femmes ayant une infection persistante par un VPH de haut risque comparativement à des femmes avec des infections transitoires. Cette valeur s'élève à 11,67 pour les lésions de haut-grade (238).

3.3 Cancer du col de l'utérus

Les cellules exfoliées du col utérin prélevées lors du test Pap sont évaluées au microscope afin de déterminer la présence des lésions. Les cellules sont donc classifiées selon l'observation de caractères cytologiques. La classification européenne divise les lésions en trois niveaux, soit CIN-1, -2 et -3, selon que les cellules soient faiblement, modérément ou sévèrement atypiques. L'acronyme provient de « cervical intraepithelial neoplasia ». La classification américaine, proposée par Bethesda, distingue les lésions de bas-grade et celles de haut-grade reconnues sous LSIL ou HSIL pour « High/Low grade squamous intraepithelial lesion ». Une équivalence est établie entre les lésions de CIN1 et LSIL ainsi que pour les CIN2/3 et les HSIL. Tant des VPH de haut ou de bas-risque sont retrouvés dans les LSIL tandis que les HSIL sont principalement associées au VPH de haut-risque (253). Les cytologies pour lesquelles il est impossible d'établir avec certitude la présence ou l'absence d'anomalie classifiables selon les normes établies sont attribuées au groupe ASCUS. Le suivi sur deux ans de ces femmes a démontré l'absence de lésion dans 79% des cas, 11% ont conservé le statut d'ASCUS, 6% ont présenté une LSIL et 4% une HSIL (7). Les LSIL sont caractérisées par la présence de koilocytes qui sont la manifestation cellulaire la plus fréquente d'une infection à VPH. Les noyaux sont trois

fois plus volumineux que dans les cellules normales et un halo périnucléaire est visible. Les HSIL présentent des cellules très atypiques dans lesquelles le noyau est rarement rond et où le rapport volume du noyau sur volume du cytoplasme est très élevé (1). Il a été estimé que les lésions CIN1 évoluent vers CIN2 à fréquence de 20%, que CIN2 progressent vers CIN3 dans 30% des cas et que 40% des lésions CIN3 vont se transformer en cancer (76). L'absence de données portant sur la progression des lésions s'explique par les problèmes éthiques posés par l'absence d'intervention qu'impliquerait ce type d'étude.

La première étude d'envergure avec un protocole standardisé visant à évaluer le rôle du VPH dans le cancer du col de l'utérus a été conduite en 1995 par l'*International Agency for Research on Cancer* et a porté sur 1000 femmes recrutées dans 22 pays différents ayant en commun le diagnostic d'un cancer du col de l'utérus. Le laboratoire central a démontré la présence d'ADN de VPH dans 99,7% des cas (25). La prévalence des différents types a été étudiée par le même groupe et a été regroupée dans une méta-analyse qui inclue les études effectuées jusqu'en janvier 2006 (248). Selon cette étude qui se base sur 14 500 cas de cancer du col, les types en ordre décroissant de prévalence sont VPH-16, -18, -33, -45, -31, -58, -52 et -35. Les types -16 et -18 sont responsables à eux seuls de 70% des cas et les huit types les plus communs comptent pour 90% des diagnostics. L'importance relative de VPH-31 semble différer selon l'origine géographique du spécimen (Figure VI). Il serait septième en termes de prévalence en Asie, sixième en Afrique, quatrième en Europe et troisième pour les Amériques (60). Une telle méta-analyse a également été effectuée pour les lésions pré-cancéreuses de haut-grade. Les études publiées jusqu'en 2006 regroupant tout près de 7000 spécimens démontrent que les types les plus fréquents sont -16, -31, -58, -18, -33, -52, -35 et -51, ce qui est somme toutes, similaire à la situation rencontrée pour les cancers, mais où VPH-18 semble sous-représenté (248). L'exercice a été répété pour les lésions de bas-grade en s'appuyant sur les études publiées jusqu'en 2004. VPH a été jugé présent dans 29 à 100% des cas témoignant d'une variation des méthodes d'échantillonnage et de détection. Néanmoins, parmi les 5910 lésions de bas-grade contenant de l'ADN viral, les types les

plus fréquemment amplifiés sont, en ordre décroissant, -16, -31, -51, -53, -56, -52, -18 et -66 (61).

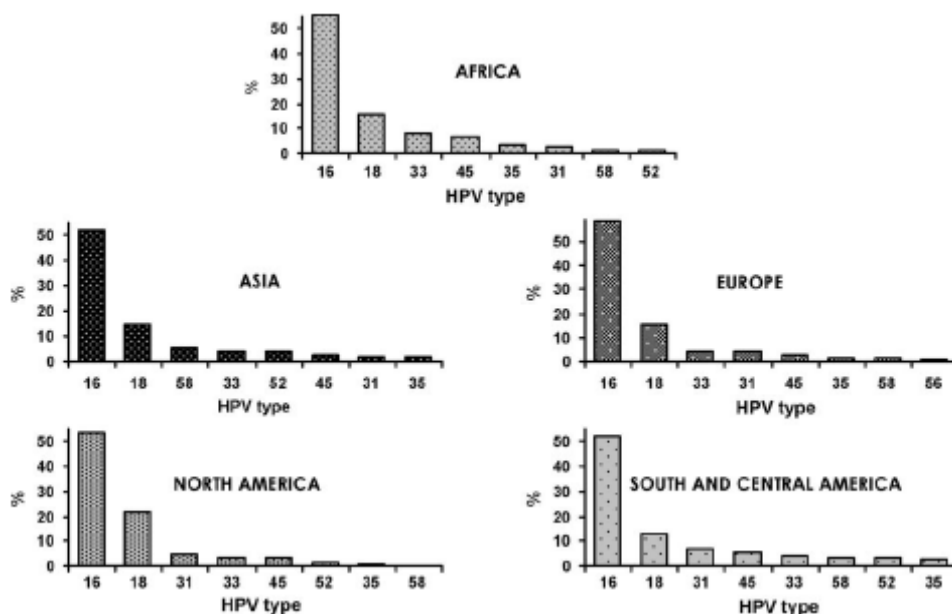


Figure VI : Les huit types de VPH les plus communs selon la région d'origine (60)

3.3.1 Prévalence du cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus est le deuxième cancer le plus fréquent chez les femmes après le cancer du sein à l'échelle mondiale (212). Annuellement, 274 000 décès lui ont été attribués en 2002 dont plus de 80% dans les pays en voie de développement où ce cancer est nettement plus fréquent (Figure VII). Survenant chez des femmes relativement jeunes, cette maladie est la plus importante cause d'années de vie perdues dans les pays en voie de développement (283). La raison de cette disparité géographique découle principalement de l'absence de programme de dépistage, mais aussi que certains facteurs de risque sont réunis tels qu'un taux de parité élevé et une mauvaise nutrition. Des taux similaires, soit autour de 38 cas par 100 000 individus étaient observés en Occident dans les années '60-'70 avant la mise en place de programme de dépistage (77). L'incidence est particulièrement élevée en Afrique subsaharienne, en Amérique latine, dans les Caraïbes et dans certaines régions d'Asie (212). La survie sur cinq ans se situe autour de

65% bien que des différences appréciables existent entre le 30,5% du Zimbabwe et les États-Unis avec 73%. La majorité des cancers sont des carcinomes épidermoïdes bien que la proportion des adénocarcinomes augmente dans les régions où l'incidence est faible, atteignant 25% en Occident (212).

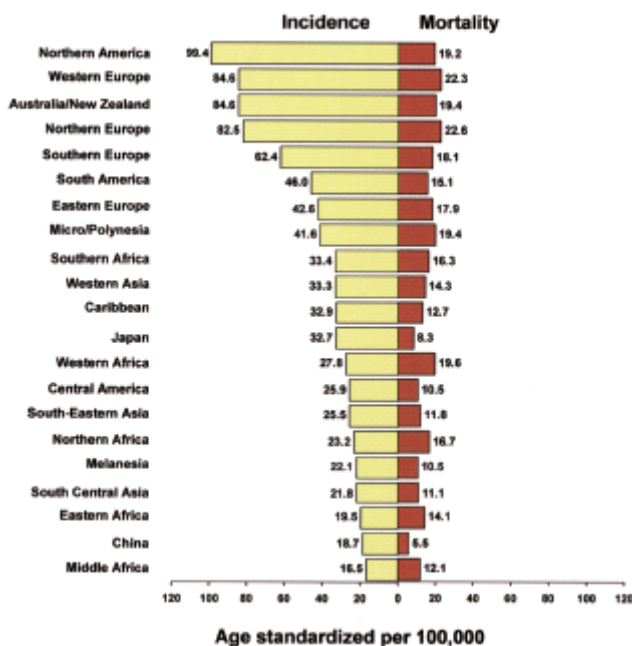


Figure VII : Taux d'incidence et de mortalité standardisés pour l'âge par 100 000 femmes selon la région en 2002 (212).

3.3.1.1 Infection au VPH chez femme VIH+

Plusieurs cancers sont associés au VIH dont notamment le sarcome de Kaposi, les lymphomes non-hodgkiniens, les cancers de la sphère ORL et le cancer du col de l'utérus (19). Certains facteurs de risque, tel que le nombre de partenaire sexuel, sont communs aux infections au VPH et au VIH, ce qui pourrait expliquer la prévalence élevée de co-infection. Au-delà de cette coïncidence, la relation entre la diminution du taux de cellules CD4 combinée à l'augmentation progressive des taux de détection du VPH, des lésions intra-épithéliales et des cancers du col de l'utérus témoigne d'un lien étroit entre ces deux types d'infection. Les mécanismes par lesquels ces phénomènes surviennent restent inconnus mais la réactivation d'une infection latente, l'augmentation des risques d'infection et de la persistance prolongée de l'infection par VPH sont autant d'hypothèses

proposées (208). Une étude avance que la moitié des lésions cervicales proviendrait de la réactivation d'infection latente au VPH et l'autre de nouvelles acquisitions (259). Bien que cette propriété ait été démontrée *in vitro*, le contact direct entre les protéines du VIH avec les virus du VPH est probablement un événement marginal et la protéine Tat contribuerait de façon négligeable à l'oncogenèse en activant le LCR (208, 267). L'infection concomitante d'une cellule par le VIH et par un VPH-18 dont l'ADN est intégré mène *in vitro* à l'augmentation de la transcription de la protéine L1. Des protéines du VIH telles que Tat pourraient contribuer à ce phénomène (74). Les femmes séropositives sont sept fois plus à risque de développer un cancer du col de l'utérus et de l'anus que les femmes séronégatives (95).

L'introduction du HAART a permis d'augmenter l'espérance de vie des personnes atteintes du VIH, mais est accompagné d'effets secondaires marqués pour une bonne portion des sujets traités. L'effet du HAART sur le développement du cancer du col de l'utérus est plutôt inconnu (245). Jusqu'à 35% des femmes présentant une cytologie normale avant le début du traitement auront un test Pap anormal à l'intérieur d'un délai de trois années après l'initiation de la thérapie (245). L'un de ces composants, l'AZT, pourrait contribuer à accroître les dommages à l'ADN (208). Bien que la différence ne soit pas statistiquement significative, le nombre de cas du cancer du col est passé de 64,2 entre 1990-1995 à 86,5 par 100 000 personnes séropositives par année entre 1996-2002, soit après l'instauration du HAART (19).

À prime abord, la restauration partielle de l'immunité devrait normaliser l'évolution des lésions mais le prolongement de la vie implique également un potentiel d'exposition accru au VPH et accroît la période de temps sur laquelle une cellule immortalisée par le VPH peut se transformer. De plus, l'état d'immunosuppression prolongée pourrait augmenter les risques d'accumulation d'anomalie au niveau génétique et mener à une plus haute fréquence de cancer. Certaines études jugent limité l'effet que le HAART puisse avoir sur les lésions cervicales (72, 124). Par exemple, une étude portant sur l'incidence des lésions cervicales chez les femmes VIH+ ayant un taux de CD4 supérieur à 350 cellules par microlitre démontre que l'incidence est similaire indépendamment de

l'adhésion au traitement HAART (246). À l'opposé, plusieurs études avancent que la restauration de l'immunité est associée à un plus fort taux de régression des lésions cervicales (3, 125, 189).

Dans une étude, le meilleur biomarqueur prédisant le risque de développer un cancer du col chez les femmes séropositives pour le VIH ne reposait pas sur le taux de cellules CD4 mais bien sur l'état anergique au niveau de la muqueuse génitale(121). La mesure de la capacité du système immunitaire à présenter une série d'antigènes au niveau de la muqueuse vaginale aussi affectée par la baisse du nombre de cellule de Langherans serait un meilleur indicateur que la concentration brute de cellule CD4 sanguine(121).

3.3.2 Facteurs de risque

3.3.2.1 Facteurs exogènes

Le comportement sexuel a un impact majeur quant aux risques de développer une infection au VPH. Le nombre de partenaires sexuels et l'âge aux premières relations sexuelles, qui pourrait n'être en fait qu'un marqueur du facteur précédent, sont considérés comme des facteurs de risque (275). La prise de contraceptifs oraux semble être un facteur de risque bien que l'ensemble des études faites à ce sujet ne parviennent pas toutes à la même conclusion (41). Dans plus de l'une d'elles, la prise de contraceptifs oraux pour une durée supérieure à cinq années serait associée à un risque accru de développer des lésions de haut-grade ou un cancer (128, 194). Cependant, l'effet de cohorte selon lequel un suivi gynécologique plus rigoureux serait retrouvé chez les femmes utilisant un tel moyen de contraception pourrait expliquer la hausse du taux de détection de lésions cervicales (41). Aussi, ces femmes pourraient être plus actives sexuellement. Les hormones ont été à plusieurs reprises étudiées quant à leur implication dans le cancer du col de l'utérus. Suite à l'exposition aux œstrogènes, une intégration favorisée du virus au génome et une hausse de la transcription des gènes E6 et E7 ont été observés dans des modèles expérimentaux alors qu'une persistance accrue a été observée chez certaines femmes (11, 81, 191, 194).

Un nombre de grossesses élevées, plutôt observée dans certaines régions du globe, semblent aussi être un facteur aggravant (128). Selon une étude, une femme ayant eu sept grossesses ou plus a quatre fois plus de risque de développer une lésion de haut-grade ou un cancer du col comparativement à une femme nullipare (198). Les études occidentales à ce sujet n'arrivent généralement pas à une telle conclusion en raison du nombre limité de femmes de multiparité élevée.

Des infections transmises sexuellement concomitantes à l'infection au VPH peuvent influencer le cours de la maladie. Une infection passée par *Chlamydia trachomatis* augmente, par des mécanismes encore inconnus, les risques de développer un cancer du col de l'utérus (10). Les observations faites sur le rôle d'une infection au HSV-2 dans l'acquisition d'un VPH sont contradictoires; certains attribuent aux femmes préalablement exposées au HSV-2 un risque deux fois plus grand de développer un cancer alors que d'autres suggèrent l'inverse, soit qu'une infection au VPH pourrait prédisposer au développement de l'herpès (164, 247).

La persistance de l'infection semble être plus grande chez les fumeuses (112). D'ailleurs, la plupart des études font état d'une progression du risque de cancer du col de l'utérus plus l'exposition au tabagisme est grande (41). Des carcinogènes retrouvés au niveau de la muqueuse vaginale de fumeuses pourraient avoir un effet synergique avec les processus oncogènes viraux (220). Le contact des cellules du col infectées par VPH-31 avec de fortes concentrations de benzo[a]pyrène, un carcinogène important retrouvé dans la fumée de cigarette, s'est traduit par une multiplication par un facteur dix du titre viral (6).

L'influence de l'alimentation dans la prévention ou le développement des cancers ne fait aujourd'hui plus de doute et le cancer du col de l'utérus ne fait pas exception à cette règle (73). Par contre, les études, effectuées jusqu'ici parviennent difficilement à départager la juste part de responsabilité de l'alimentation en raison de sa forte association avec le statut socio-économique, lui-même relié à certains facteurs de risque reconnu tel que le

tabagisme et la multiparité. À titre d'exemple, le faible apport en caroténoïdes, plus spécifiquement en vitamine C, avait initialement été identifié comme un facteur de risque alors qu'un rôle préventif lui est plutôt attribué à la lumière d'études plus récentes (102, 218). Pour les études répertoriées de 1995 à 2003, un consensus est généralement atteint quant à l'association entre la consommation de fruits et légumes et la diminution de la persistance de l'infection. Plus spécifiquement, la vitamine C, la vitamine B12, l'alpha-carotène, la beta-carotène, le lycopène, la lutéine/zeaxanthine et la cryptoxanthine pourraient réduire les risques de néoplasies (102).

3.3.2.2 Polymorphisme chez VPH-16

Plusieurs études récentes se sont attardées à la séquence de la protéine L1 du VPH-16 dans le souci d'élucider les variations de la séquence dans le contexte de l'élaboration du vaccin prophylactique. Les polymorphismes du gène de la capsid ont été étudiés largement dans les années 1990 (56, 137, 221, 224, 274, 282). Étant plutôt descriptifs et ayant surtout des visées de classification, ces résultats étaient mis en relation avec l'arbre phylogénétique initialement réalisé à partir des séquences du LCR qui établit un lien entre l'origine géographique du variant et le polymorphisme viral. Les principaux clades y étant établis sont Af1, Af2, E, As, AA (135). L'expression de la protéine L1 est détectée à une fréquence moindre dans les cas de cancers comparativement aux lésions CIN3 si bien que ce phénomène semble faire partie d'une stratégie d'évasion du système immunitaire (203). Plus encore, il a été démontré que la séquence du génome viral encodant pour la protéine L1 est souvent supprimée dans les cas où le virus est intégré (161). Les capsides assemblées induisent une réponse immunitaire et une diminution, voire même une abolition de l'assemblage pourrait favoriser la propagation du virus. Certaines mutations, notamment D202H, D223G, N327S et F446S, répertoriées dans les études mentionnées ci-haut, proviennent de spécimens de cancer du col. Ces mutations affectent des régions conservées dont le rôle semble être crucial puisque les protéines mutées ont démontré une faible capacité de s'assembler spontanément dans des cellules d'insectes (284).

Le LCR ainsi que la protéine E2 sont les deux facteurs clés impliqués dans la transcription chez VPH. Malgré qu'un nombre appréciable d'études se soit penché sur la possibilité que certains polymorphismes puissent accroître le niveau de transcription, il semble que cette stratégie soit limitée pour cette classe de virus. Notons à prime abord qu'aucune modification génétique n'ayant un impact significatif n'a été retrouvée au niveau de la protéine E2 (266). Il est spéculé que la tendance qu'ont les variantes de la branche évolutive asiatique-américaine à progresser vers des lésions plus sévères comparativement au prototype pourrait être attribuable à une augmentation de l'activité du promoteur P97 (144, 280). La stimulation de la transcription chez les variantes du clade asiatique-américain est surtout attribuable aux mutations de la région 3' du LCR, lesquelles sont surtout confinées aux nucléotides 7660 à 7890 qui correspondent à une région liée par le facteur cellulaire TEF-I (266). Une variante appartenant au même clade et mutée au niveau d'un site de liaison aux facteurs GRE et TEF-I a démontré une activité de transcription 1,7 fois plus élevée que le prototype (266). Aussi, la position 7310 située au sein d'un site de liaison pour un facteur de régulation négative NF- κ B, où la cytidine est remplacée soit par une guanine ou une thymine, a été associée avec une progression accrue vers CIN3 et le cancer du col de l'utérus (158). Auparavant, une mutation en cette position avait été associée à une transcription stimulée dans un contexte de cancer oropharyngé (51). Les variantes aux positions 7193 et 7321 ont un effet contradictoire sur l'activité oncogénique du virus comme en témoigne des résultats opposés dans la littérature (158, 266). La mutation du LCR la plus répandue est située dans la séquence du site de liaison du répresseur transcriptionnel YY1, plus particulièrement à la position 7519. L'activité du promoteur est ainsi augmentée et affranchit le virus en le rendant indépendant à la répression cellulaire (75, 184). La prévalence de cette mutation pour les isolats issus de cancer du col de l'utérus semble plus élevée alors que les variantes retrouvées dans des lésions qui ne progressent pas sont mutées dans ou à proximité d'autres sites recrutant les facteurs de transcription cellulaire (239). De nombreux autres polymorphismes ont pu être identifiés sur des isolats cliniques sans impact tangible au niveau de la progression de l'infection vers le cancer. Des expériences de mutagenèse aléatoire ont permis de démontrer l'importance de certaines régions, notamment la position 7729 qui multiplie par trois l'activité du promoteur P97 (144).

L'implication de la protéine E7 dans le processus de stimulation de la croissance cellulaire en fait, tout comme E6, une source de variabilité pouvant expliquer la différence de potentiel oncogénique entre les types de VPH. De ce fait, plusieurs tentatives ont été effectuées dans le but d'identifier des régions conférant une telle caractéristique aux protéines E6 et E7. Les variations de la protéine E7 sont, selon la littérature disponible à ce jour, limitées. La variante majeure d'intérêt médical retrouvée à haute fréquence dans les cancers du col de l'utérus de certaines régions du monde présente une substitution à la position 29 de la protéine d'une sérine par une asparagine. Cette variante est associée au clade asiatique de VPH-16 et est, par conséquent, plus fréquemment retrouvée dans cette région du monde. Sa prévalence est de 14,3% dans la région sichuanaise, de 59,5% en Corée, de 0,9% en Allemagne et de 36,4% en Tanzanie (82, 202, 250, 255). Un recensement de cette mutation auprès des isolats issus de cancer du col et d'un groupe contrôle ne présentant pas de lésions d'une population de femmes coréennes a établi respectivement les taux de prévalence à 70% et 33% (250). Une étude portant sur des femmes chinoises a corroboré ces résultats en plus de souligner la haute fréquence des mutations S63F et T846C au niveau du gène de la protéine virale (276). À l'opposé, la distribution de cette mutation au Japon, dans le sud de la Chine et en Inde semble être uniforme entre les types de lésions (48, 96, 223). L'oncogenicité variable de certaines variantes en fonction de l'ethnicité des individus infectés est expliqué par la distribution des allèles du HLA (278). Plusieurs autres polymorphismes ont été répertoriés sans qu'une importance clinique particulière ne leur soit attribuée.

Plusieurs variations pour VPH-16 ont été identifiées à l'intérieur du gène de la protéine E6 et plusieurs études ont tenté d'associer certaines de ces variations à la persistance ou la progression des lésions. Les premières études établirent que certaines variantes démontraient une tendance plus marquée à persister comparativement au prototype (169, 279). La mutation la plus la plus fréquente affecte le résidu 83 où la valine initiale est substituée pour une leucine. Les échantillons issus d'une cohorte de femmes suédoises ont démontré la présence du variant L83V dans 88% des cas de cancer du col de l'utérus et dans 44% des lésions classifiées CIN3 (288). Une observation similaire a été répétée

dans une étude menée auprès de femmes françaises (117). Cependant, d'autres études, notamment certaines européennes, sont arrivées à la conclusion que la distribution était uniforme au sein de la population étudiée (30, 202, 264). Entre autres, la proportion du variant L83V diminuerait en fonction de la progression du type de la lésion chez les femmes italiennes et tchèques (143, 287). Tout comme dans le cas des variantes retrouvées en Asie, il a été postulé que la distribution des gènes du HLA pourrait influencer le potentiel oncogénique d'une variante (287). La différence d'oncogenicité de la protéine E6 peut aussi être attribuable en partie à la force de son interaction avec son partenaire cellulaire p53 et de la protéine recrutée pour sa dégradation, E6AP. La variante L83V démontre une capacité accrue en comparaison au prototype à diminuer l'expression de p53 et de Bax mais présente également la particularité d'interagir fortement avec les voies de signalisation MAPK et Notch (12, 46).

Les expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier des modifications de la protéine E6 procurant un potentiel oncogénique accru ainsi que les positions clés dans les interactions avec les différents acteurs protéiques qui interagissent avec E6. Par exemple, il a été déterminé que les modifications 46Y/47Y/49H dans une région de contact avec p53 entraîne une baisse de sa répression transcriptionnelle (162). Aussi, des mutations au niveau des acides aminés 8 à 10 ou une délétion des résidus 9 à 13 compromettent grandement la capacité de E6 à dégrader p53 (93). Ces mutations n'ont toutefois été que rarement répertoriées dans des isolats cliniques. Le risque accentué de progression des lésions qui accompagne la substitution E31G serait dépendant du type de molécule HLA (65, 83). La variation D25E semble être préférentiellement associée au cancer du col de l'utérus au Japon alors qu'une augmentation de cette variante à travers les lésions est constatée chez les femmes chinoises (183, 222, 277). Sa prévalence est également élevée en Corée dans les cas de cancer du col mais la puissance statistique de l'étude n'était pas suffisante pour confirmer cette tendance (146). Des facteurs génétiques expliquent ici aussi en partie ce phénomène (182, 278). Les variantes non-européennes de E6, particulièrement celles de type asiatique-américain, induiraient un risque plus élevé de progression vers le cancer (17, 281).

3.3.2.3 Polymorphisme pour les types autres que VPH-16

Les types de VPH autres que le type 16 ont une incidence moindre et leur étude nécessite donc un nombre d'échantillons plus importants. Par conséquent, ils ont fait l'objet d'un nombre plus limité de publications relatives à leur polymorphisme. Il a été proposé que le LCR de VPH-18 serait plus performant que celui de sa contrepartie chez VPH-16 en raison de sa capacité accrue à transformer des kératinocytes *in vitro*. Les variations naturelles au niveau des sites des facteurs cellulaires SP1 et YY1 favorisant l'expression de E6/E7 seraient responsables de cette caractéristique (231, 244). À l'instar de VPH-16, les variantes asiatique-américain de VPH-18 montrent un risque accru de progression vers le cancer et l'association entre quelques variantes et la persistance a été réalisée (269). À l'inverse, certaines variantes présentent un potentiel oncogénique inférieur (126, 232). L'hypothèse selon laquelle VPH-18 est préférentiellement retrouvé dans les adénocarcinomes est alimentée par quelques publications bien que les échantillons de ceux-ci soient limités et que ces observations restent à être confirmées (34, 168). L'une d'elle souligne que les variantes du clade africain sont exclusivement retrouvées dans les carcinomes épidermoïdes tandis que les variantes de la branche asiatique-américaine sont aussi retrouvées dans les adénocarcinomes (67). Une association entre certaines variantes de VPH-33, -35, -52 et -58 avec la persistance et la présence de lésions de haut-grade a également été observée dans quelques études (4, 98, 109).

3.3.2.4 Facteurs endogènes

Plusieurs facteurs génétiques impliqués dans la réponse immunitaire présentent des polymorphismes qui influent sur la susceptibilité de la femme à développer une infection vaginale (104). D'abord, la soustraction des cellules aux signaux d'apoptose reçus est une étape critique dans le développement d'une tumeur. Ainsi, certains polymorphismes au niveau de ces voies de signalisation se traduisent par une augmentation du taux de cancer, tel qu'observé au niveau de Fas/FasL dans les cas de cancer du col de l'utérus (160, 291). De plus, bien que réfutées par certaines études, l'homozygotie arginine à la position 72

du gène p53 semble être un facteur de risque dans certains contextes (140, 155, 251). Aussi, le polymorphisme peut influencer le niveau d'expression de certaines chimiokines. Par exemple, un phénotype de faible sécrétion de TNF- α accroît les risques de développer une lésion de type CIN1 tandis qu'une forte expression d'IFN- γ augmente les risques de cancer du col de l'utérus en favorisant l'inflammation, souvent identifié comme un marqueur important de la progression des tumeurs (150, 159). Également, certains polymorphismes, notamment au niveau de l'interleukine -10 et du récepteur de l'interleukine -1 (IL-1RA) pourraient être des facteurs prédisposant au cancer du col (84, 154, 291). Récemment, l'implication des polymorphismes de Fas et de l'IL-10 a été remise en doute au profit de polymorphismes au niveau des récepteurs de chimiokine -2 (CCR-2) et de l'interleukine -4 (IL-4R) (139).

L'efficacité de la réponse immunitaire peut être influencée par l'habileté des cellules à présenter les antigènes viraux par l'intermédiaire des molécules du HLA de type II. Hautement polymorphiques, ces régions ont été étudiées afin de déterminer si certains allèles prédisposaient au cancer du col. Selon la région du monde où l'étude a été effectuée, les résultats obtenus variaient d'un effet nul ou aggravant les risques pour les allèles DQB1*0301-3 et DRB1*1501/DQB1*0602 (131). À l'inverse, DQB1*0301-3 est associé à un risque moins grand de développer un cancer du col. Une hypothèse veut cependant qu'il soit plus facile d'identifier un allèle protecteur qui présente efficacement les antigènes de VPH contrairement à une série d'allèles qui présentent les antigènes avec peu d'efficacité, ce qui viendrait expliquer le plus grand nombre d'allèle protecteur identifié (131). Plusieurs allèles de faible prévalence ont aussi été démontrés comme protecteurs mais la reproduction de ces résultats demeure statistiquement improbable. Quelques études ont également porté sur les HLA de type I sans qu'un consensus soit obtenu sur quelque allèle à l'exception de l'allèle DQB1*0302 qui est associé avec un risque plus élevé de cancer du col de l'utérus (23, 30, 113, 129, 271). L'haptoglobine est une protéine de la phase aiguë de la réponse inflammatoire et une étude récente impute un risque plus élevé de cancer du col aux femmes présentant une haptoglobine de type 1.1 (173). Ces résultats restent à être confirmés, étant donné la faible prévalence de ce phénotype dans la population étudiée essentiellement caucasienne.

3.4 Autres cancers anogénitaux

Les cancers de la vulve et du vagin comptent pour 6% des cancers gynécologiques et bien qu'ils soient d'origine hétérologue, une forte proportion est attribuable au VPH. La forme la plus fréquemment rencontrée du cancer de la vulve survient chez les jeunes femmes et découle de la présence de VPH alors qu'une forme indépendante de VPH est retrouvée chez les femmes plus âgées (32). Ces cancers sont souvent associés à des lésions de haut grade au niveau du col de l'utérus (32). Une classification établie en fonction de la progression de la dysplasie, analogue à celle employée pour les lésions du col de l'utérus, a été instaurée en 1986. Cependant, en 2004, l'ambiguïté entourant le diagnostic de la lésion de bas-grade du vagin (Vagina Intraepithelial Neoplasia 1) ainsi que l'absence d'un continuum des lésions bénignes au cancer a entraîné le retrait du premier échelon de la gradation. Cette modification est toutefois contestée, particulièrement par une étude qui établit un paradoxe avec les lésions du col de l'utérus. Cette étude fait état de la présence de VPH-6 ou -11 dans 43% des lésions de bas-grade et à hauteur de 3% dans les lésions de haut-grade, tandis que les types à haut-risque -16 et -18 sont quant à eux retrouvés dans 6% des lésions de bas-grade et dans 91% des lésions de haut-grade (252).

Le cancer du pénis est très peu fréquent et touche annuellement environ 400 hommes en Grande-Bretagne. À l'instar du cancer du col de l'utérus, d'importantes disparités régionales caractérisent ce cancer pour lequel l'incidence serait 20 fois plus élevée dans les pays en voie de développement en comparaison à l'Occident (Figure VIII). La majorité des cas se déclarent dans la soixantaine (188). VPH serait fortement associé aux carcinomes des cellules squameuses qui représentent 95% des tumeurs issues du pénis. Selon l'étude, l'ADN de VPH serait détecté dans 40 à 80% des cas (147).

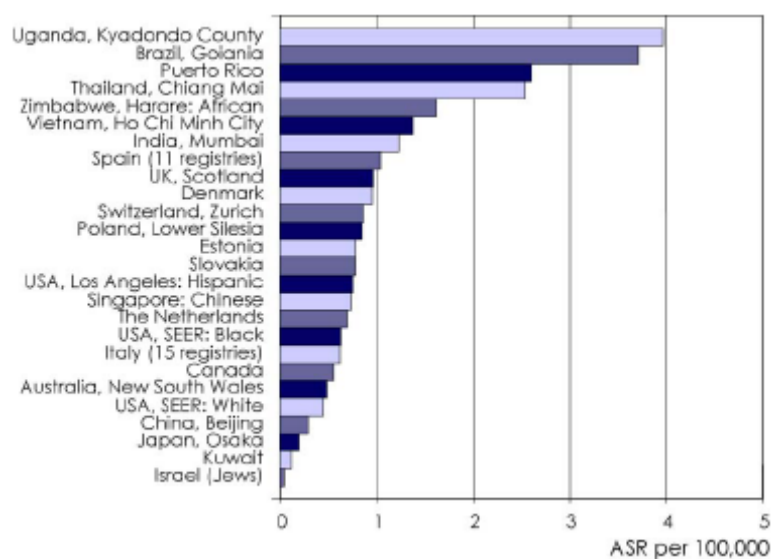


Figure VIII : Incidence du cancer du pénis standardisé en fonction de l'âge pour les années 1993-1997 (211).

Le cancer de l'an us a été répertorié à hauteur de 4660 cas aux États-Unis en 2006 selon le *National Cancer Institute* (261). 660 décès ont été attribués à ce cancer durant la même période. Plutôt rare dans la population hétérosexuelle où un cas sur 100 000 individus est répertorié, les hommes ayant des relations avec des hommes ont un risque relatif 37 fois plus élevé d'être touchés par cette maladie (263). Les individus atteints du VIH courent deux fois plus de risque que les hommes séronégatifs mais tout individu immunosupprimé est davantage à risque. Les facteurs de risque incluent le tabagisme et la pratique de la pénétration anale. Certains auteurs évaluent que le cancer de l'an us remplit les conditions pour être classifié comme une maladie transmise sexuellement (105). VPH est généralement détecté dans les cas de carcinome épidermoïde de l'an us qui comptent pour 84% des tumeurs de la région anale. La classification de la progression des dysplasies anales, nommée AIN (anal intraepithelial neoplasia), repose sur des critères semblables à celui des lésions du col de l'utérus (263).

3.5 Cancers associés

Le cancer de la peau autre que le mélanome est le cancer le plus souvent diagnostiqué chez les Caucasiens et sa fréquence tend à augmenter depuis les 20 dernières années (257). Les décès qui y sont associés sont rares si bien que le taux de guérison est estimé à 99% (215). Les premiers doutes quant à l'implication de VPH dans les cancers de la peau sont apparus alors que ces virus étaient identifiés chez les gens souffrant d'épidermodysplasie verruciformis. Une forte majorité de ces individus développent un cancer de la peau avant l'âge de 40 ans (256). Ensuite, le fait que plus de 90% des tumeurs des individus immunosupprimés et 50% des immunocompétents contiennent de l'ADN viral de VPH alimente cette théorie (215). Cependant, VPH est aussi retrouvé sur la peau saine ce qui rend nécessaire l'exclusion d'infections superficielles par un VPH contaminant afin de ne pas leur imputer précipitamment ce type de cancer. Cette précaution a rarement été prise dans les études par le passé. Une étude de 2007 éliminant une couche de peau superficielle en est venue à des conclusions qui influenceront certainement la recherche dans ce domaine (92). Selon l'étude, VPH est plus souvent retrouvé au niveau de la peau avec un cancer épidermoïde ou avec une lésion bénigne que sur la peau saine pour un même site anatomique chez un même individu. Qui plus est, des types identiques de VPH n'ont été retrouvés que dans 2,3% des cas où un site anatomique sain a été comparé à un site anatomique lésé chez un même individu. Les lésions semblaient plus souvent révéler la présence de VPH appartenant à la sous catégorie 1 ou 2 du genre beta-papillomavirus malgré qu'aucun type particulier n'ait reçu le statut de « haut-risque ». D'ailleurs, VPH est plus enclin à être détecté au niveau des sites particulièrement exposés au soleil. Ce phénomène pourrait être attribuable à l'effet immunosupresseur des UV et les auteurs avancent également que l'immunosuppression induite par les médicaments chez les greffés combinés à l'effet des UV pourraient expliquer leur plus grande susceptibilité au cancer de la peau (123). Bien que les UV soient reconnus comme le principal facteur étiologique des cancers de la peau, le rôle de cofacteur de VPH dans la carcinogenèse est à envisager.

Une proportion des cancers de la tête et du cou, particulièrement ceux du pharynx, du larynx et de la cavité buccale est attribuable aux VPH (127). Ces derniers seraient également détectés dans un large éventail de cancer sans qu'un lien de cause à effet ne soit hors de tout doute établi. Les cancers de l'œsophage, de la conjonctive, de la vessie, du poumon, de l'endomètre, des ovaires, du colon, de la prostate et du rétinoblastome présente dans une certaine proportion, des traces d'ADN viral provenant de VPH (108).

3.6 Autres pathologies

Les verrues sont sans contredits les plus communes des pathologies non néoplasiques causées par papillomavirus. Celles affectant la région ano-génitale sont désignées verruciformis condylomata, mieux connues sous le nom de condylomes. Ces proliférations épithéliales bénignes sont causées dans 90% des cas par VPH-6 ou -11 et il est estimé qu'environ 1% de la population américaine présente des condylomes apparents (156). Leur potentiel de transmission est reconnu comme étant élevé (206). Les traitements dépendent principalement de la taille, de la localisation et du nombre, mais l'efficacité de ceux-ci est limitée. En effet, malgré les traitements, des taux élevés de récurrence de l'ordre de 30% sont observés. Les conditions d'immunosuppression rendent le traitement des condylomes particulièrement difficile (78).

Entre 7 et 10% de la population rapporte avoir eu des verrues non génitales. Les jeunes de 12 à 16 ans sont particulièrement touchés par ce type d'infection qui régresse spontanément dans la majorité des cas (167). Les verrues plantaires sont principalement causées par VPH-1, les verrues vulgaires par VPH-1, -2, -4, -27 et -57 alors qu'VPH-3 et 10 sont responsables des verrues retrouvées au niveau du visage et des membres (107).

D'occurrence très peu élevée, les formes adulte et juvénile de papillomatose respiratoire récurrente ont été décrites pour la première fois au XIXe siècle. La forme adulte à une incidence de 2 par 100 000 individus alors que sa contrepartie juvénile est deux fois plus commune (114). Cette dernière est, dans la majorité des cas, diagnostiquée autour de la

troisième année de vie alors que la forme adulte se déclare autour de la trentaine ou de la quarantaine. Les lésions sont typiquement localisées à la rencontre des tissus épithéliaux squameux et cylindriques ciliés des voies aéro-digestives. Cette maladie est caractérisée par une prolifération bénigne de papillome squameux. Le traitement repose sur l'ablation chirurgicale visant à dégager les voies respiratoires afin de maintenir une qualité de vie acceptable aux sujets atteints (289). Une étude effectuée sur 603 enfants a révélé qu'ils avaient subi annuellement une moyenne de 5,1 interventions chirurgicales (225). Les types VPH-6 et -11 sont les plus communément rencontrés dans la papillomatose respiratoire récurrente (116).

De plus, papillomavirus pourrait participer à la pathogenèse de certaines maladies sur lesquelles les connaissances sont limitées, bien qu'il soit également envisageable que sa présence ne soit due à un épithélium altéré propice à sa multiplication (9). Par exemple, VPH-5, -6 et -38 seraient détectés dans jusqu'à 90% des lésions cutanées psoriasiques et les titres d'anticorps dirigés contre ces virus y seraient sept fois plus élevés que chez les peaux saines (85, 273). Plusieurs études contestent cependant ces données (29, 270).

Chapitre IV : Capside virale

La protéine majeure de la capside, L1, est retrouvée à raison de 360 copies dans la capside virale alors que la protéine L2 est présente en 12 copies. La capside du VPH se retrouve sous la forme d'un icosaèdre T=7 de 600 Å de diamètre. Chaque capsomère est composé de 5 monomères de la protéine L1. Les 12 capsomères disposés aux sommets de l'icosaèdre sont pentavalents, c'est-à-dire qu'ils jouxtent 5 capsomères, alors que les 60 autres sont hexavalents. Chacune des protéines L2 semble être associée à un sommet de l'icosaèdre (86).

4.1 Protéine L1

Les bases nécessaires à l'élucidation de la structure de la protéine L1 de 55kDa et de la capside du VPH-16 ont d'abord été jetées par Chen et ses collaborateurs en 2000. Il est cependant à noter que son évaluation de la structure de la capside virale n'a été qu'approximative compte tenu du fait qu'elle est effectuée sur un icosaèdre T=1. La cristallisation de la structure T=7 n'a pu être réalisée à ce jour et les expériences conduites par Chen et ses collaborateurs ont été effectuées sur un cristal de 12 pentamères (50).

Le monomère de L1, long de 504 résidus, est principalement constitué d'une série de brins β antiparallèles s'étendant des résidus 20 à 382 disposés de façon à former deux feuillets opposés connus sous le nom de « Jelly roll β sandwich » (Figure IX). Une projection latérale allant de résidus 383 à 475 est reliée à la structure centrale par le brin J de type β qui interagit avec le feuillet composé des brins CHEF, tandis que l'hélice H5 interagit avec la région hydrophobique créé par le feuillet BIDG. Cette projection est composée en partie de la boucle H4 (50).

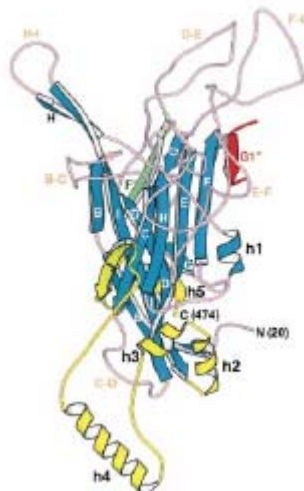


Figure IX : Représentation de la protéine L1. Les feuillets en bleu appartiennent au « Jelly roll β sandwich », les boucles en rose assurent la connexion entre les différents domaines. La région G1 interagissant avec le feuillet CHEF provient du pentamère en position antihoraire alors qu'en vert est illustré la région F du pentamère en position horaire. Les hélices en projections latérales sont en jaune (50).

4.1.1 Structure

L1 forme des VLP dans plusieurs contextes d'expression hétérologues tels que les systèmes faisant appel au *Baculovirus*, aux levures et au virus de la variole. Sa capacité à former spontanément des pseudo-particules virales en présence ou en absence de la protéine L2 a été mise à profit dans l'élaboration de vaccins.

D'abord, les protéines L1 s'assemblent en pentamères via les interactions des hélices H2, H3 et H4 avec les autres monomères. Aussi, le brin G, à la marge du feuillet BIDG, interagit avec le feuillet CHEF du monomère adjacent en position horaire. Finalement, la boucle HI, qui s'étend jusqu'à pouvoir être en contact avec son monomère voisin au deuxième degré, s'insère dans le sillon formé par les boucles FG et EF du monomère en position antihoraire. La somme de ces interactions mène à la formation de pentamères de forme conique ayant en son centre un espace d'un diamètre de 14 Å et où les monomères sont légèrement orientés vers l'extérieur (50).

L'architecture de la capside du VPH présente plusieurs similarités avec celles des virus SV-40 et du polyomavirus murin (166, 254). Ce constat, jumelé à l'identification d'un pont disulfure entre les cystéines des positions 175 et 428 de deux pentamères de la particule virale de VPH-16, a permis de parfaire le modèle de structure de la capside (88, 192, 236). Comblant les lacunes du modèle proposé par Chen, le modèle du « bras envahissant » est aujourd'hui préconisé. Selon celui-ci, chaque pentamère reçoit cinq projections et en étend tout autant vers les pentamères adjacents afin de cimenter la structure de la capside (Figure X). Une région charnière allant des résidus 403 à 413 précède la région 414-469 qui comprend la boucle H4 et qui forme les ponts disulfures entre pentamères, procurant davantage de stabilité à la capside. La région charnière, riche en glycine et en proline, procure la flexibilité nécessaire pour s'adapter à un environnement pentavalent ou hexavalent. La région conservée de 20 acides aminés en position N-terminale ainsi que la boucle CD contribueraient à augmenter la stabilité de la capside en obstruant le vide créé entre les pentamères (192). De plus, la boucle H5 de la protéine L1 semble être essentielle dans la pentamérisation compte tenu que sa région hydrophobique influe sur la structure de la protéine tandis qu'une délétion de la boucle H4 n'affecte que faiblement la multimérisation (20).

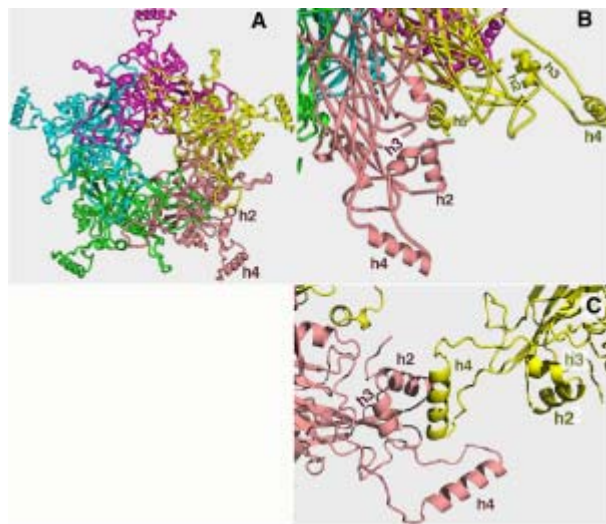


Figure X : Détails structuraux d'un capsomère de VPH. A Vue apicale d'un pentamère où chacun des monomères est identifié par une couleur différente. B Positionnement des projections latérales d'un monomère. C Interaction entre les projections latérales de monomères voisins (20).

4.2 Régions hypervariables

L'alignement des séquences des protéines L1 de 49 types de VPH a permis de constater que des régions hypervariables étaient disposées à travers la séquence mais que la position relative était constante à travers les types de VPH (Figure XI). Le modèle structurel permet de constater que ces régions correspondent aux boucles BC-CD-DE-EF-HI (Figure XII). L'absence de conservation de ces régions, contrairement au reste de la protéine, peut s'expliquer par la dérive génique ou par la pression sélective. La première hypothèse attribue la cause de la variabilité à la dérive par l'absence de contrainte fonctionnelle qui pourrait limiter ce processus. La seconde, plus probable, souligne la pression qu'exercent les anticorps en contact avec le virus qui contribue à induire des changements de façon à échapper à la reconnaissance du système immunitaire (50).

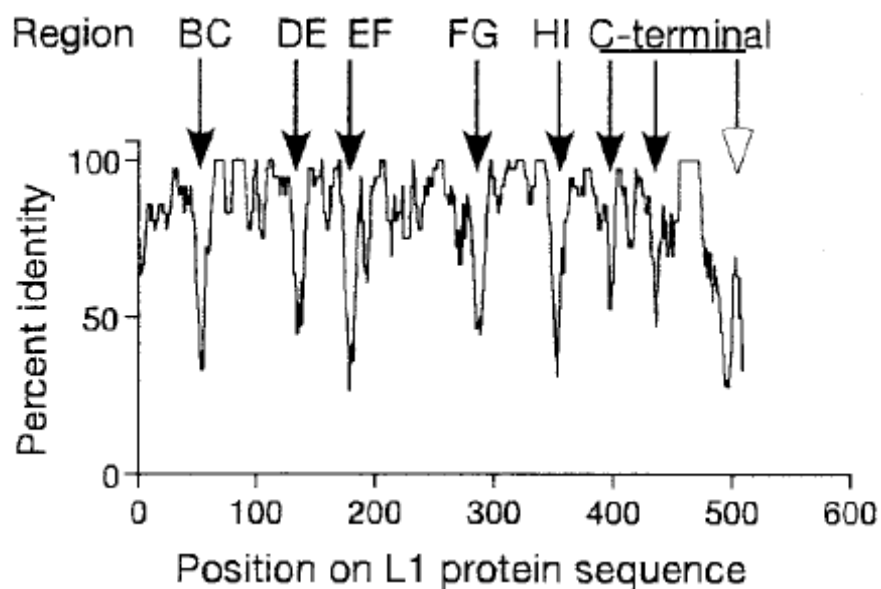


Figure XI : Alignement de la séquence de la protéine L1 des types de VPH de la famille $\alpha 9$. Le faible pourcentage d'identité entre les boucles BC, DE, EF, FG, et HI est mis en évidence (38).

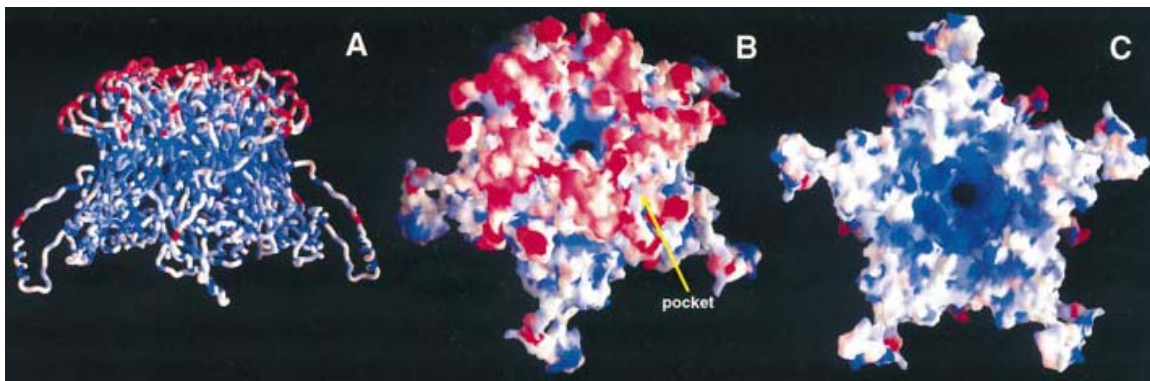


Figure XII : Représentation de la variabilité de la protéine L1 de 49 types de VPH. Les régions hypervariables sont en rouges, les régions partiellement conservées en blanc et totalement conservées en bleu. A Vue latérale d'un capsomère. B Vue apicale d'un pentamère de L1. C Vue du dessous d'un pentamère où les résidus conservés au fond de la structure de forme pentamérique est mise en évidence (50).

4.2.3 Polymorphisme chez VPH-31

Les études sur le polymorphisme de la protéine L1 de VPH-31 sont rares. D'abord, le premier VPH-31 à avoir été identifié l'a été à partir d'une biopsie originant d'une dysplasie cervicale (171). Les méthodes de l'époque ne permettaient qu'une caractérisation partielle du virus. L'évaluation de son homologie par rapport aux autres variantes identifiées à ce jour reposait sur des analyses de *Southern blot* réalisées à différentes températures et dans des conditions de salinité variables, suivant une digestion enzymatique. Un sous-type du VPH-31 a été identifié de la même façon suite à des expériences réalisées sur une nouvelle lignée cellulaire (16). Seule une étude exhaustive sur le polymorphisme du VPH-31 a été publiée et porte sur quatre isolats de femmes américaines parmi lesquelles trois présentaient des lésions de types CIN 3 et une CIN 1 (137).

4.3 Protéine L2

La protéine L2 semble être, au contraire de la protéine L1, moins limitée à un rôle structural et participerait activement à plusieurs étapes du cycle viral. Une fois synthétisée dans le cytoplasme, ses deux signaux de localisation situés en C- et en N-terminal et l'interaction de sa partie C-terminale avec la chaperonne cellulaire Hsc70 la

dirige vers le noyau en vue de l'assemblage (90). Son entrée est alors régulée par son interaction avec des récepteurs d'import nucléaire de type kap beta (24, 66). Elle recrute alors la protéine L1 en l'entraînant dans des compartiments subnucléaires nommés « Nuclear domain 10 » où l'assemblage est présumé avoir lieu (148). L2 aurait aussi la propriété d'interagir avec la protéine E2, qui à son tour lie l'ADN viral. Ces deux caractéristiques poussent à croire qu'elle joue un rôle clé dans l'encapsidation du génome viral (86).

Le rôle de L2 ne s'arrête pas une fois le virus relâché de la cellule. Au contraire, son implication au niveau de l'attachement à la membrane et de l'étape de fusion avec la cellule est soutenue par un nombre grandissant de publications où l'infectiosité du virus dépend de sa présence. La région C-terminale a été démontrée comme étant nécessaire afin que le virus endocyté par une vésicule de clathrine puisse s'échapper de l'endosome (136). La protéine L2 procéderait d'abord, dans des conditions acides, en associant une région positivement chargée aux lipides négatifs de la membrane. Il s'ensuivrait un stress qui altérerait l'intégrité membranaire résultat de l'insertion d'une région hydrophobe de L2 dans la membrane (145). La décapsidation surviendrait, selon ce mécanisme, dans les endosomes et serait dépendant du clivage de la partie N-terminale de la protéine L2 par une protéase de type furine (228). La protéine L2 accompagnerait l'ADN viral vers le noyau et permettrait son entrée par son interaction avec les mêmes récepteurs cellulaires que lors du processus d'assemblage (24). Le cheminement vers le noyau serait assuré par l'interaction du domaine C-terminal de la protéine L2 avec les dynéines cellulaires (89). Une voie alternative ne faisant pas interagir de lysosomes ou d'endosomes semblerait plutôt prédominer dans le cas de papillomavirus endocytés par des vésicules de caveolea (132). La protéine L2 pourrait influencer le trafic vésiculaire par son interaction avec la tSNARE syntaxine 8 et permettre la décapsidation dans le réticulum endoplasmique (27).

Chapitre V : Vaccin

5.1 Généralités

Plusieurs vaccins contre des maladies d'origine virale tels que l'hépatite et la grippe ont été développés au fil du temps. Les premières expériences d'immunisation à partir de protéines de la capsidite d'un papillomavirus ont été réalisées chez le modèle animal du lapin à queue blanche en 1992 (151). La protéine L1 s'assemble spontanément en conservant les propriétés immunologiques du virus natif en n'étant toutefois pas infectieux du fait que le pseudo virion formé ne contient pas de matériel génétique. La réponse immunitaire des rongeurs s'est avérée robuste en démontrant une forte réponse en IgG, ce qui a encouragé la poursuite des expérimentations chez l'humain. Les protéines de la capsidite de VPH-11 et -16 ont été injectées chez des femmes en 1997 (122). La compagnie Merck est parvenue à démontrer deux années après l'immunisation par VPH-16 qu'aucune femme des 765 recrutées n'a développé d'infections persistantes vis-à-vis ce type alors que 41 des 765 femmes attirées au groupe placebo l'ont subi (157). Quatre ans après l'immunisation, le vaccin démontrait une efficacité de 94% alors que sept femmes vaccinées contre 111 ayant reçu le placebo ont développé une telle infection (175).

Ces expériences ont servi de prémisse à la mise au point d'un vaccin quadrivalent, le Gardasil, fabriqué par Merck et d'un vaccin bivalent, le Cervarix, commercialisé par Glaxo Smith Kline (GSK). Le premier est disponible dans 80 pays depuis juin 2006 tandis que le second a été soumis aux autorités réglementaires américaines en 2007 et a été approuvé à l'automne 2009. Le vaccin quadrivalent contient les types -6, -11, -16, et -18 pour qui l'assemblage des pseudovirus repose sur un système d'expression en levure. Un système faisant appel à un baculovirus recombinant infectant des cellules d'insectes assure la production de VLP pour le vaccin bivalent contenant VPH -16 et -18 (22). L'hydroxide d'aluminium (AsO_4) est l'adjuvant que contient le vaccin de GSK alors que Merck a opté pour le sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium qui a démontré sa supériorité chez la souris (43).

5.2 Administration

Les deux vaccins sont administrés de façon intramusculaire à raison de trois doses séparées d'un intervalle minimal de six mois. La population actuellement visée par les campagnes de vaccination est limitée aux jeunes filles de 11-12 ans mais toutes femmes de 9 à 26 ans peuvent recevoir le vaccin selon le « Advisory Committee on Immunization Practices » (178). Somme toute, les effets adverses sont peu nombreux mais une douleur au site d'injection a été observée à plus haute fréquence chez les individus vaccinés que chez ceux recevant le placebo. Cervarix semble être le vaccin qui occasionne le plus de douleur (119). Des cas isolés du syndrome de Guillain-Barré et de paralysie faciale partielle ont été rapportés dans la population vaccinée, notamment chez une jeune femme ayant reçu depuis peu le vaccin contre l'hépatite B (22).

Les titres d'anticorps plus élevé d'un facteur 1,7 à 2,7 constatés chez les jeunes militent en faveur de l'instauration de campagne de vaccination en bas âge. Aussi, les jeunes semblent ressentir moins de douleur à la vaccination, mais des cas de fièvre sont plus nombreux dans ce groupe d'âge. Des études en cours examinent la possibilité d'administrer des vaccins chez les enfants séropositifs de 7 à 12 ans ainsi que chez les femmes de 26 à 45 ans (22). L'évaluation des bénéfices qu'entraînerait la vaccination systématique des hommes par rapport au coût engendré est aussi sous évaluation. La combinaison des vaccins réunissant un effet protecteur contre notamment VPH, le tétanos, la diphtérie et la coqueluche est considérée et certaines de ces combinaisons sont d'ores et déjà brevetées (285).

5.3 Efficacité

Le vaccin est considéré prophylactique puisqu'il ne présente aucun effet clairement démontré pour les infections déjà présentes (21). Les données compilées jusqu'ici l'ont été chez des femmes n'ayant pas d'historique de lésions cervicales et par conséquent, aucune de ces conclusions ne peut être extrapolée chez les femmes ayant des lésions (47). Néanmoins, une réduction de 46% du nombre de CIN2/3 ou d'adénocarcinome

occasionnés par les types -6, -11, -16 et -18 a été observée chez les femmes vaccinées présentant une infection au moment de la vaccination due à l'un des quatre types précédemment mentionné (47). Cette constatation oriente la vaccination vers une population n'ayant pas été infecté par le virus, d'où le choix des jeunes filles n'ayant, selon toute vraisemblance, pas eu de relation sexuelle. Les sujets immunodéficients, notamment ceux atteints par le VIH qui sont particulièrement à risque de développer des lésions ano-génitales, pourraient bénéficier des effets du vaccin. Des études réalisées chez la souris déficiente en cellules CD4 ont permis de démontrer une réponse immunitaire contre les épitopes du VPH (284).

L'efficacité du vaccin contre VPH dépend de l'établissement d'une population de cellule B mémoires. Cinq ans après son administration chez des femmes, des titres d'anticorps égaux ou supérieurs à ceux observés dans les cas d'infections naturels témoignent de l'efficacité du vaccin (103, 268). Des études devront cependant être entreprises afin d'établir la durée de la protection induite par ces vaccins. Les programmes de dépistage du cancer du col de l'utérus déjà mis en place dans les pays scandinaves en ont fait un choix tout indiqué pour la poursuite d'étude visant à établir l'efficacité à long terme de ces vaccins (163). Deux études d'envergure de phase III et IV y sont actuellement en cours. Jusqu'ici, la mise en commun d'études cliniques portant sur le vaccin quadrivalent révèle qu'une seule femme parmi les 8579 vaccinées a développé une lésion cervicale contre 85 sur 8550 pour le groupe placebo pour une efficacité de 99% (13). Le vaccin bivalent a démontré dans une étude de phase III une efficacité supérieure à 90% (207).

5.4 Risque de sélection

L'éventualité où l'élimination des VPH de la niche écologique qu'ils occupent pourrait entraîner l'émergence de souches oncogénique a été soulevée notamment par la FDA. En observant un taux plus élevé, mais non significatif, de lésions cervicales chez les femmes séropositives infectées par un type non contenu dans le vaccin qu'elles ont reçu par rapport au groupe placebo, l'organisme en est venu à émettre cette réserve (237). N'ayant pas observé de compétition pour la niche écologique entre les virus et n'étant pas un

constituant de la flore normale, il n'y a, *a priori*, aucune raison qui pourrait laisser croire qu'un autre VPH comblerait la niche laissée vacante (119, 165). Aussi, le danger d'exercer une pression sélective sur certaines variantes est un aspect de la vaccination qui peut être préoccupant. Cependant, l'utilisation par le virus de la machinerie cellulaire qui introduit rarement des erreurs rend peu probable son évolution rapide vers une forme qui ne serait pas couverte par l'immunité induite par le vaccin. De plus, les variantes divergeant de 2% à l'intérieur d'un type sont neutralisées à partir des anticorps générés par un virus du même type, diminuant davantage les probabilités d'un tel événement (229).

5.5 Immunité croisée

Les expériences menées sur le lapin à queue blanche ont établi que la protection du vaccin était conférée exclusivement envers les types qui le composent (31). De façon similaire, les individus ayant reçu le vaccin contenant seulement VPH-16 avait un taux de lésions attribuables aux autres types similaire au groupe placebo (175). La réactivité croisée est un phénomène qui peut étendre la couverture envers des types oncogènes qui n'entrent pas dans la composition du vaccin. Aussi, la diminution des lésions CIN1 à CIN3 qui sont majoritairement causées par des types non inclus dans le vaccin pourrait éviter le stress encouru par l'annonce de telles lésions et alléger la pression sur le système de santé qu'exerce leur suivi (61, 214).

Les types non inclus dans les deux principaux vaccins sont la cause de 30% des cancers du col de l'utérus. L'étude de l'épitope de la capsidie reconnus par les anticorps a permis d'observer que certains étaient répandus à plus d'un type et rendaient ainsi possible la neutralisation de plus d'un type par un même anticorps. Malgré qu'ils soient pratiquement absents des lésions de haut grade, l'intérêt de l'immunité croisée entre les types -6 et -11 n'est pas moindre en raison du coût des traitements qu'ils engendrent (153). Ces deux types partagent des épitopes dont un notamment reconnus par l'anticorps H6.J54 (59, 272). Il semble également que les types 18 aient en commun certains épitopes avec le type 45 qui lui est phylogénétiquement apparenté (110). Des expériences

similaires *in vitro* ont jeté la lumière sur l'immunité croisée entre les membres de la famille $\alpha 9$ (62). Les types -16, -31, -33 et -58 seraient neutralisés simultanément par un même anticorps. Cependant, le taux de réactivité croisée le plus élevé est rencontré chez VPH-16 et -31 où l'activité de l'anticorps chez VPH-31 représente 1% de sa capacité neutralisante pour son épitope principal situé sur la protéine L1 de VPH-16. Cette observation effectuée en étudiant un répertoire limité d'anticorps se traduit par une protection de 34,5% envers VPH-31 et de 94,2% face à VPH-45 suite à l'administration de vaccin bivalent chez des femmes pour qui la diversité du bassin d'anticorps est incomparable à l'étude *in vitro* (120). Cette dernière faisait également état d'une faible réactivité croisée entre VPH-39 et -59 (62).

5.6 Perspectives

L'élargissement du nombre de types de VPH couvert par le vaccin serait un exploit sur lequel plusieurs groupes de recherche se penchent. Munoz et ses collaborateurs ont estimé qu'un vaccin nonavalent basé sur la protéine L1 serait nécessaire afin d'induire une immunité contre 90% des types de virus présentant un fort potentiel oncogénique (196). La protéine L2 est considérée comme une alternative prometteuse. L'anticorps RG-1 qui réagit contre sa région hautement conservée entre les VPH-16 et -18 constitué des résidus 17 à 36 a démontré une capacité à neutraliser les pseudovirions des VPH-5, -6, -16, -18, -31, -45, -52 et -58 (101). Aussi, un vaccin à ADN codant pour une protéine de fusion entre les protéines virales E6, E7 et L2 est présentement à l'étude et semblerait particulièrement efficace en générant une réponse de cellules CD8 contre les cellules cancéreuses dans lesquelles sont exprimées E6 et E7 (100, 149). Cependant, le plus grand obstacle qu'affronte le domaine de la vaccination contre le cancer du col de l'utérus demeure son accessibilité aux populations les plus touchées. L'Organisation mondiale de la santé, les compagnies pharmaceutiques ainsi que les œuvres caritatives devront coopérer afin de trouver un terrain d'entente et rendre disponible ce vaccin au pays moins bien nantis. Parmi les améliorations à apporter afin de rendre possible ce projet, le coût du vaccin devra être abaissé. La culture en cellule eucaryote est actuellement la norme

mais pourrait dorénavant se faire dans un hôte bactérien tel qu'*Escherichia coli* afin d'amoindrir les coûts de production (87, 233). La résistance à la température est aussi un aspect à ne pas négliger dans les pays où les moyens de réfrigération sont plus rares. Dans un contexte où le matériel médical est un luxe, l'administration du vaccin sans faire usage de seringue serait un atout. En réponse à cet obstacle, l'administration transdermique et intranasale sont considérés (226).

Objectifs et hypothèse

L'association entre le polymorphisme de certains gènes et la persistance de l'infection ayant été démontrée notamment chez les VPH-16, -18, -33, -35 et -52, il est pertinent d'explorer l'éventualité où une telle relation pourrait être retrouvée chez le VPH-31 (4, 98, 109, 169, 269, 279). Comme mécanisme qui pourrait expliquer une telle association, il est possible de mentionner une capacité accrue d'adhésion aux cellules épithéliales que pourrait procurer certaines variations de la capsid. Également, des altérations majeures de la séquence de la protéine de la capsid pourraient prévenir son assemblage et ainsi réduire les risques de neutralisation par le système immunitaire de l'hôte (283). Afin d'attester l'existence de variantes présentant de telles propriétés, le polymorphisme de la capsid a été mis en relation avec la durée de l'infection ainsi qu'avec le stade de la lésion. Compte tenu des observations rapportées chez les autres membres de l'espèce 9 des alpha-papillomavirus, il est possible de croire qu'une telle association pourra être observée pour la protéine de la capsid de VPH-31 (4, 98, 109). Cependant, ces conclusions ont été tirées à partir de l'analyse de gènes ayant un rôle direct dans l'oncogenèse, soit E6, E7 et LCR, tandis que les données recueillies au sujet des protéines de la capsid restent plutôt éparses (137).

La cristallographie de la protéine majeure de la capsid L1 de VPH-16 a permis d'établir avec précision sa structure (50). La proximité phylogénétique entre VPH-31 et VPH-16 permet d'avancer que les régions hypervariables exposées au système immunitaire ainsi que les régions d'importance structurelle identifiées chez ce dernier seront retrouvées chez VPH-31. Les régions hypervariables, de par leur exposition au système immunitaire de l'hôte, devraient avoir subi une pression de sélection dont les régions structurelles enfouies au sein de la protéine ont été exemptes, ce qui devrait entraîner une plus grande variabilité dans les régions externes comparativement aux régions internes.

Les femmes recrutées aux fins de cette étude proviennent de cliniques dédiées au suivi d'infection transmise sexuellement et cet échantillonnage permet par conséquent de comparer l'incidence de l'infection à VPH-31 entre les femmes canadiennes VIH+ à celles à risque de contracter cette maladie. Des résultats contradictoires ont été obtenus jusqu'ici quant à la

supériorité de l'incidence des infections par des VPH considérés à haut risque comparativement aux bas risques chez les femmes VIH+ (72, 124, 208). L'incidence entre ces deux groupes ne devrait donc pas présenter une différence significative.

DÉCLARATION DE L'ÉTUDIANT CONCERNANT L'ARTICLE CONTENU DANS CE MÉMOIRE

J'ai assuré la conception des amorces spécifiques ainsi que l'optimisation des conditions expérimentales pour l'amplification et le séquençage du gène de la capsid de VPH-31. Le criblage de la banque de spécimens de lavages cervico-vaginaux visant à identifier les échantillons positifs pour VPH-31 avait préalablement été réalisé par l'équipe du laboratoire. J'ai réalisé toutes les manipulations nécessaires à la caractérisation du gène de la protéine majeure de la capsid du VPH-31, allant de l'amplification au séquençage, après quoi je me suis consacré à l'analyse des séquences générées. J'ai également collaboré à l'écriture de l'article.

Article

Article accepté en date du 7 janvier 2010 pour publication dans le *Journal of medical virology*.

Polymorphism of the capsid L1 gene of human papillomavirus types 31, 33 and 35.

Gilbert Cornut¹, Simon Gagnon¹, Catherine Hankins^{3,4}, Deborah Money⁵, Karina Pourreux³, The Canadian Women's HIV Study Group, Eduardo L. Franco² and François Coutlée^{1,2,6}.

1- Laboratoire de Virologie Moléculaire, Centre de Recherche and Département de Microbiologie-Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada.

2- Division of Cancer Epidemiology and Department of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Health, McGill University, Montreal, Que., Canada.

3- Département de Médecine Sociale et Préventive, Université de Montréal, Montréal, Qué., 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- Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada.

The Canadian Women's HIV Study Group includes the following investigators from across Canada: Halifax: Janet Connors, Rob Grimshaw, David Haase, Lynn Johnston, Wally Schleich, Arlo Yuzicappi-Fayant. Hamilton: Stephen Landis, Fiona Smail. 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.

Key words: HPV, polymorphism, vaccine, capsid, cancer, HPV-16

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.

Abstract

The L1 gene encodes for the major capsid protein of human papillomaviruses (HPV). There is limited information on the polymorphism of L1 for types related to HPV-16. This report explores the polymorphism of L1 in phylogenetically-related types 31, 33, and 35 compared to HPV-16. Genital specimens collected from 732 HIV-seropositive and 323 HIV-seronegative women were screened for HPV DNA with consensus L1 PCR. Cervical samples positive for HPV-16 (n=74), -31 (n=78), -33 (n=37), and -35 (n=58) were further characterized by PCR-sequencing of the complete L1 gene. The number of nucleotide substitutions within L1 ranged from 19 for HPV-33 to 52 for HPV-31. The ratio of the number of variants/number of isolates tested was higher for HPV31 (56.4%, p=0.05) and HPV-35 (60.3%, p=0.04) compared to HPV-16 (40.5%), while this ratio was lower for HPV-33 (24.3%), although not significantly (p=0.14). The maximal distance between HPV variants was greater in the five putative surface-exposed loops of L1 than in sequences outside the loops (p<0.01). Synonymous variations were encountered in 1.7% (95% CI 1.1-2.3) of nucleotides inside the L1 loops and 2.4% (95% CI 1.2-3.7) of nucleotides outside the L1 loops. Non-synonymous variations were encountered in 1.8% (95% CI 1.1-2.5) of nucleotides within the L1 loops and 0.2% (95% CI 0-0.4) of nucleotides outside the loops. dN/dS ratios were below 1.0 in extra-loop and intra-loop regions, but they were lower in extra-loop regions. These results suggest that sequences within and outside the hypervariable loops of L1 were under selective constraint.

Introduction

More than 100 genotypes of Human papillomaviruses (HPV) infect mucosal and cutaneous epithelial cells in humans. The 40 mucosal HPV genotypes are classified into low-risk and high-risk types depending on their association with cervical intraepithelial neoplasia and cancer [Bosch et al., 2002]. HPV types 31, 33, and 35 are closely related to HPV-16, the most prevalent type detected in cervical cancer [Munoz et al., 2003]. These genotypes are considered as high-risk types based on epidemiological and phylogenetic studies [Chan et al., 1992; Munoz et al., 2003]. These types also segregate into the same phylogenetic branch, designated species 9 of the alpha-papillomavirus genus [de Villiers et al., 2004]. In North America, HPV-31, -33 and -35 are important oncogenic types as they rank amongst the seven most frequent genotypes detected in cervical cancer [Clifford et al., 2006]. Moreover, HPV-35 was amongst the oncogenic genotypes along with HPV-16 and 59 with the highest risk for cervical cancer in an international case-control study [Munoz et al., 2003]. We have previously reported on the polymorphism of long control region (LCR), E6 and E7 genes of these three genotypes in a cohort of sexually active women in Canada [Gagnon et al., 2004; Gagnon et al., 2005].

Humoral responses against HPV types target a complex set of epitopes, both type-specific and cross-reactive [Orozco et al., 2005]. Linear and conformational epitopes have been mapped to the capsid of HPV-16 [Christensen et al., 1996a; Christensen and Kreider, 1990; White et al., 1998]. Non-contiguous loop regions of L1 that display critical components of type-specific and conformational epitopes are juxtaposed upon L1 folding into capsomers [Carter et al., 2006; Christensen et al., 2001; Olcese et al., 2004]. HPV L1 loops exhibit considerable polymorphism within and between types [Carter et al., 2006; Christensen et al., 2001; Olcese et al., 2004], resulting in different binding affinities to neutralising antibodies [Varsani et al., 2006]. L1 polymorphism may have been established to escape neutralisation since non-synonymous variations are localised closely to neutralisation epitopes [Pastrana et al., 2001; Roden et al., 1997]. A single amino acid change can also markedly affect the efficiency of assembly of HPV-16 L1 protein into a virus-like particle [Kirnbauer, 1996].

Despite these important facts, there is limited information available on the polymorphism of the L1 gene of types related to HPV-16 [Gagnon et al., 2007; Icenogle et al., 1995; Raiol et al.,

2009;Stewart et al., 1996;Yamada et al., 1995]. The most recent report on HPV types related to HPV-16 was conducted in Brazil and analyzed only a portion of the L1 protein [Raiol et al., 2009]. In this work, the polymorphism of the L1 gene of high-risk types 31, 33, and 35 is described and compared in this work to HPV-16 polymorphism in isolates collected from a population of sexually active women living in Canada infected or at risk of being infected by HIV. We also assessed whether L1 polymorphism was greater in areas of the L1 proteins putatively exposed to the immune system.

Materials and methods

Study population and study design. Cell lysates were selected from stored processed cervicovaginal lavages collected from 1055 participants (732 HIV-seropositive, 323 HIV-seronegative) recruited in the Canadian Women's HIV Study who had tested positive at least once for HPV-16, 31, 33 or 35 DNA. From 1993 to 2000, women were recruited across Canada if they were seropositive for HIV (n=732) or if they were seronegative (n=323) but at risk for HIV infection [Hankins et al., 1998;Hankins et al., 1999]. The original study design and characteristics of the cohort have been described elsewhere [Aho et al., 2003;Hankins et al., 1999]. Briefly, each cell lysate was amplified for β -globin DNA with PC04 and GH20 primers to control for DNA integrity [Coutlée et al., 1997]. β -globin-positive lysates were tested for the detection and typing of HPV DNA using the MY09-MY11-HMB01 consensus L1 PCR as described previously [Coutlée et al., 1997;Coutlée et al., 1999]. Amplified products were spotted onto nylon membranes and reacted under stringent conditions with 32 P-labelled oligonucleotide probes for types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56 and 58. All participants provided written informed consent. Ethics committees of participating institutions approved the study protocol.

Amplification and PCR-sequencing of HPV-16, 31, 33, 35 L1 genes. HPV-16, -31, -33, and -35 isolates from cervicovaginal lavages were further characterized by amplifying three overlapping regions of L1 using primer pairs described in Table 1. Two μ l of processed sample was amplified in a 9600 Thermal Cycler in a 100 μ l reaction volume containing 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 units of *AmpliTaq* Gold enzyme (Roche Diagnostic Systems,

Mississauga, Ont.), 2.0 mM MgCl₂ concentration, 0.5 μM of each primer, 0.25 mM each dCTP, dTTP, dGTP and dATP. Amplification profiles included an initial step at 94°C for 120 sec followed by 10 cycles at 94°C for 15 sec, at 55°C for 30 sec and at 72°C for 45 seconds, and completed with 35 cycles at 94°C for 15 sec, at 55°C for 30 sec and at 72°C for 45 seconds. In the last round of 35 cycles, the extension step of each cycle was increased by five seconds. A last step was performed to complete the amplification reaction at 72°C for 7 min. All isolates were amplified successfully with the respective three L1 primer pairs (data not shown).

Direct double-stranded PCR-sequencing was done with the same primers described above for each HPV genomic areas, using the fluorescent cycle-sequencing method (BigDye terminator ready reaction kit, Perkin-Elmer) on 20 ng of purified amplicons [Gagnon et al., 2007]. Cycling parameters were 25 cycles at 96°C for 10 sec, 50°C for 5 sec and 62°C for 4 min. Sequence analysis was performed on an ABI Prism 3100 Genetic Analyser system. Non-prototypic isolates were sequenced at least twice to exclude *Taq*-induced errors.

Data analysis. HPV-31 and 33 prototypes were the first isolates sequenced [Cole and Streek, 1986; Myers et al., 1995]. HPV-35 prototype was HPV-35H since multiple errors have been reported in the original published sequence data (HPV genome database, Los Alamos National Laboratory (<http://hpv-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/compendium/htdocs/>)). For each type, HPV L1 sequences from the prototype and variants were aligned using CLUSTALW 1.8. Phylogenetic trees were constructed based on the neighbor-joining algorithm by using the Mega version 4. dN/dS ratios were calculated using the Nei-Gojobori method [Tamura et al., 2007; Zhang et al., 1998]. For the comparisons of genetic variability between genotypes, the significance of difference of number of variation sites per variant or isolate was assessed with a Mann-Whitney rank sum test and of the proportion of variable nucleotides was assessed with a Fisher's exact test.

Results

Of 1055 women recruited in The Canadian Women's HIV Study, 78 were infected by HPV-31, 37 by HPV-33 and 58 by HPV-35. All these isolates were sequenced successfully across the L1 gene. There was no evidence of premature stop codon or nucleotide deletion in the L1 genes. The

site and nature of synonymous and non-synonymous variations defining HPV-31, 33 or 35 variants as well as the putative hypervariable regions in L1 for types 31, 33 and 35 are displayed on Figure 1. A total of 44, 9 and 35 genomic variants were identified in 78 HPV-31, 37 HPV-33 and 58 HPV-35 isolates, respectively (Figure 1, Table 2). No more than one variant was detected per sample. The prototype was the most frequent molecular variant for HPV-33 but not for HPV-31 or 35 (Figure 1).

The variability of the L1 gene was compared between types as presented in Table 2. Since the three genotypes are related to HPV-16, the L1 gene of 74 HPV-16 isolates from women selected consecutively was also sequenced as a reference. HPV-16 nucleotide variations in these isolates were consistent with those published in previous reports [de Boer et al., 2004; Yamada et al., 1995]. The number of variants in proportion to the number of isolates as shown in Table 2 was higher for HPV-31 (56.4%, $p=0.05$) and HPV-35 (60.3%, $p=0.04$) compared to HPV-16 (40.5%). This ratio was lower for HPV-33 (24.3%) than for HPV-16, although this difference was not statistically significant ($p=0.14$). The maximal distance between any two variants for each genotype was less than 2% in the nucleotide sequence of L1 (Table 2). The total number of nucleotide substitutions within the L1 gene ranged from 19 for HPV-33 to 52 for HPV-31. The lengths of the L1 genes and of the putative loops from the various types were similar (Table 2). A mean of 0.6% (range, 0.4%-0.8%) of nucleotides in L1 were sites of non-synonymous variations for HPV-31, 33 and 35. As described previously for HPV-16, there was a greater number of synonymous than non-synonymous variations in L1 for all high-risk types (Table 2) [Pushko et al., 1994]. The proportion of synonymous to non-synonymous variations in L1 was similar across types ($p=0.80$). Compared to HPV-16, the percentage of nucleotides that were sites of polymorphism (% variation in Table 2) was similar for HPV-31 or 35 ($p>0.10$ for each comparison), but was lower for HPV-33 ($p=0.005$) due mainly to a smaller percentage of nucleotides being sites of synonymous variations for the latter type. Overall, HPV-31 was the most heterogeneous of the high-risk genotypes considering the number of variants identified or the proportion of nucleotide variations per variant or per isolate tested (Table 2). The distribution of number of variations per variant was significantly different when HPV-31 was compared with each of the other types ($p=0.0001$ for each comparison), when HPV-16 and HPV-35 were compared ($p=0.0001$), but not when HPV-35 and HPV-33 were compared ($p=0.018$; significance

level for 6 comparisons set at 0.008; Table 2). HPV-31 also had the highest median number of variations per isolate. This difference was significant when HPV-31 was compared to types 33 or 35 ($p < 0.003$) but not to type 16 ($p = 0.046$) (significance level for 6 comparisons set at 0.008).

The fact that HPV-33 was less heterogeneous than the other related high-risk types could be related to the smaller number of HPV-33 isolates tested or to a lower degree of polymorphism for this genotype. The maximum distance between any variants of HPV-33, HPV-16 or HPV-31 was similar (Table 2). Also, HPV-33 had a similar number and similar percent nucleotide variations per variant or per isolate compared to HPV-16. As stated in the paragraph above, the distribution of number of variations per variant was not significantly different between HPV-35 and HPV-33. The distribution of number of variations per isolate was not significantly different between HPV-33 and HPV-16 or HPV-35 ($p > 0.10$ for each comparison). These findings support that the smaller number of HPV-33 isolates tested compared to the other genotypes may contribute to the lower heterogeneity measured for HPV-33.

Since the ethnic origin of women recruited in the study was known [Gagnon et al., 2004; Gagnon et al., 2005], we investigated if HPV-31, 33 or 35 polymorphism was associated with ethnicity. Phylogenetic analysis of the L1 gene from HPV-31, HPV-33 and HPV-35 revealed the presence of branches in the three phylogenetic trees (Figure 2). Isolates from all women from African descent clustered in HPV-31 Cluster A. Thus, 13 (30.3%) of the 43 isolates of HPV-31 Cluster A were from women of African descent compared to none (0%) of the 22 isolates of HPV-31 cluster B ($p = 0.002$) and none (0%) of the 13 isolates of HPV-31 cluster C ($p = 0.03$). The 13 women of African descent were not living in the same city in Canada: 7 were living in Montreal, 4 in Toronto and 2 in Ottawa. Twenty-nine (67.4%) of the 43 women infected by HPV-31 isolates in the HPV-31 cluster A were Caucasian in comparison to 33 (94.3%) of 35 isolates in HPV-31 clusters B ($p = 0.004$). Only three isolates were from Asian woman. Three (12.0%) of the 25 isolates in HPV-33 Cluster A were obtained from women from African descent compared to 7 (58.3%) of 12 of isolates belonging to HPV-33 Cluster B ($p = 0.006$). In opposite, 21 (84.0%) of the 25 isolates in HPV-33 Cluster A and 5 (41.7%) of the 12 isolates in HPV-33 Cluster B were Caucasians ($p = 0.02$). In opposite to results obtained with HPV-31 and 33, no association was found between HPV-35 clusters and the ethnic origin of participants. Isolates from women from

African descent were detected in 17 (44.7%) of 38 and 11 (55.0%) of 20 isolates from HPV-35 clusters A and B, respectively ($p=0.58$).

HPV-16 hypervariable regions correspond to loops BC, DE, EF, FG, and HI [Carter et al., 2003;Chen et al., 2000;Olcese et al., 2004]. The positions of the putative five loops in HPV-31, 33 and 35 were deduced by aligning L1 sequences of the prototypes of these types with HPV-16 prototype. The distribution of non-synonymous and synonymous nucleotide variations within putative hypervariable regions and within conserved regions outside these loops is illustrated in Figure 1. Non-synonymous L1 variations were not distributed evenly over the L1 gene and were located mainly in putative hypervariable regions while synonymous variations were distributed more evenly. The distance between isolates was greater in the hypervariable loops than in conserved regions of L1, except for HPV-35 (Table 2). The greatest intra-loop distance was calculated for HPV-31 and the lowest for HPV-35, a difference that was statistically significant ($p=0.038$).

The proportions of nucleotides variations in intra and extra-loop regions of L1 with synonymous or non-synonymous for the four high-risk types are provided in Table 3. Synonymous variations were found in a mean of 1.7% (95% CI 1.1-2.3) of nucleotides in the loops and of 2.4% (95% CI 1.2-3.7) outside the loops, while non-synonymous variations were encountered in 1.8% (95% CI 1.1-2.5) of nucleotides within the loops and 0.2% (95% CI 0-0.4) of nucleotides outside the loops. Thus, non-synonymous variations were less frequently detected in extra-loop regions than synonymous variations within and outside the loops and of non-synonymous variations within the loops. Non-synonymous variations were detected as frequently as synonymous variations inside the loops but less frequently than synonymous variations outside the loops, except for HPV-33. The proportion of nucleotides with synonymous variations were thus similar for sequences inside or outside the putative loops for all types ($p>0.30$). In opposite, non-synonymous variations were significantly more frequently encountered inside hypervariable regions than in sequences between the loops. However, the proportion of nucleotides with non-synonymous variations in loop sequences was similar to that of synonymous variations calculated for intra-loop and extra-loop regions (Table 3). dN/dS ratios calculated for intra-loop and extra-loop regions in Table 3 were below 1.0. The dN/dS ratio was especially lower for

outer-loop sequences ($p < 0.005$) for all types studied. This ratio was higher for intra-loop sequences but still was below 1.0. These ratios suggested that L1 sequences were under selective constraint, or purifying selection, meaning that non-synonymous variations have evolved at a slower rate than synonymous sites, especially for sequences located between outer loops (Table 3).

Discussion

In this work, the sequence variations in the L1 gene of four members of species 9 of the Alpha-papillomavirus genus were analyzed in genital samples collected from sexually active women in the course of a prospective study on HPV persistence and HIV infection. Limited nucleotide variations in the L1 gene genital HPV types other than HPV-16 had been reported previously [Stewart et al., 1996; Raiol et al., 2009; Gagnon et al., 2007].

As found for other HPV types and in HPV genes other than L1, HPV-31, 33 and 35 L1 variants did not evolve from random mutational events and several variation sites were shared by several isolates and variants [Aho et al., 2003; Bernard et al., 2006; Calleja-Macias et al., 2004; Gagnon et al., 2004; Giannoudis and Herrington, 2001; Heinzl et al., 1995; Ho et al., 1993; Nindl, 2002; Ong et al., 1993; Prado et al., 2005; Yamada et al., 1997]. The genetic variation of up to 1.1% between the most divergent L1 variants for each type corresponds to the expected degree of diversity within a HPV type in a coding sequence. Deletion or insertion was not a source of polymorphism in L1.

Ethnicity has been associated with lineage for several high-risk types [Aho et al., 2003; Bernard et al., 2006; Calleja-Macias et al., 2004; Prado et al., 2005]. We found that women of African descent were more likely to be infected by non-prototypic variants belonging to clusters in the phylogenetic trees of types 31 and 33, in opposite to HPV-35. As found previously by others based on the analysis of other regions of the HPV genome, dichotomic trees were observed with types 31, 33 and 35 [Calleja-Macias et al., 2004; Calleja-Macias et al., 2005; Khoudri et al., 2006; Raiol et al., 2009]. In opposite, HPV-52 variants have been reported by one group to cluster in several branches [Raiol et al., 2009]. In a Mexican population of women, HPV-31 and 35 variants were also separated into phylogenetic branches [Calleja-Macias et al., 2004]. The

differences in L1 polymorphism between the three types analyzed could be related to differences in ethnic distribution of women infected by each type in the cohort. However, participants were recruited from the same population of women living in Canada and the ethnic origin of women infected by each type was similar. Lineage of HPV variants could be determined only for HPV-16 since it is not as comprehensively established for other types. These differences underscore the fact that the HPV DNA polymorphism is not the same across types.

HPV genotypes share several conserved domains in the L1 gene, corresponding to internal capsid structures. These domains are separated in HPV-16 by five regions of highly divergent residues from 10 to 30 amino acids in length extending outward from the capsid and forming exposed loop domains [Chen et al., 2000;Pushko et al., 1994;Zhou et al., 1992]. These non-contiguous hypervariable loops are juxtaposed upon folding of L1 and display critical components of type-specific and conformational B cell epitopes that are recognised by neutralising antibodies [Carter et al., 2006;Chen et al., 2000;Christensen et al., 1996b;Christensen et al., 1996a;Christensen et al., 2001;Combata et al., 2002;Gagnon et al., 2005;Ludmerer et al., 2000;Olcese et al., 2004;Roden et al., 1997;Wang et al., 1997]. The crystallography model of HPV L1 also predicts these loop structures on assembled capsomers [Bishop et al., 2008;Chen et al., 2000]. Amino acid changes induced by non-synonymous variations in HPV-16 L1 map closely to the principal neutralisation epitopes [Pastrana et al., 2001;Chen et al., 2005;Roden et al., 1997]. Conformational differences of hypervariable L1 loops have been demonstrated between HPV types [Bishop et al., 2008]. Most of the non-synonymous variations were localised inside the putative hypervariable L1 zones for the four types studied in this report. As previously described for HPV-16 [Yamada et al., 1995;Yang et al., 2005], non-synonymous variations were also found rarely outside hypervariable zones in types 31, 33 and 35. An additional variable region in HPV-16 has been described between residues 400 and 450, the same area we found most of the non-synonymous variations outside the hypervariable regions [Carter et al., 2003].

Amino acid changes induced by non-synonymous variations in HPV-16 L1 map closely to the principal neutralisation epitopes [Chen et al., 2005;Pastrana et al., 2001;Roden et al., 1997]. The polymorphism of surface-exposed amino acids could result from drift due to weak functional

constraints, negative selection by neutralising antibodies or other components of the immune response, or from adaptation to the use of different cell receptors [Yang et al., 2005]. The presence of neutralising antibodies against surface loops of L1 suggest that loops are exposed to the selective pressure from the host immune system [Chen et al., 2000;Christensen et al., 1996a;Christensen et al., 2001;Christensen and Kreider, 1990;Dillner, 1999;Roden et al., 1997;Wang et al., 1997;White et al., 1998]. The low dN/dS ratios for DNA sequences inside and outside the L1 loops are suggestive that they were under selective constraint. The polymorphism within hypervariable L1 loops could have been driven by the selective pressure of the host's immune response. The inter-loop sequences were even less variable and more strongly selected possibly due to structural reasons. Amino acid variations in these areas could compromise particle assembly or alter L1 conformation that is exposed to the immune system or interacts with the cell receptor for the entry of the virus into the cell [Kirnbauer, 1996;Yang et al., 2005].

This study contributes to the understanding of polymorphism of the capsid of high-risk HPV types related to HPV-16. In summary, although there were some differences between related high-risk HPV genotypes in polymorphism of L1, precise areas with most of the amino acid changes were found at similar locations in all the types studied. The internal regions of L1 were more conserved than L1 loop regions. The inter-loop sequences were also under selective pressure. Studies on L1 polymorphism should be extended to other high-risk types from other HPV species to establish if the evolution of L1 sequences from other types was similar to HPV-16-related types.

Acknowledgements and conflict of interest.

This study was supported by The Canadian Institutes of Health Research operational grant and by a CIHR team grant, as well as by the Réseau FRSQ SIDA-Maladies Infectieuses. There was no conflict of interest by any of the authors of this paper related to the subject of the article.

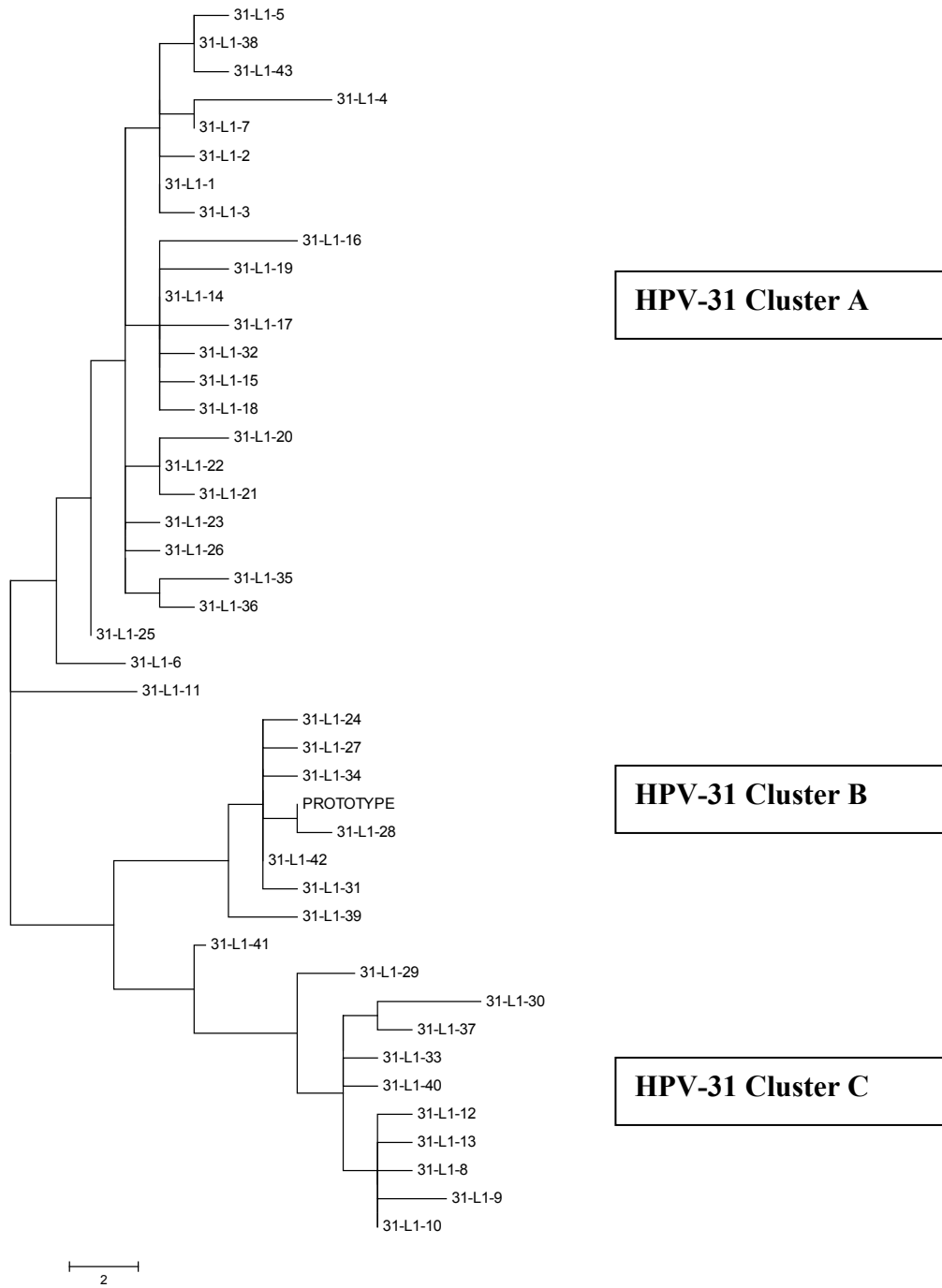
1b) HPV-33 L1 polymorphism

L1 genomic positions																				
	5749	5760	5773	5890	5990	6010	6133	6337	6390	6478	6487	6595	6663	6664	6704	7063	7072	7077	7078	Frequency
Outer Loop	BC	BC	BC		DE	DE			FG				HI	HI						
Protototype	t	c	a	a	g	a	a	c	c	t	a	a	a	a	c	g	a	a	a	14
33L1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-	-	1
33L1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	7
33L1.3	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	1
33L1.4	-	a	-	-	a	-	-	-	a	c	-	-	-	g	-	-	-	-	-	2
33L1.5	-	a	g	g	a	-	-	t	a	-	t	-	-	-	t	-	-	g	g	8
33L1.6	-	a	g	g	a	-	-	t	a	-	t	-	-	-	t	-	g	g	g	1
33L1.7	c	a	g	g	a	-	-	t	a	-	t	-	-	-	t	-	-	g	g	2
33L1.8	-	a	g	g	a	g	-	t	a	-	t	g	-	-	t	-	-	g	g	1
Codon position		56			133				266				357						495	
prototype AA		T			G				T				E						K	
mutated AA		N			S				K				G						R	

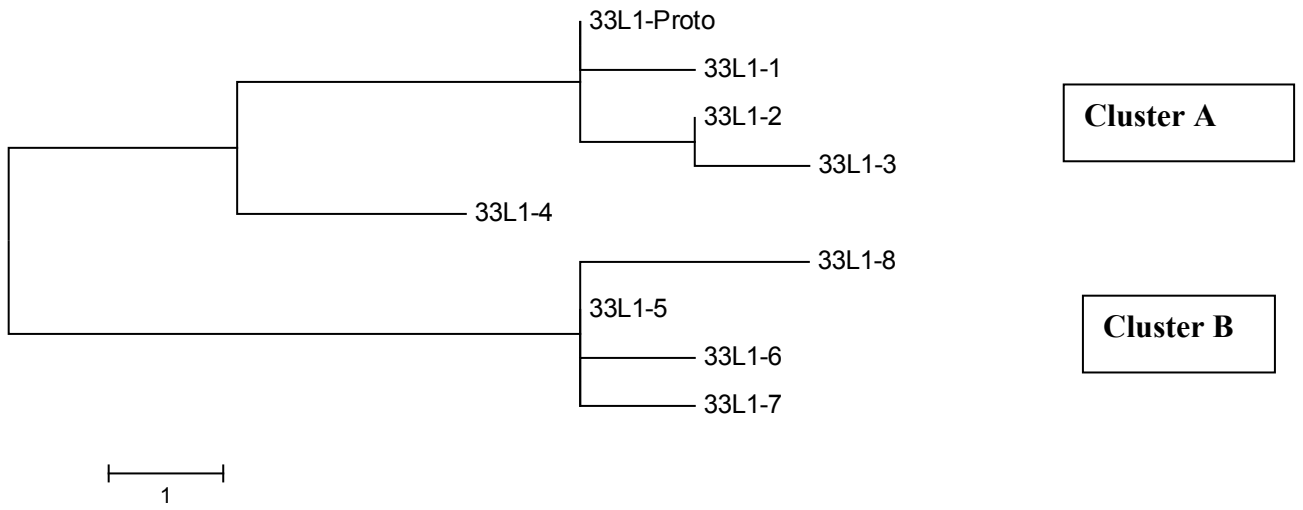
Figure 1. Polymorphism of the L1 gene of HPV types 31, 33 and 35. Nucleotide positions where variations were detected in L1 are shown for HPV-31 (fig. a), HPV-33 (fig. b) and HPV-35 (fig. c). Positions for which no variation was encountered compared to the prototype are marked by a hyphen, whereas a letter showing the mutated base indicates the variation site. The designation of variants was arbitrary. Frequency indicates the no. of isolates identified for each variant. Changes in amino acid (AA) are also shown. Nucleotides that are the site of non-synonymous variations are in bold.

Figure 2. Phylogenetic trees of HPV-31, 33 and 35 variants based on L1 sequences.

2a) HPV-31



2b) HPV-33



2c) HPV-35

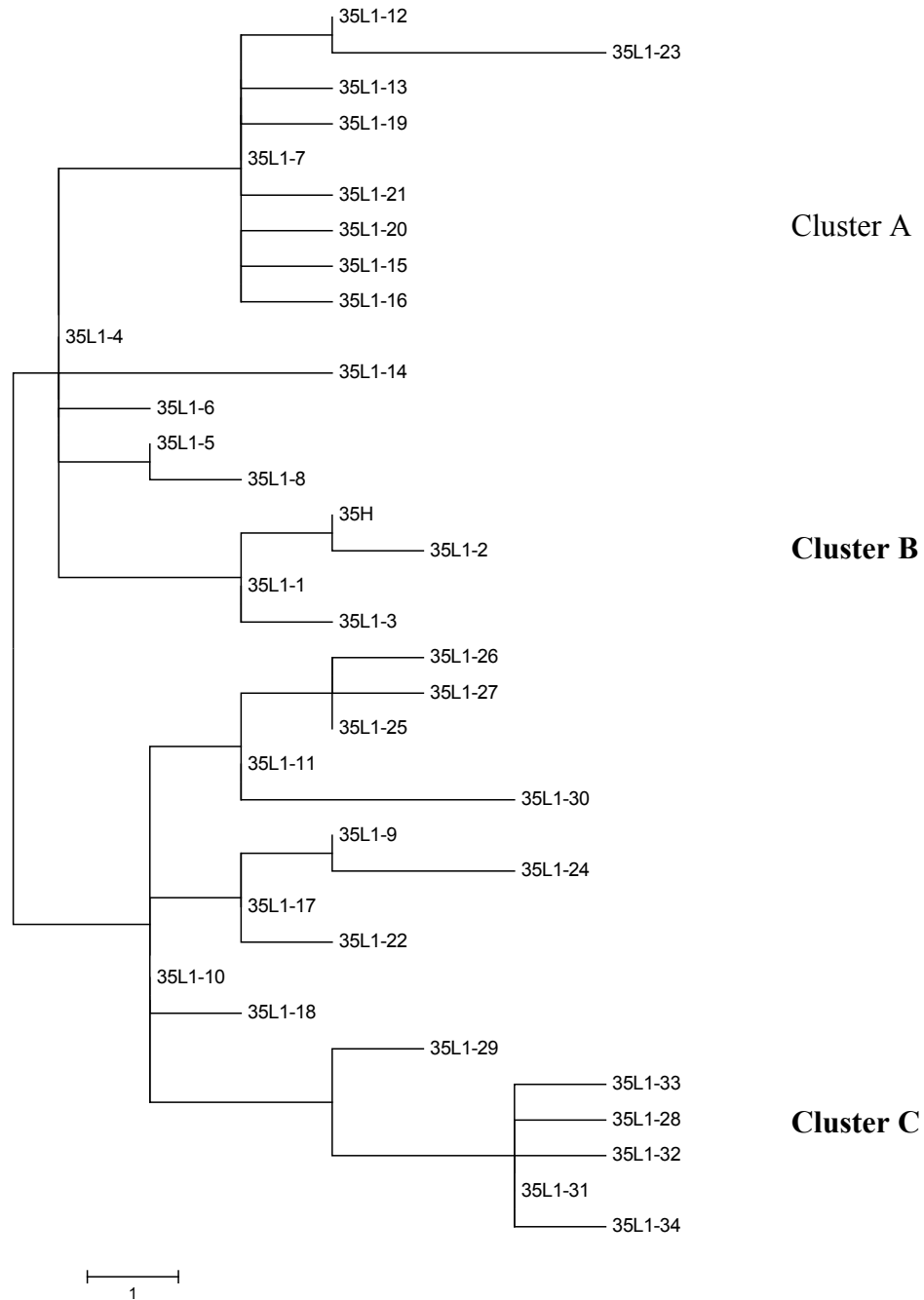


Figure 2. Phylogenetic trees of HPV-31, 33 and 35 variants based on L1 sequences.

The sequences of L1 from 43 HPV-31 variants, 8 HPV-33 variants and 34 HPV-35 variants were aligned. Parsimony analyses were done to construct phylogenetic trees. The

bottom scales measure genetic distances in substitutions per nucleotide. Letters in bold indicates the clusters for each type.

Table 1. Primers for HPV-16, -31, -33 and -35 L1 analysis.

Name	Amplified segment	Sequence (5' to 3')	Position
16-L1-1	HPV16 L1 5'-end segment	TATAACTGACCAAGTCCTTCA	5492-5513
16-L1-2		CCTGGATTTACTGCAACATTG	6165-6185
16-L1-3	HPV16 L1 middle segment	TGCAGGTGTGGATAATAGAGAA	6051-6072
16-L1-4		TCCCCATGTCGTAGGTACTC	6721-6740
16-L1-5	HPV16 L1 3'-end segment	TGGCATTGTGTTGGGGTAAC	6600-6618
16-L1-6		CAAGCACATACAAGCACATACA	7201-7222
31-L1-1	HPV31 L1 5'-end segment	CCTACAACGCCACAAGTGTC	5443-5462
31-L1-2		GCATTGTTACTACAAGGACTACC	6068-6090
31-L1-3	HPV31 L1 middle segment	GCAAACCACCTATTGGAGAGC	6036-6056
31-L1-4		GGTGTGGTCAATCCAAAATTC	6760-6780
31-L1-5	HPV31 L1 3'-end segment	CCACACGTAGTACCAATATGTCTG	6561-6584
31-L1-6		CAATACAGCACAAAGCACATACAC	7072-7094
33-L1-1	HPV33 L1 5'-end segment	TGTAGACGGTGCTGACTTTG	5511-5530
33-L1-2		GGCAGGTGCTGCATTAGTA	6121-6139
33-L1-3	HPV33 L1 middle segment	AGCCTCCAACAGGGGAACA	6081-6099
33-L1-4		GTGTAAACCAAATTGCCAATC	6726-6749
33-L1-5	HPV33 L1 3'-end segment	CCACTCGCAGTACTAATATGAC	6600-6621
33-L1-6		ACATGCACACAAACAAGTACAC	7226-7248
35-L1-1	HPV35 L1 5'-end segment	GCAGATGGGGGTGACTTTTA	5519-5538
35-L1-2		CACCAAATCCTGTGTCTACCA	6199-6220
35-L1-3	HPV35 L1 middle segment	CCTTGTAATGCTAACCAGGTA	6120-6140
35-L1-4		TGGTGTAAGGCCAAAATTC	6800-6818
35-L1-5	HPV35 L1 3'-end segment	GTCTGTGTGTTCTGCTGTGTC	6620-6640
35-L1-6		CGGTTGAAAGGTAATGTAAAG	7424-7444

Table 2- L1 polymorphism in HPV-31, 33 and 35 compared to HPV-16 .

	HPV-16	HPV-31	HPV-33	HPV-35
No. of variants	30	44	9	35
No of isolates	74	78	37	58
L1 length (nt)	1596	1515	1500	1508
Extra loop	1290	1206	1197	1211
Intra loop	306	309	303	297
Total no. of variations (%)	51 (100)	52 (100)	19 (100)	38 (100)
Synonymous	38 (74.5)	41 (78.9)	14 (73.7)	32 (84.2)
Non-synonymous	13 (25.5)	11 (21.1)	5 (26.3)	6 (15.8)
% Variation of L1	3.2	3.4	1.3	2.5
Synonymous	2.4	2.7	0.9	2.1
Non-synonymous	0.8	0.7	0.4	0.4
Max. distance between variant (%)	17/1596 (1.1)	12/1515 (0.8)	12/1500 (0.8)	7/1508 (0.5)
Intraloop	5/306 (1.6)	7/309 (2.3)	5/303 (1.7)	1/297 (0.3)
Extralloop	12/1290 (0.9)	5/1206 (0.4)	7/1197 (0.6)	6/1212 (0.5)
No. of variation per variant				
median	2.0	12.0	5.0	6.0
range	0-18	0-16	0-12	0-10
Lower-upper quartile	2.0-16.0	10.5-13.0	1.0-11.0	5.0-8.0
% variation per variant				
median	0.4	0.7	0.3	0.4
range	0-1.1	0-1.1	0-0.8	0-0.7
No. of Variation per isolate				
median	1.0	12.0	1.0	5.0
range	0-18	0-16	0-12	0-10
Lower-upper quartile	1.0-2.0	10.0-13.0	0-10.0	5.0-7.0
% Variation per isolate				
median	0.1	1.1	0.2	0.6
range	0-1.1	0-1.1	0-0.8	0-0.7

The L1 gene of HPV-16, 31, 33 and 35 was characterized by PCR-sequencing as

described in the methods section. 74 isolates of HPV-16 were also characterized as

HPV-31, 33 and 35 are related to HPV-16 and belong to the alpha 9 species. As

reported previously, 62 HPV-16 isolates were European variants, 7 were African-1

variants, 3 were African-2 variants and 2 were Asian-American variants (Fontaine et al., 2005; Wheeler et al., 1997). CI is for confidence interval.

Table 3- L1 polymorphism in highly variable loops and non variable regions of the L1 protein of HPV types 16, 31, 33, 35, 52.

HPV types loops	<u>Proportion of synonymous var.</u>			Proportion of non-synonymous var.			Intra loops		Extra	
	Intra loops	Extra loops	p	Intra loops	Extra loops	p	dN/dS	Z test	dN/dS	Z
16	5/306 (1.6)	33/1290 (2.6)	0.35	5/306 (1.6)	6/1290 (0.5)	0,03	0.35	0.10	0.08	<0.001
31	6/309 (1.9)	35/1206 (2.9)	0,46	4/309 (1.3)	1/1206 (0.1)	0,04	0.12	0.01	0.02	<0.001
33	4/303 (1.3)	10/1197 (0.8)	0,43	5/303 (1.7)	1/1197 (0.1)	0,001	0.38	0.12	0.04	0.002
35	4/297 (1.4)	28/1211 (2.3)	0,30	5/297 (1.7)	1/1211 (0.1)	0,0001	0.33	0.14	0.02	0.001

The rate of synonymous or non-synonymous variations were compared between loops and extraloops regions of L1 protein by first comparing the proportion of nucleotides in or outside the putative loop regions with these variations and also by calculating the dN (number of non-synonymous substitutions per nonsynonymous site)/dS (synonymous substitutions per synonymous site) and Z-test.

References

- Aho, J., C.Hankins, C.Tremblay, F.Lang, P.Forest, K.Pourreaux, F.Rouah, The Canadian Women's HIV study Group, and F.Coutlée. 2003. Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of HIV-seropositive and seronegative women. *J Inf Dis* 188:1517-1527.
- Bernard, H.U., I.E.Calleja-Macias, and S.T.Dunn. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int. J Cancer* 118:1071-1076.
- Bishop, B., J.Dasgupta, M.Klein, R.L.Garcea, N.D.Christensen, R.Zhao, and X.S.Chen. 2008. Crystal structures of four types of HPV L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem* in press.
- Bosch, F.X., A.Lorincz, N.Munoz, C.J.L.M.Meijer, and K.V.Shah. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244-265.
- Calleja-Macias, I.E., M.Kalantari, J.Huh, R.Ortiz-Lopez, A.Rojas-Martinez, J.F.Gonzalez-Guerrero, A.L.Williamson, B.Hagmar, D.J.Wiley, L.Villarreal, H.U.Bernard, and H.A.Barrera-Saldana. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* 319:315-323.
- Calleja-Macias, I.E., L.L.Villa, J.C.Prado, M.Kalantari, B.Allan, A.L.Williamson, L.P.Chung, R.J.Collins, R.E.Zuna, S.T.Dunn, T.Y.Chu, H.A.Cubie, K.Cuschieri, M.von-Knebel-Doeberitz, C.R.Martins, G.I.Sanchez, F.X.Bosch, N.Munoz, and H.U.Bernard. 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol* 79:13630-13640.
- Carter, J.J., G.C.Wipf, S.F.Benki, N.D.Christensen, and D.A.Galloway. 2003. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J Virol* 77:11625-11632.
- Carter, J.J., G.C.Wipf, M.M.Madeleine, S.M.Schwartz, L.A.Koutsky, and D.A.Galloway. 2006. Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera. *J. Virol.* 80:4664-4672.

- Chan, S.Y., H.U.Bernard, C.K.Ong, S.P.Chan, B.Hoffman, and H.Delius. 1992. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 66:5714-5725.
- Chen, X.S., R.L.Garcea, I.Goldberg, G.Casini, and S.C.Harrison. 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 5:557-567.
- Chen, Z., M.Terai, L.Fu, R.Herrero, R.Desalle, and R.D.Burk. 2005. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* 79:7014-7023.
- Christensen, N.D., N.M.Cladel, C.A.Reed, L.R.Budgeon, M.E.Embers, D.M.Skulsky, W.L.McClements, S.W.Ludmerer, and K.U.Jansen. 2001. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology* 291:324-334.
- Christensen, N.D., J.Dillner, C.Eklund, J.J.Carter, G.C.Wipf, C.A.Reed, N.M.Cladel, and D.A.Galloway. 1996a. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* 223:174-184.
- Christensen, N.D. and J.W.Kreider. 1990. Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomaviruses. *J Virol* 64:3151-3156.
- Christensen, N.D., C.A.Reed, N.M.Cladel, K.Hall, and G.S.Leiserowitz. 1996b. Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6. *Virology* 224:477-486.
- Clifford, G., S.Franceschi, M.Diaz, N.Munoz, and L.L.Villa. 2006. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 24 Suppl 3:S26-S34.
- Cole, S.T. and R.E.Streek. 1986. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *J Virol* 58:991-995.

- Combita, A.L., A.Touze, L.Bousarghin, N.D.Christensen, and P.Coursaget. 2002. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J. Virol.* 76:6480-6486.
- Coutlée, F., P.Gravitt, H.Richardson, C.Hankins, E.Franco, N.Lapointe, H.Voyer, and The Canadian Women's HIV study Group. 1999. Nonisotopic detection and typing of human papillomavirus DNA in genital samples by the line blot assay. *J Clin Microbiol* 37:1852-1857.
- Coutlée, F., C.Hankins, N.Lapointe, J.Gill, B.Romanowski, S.Shafran, R.Grimshaw, D.Haase, W.Schlech, J.Sellors, F.Smail, M.Boucher, M.Chateauvert, J.Falutz, R.Lalonde, J.Macleod, G.Noel, J.P.Routy, E.Toma, G.Garber, G.Victor, S.Trottier, P.Berger, L.Friedland, and D.Keystone. 1997. Comparison between vaginal tampon and cervicovaginal lavage specimens collection for detection of human papillomavirus DNA by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 51:42-47.
- de Boer, M.A., L.A.Peters, M.F.Aziz, B.Siregar, S.Cornain, M.A.Vrede, E.S.Jordanova, S.Kolkman-Uljee, and G.J.Fleuren. 2004. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gyn Oncol* 94:488-494.
- de Villiers, E.M., C.Fauquet, T.R.Broker, H.U.Bernard, and H.H.zur. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virol* 324:17-27.
- Dillner, J. 1999. The serological response to papillomaviruses. *Sem Cancer Biol* 9:423-430.
- Fontaine, J., C.Hankins, M.H.Mayrand, J.Lefevre, D.Money, S.Gagnon, A.Rachlis, K.Pourreaux, and F.Coutlee. 2005. High levels of episomal and integrated HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical lesions in women at risk or infected with HIV. *AIDS* 19:785-794.
- Gagnon, S., C.Hankins, K.Pourreaux, E.Franco, The Canadian Women's HIV study Group, and F.Coutlee. 2007. Polymorphism of the capsid L1 gene is not a determinant of persistence of HPV-52 infection in HIV-seropositive women. *J Acq Imm Def Syndr* 44:61-65.

- Gagnon, S., C.Hankins, C.Tremblay, P.Forest, K.Pourreaux, and F.Coutlee. 2004. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect. Dis.* 190:1575-1585.
- Gagnon, S., C.Hankins, C.Tremblay, K.Pourreaux, P.Forest, F.Rouah, and F.Coutlee. 2005. Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J Med. Virol* 75:213-221.
- Giannoudis, A. and C.S.Herrington. 2001. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 193:295-302.
- Hankins, C., F.Coutlee, N.Lapointe, P.Simard, T.Tran, J.Samson, L.Hum, and The Canadian Women's HIV study Group. 1999. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *Can Med Ass J* 160:185-191.
- Hankins, C., N.Lapointe, S.Walmsley, and The Canadian Women's HIV study Group. 1998. Participation in clinical trials among women living with HIV in Canada. *Can Med Ass J* 159:1359-1365.
- Heinzel, P.A., S.Y.Chan, L.Ho, M.O'Connor, P.Balaram, M.S.Campo, K.Fujinaga, N.Kiviat, J.Kuypers, and H.Pfister. 1995. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* 33:1746-1754.
- Ho, L., S.Y.Chan, R.D.Burk, B.C.Das, K.Fujinaga, J.P.Icenogle, T.Kahn, N.Kiviat, W.Lancaster, and P.Mavromara-Nazos. 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 67:6413-6423.
- Icenogle, J.P., K.A.Clancy, and S.Y.Lin. 1995. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16 and type 31. *Virol* 214:664-669.
- Khouadri, S., L.L.Villa, S.Gagnon, A.Koushik, H.Richardson, S.Feirreira, P.Tellier, G.Matlashewski, M.Roger, E.L.F.Franco, and F.Coutlée. 2006. Human papillomavirus type 33 polymorphism and high-grade lesions of the uterine cervix. *J Inf Dis* 194:886-894.

- Kirnbauer, R. 1996. Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. [Review] [82 refs]. *Intervirology* 39:54-61.
- Ludmerer, S.W., W.L.McClements, X.M.Wang, J.C.Ling, K.U.Jansen, and N.D.Christensen. 2000. HPV11 mutant virus-like particles elicit immune responses that neutralize virus and delineate a novel neutralizing domain. *Virology* 266:237-245.
- Munoz, N., F.X.Bosch, S.de Sanjose, R.Herrero, X.Castellsague, K.Shah, P.J.F.Snidjers, and C.J.L.M.Meijer. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 348:518-527.
- Myers, G., B, H.-U.Bernard, H.Delius, C.C.Baker, J.Icenogle, A.L.Halpern, and C.Wheeler. 1995. Human papillomavirus. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, N.M.
- Nindl, I. 2002. HPV variants and risk of cervical cancer. *Papillomavirus Report* 13:1-6.
- Olcese, V.A., Y.Chen, R.Schlegel, and H.Yuan. 2004. Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope. *BMC Microbiol* 4:29.
- Ong, C.K., S.Y.Chan, M.S.Campo, K.Fujinaga, P.Mavromara-Nazos, Labropoulou, H.Pfister, S.K.Tay, J.Ter Meulen, and L.L.Villa. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virology* 67:6424-6431.
- Orozco, J.J., J.J.Carter, L.A.Koutsky, and D.A.Galloway. 2005. Humoral immune response recognizes a complex set of epitopes on human papillomavirus type 6 L1 capsomers. *J. Virology*. 79:9503-9514.
- Pastrana, D.V., W.C.Vass, D.R.Lowy, and J.T.Schiller. 2001. NHPV16 VLP vaccine induces human antibodies that neutralize divergent variants of HPV16. *Virology* 279:361-369.
- Prado, J.C., I.E.Calleja-Macias, H.U.Bernard, M.Kalantari, S.A.Macay, B.Allan, A.L.Williamson, L.P.Chung, R.J.Collins, R.E.Zuna, S.T.Dunn, R.Ortiz-Lopez, H.A.Barrera-Saldana, H.A.Cubie, K.Cuschieri, M.von-Knebel-Doeberitz, G.I.Sanchez, F.X.Bosch, and L.L.Villa. 2005. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology* 340:95-104.

- Pushko, P., T.Sasagawa, J.Cuzick, and L.Crawford. 1994. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 75:911-916.
- Raiol, T., P.S.Wyant, R.M.de Amorim, D.M.Cerqueira, N.G.Milanezi, M.M.Brigido, L.Sichero, and C.R.Martins. 2009. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. *J. Med. Virol.* 81:685-692.
- Roden, R.B., A.Armstrong, P.Haderer, N.D.Christensen, N.L.Hubbert, Lowy, DR, J.T.Schiller, and R.Kirnbauer. 1997. Characterization of a human papillomavirus type 16 variant-dependent neutralizing epitope. *J Virol* 71:6247-6252.
- Stewart, A.C., A.M.Eriksson, M.M.Manos, N.Munoz, F.X.Bosch, J.Peto, and C.M.Wheeler. 1996. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 70:3127-3136.
- Tamura, K., J.Dudley, M.Nei, and S.Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Varsani, A., A.-L.Williamson, M.A.Jaffer, and E.P.Rybicki. 2006. A deletion and point mutation study of the human papillomavirus type 16 major capsid gene. *Virus Research* 122:154-163.
- Wang, Z., N.Christensen, J.T.Schiller, and J.Dillner. 1997. A monoclonal antibody against intact human papillomavirus type 16 capsids blocks the serological reactivity of most human sera. *J Gen Virol* 78:2209-2215.
- Wheeler, C.M., T.Yamada, A.Hildesheim, and S.A.Jenison. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variants- identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 35:11-19.
- White, W.I., S.D.Wilson, W.Bonnez, R.C.Rose, S.Koenig, and J.A.Suzich. 1998. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* 72:959-964.
- Yamada, T., M.M.Manos, J.Peto, C.E.Greer, N.Munoz, F.X.Bosch, and C.M.Wheeler. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers - a worldwide perspective. *J Virol* 71:2463-2472.
- Yamada, T., C.M.Wheeler, A.L.Halpern, A.C.Stewart, A.Hildesheim, and S.A.Jenison. 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations

characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 69:7743-7753.

Yang, R., C.M.Wheeler, X.Chen, S.Uematsu, K.Takeda, S.Akira, D.V.Pastrana, R.P.Viscidi, and R.B.Roden. 2005. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol* 79:6741-6750.

Zhang, J., H.F.Rosenberg, and M.Nei. 1998. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:3708-3713.

Zhou, J., X.Y.Sun, H.Davies, L.Crawford, D.Park, and I.H.Frazer. 1992. Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Viol* 189:592-599.

Discussion

Les variations de séquence du gène de la protéine majeure de la capside L1 de plusieurs membres de l'espèce 9 du genre alpha papillomavirus ont été analysées à partir de prélèvements effectués sur une cohorte de femmes canadiennes à risque ou infectées par le VIH. L'étude présentée est la plus grande réalisée jusqu'ici portant sur les polymorphismes des types apparentés phylogénétiquement au VPH-16 (35, 36, 97, 137). Le VPH-58, un membre de l'espèce 9 des papillomavirus, a été exclu de cette étude en raison de sa faible représentation au sein de la cohorte étudiée et de la difficulté d'accès à des échantillons qui en découlait. Ce type est particulièrement important en Asie où il cause un nombre plus grand de cancer du col qu'au Canada toute proportion gardée en regard avec la taille de la population.

Jusqu'à maintenant, les efforts de recherche ont principalement été orientés vers la compréhension des mécanismes oncogéniques et des propriétés immunologiques des papillomavirus d'importance clinique. L'analyse de la protéine L1 a été exhaustivement étudiée pour le VPH-16 alors qu'un nombre plus limité de publications a porté sur les autres types. Avec les données accumulées sur VPH-16, il est pertinent de répertorier celles relatives aux types dont la prévalence est moindre dans un contexte où la couverture conférée par la vaccination aspire à être étendue aux types moins fréquents. L'importance des infections causées par VPH-16 risque de diminuer avec l'introduction du vaccin anti VPH-16, ce qui pourrait permettre aux autres types d'augmenter leur prévalence comme agent étiologique du cancer (206). L'équipe de Stewart a cependant fait un travail de pionnier dans le domaine en analysant la séquence de douze types de VPH lesquels sont les types -16, -18, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -58, -59, -68, et -73 (258). L'intérêt de cet article ne réside pas dans le nombre de spécimens analysés qui est somme toutes plutôt modeste avec un total de 175 échantillons, mais bien de par la diversité géographique de l'origine des spécimens. Ces derniers étaient majoritairement issus de tumeurs de col utérin prélevés en Amérique du Sud (Argentine, Brésil, Bolivie, Cuba, Colombie, Chili, Panama, Paraguay), en Amérique du Nord (Canada, États-Unis),

en Europe (Allemagne, Espagne, Pologne), en Afrique (Algérie, Bénin, Guinée, Mali, Ouganda, Tanzanie) et en Asie (Indonésie, Philippines, Thaïlande).

Un certain nombre de conclusions peuvent être tirées des résultats de cette étude. D'abord, malgré qu'il soit généralement possible de construire un arbre phylogénétique à partir de plusieurs échantillons d'une même espèce de VPH génitaux, ou à tout le moins d'associer l'origine géographique du prélèvement à un clade génétique, les auteurs soulignent que les types -33, -35, -51, -58 et -68 n'ont pu permettre une telle construction. Le nombre limité de spécimens, la faible diversité à l'intérieur de l'échantillonnage pour les types sus-mentionnés couplés à une faible variabilité intratypique et à un séquençage limité à 400 paires de bases du gène L1 fournissent des pistes plausibles expliquant ce constat. À l'inverse, et ce même pour un nombre de spécimens limité, une telle association était possible pour VPH-45. Trois groupes ont ainsi été observés après l'alignement de leurs séquences, parmi lesquels l'un d'entre eux était associé à la présence de plusieurs variations propres à son origine africaine dont deux substitutions aux résidus 379 et 462. Toutes les variantes prototypiques étaient représentées pour tous les types de VPH à l'exception de VPH-39 et -73. Le VPH-52 a été celui qui a présenté le plus de variation intratypique en comparaison avec la variante prototypique pour un total cumulé de 19 substitutions de nucléotides pour les 13 isolats analysés, parmi lesquels sept étaient identiques à la séquence du prototype. Un échantillon présentait 10 nucléotides divergents du prototype. Le VPH-52 était donc le type avec la variante la plus distante du prototype. VPH-52 est également celui qui se distingue en étant le type ayant le nombre absolu le plus élevé de nucléotides différents entre deux variantes, soit de 12. La plus grande distance intratypique relativement aux substitutions d'acides aminés l'a été avec VPH-45 pour qui sept résidus étaient affectés.

Les résultats obtenus par Gagnon *et al.* appuient l'étude de Stewart à l'effet que HPV-52 semble présenter une variabilité élevée au niveau de son gène L1 (97). Cent quatorze échantillons ont ainsi été séquencés sur la totalité de la longueur du gène. Bien que moins variable que les gènes E6 et E7 où les variations non-synonymes comptent pratiquement pour la moitié des mutations rapportées, il reste que 14 des 70 modifications dans VPH-

52 entraînent un changement d'acide aminé pour la protéine L1. Les variations non-synonymes se retrouvent préférentiellement dans les boucles hypervariables (10 mutations/311 pb – 3,2%) en comparaison aux régions conservées qui les ceinturent (4 mutations/1278 pb – 0,3%). Les mutations synonymes semblaient pour leur part être distribuées uniformément entre les régions hypervariables (10 substitutions/311pb – 3,2%) et conservées (46 substitutions/1278pb – 3,6%). Aucune variante n'a démontré une persistance accrue pour les spécimens analysés. Il en va de même pour les résultats que nous avons obtenus; aucune substitution de nucléotide n'a pu être associée à une infection dont la persistance était accrue et la distribution des mutations est similaire à celle observée par Gagnon *et al.* En effet, la proportion de mutations non-synonymes dans les régions hypervariables s'élève à 1,3% (4 mutations/309 pb) alors qu'elle se chiffre à moins de 0,1% (1 mutation/1206 pb) pour les régions conservées. Ces dernières présentaient 35 substitutions parmi les 1206 paires de bases analysées (2,9%) et 6 substitutions parmi les 306 (1,9%) nucléotides que comptent les régions hypervariables.

Dans un pays tel que le Brésil, reconnu comme ayant la troisième prévalence mondiale de cancer du col de l'utérus, l'enjeu de santé public que représente le VPH incite plusieurs groupes de recherche brésiliens à s'intéresser au VPH et plus particulièrement, aux types moins fréquents que le VPH-16 qui ne sont par ailleurs pas inclus dans les préparations vaccinales actuelles. Ainsi, Cerqueira *et al.* a entre autres publié deux articles s'attardant à la séquence de L1 pour des types autres que VPH-16 (44, 45). L'origine de ces variantes a été retracée et des arbres phylogénétiques construits. Un total de neuf nouvelles variantes a été identifié pour les types –18, -33, -53, -58, -59 et –66 à partir d'un échantillonnage dont la taille n'a pas été mentionnée. Aucune analyse exhaustive n'a été effectuée, les auteurs se contentant de séquencer environ 400 paires de bases pour les types présentant un patron de migration hors du commun obtenu au RFLP. La restriction du séquençage à une portion qui ne recoupe pas toutes les régions hypervariables représente assurément une sous-évaluation du polymorphisme de L1.

Dans un effort de classification, Calleja-Macias et des collaborateurs internationaux ont mis en commun leurs efforts pour établir la phylogénie de plusieurs types de VPH (35,

36). Parmi ceux-ci, VPH-31, -35, -52 et -58 ont été sélectionnés mais cette classification s'est effectuée à partir de la séquence du LCR, reconnue comme étant plus variable (5, 49, 106). D'ailleurs, l'étude affirme que la diversité est plus grande dans les régions non-codantes que pour les protéines E6 et L1. La protéine de la capsidite a été séquencée au tiers de sa longueur, soit la section couverte par les amorces MY09/11. À peine six variantes détectées sur 25 isolats étaient différentes de la séquence de référence malgré qu'ils aient sélectionné leurs spécimens à analyser en fonction de la plus grande distance phylogénétique possible à partir de leurs résultats basés sur le LCR. À nouveau, l'analyse des gènes L1 se concentrait sur une région variable entre les génotypes qui est amplifiée par des amorces consensus. Le polymorphisme de la protéine L1 ne pouvait, encore ici, être apprécié à sa pleine mesure pour les types autres que VPH-16 sur la pleine longueur de la protéine.

Des études d'envergure moindre de par le nombre de spécimens évalués ont aussi été réalisées (137, 219). L'une d'elle s'est attardée à comparer les séquences de la capsidite de VPH-16 et -31. Les auteurs en sont venus à la conclusion que les régions à la source des variations intratypiques étaient également les régions qui présentaient le plus de disparité entre les espèces de VPH-16 et -31 (137). Le génome du VPH-31 a été séquencé des nucléotides 3972 à 7170 à partir de 4 échantillons dont deux se sont avérés identiques à la séquence prototypique (219). L'autre étude observait une faible variabilité pour les gènes L1 des types -53, -56 et -66 pour qui une étude phylogénétique a été réalisée à partir du LCR. Encore une fois cette dernière étude ne se contentait que de l'amplification de la séquence comprise entre les amorces MY09/11, représentant sommairement le tiers de la longueur totale du gène, avec toutes les limitations que cela comporte. L'analyse exhaustive comparative du polymorphisme de la protéine L1 de types autres que VPH-16 n'a donc été publiée qu'une seule fois et se basait sur deux spécimens différents du prototype.

Pour ce qui est de VPH-16, l'étude de la protéine L1 illustre bien les progrès et les succès qui ont mené à la mise au point d'un vaccin une vingtaine d'années après que l'agent étiologique du cancer du col de l'utérus eut été établi hors de tout doute. Les premières

études consistaient sommairement à une accumulation de données descriptives. D'abord, un article d'Icenogle *et al.* se limitait à décrire de nouvelles variantes chez VPH-16 mais aussi pour VPH-6 (138). Ensuite les connaissances quant à la structure de la protéine se sont accumulées grâce à l'analyse de l'hydrophobicité des résidus et par la neutralisation de certains épitopes qualifiés de dépendants des lymphocytes B et T. Ces avancées ont permis de prédire les régions exposées au système immunitaire. Ont alors été publiés des articles où des liens ont été établis entre les régions hydrophiles ou hydrophobes et le degré de variation intratypique. À titre d'exemple, Pushko *et al.* a conclu que les mutations silencieuses avaient généralement lieu à des positions conservées de la protéine L1 et ce, à travers les VPH (221). Au contraire, les modifications entraînant une modification de la séquence de la protéine avaient lieu en des positions qui étaient soit variables soit constantes. Ces constatations reflètent en fait que certaines régions sont plus conservées et que des régions hypervariables sont retrouvées dans la protéine L1 des membres de la famille des VPH. Ces auteurs soulignaient que le nombre de mutations synonymes excédait le nombre de mutations non-synonymes. La présente étude portant sur les types de l'espèce 9 établit aussi que le nombre de mutations synonymes excède celui des mutations non-synonymes pour tous les types étudiés. De plus, ils remarquaient une ségrégation de certaines mutations ensemble selon l'origine de la patiente, ce constat ayant été rendu possible puisqu'ils ont effectué leurs recherches sur des échantillons de Trinidad et de Grande-Bretagne. Bon nombre de substitutions présentes dans les spécimens caribéens ne l'étaient pas pour les spécimens européens et vice versa. Quatre variations de résidus sur les neuf identifiées dans l'étude étaient situées dans une zone hydrophilique. La protéine L2, à qui était alors attribué un rôle important dans le phénomène de réponse de l'hôte, semblait être, selon ces auteurs, plus variable que L1 dans les spécimens de Trinidad mais pas pour ceux de la Grande-Bretagne.

Représentant une percée significative pour l'époque, l'analyse d'un fragment de 297 paires de bases de L1 par un groupe de l'université de Cape Town a mené à la formulation de constats qui sont toujours reconnus aujourd'hui (224). Leurs conclusions étaient que les régions hydrophiles identifiées quelques années auparavant correspondaient à des zones hypervariables flanquées par des régions hydrophobes plutôt

conservées (40). Au terme de leur recherche, ils ont postulé que le rythme auquel évoluent certains gènes est moindre en raison de contraintes structurelles et de pression de sélection par l'hôte. Ces observations se sont basées sur les différences de variabilité entre L1 et le LCR. Ils ont fait référence à une étude qui répertorie 48 substitutions sur une longueur de 345 paires de bases du LCR alors que trois études sur L1 rapportent un total de dix mutations sur une longueur de 297 paires de bases (134, 138, 221). Au même moment, des études sur la phylogénie du VPH étaient publiées et étaient basées sur l'étude du LCR (134, 205). Contrairement à ce qui venait d'être publié, les auteurs spécifiaient qu'ils ne parvenaient pas à associer l'origine géographique de la femme de laquelle le spécimen était issu à une séquence de variante. Naturellement, la faible variabilité de L1 par rapport au LCR rend moins probable l'observation d'une telle association, d'autant plus que seul un fragment restreint de la protéine a été évalué (18).

La nouvelle classification des variantes de VPH-16 a été renforcée par des études portant sur L1. Yamada et al. ont observé que 11 changements de nucléotide étaient spécifiques au groupe formé par les branches NA, Af1, Af2 et AA et que de cinq à six de ces variations leurs étaient respectivement spécifiques (282). Au niveau des acides aminés, trois modifications étaient spécifiques au groupe, parmi lesquelles la leucine à la position 428 était typique de la branche As. Les auteurs soulignent que les variations d'acides aminés sont dispersées de façon relativement égale à travers la région codante alors qu'on observe une concentration en certaine région pour L2. La schématisation du locus de leurs mutations permet de deviner que celles-ci se retrouvent dans les zones hypervariables, théorie qui avait tout de même été avancée par des auteurs autour de la même période. Encore ici, la variabilité de L1 mise en perspective par rapport à celle de E6, L2 et le LCR met en évidence son faible taux de mutation. Sur un total de 1484 paires de bases séquencées pour L1, 2,2% des nucléotides se sont avérés variables alors que le second moins variable était E6 avec 3,3%. La différence est plus flagrante en s'attardant aux mutations non-synonymes qui se retrouvent pour 2,4% des nucléotides de L1, en acceptant plus d'une même mutation pour une même position, tandis que cette valeur s'élève à 4,6% pour E6. La plus grande distance entre deux variantes était de 18 nucléotides dans L1 sur un total de 1484 paires de bases analysées.

Toujours dans l'objectif de répertorier la séquence des VPH-16 en fonction de l'origine du prélèvement, environ 250 spécimens de femmes porteuses de cancer du col ont été séquencés au niveau des gènes E6 et L1 (281). Une covariation de mutations entre ces deux gènes a été constatée, ce qui est en accord avec ce qui a été rapporté précédemment (274, 282). Aucune combinaison atypique E6-L1 n'a été observée, c'est-à-dire que la co-ségrégation se fait à l'intérieur de variantes reconnues comme appartenant à la même sous-classe pour les deux protéines. L'absence de combinaison atypique suggère qu'il n'y a pas de phénomène de recombinaison entre variantes. Comme il faut s'y attendre, des substitutions de nucléotides n'ayant pas été préalablement rapportées sont communément retrouvées dans ce type d'étude et deux l'ont été dans celle-ci.

Par la suite, l'idée selon laquelle certaines substitutions de nucléotides de E6, E7 et du LCR pourraient conférer un potentiel oncogénique accru s'est répandue. Ainsi, la première publication de la décennie sur le polymorphisme a tenté d'associer à la fois l'origine géographique des souches de VPH-16 et les caractéristiques de l'infection de la femme à la séquence des protéines virales (269). L'étude a conclu que les variantes non-européennes conduisaient plus souvent à des infections persistantes, accroissant du même fait le risque de cancer (280). Puisqu'il a déjà été démontré que les mutations co-ségréguaient préférentiellement, les versions non-européennes de la capsid devraient également être associées à la persistance de l'infection au VPH. Les observations faites sur E6 et L1 venaient donc confirmer la classification des variantes de VPH-16 en clade basée sur l'analyse du LCR et ont permis d'attribuer à certaines variantes un pouvoir oncogénique accru.

La comparaison entre les variations à l'intérieur des protéines E6, E7 et L1 d'échantillons provenant de pays ayant une faible prévalence de cancer du col de l'utérus, tel que les Pays-Bas, à ceux issus de pays à haut-risque, tels que l'Indonésie et le Suriname, serait une stratégie pour faire ressortir les positions-clés qui pourraient conférer un potentiel oncogénique accru (68). À partir de spécimens positifs pour VPH-16 de 24 femmes ayant nouvellement reçu un diagnostic de carcinome du col à Jakarta, 34 au Suriname et 29 aux

Pays-Bas, la région de L1 couverte par les amorces MY09/11 a été séquencée. La représentation à 73% d'une variante indonésienne ayant comme marqueur C6822T au sein de L1, G660A en E7 et A276G en E6 suggère qu'elle présente un potentiel oncogénique accru. Aussi retrouvée dans l'échantillonnage surinamien, sa présence pourrait expliquer l'incidence plus élevée de cancer chez les Javanaises résidentes au Suriname en comparaison aux autres groupes ethniques. Des études plus élaborées et dans d'autres populations permettraient d'explorer cette hypothèse, laquelle il a été impossible de confirmer dans notre étude portant sur les femmes canadiennes puisque cette variante n'a pas été recensée au sein des échantillons étudiés.

Les deux études qui ont suivi se sont encore attardées sur les gènes E6, E7 et L1 issus de spécimens provenant de la Chine et du nord de l'Inde. La première a révélé, parmi ses 131 échantillons venant de carcinome du col de l'utérus que 93% des spécimens chinois contenaient une séquence identique au prototype asiatique et que 98% appartenaient à la lignée asiatique (276). Au total, 10 substitutions de nucléotides ont été observées, dont quatre silencieuses et six non-synonymes. La seconde étude a, au contraire, souligné l'absence de variante asiatique au profit d'une forte représentation de la lignée européenne (209). Treize positions se sont avérées variables, parmi lesquelles cinq entraînaient des modifications de résidus, dont l'une a attiré l'attention des auteurs. L'échange d'une thréonine pour une proline au résidu 353 pourrait altérer la structure tertiaire de la protéine compte tenu que la présence de cet acide aminé au cœur de structures secondaires telles que l'hélice et le feuillet est incompatible. Les auteurs de cette étude soulèvent que cette substitution pourrait altérer les épitopes conformationnels impliqués dans la neutralisation par l'hôte, mais cette hypothèse reste à être vérifiée. Fait surprenant, la protéine L1 avait démontré une plus grande variabilité que E6 et E7 dans cette étude tout comme dans celle de Yamada et al. (281).

Le polymorphisme de tous les types présentés dans notre étude est similaire. La plus faible variabilité observée pour VPH-33 reflète probablement le faible nombre d'isolats testés. En effet, le pourcentage de nucléotides polymorphiques dans VPH-33 est similaire à celui des autres types. Bien entendu, la différence dans le nombre de mutations des

gènes étudiés est fonction du degré de polymorphisme du gène en question, de sa longueur et du nombre d'isolats examinés. Une correction s'est donc imposée afin de permettre l'analyse des résultats. Tel que mentionné dans les études précédemment citées, l'ethnicité est fortement associée au polymorphisme de L1 pour VPH-16 et cette association est présente bien que plus faible pour certains autres types. La différence du polymorphisme du gène L1 entre les types issus de la cohorte pourrait être due à la différence d'origine ethnique des femmes recrutées pour l'étude. Cependant, les participantes ont toutes été enrôlées dans l'étude à partir d'une même population canadienne et l'origine ethnique des femmes étaient similaires à travers les types de VPH. Pour mettre ces résultats en perspective avec d'autres études également réalisées sur d'autres cohortes de femmes, il est pertinent de souligner que la diversité ethnique canadienne est reflétée dans la diversité des polymorphismes retrouvés chez les variantes du VPH. Le groupe phylogénétique des variantes n'a seulement pu être établie que pour VPH-16, étant donné que la classification phylogénétique n'est pas complétée pour les autres types. Des variantes de toutes les lignées majeures de VPH-16 ont été retrouvées dans cette étude. Dans nos études précédentes, le polymorphisme des VPH était associé avec l'ethnicité indépendamment de l'année d'immigration (5, 97, 99).

Les VPH partagent plusieurs domaines conservés à travers le gène L1, ce qui correspond à la structure interne de la protéine de la capsid (50). Cette structure conservée est notamment composée de feuillets beta antiparallèles CHEF et BIDG ainsi que d'une série d'hélices qui interviennent entre autres dans la formation des capsomères. Ces domaines sont séparés pour le VPH-16 par cinq régions hypervariables s'étendant sur une longueur de 10 à 30 acides aminés chacune. De fait, ces boucles ont pour rôle de connecter ces structures les unes aux autres. Elles sont au nombre de six mais la boucle CD, reliant les composantes C et D des feuillets n'est pas exposé à la surface mais est plutôt enfoui dans la structure tertiaire de la protéine, jouant probablement un rôle davantage structurel que ses homologues, d'où l'absence d'une variabilité élevée à ce niveau. Les cinq boucles DE, EF, FG, GH et HI qui s'élancent vers l'extérieur de la protéine s'y retrouvent juxtaposées malgré qu'il y ait absence de contiguïté de façon linéaire. Il en résulte des épitopes conformationnels reconnus par les anticorps neutralisants (39, 58, 62, 204). Tant

la cristallographie que des expériences de neutralisation en sont venues à identifier la structure présumée de la protéine L1. Toutefois, la structure de la capsid ne semble pas être exactement identique pour tous les types (20). En effet, il semble que les épitopes conformationnels immunodominants varient selon le type puisque les boucles FG et HI semblent primer pour VPH-16 alors que BC, DE et HI le serait davantage pour les VPH-6 et -11 (57, 172). Les dernières études de cristallographie ont révélé avec précision les différences structurelles de ces boucles entre les types -11, -16, -18 et -35. La plupart des mutations non-synonymes ont été identifiées au sein de boucles variables pour VPH-31. Cependant, tel que rapporté pour VPH-16 et d'autres types, des variations non-synonymes sont aussi retrouvées à l'extérieur de ces zones. La majorité des mutations non synonymes hors boucle pour les types -16 et -52 origine d'une région hypervariable entre les résidus 400 et 450 dont l'existence a déjà été révélée pour VPH-16 (284).

L'immunogénicité de la protéine de la capsid du VPH lui est conférée par les boucles résultantes de sa conformation tridimensionnelle. Une modification au sein de l'une de ces boucles entraîne également une modification de ces propriétés immunologiques. Ce constat a été élaboré notamment en interchangeant les boucles des VPH-16 et -31 et en soumettant la chimère à un sérum réactif contre le virus non-modifié (38). Les anticorps ne réussissaient dorénavant plus à neutraliser les particules virales. Les boucles DE, FG et HI semblaient être, selon les conclusions de cette étude, critiques pour la reconnaissance de la capsid par les anticorps. L'introduction d'épitopes du virus de l'hépatite B au niveau des boucles de la protéine majeure de la capsid du VPH-16 a aussi permis d'observer une diminution de l'efficacité des anticorps qui neutralisaient mieux le virus non modifié (37). De surcroît, ce nouvel immunogène générerait des anticorps neutralisant le virus de l'hépatite B une fois injecté chez un hôte immunocompétent, permettant de croire que le VPH serait un candidat potentiel à titre de vecteur d'épitope. Il a été constaté que les variations non-synonymes survenant dans la séquence de la protéine L1 sont concentrées au niveau des épitopes immunogènes. Toujours en se basant sur des méthodes de neutralisation par des anticorps, la concentration des mutations non-synonymes au niveau des boucles au cours de l'évolution des VPH qui sont propres à chaque type a comme corolaire que certains anticorps dirigés contre les boucles d'un

sous-type ne seront pas neutralisants pour un autre. Par contre les anticorps neutralisants contre le VPH-16 le sont contre des variantes de ce type (53).

La source exacte de cette variabilité reste toutefois inconnue bien que plusieurs hypothèses soient mises de l'avant pour tenter de l'expliquer. L'une des plus reconnues à ce jour propose que les variations proviennent de la pression sélective exercée par le système immunitaire de l'hôte. Il est aussi envisagé que cette variabilité ne découle que de la simple dérive génique. Les faibles contraintes structurelles démontrées par l'insertion de séquences exogènes permettant néanmoins l'assemblage de particules virales sont en accord avec cette hypothèse. Qui plus est, étant un virus à ADN, la dérive génique se fait à un rythme moindre comparativement aux virus à ARN en raison d'une polymérase plus fidèle à sa matrice. Finalement, les variations attribuables à l'hôte seraient une source négligeable de variabilité au sein des VPH.

Hormis les variations d'acides aminés de sa protéine majeure de capsid, le virus a mis au point de nombreuses autres stratégies pour échapper au contrôle immunitaire de l'hôte afin de compléter son cycle de vie. À l'inverse de plusieurs virus qui tentent d'altérer la réponse immunitaire de l'hôte, le VPH se distingue par la discrétion de son cycle réplcatif. D'abord, la réplication du virus est étroitement coordonnée avec le programme de réplication et de différenciation normal du kératinocyte, cellule de la muqueuse épithéliale qu'il infecte. Il n'entraîne pas sa lyse qui pourrait être propice à ce qu'une cellule présentatrice d'antigène expose à sa surface des antigènes de VPH phagocytés. Plutôt, le virus attend la mort naturelle des kératinocytes par desquamation et est ainsi libéré. Aussi, le VPH exprime exclusivement sa principale protéine immunogène dans la partie supérieure de l'épithélium qui est d'ailleurs considérée comme immunologiquement vierge, limitant encore une fois les risques d'activation des défenses de l'hôte. De plus, l'infection est circonscrite au site d'infection, soit l'épithélium, ce qui limite la capacité de réponse de l'hôte en limitant le nombre de cellules ayant le potentiel d'entrer en contact avec une cellule infectée. L'altération de la réponse antivirale intracellulaire compte également parmi les stratégies adoptées par le VPH. Ainsi, les protéines E6 et E7, essentielles dans le processus d'oncogenèse, interfèrent avec

l'expression de l'IFN-alpha (200, 210). Tous ces processus combinés font des VPH des virus presque invisibles pour notre système immunitaire.

Les mutations au niveau des régions hors boucles, quant à elle, affectent la production de particules virales. Le taux de production de particules virales dans un système de culture de cellule d'insecte varie à l'intérieur du type VPH-16 d'un facteur allant de 1 à 79 dépendamment de la séquence de L1. Les résidus 83 à 97 semblent jouer un rôle crucial dans cette disparité (262). Des résultats abondant en ce sens ont été obtenus dans un système de culture en levure (152). Une altération de cette séquence peut rendre impossible la formation d'une capsidie fonctionnelle. Les conséquences d'une altération majeure de la séquence codante ont par ailleurs été démontrées avec VPH-16. L'activation des cellules dendritiques via Myd88, un intermédiaire commun de la voie de signalisation de plusieurs TLR, était diminuée significativement chez des souris infectées par certains virus recueillis de lésions cancéreuses avancées. La cause de cette absence de réponse était en fait due à l'efficacité amoindrie du virus à assembler correctement une capsidie virale. Sur les 8 échantillons de lésions de grade CIN-III recueilli aux fins de leur étude, la moitié présentaient une telle caractéristique et d'autres études présentaient des observations similaires (118, 134). Les auteurs croient que la diminution de l'assemblage efficace est en fait une stratégie supplémentaire pour tenter d'échapper au contrôle immunitaire de l'hôte (284). L'impact que semble avoir les résidus à l'extérieur des boucles sur l'assemblage efficace des particules virales permet d'avancer l'hypothèse que les contraintes structurelles de la capsidie ont régi en partie son évolution au cours des siècles.

Cette étude contribue à la compréhension du polymorphisme chez les types à haut-risque autres que VPH-16. En résumé, outre des différences entre ces types à haut-risque, il reste que la localisation de la majorité des substitutions d'acides aminés était similaire. D'ailleurs, la région interne de la protéine était plus conservée que les boucles externes de la protéine L1. Les données obtenues suggèrent qu'il n'y a pas eu une évolution poussée par la pression sélective du système immunitaire mais plutôt par une pression de sélection. L'étude du polymorphisme de L1 devrait être étendue aux autres types à haut-

risque afin de déterminer si l'évolution de leur protéine de capsid est similaire à celle observée chez les types apparentés à VPH-16

Perspectives de projets de recherche futurs pour l'étude du polymorphisme du VPH

Les perspectives du champ de recherche portant sur le polymorphisme des différentes protéines virales du VPH devraient être orientées de façon à tenter de pallier à sa principale lacune, son approche fragmentée. Plusieurs études ont porté sur la mutation T350G au niveau de la protéine E6 comme étant une substitution conférant un fort potentiel oncogénique. Or, le rôle clé de cette position ne peut être démontré avec certitude. Il pourrait bel et bien s'agir de nouvelles propriétés conférées par un niveau d'activité plus élevé ou par une nouvelle conformation, mais bien d'une réponse différente de l'hôte aux antigènes du virus ou d'une régulation différente de l'expression de la protéine (52). Plusieurs études ont démontré la tendance qu'ont plusieurs mutations à co-ségréger ; ces hypothèses ne peuvent donc pas être balayées du revers de la main sans une investigation plus approfondie. Pour ce faire, l'analyse complète du génome attribuerait sans équivoque le potentiel oncogénique à une position ou plutôt à une variante vu que ce potentiel est en réalité une somme de ces caractéristiques. Douze variantes majeures de VPH-16 ont ainsi été séquencées. La classification actuelle semblait être respectée, à l'exception de la branche phylogénétique Afl qui démontrait une ambiguïté quant à son positionnement. D'autres auteurs soulignent également que le rythme d'évolution serait plus grand dans les gènes précoces en comparaison aux gènes tardifs, remettant en doute le concept de classification basée sur un seul gène sur lequel repose des observations cliniques, d'où le besoin d'une approche globale du génome du VPH malgré la complexité de la tâche (52). Un autre argument en faveur d'une telle approche vient du fait que des types apparentés à VPH-16, ceux des groupes 9 et 11, partagent une homologie de leurs gènes E6 et E7 avec les groupes 5, 6 et 7 apparentés à VPH-18 sans pour autant que leur distribution soit identique dans les cas de cancer squameux et glandulaire (8). Des différences à l'extérieur des protéines classiquement reconnues comme impliquées dans l'oncogenèse doivent donc nécessairement exister

(34). Les études *in vitro* pour différencier les impacts des différentes mutations d'une protéine devraient donc investiguer si les mutations qui coségrègent avec la mutation identifiée ont aussi un impact sur l'activité de la protéine pour laquelle ils codent.

Pour conclure, l'ensemble des résultats présentés dans cet ouvrage permettent d'élargir les connaissances quant au polymorphisme de la capsidite de des types qui appartiennent à la même espèce que le type le plus prévalent des papillomavirus oncogènes, le VPH-16. Le polymorphisme de la capsidite de ces papillomavirus oncogènes n'avait jamais été évalué jusqu'à notre travail. Plus spécifiquement, une esquisse de la phylogénie du VPH-31 basée sur l'origine ethnique des femmes infectées a pu être établie et pourrait éventuellement permettre d'identifier des variantes virales dont les particularités de la capsidite lui confèreraient une capacité de persistance accrue ou une tendance plus marquée à générer des lésions. Cette étude démontre que le polymorphisme de la capsidite des papillomavirus oncogène est globalement similaire entre les types oncogènes. Finalement, les données obtenues viennent appuyer la littérature actuelle les selon laquelle l'évolution des papillomavirus est grandement modulée par des contraintes structurelles et ce, même au niveau des boucles externes de la protéine.

Références

1. 1993. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: revised after the second National Cancer Institute Workshop, April 29-30, 1991. *Acta Cytol* **37**:115-24.
2. **af Geijersstam, V., C. Eklund, Z. Wang, M. Sapp, J. T. Schiller, J. Dillner, and L. Dillner.** 1999. A survey of seroprevalence of human papillomavirus types 16, 18 and 33 among children. *Int J Cancer* **80**:489-93.
3. **Ahdieh-Grant, L., R. Li, A. M. Levine, L. S. Massad, H. D. Strickler, H. Minkoff, M. Moxley, J. Palefsky, H. Sacks, R. D. Burk, and S. J. Gange.** 2004. Highly active antiretroviral therapy and cervical squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst* **96**:1070-6.
4. **Aho, J., C. Hankins, C. Tremblay, P. Forest, K. Pourreaux, F. Rouah, and F. Coutlee.** 2004. Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J Infect Dis* **190**:46-52.
5. **Aho, J., C. Hankins, C. Tremblay, F. Lang, P. Forest, K. Pourreaux, F. Rouah, and F. Coutlee.** 2003. Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *J Infect Dis* **188**:1517-27.
6. **Alam, S., M. J. Conway, H. S. Chen, and C. Meyers.** 2008. The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol* **82**:1053-8.
7. **Alanen, K. W., L. M. Elit, P. A. Molinaro, and C. M. McLachlin.** 1998. Assessment of cytologic follow-up as the recommended management for patients with atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Cancer* **84**:5-10.
8. **Alonso, A., and J. Reed.** 2002. Modelling of the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Biochim Biophys Acta* **1601**:9-18.
9. **Antonsson, A., O. Forslund, H. Ekberg, G. Sterner, and B. G. Hansson.** 2000. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* **74**:11636-41.
10. **Anttila, T., P. Saikku, P. Koskela, A. Bloigu, J. Dillner, I. Ikaheimo, E. Jellum, M. Lehtinen, P. Lenner, T. Hakulinen, A. Narvanen, E. Pukkala, S. Thoresen, L. Youngman, and J. Paavonen.** 2001. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *Jama* **285**:47-51.
11. **Arbeit, J. M., P. M. Howley, and D. Hanahan.** 1996. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2930-5.
12. **Asadurian, Y., H. Kurilin, H. Lichtig, A. Jackman, P. Gonen, M. Tommasino, I. Zehbe, and L. Sherman.** 2007. Activities of human papillomavirus 16 E6 natural variants in human keratinocytes. *J Med Virol* **79**:1751-60.
13. **Ault, K. A.** 2007. Long-term efficacy of human papillomavirus vaccination. *Gynecol Oncol* **107**:S27-30.
14. **Baken, L. A., L. A. Koutsky, J. Kuypers, M. R. Kosorok, S. K. Lee, N. B. Kiviat, and K. K. Holmes.** 1995. Genital human papillomavirus infection among male and female sex partners: prevalence and type-specific concordance. *J Infect Dis* **171**:429-32.
15. **Baleriola, C., D. Millar, J. Melki, N. Coulston, P. Altman, N. Rismanto, and W. Rawlinson.** 2008. Comparison of a novel HPV test with the Hybrid Capture II (hcII) and a reference PCR method shows high specificity and positive predictive value for 13 high-risk human papillomavirus infections. *J Clin Virol* **42**:22-26.
16. **Bedell, M. A., J. B. Hudson, T. R. Golub, M. E. Turyk, M. Hosken, G. D. Wilbanks, and L. A. Laimins.** 1991. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* **65**:2254-60.
17. **Bernard, H. U., I. E. Calleja-Macias, and S. T. Dunn.** 2006. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* **118**:1071-6.
18. **Bernard, H. U., S. Y. Chan, M. M. Manos, C. K. Ong, L. L. Villa, H. Delius, C. L. Peyton, H. M. Bauer, and C. M. Wheeler.** 1994. Identification and assessment of known and novel human

- papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* **170**:1077-85.
19. **Biggar, R. J., A. K. Chaturvedi, J. J. Goedert, and E. A. Engels.** 2007. AIDS-related cancer and severity of immunosuppression in persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst* **99**:962-72.
 20. **Bishop, B., J. Dasgupta, M. Klein, R. L. Garcea, N. D. Christensen, R. Zhao, and X. S. Chen.** 2007. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **282**:31803-11.
 21. **Block, S. L., T. Nolan, C. Sattler, E. Barr, K. E. Giacoletti, C. D. Marchant, X. Castellsague, S. A. Rusche, S. Lukac, J. T. Bryan, P. F. Cavanaugh, Jr., and K. S. Reisinger.** 2006. Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women. *Pediatrics* **118**:2135-45.
 22. **Bonnez, W.** 2007. Human papillomavirus vaccine-recent results and future developments. *Curr Opin Pharmacol* **7**:470-7.
 23. **Bontkes, H. J., M. van Duin, T. D. de Gruijl, M. F. Duggan-Keen, J. M. Walboomers, M. J. Stukart, R. H. Verheijen, T. J. Helmerhorst, C. J. Meijer, R. J. Scheper, F. R. Stevens, P. A. Dyer, P. Sinnott, and P. L. Stern.** 1998. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer* **78**:166-71.
 24. **Bordeaux, J., S. Forte, E. Harding, M. S. Darshan, K. Klucvsek, and J. Moroianu.** 2006. The I2 minor capsid protein of low-risk human papillomavirus type 11 interacts with host nuclear import receptors and viral DNA. *J Virol* **80**:8259-62.
 25. **Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. M. Jansen, J. Peto, M. H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, and K. V. Shah.** 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* **87**:796-802.
 26. **Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen, and H. zur Hausen.** 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* **3**:1151-7.
 27. **Bossis, I., R. B. Roden, R. Gambhira, R. Yang, M. Tagaya, P. M. Howley, and P. I. Meneses.** 2005. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol* **79**:6723-31.
 28. **Bousarghin, L., A. Touze, P. Y. Sizaret, and P. Coursaget.** 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* **77**:3846-50.
 29. **Boxman, I. L., L. H. Mulder, A. Russell, J. N. Bouwes Bavinck, A. Green, and J. Ter Schegget.** 1999. Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol* **141**:246-9.
 30. **Brady, C. S., M. F. Duggan-Keen, J. A. Davidson, J. M. Varley, and P. L. Stern.** 1999. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol* **80** (Pt 12):3233-40.
 31. **Breitbart, F., R. Kirnbauer, N. L. Hubbert, B. Nonnenmacher, C. Trin-Dinh-Desmarquet, G. Orth, J. T. Schiller, and D. R. Lowy.** 1995. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* **69**:3959-63.
 32. **Bruchim, I., W. H. Gotlieb, S. Mahmud, E. Tunitsky, K. Grzywacz, and A. Ferenczy.** 2007. HPV-related vulvar intraepithelial neoplasia: outcome of different management modalities. *Int J Gynaecol Obstet* **99**:23-7.
 33. **Burd, E. M.** 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* **16**:1-17.
 34. **Burk, R. D., M. Terai, P. E. Gravitt, L. A. Brinton, R. J. Kurman, W. A. Barnes, M. D. Greenberg, O. C. Hadjimichael, L. Fu, L. McGowan, R. Mortel, P. E. Schwartz, and A. Hildesheim.** 2003. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* **63**:7215-20.
 35. **Calleja-Macias, I. E., M. Kalantari, J. Huh, R. Ortiz-Lopez, A. Rojas-Martinez, J. F. Gonzalez-Guerrero, A. L. Williamson, B. Hagmar, D. J. Wiley, L. Villarreal, H. U. Bernard, and H. A. Barrera-Saldana.** 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and

- 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* **319**:315-23.
36. **Calleja-Macias, I. E., L. L. Villa, J. C. Prado, M. Kalantari, B. Allan, A. L. Williamson, L. P. Chung, R. J. Collins, R. E. Zuna, S. T. Dunn, T. Y. Chu, H. A. Cubie, K. Cuschieri, M. von Knebel-Doeberitz, C. R. Martins, G. I. Sanchez, F. X. Bosch, N. Munoz, and H. U. Bernard.** 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol* **79**:13630-40.
37. **Carpentier, G. S., M. J. Fleury, A. Touze, J. R. Sadeyen, S. Tourne, P. Y. Sizaret, and P. Coursaget.** 2005. Mutations on the FG surface loop of human papillomavirus type 16 major capsid protein affect recognition by both type-specific neutralizing antibodies and cross-reactive antibodies. *J Med Virol* **77**:558-65.
38. **Carter, J. J., G. C. Wipf, S. F. Benki, N. D. Christensen, and D. A. Galloway.** 2003. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J Virol* **77**:11625-32.
39. **Carter, J. J., G. C. Wipf, M. M. Madeleine, S. M. Schwartz, L. A. Koutsky, and D. A. Galloway.** 2006. Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera. *J Virol* **80**:4664-72.
40. **Cason, J., D. Patel, J. Naylor, D. Lunney, P. S. Shepherd, J. M. Best, and D. J. McCance.** 1989. Identification of immunogenic regions of the major coat protein of human papillomavirus type 16 that contain type-restricted epitopes. *J Gen Virol* **70 (Pt 11)**:2973-87.
41. **Castellsague, X., and N. Munoz.** 2003. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*:20-8.
42. **Cates, W., Jr.** 1999. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis* **26**:S2-7.
43. **Caulfield, M. J., L. Shi, S. Wang, B. Wang, T. W. Tobery, H. Mach, P. L. Ahl, J. L. Cannon, J. C. Cook, J. H. Heinrichs, and R. D. Sitrin.** 2007. Effect of alternative aluminum adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice. *Hum Vaccin* **3**:139-45.
44. **Cerqueira, D. M., G. N. Camara, M. R. da Cruz, E. O. Silva, M. Brigido Mde, L. G. Carvalho, and C. R. Martins.** 2003. Variants of human papillomavirus types 53, 58 and 66 identified in Central Brazil. *Virus Genes* **26**:83-7.
45. **Cerqueira, D. M., S. M. D. de, G. N. Camara, F. A. Amaral, C. N. Oyama, M. Q. dos Santos, and C. R. Martins.** 2007. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol* **152**:75-83.
46. **Chakrabarti, O., K. Veeraraghavalu, V. Tergaonkar, Y. Liu, E. J. Androphy, M. A. Stanley, and S. Krishna.** 2004. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol* **78**:5934-45.
47. **Chan, J. K., and J. S. Berek.** 2007. Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer. *J Clin Oncol* **25**:2975-82.
48. **Chan, P. K., C. W. Lam, T. H. Cheung, W. W. Li, K. W. Lo, M. Y. Chan, J. L. Cheung, L. Y. Xu, and A. F. Cheng.** 2002. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Infect Dis* **186**:696-700.
49. **Chan, S. Y., L. Ho, C. K. Ong, V. Chow, B. Drescher, M. Durst, J. ter Meulen, L. Villa, J. Luande, H. N. Mgaya, and et al.** 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* **66**:2057-66.
50. **Chen, X. S., R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, and S. C. Harrison.** 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**:557-67.
51. **Chen, Z., K. A. Storthz, and E. J. Shillitoe.** 1997. Mutations in the long control region of human papillomavirus DNA in oral cancer cells, and their functional consequences. *Cancer Res* **57**:1614-9.
52. **Chen, Z., M. Terai, L. Fu, R. Herrero, R. DeSalle, and R. D. Burk.** 2005. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* **79**:7014-23.

53. **Cheng, G., J. P. Icenogle, R. Kirnbauer, N. L. Hubbert, M. E. St Louis, C. Han, E. I. Svare, S. K. Kjaer, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1995. Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive. *J Infect Dis* **172**:1584-7.
54. **Chin-Hong, P. V., E. Vittinghoff, R. D. Cranston, S. Buchbinder, D. Cohen, G. Colfax, M. Da Costa, T. Darragh, E. Hess, F. Judson, B. Koblin, M. Madison, and J. M. Palefsky.** 2004. Age-Specific prevalence of anal human papillomavirus infection in HIV-negative sexually active men who have sex with men: the EXPLORE study. *J Infect Dis* **190**:2070-6.
55. **Ching, R. W., G. Dellaire, C. H. Eskiw, and D. P. Bazett-Jones.** 2005. PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci* **118**:847-54.
56. **Choo, K. B., H. H. Lee, C. C. Pan, S. M. Wu, L. N. Liew, W. F. Cheung, and S. H. Han.** 1988. Sequence duplication and internal deletion in the integrated human papillomavirus type 16 genome cloned from a cervical carcinoma. *J Virol* **62**:1659-66.
57. **Christensen, N. D., N. M. Cladel, C. A. Reed, L. R. Budgeon, M. E. Embers, D. M. Skulsky, W. L. McClements, S. W. Ludmerer, and K. U. Jansen.** 2001. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology* **291**:324-34.
58. **Christensen, N. D., J. Dillner, C. Eklund, J. J. Carter, G. C. Wipf, C. A. Reed, N. M. Cladel, and D. A. Galloway.** 1996. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* **223**:174-84.
59. **Christensen, N. D., R. Kirnbauer, J. T. Schiller, S. J. Ghim, R. Schlegel, A. B. Jensen, and J. W. Kreider.** 1994. Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* **205**:329-35.
60. **Clifford, G., S. Franceschi, M. Diaz, N. Munoz, and L. L. Villa.** 2006. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* **24 Suppl 3**:S26-34.
61. **Clifford, G. M., R. K. Rana, S. Franceschi, J. S. Smith, G. Gough, and J. M. Pimenta.** 2005. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**:1157-64.
62. **Combita, A. L., A. Touze, L. Bousarghin, N. D. Christensen, and P. Coursaget.** 2002. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol* **76**:6480-6.
63. **Coutlee, F., P. Gravitt, J. Kornegay, C. Hankins, H. Richardson, N. Lapointe, H. Voyer, and E. Franco.** 2002. Use of PGMV primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* **40**:902-7.
64. **Culp, T. D., L. R. Budgeon, M. P. Marinkovich, G. Meneguzzi, and N. D. Christensen.** 2006. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* **80**:8940-50.
65. **Da Costa, M. M., C. J. Hogeboom, E. A. Holly, and J. M. Palefsky.** 2002. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Infect Dis* **185**:1229-37.
66. **Darshan, M. S., J. Lucchi, E. Harding, and J. Moroianu.** 2004. The 12 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol* **78**:12179-88.
67. **De Boer, M. A., L. A. Peters, M. F. Aziz, B. Siregar, S. Cornain, M. A. Vrede, E. S. Jordanova, and G. J. Fleuren.** 2005. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer* **114**:422-5.
68. **de Boer, M. A., L. A. Peters, M. F. Aziz, B. Siregar, S. Cornain, M. A. Vrede, E. S. Jordanova, S. Kolkman-Uljee, and G. J. Fleuren.** 2004. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol* **94**:488-94.
69. **de Roda Husman, A. M., J. M. Walboomers, A. J. van den Brule, C. J. Meijer, and P. J. Snijders.** 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76** (Pt 4):1057-62.
70. **de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen.** 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**:17-27.

71. **de Villiers, E. M., L. Gissmann, and H. zur Hausen.** 1981. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol* **40**:932-5.
72. **Del Mistro, A., R. Bertorelle, M. Franzetti, A. Cattelan, A. Torrisi, M. T. Giordani, R. Sposetti, E. Bonoldi, L. Sasset, L. Bonaldi, D. Minucci, and L. Chieco-Bianchi.** 2004. Antiretroviral therapy and the clinical evolution of human papillomavirus-associated genital lesions in HIV-positive women. *Clin Infect Dis* **38**:737-42.
73. **Divisi, D., S. Di Tommaso, S. Salvemini, M. Garramone, and R. Crisci.** 2006. Diet and cancer. *Acta Biomed* **77**:118-23.
74. **Dolei, A., S. Curreli, P. Marongiu, A. Pierangeli, E. Gomes, M. Bucci, C. Serra, and A. M. Degener.** 1999. Human immunodeficiency virus infection in vitro activates naturally integrated human papillomavirus type 18 and induces synthesis of the L1 capsid protein. *J Gen Virol* **80 (Pt 11)**:2937-44.
75. **Dong, X. P., F. Stubenrauch, E. Beyer-Finkler, and H. Pfister.** 1994. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer* **58**:803-8.
76. **Doorbar, J.** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **110**:525-41.
77. **Dorn, H. F., and S. J. Cutler.** 1959. Morbidity from cancer in the United States. *Public Health Monogr* **73**:1-207.
78. **Dunne, E. F., C. M. Nielson, K. M. Stone, L. E. Markowitz, and A. R. Giuliano.** 2006. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis* **194**:1044-57.
79. **Dunne, E. F., E. R. Unger, M. Sternberg, G. McQuillan, D. C. Swan, S. S. Patel, and L. E. Markowitz.** 2007. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *Jama* **297**:813-9.
80. **Durst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, and H. zur Hausen.** 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:3812-5.
81. **Elson, D. A., R. R. Riley, A. Lacey, G. Thordarson, F. J. Talamantes, and J. M. Arbeit.** 2000. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* **60**:1267-75.
82. **Eschle, D., M. Durst, J. ter Meulen, J. Luande, H. C. Eberhardt, M. Pawlita, and L. Gissmann.** 1992. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **73 (Pt 7)**:1829-32.
83. **Etherington, I. J., J. R. Ellis, D. M. Luesley, D. D. Moffitt, and L. S. Young.** 1999. Histologic and immunologic associations of an HPV16 variant in LoSIL smears. *Gynecol Oncol* **72**:56-9.
84. **Farzaneh, F., S. Roberts, D. Mandal, B. Ollier, U. Winters, H. C. Kitchener, and L. Brabin.** 2006. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. *Bjog* **113**:961-4.
85. **Favre, M., G. Orth, S. Majewski, S. Baloul, A. Pura, and S. Jablonska.** 1998. Psoriasis: A possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* **110**:311-7.
86. **Finnen, R. L., K. D. Erickson, X. S. Chen, and R. L. Garcea.** 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **77**:4818-26.
87. **Fligge, C., T. Giroglou, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2001. Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33. *Virology* **283**:353-7.
88. **Fligge, C., F. Schafer, H. C. Selinka, C. Sapp, and M. Sapp.** 2001. DNA-induced structural changes in the papillomavirus capsid. *J Virol* **75**:7727-31.
89. **Florin, L., K. A. Becker, C. Lambert, T. Nowak, C. Sapp, D. Strand, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2006. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *J Virol* **80**:6691-6.
90. **Florin, L., K. A. Becker, C. Sapp, C. Lambert, H. Sirma, M. Muller, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2004. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol* **78**:5546-53.
91. **Florin, L., F. Schafer, K. Sotlar, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2002. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein l2. *Virology* **295**:97-107.

92. **Forslund, O., T. Iftner, K. Andersson, B. Lindelof, E. Hradil, P. Nordin, B. Stenquist, R. Kirnbauer, J. Dillner, and E. M. de Villiers.** 2007. Cutaneous human papillomaviruses found in sun-exposed skin: Beta-papillomavirus species 2 predominates in squamous cell carcinoma. *J Infect Dis* **196**:876-83.
93. **Foster, S. A., G. W. Demers, B. G. Etscheid, and D. A. Galloway.** 1994. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J Virol* **68**:5698-705.
94. **Frega, A., M. Cenci, P. Stentella, L. Cipriano, A. De Ioris, M. Alderisio, and A. Vecchione.** 2003. Human papillomavirus in virgins and behaviour at risk. *Cancer Lett* **194**:21-4.
95. **Frisch, M., R. J. Biggar, and J. J. Goedert.** 2000. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* **92**:1500-10.
96. **Fujinaga, Y., K. Okazawa, A. Nishikawa, Y. Yamakawa, M. Fukushima, I. Kato, and K. Fujinaga.** 1994. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes* **9**:85-92.
97. **Gagnon, S., C. Hankins, D. Money, K. Poudreux, E. Franco, and F. Coutlee.** 2007. Polymorphism of the L1 capsid gene and persistence of human papillomavirus type 52 infection in women at high risk or infected by HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* **44**:61-5.
98. **Gagnon, S., C. Hankins, C. Tremblay, P. Forest, K. Poudreux, and F. Coutlee.** 2004. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect Dis* **190**:1575-85.
99. **Gagnon, S., C. Hankins, C. Tremblay, K. Poudreux, P. Forest, F. Rouah, and F. Coutlee.** 2005. Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J Med Virol* **75**:213-21.
100. **Gambhira, R., P. E. Gravitt, I. Bossis, P. L. Stern, R. P. Viscidi, and R. B. Roden.** 2006. Vaccination of healthy volunteers with human papillomavirus type 16 L2E7E6 fusion protein induces serum antibody that neutralizes across papillomavirus species. *Cancer Res* **66**:11120-4.
101. **Gambhira, R., B. Karanam, S. Jagu, J. N. Roberts, C. B. Buck, I. Bossis, H. Alphas, T. Culp, N. D. Christensen, and R. B. Roden.** 2007. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J Virol* **81**:13927-31.
102. **Garcia-Closas, R., X. Castellsague, X. Bosch, and C. A. Gonzalez.** 2005. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer* **117**:629-37.
103. **Garland, S. M., M. Hernandez-Avila, C. M. Wheeler, G. Perez, D. M. Harper, S. Leodolter, G. W. Tang, D. G. Ferris, M. Steben, J. Bryan, F. J. Taddeo, R. Railkar, M. T. Esser, H. L. Sings, M. Nelson, J. Boslego, C. Sattler, E. Barr, and L. A. Koutsky.** 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* **356**:1928-43.
104. **Genç, M. R., A. Onderdonk, and S. S. Witkin.** 2004. Innate Immune System Gene Polymorphisms in Women with Vulvovaginal Infections. *Curr Infect Dis Rep* **6**:462-8.
105. **Gervaz, P., A. S. Allal, P. Villiger, L. Buhler, and P. Morel.** 2003. Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. *Swiss Med Wkly* **133**:353-9.
106. **Giannoudis, A., and C. S. Herrington.** 2001. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* **193**:295-302.
107. **Gibbs, S., I. Harvey, J. C. Sterling, and R. Stark.** 2003. Local treatments for cutaneous warts. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001781.
108. **Gillison, M. L., and K. V. Shah.** 2003. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*:57-65.
109. **Giovannelli, L., G. Campisi, A. Lama, O. Giambalvo, J. Osborn, V. Margiotta, and P. Ammatuna.** 2002. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* **185**:833-6.
110. **Giroglou, T., M. Sapp, C. Lane, C. Fligge, N. D. Christensen, R. E. Streeck, and R. C. Rose.** 2001. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* **19**:1783-93.
111. **Gissmann, L., and H. zur Hausen.** 1980. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer* **25**:605-9.
112. **Giuliano, A. R., R. L. Sedjo, D. J. Roe, R. Harri, S. Baldwi, M. R. Papenfuss, M. Abrahamsen, and P. Inserra.** 2002. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control* **13**:839-46.

113. **Glew, S. S., M. E. Connor, P. J. Snijders, C. M. Stanbridge, C. H. Buckley, J. M. Walboomers, C. J. Meijer, and P. L. Stern.** 1993. HLA expression in pre-invasive cervical neoplasia in relation to human papilloma virus infection. *Eur J Cancer* **29A**:1963-70.
114. **Goon, P., C. Sonnex, P. Jani, M. Stanley, and H. Sudhoff.** 2008. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **265**:147-51.
115. **Gravitt, P. E., C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutlee, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott, and R. J. Apple.** 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* **38**:357-61.
116. **Greer, C. E., C. M. Wheeler, M. B. Ladner, K. Beutner, M. Y. Coyne, H. Liang, A. Langenberg, T. S. Yen, and R. Ralston.** 1995. Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol* **33**:2058-63.
117. **Grodzki, M., G. Besson, C. Clavel, A. Arslan, S. Franceschi, P. Birembaut, M. Tommasino, and I. Zehbe.** 2006. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**:820-2.
118. **Hall, W. S., R. Goto-Mandeville, H. A. Shih, P. R. Shank, and L. Braun.** 1997. Molecular analysis of episomal human papillomavirus type 16 DNA in a cervical carcinoma cell line. *Virus Res* **51**:183-95.
119. **Harper, D. M., E. L. Franco, C. Wheeler, D. G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N. S. De Carvalho, C. M. Roteli-Martins, J. Teixeira, M. M. Blatter, A. P. Korn, W. Quint, and G. Dubin.** 2004. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* **364**:1757-65.
120. **Harper, D. M., E. L. Franco, C. M. Wheeler, A. B. Moscicki, B. Romanowski, C. M. Roteli-Martins, D. Jenkins, A. Schuind, S. A. Costa Clemens, and G. Dubin.** 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* **367**:1247-55.
121. **Harris, T. G., R. D. Burk, X. Xue, K. Anastos, H. Minkoff, L. S. Massad, M. A. Young, A. M. Levine, S. J. Gange, D. H. Watts, J. M. Palefsky, and H. D. Strickler.** 2007. Association of cutaneous anergy with human papillomavirus and cervical neoplasia in HIV-seropositive and seronegative women. *Aids* **21**:1933-41.
122. **Harro, C. D., Y. Y. Pang, R. B. Roden, A. Hildesheim, Z. Wang, M. J. Reynolds, T. C. Mast, R. Robinson, B. R. Murphy, R. A. Karron, J. Dillner, J. T. Schiller, and D. R. Lowy.** 2001. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* **93**:284-92.
123. **Harwood, C. A., T. Suretheran, J. M. McGregor, P. J. Spink, I. M. Leigh, J. Breuer, and C. M. Proby.** 2000. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* **61**:289-97.
124. **Heard, I., V. Potard, and D. Costagliola.** 2006. Limited impact of immunosuppression and HAART on the incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-positive women. *Antivir Ther* **11**:1091-6.
125. **Heard, I., V. Schmitz, D. Costagliola, G. Orth, and M. D. Kazatchkine.** 1998. Early regression of cervical lesions in HIV-seropositive women receiving highly active antiretroviral therapy. *Aids* **12**:1459-64.
126. **Hecht, J. L., A. S. Kadish, G. Jiang, and R. D. Burk.** 1995. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer* **60**:369-76.
127. **Herrero, R.** 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr*:47-51.
128. **Hildesheim, A., R. Herrero, P. E. Castle, S. Wacholder, M. C. Bratti, M. E. Sherman, A. T. Lorincz, R. D. Burk, J. Morales, A. C. Rodriguez, K. Helgesen, M. Alfaro, M. Hutchinson, I. Balmaceda, M. Greenberg, and M. Schiffman.** 2001. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer* **84**:1219-26.

129. **Hildesheim, A., M. Schiffman, D. R. Scott, D. Marti, T. Kissner, M. E. Sherman, A. G. Glass, M. M. Manos, A. T. Lorincz, R. J. Kurman, J. Buckland, B. B. Rush, and M. Carrington.** 1998. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**:1035-41.
130. **Hildesheim, A., M. H. Schiffman, P. E. Gravitt, A. G. Glass, C. E. Greer, T. Zhang, D. R. Scott, B. B. Rush, P. Lawler, M. E. Sherman, and et al.** 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* **169**:235-40.
131. **Hildesheim, A., and S. S. Wang.** 2002. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* **89**:229-40.
132. **Hindmarsh, P. L., and L. A. Laimins.** 2007. Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virology* **4**:19.
133. **Ho, G. Y., R. Bierman, L. Beardsley, C. J. Chang, and R. D. Burk.** 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* **338**:423-8.
134. **Ho, L., S. Y. Chan, R. D. Burk, B. C. Das, K. Fujinaga, J. P. Icenogle, T. Kahn, N. Kiviat, W. Lancaster, P. Mavromara-Nazos, and et al.** 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* **67**:6413-23.
135. **Ho, L., S. Y. Chan, V. Chow, T. Chong, S. K. Tay, L. L. Villa, and H. U. Bernard.** 1991. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* **29**:1765-72.
136. **Holmgren, S. C., N. A. Patterson, M. A. Ozbun, and P. F. Lambert.** 2005. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol* **79**:3938-48.
137. **Icenogle, J. P., K. A. Clancy, and S. Y. Lin.** 1995. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16 and type 31. *Virology* **214**:664-9.
138. **Icenogle, J. P., P. Sathya, D. L. Miller, R. A. Tucker, and W. E. Rawls.** 1991. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virology* **184**:101-7.
139. **Ivansson, E. L., I. M. Gustavsson, J. J. Magnusson, L. L. Steiner, P. K. Magnusson, H. A. Erlich, and U. B. Gyllensten.** 2007. Variants of chemokine receptor 2 and interleukin 4 receptor, but not interleukin 10 or Fas ligand, increase risk of cervical cancer. *Int J Cancer* **121**:2451-7.
140. **Ji, X., A. S. Neumann, E. M. Sturgis, K. Adler-Storthz, K. Dahlstrom, J. T. Schiller, Q. Wei, and G. Li.** 2008. p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never smokers. *Carcinogenesis*.
141. **Jones, V., S. J. Smith, and H. A. Omar.** 2007. Nonsexual transmission of anogenital warts in children: a retrospective analysis. *ScientificWorldJournal* **7**:1896-9.
142. **Joyce, J. G., J. S. Tung, C. T. Przysiecki, J. C. Cook, E. D. Lehman, J. A. Sands, K. U. Jansen, and P. M. Keller.** 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* **274**:5810-22.
143. **Kammer, C., M. Tommasino, S. Syrjanen, H. Delius, U. Hebling, U. Warthorst, H. Pfister, and I. Zehbe.** 2002. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer* **86**:269-73.
144. **Kammer, C., U. Warthorst, N. Torrez-Martinez, C. M. Wheeler, and H. Pfister.** 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* **81**:1975-81.
145. **Kamper, N., P. M. Day, T. Nowak, H. C. Selinka, L. Florin, J. Bolscher, L. Hilbig, J. T. Schiller, and M. Sapp.** 2006. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* **80**:759-68.
146. **Kang, S., Y. T. Jeon, J. W. Kim, N. H. Park, Y. S. Song, S. B. Kang, and H. P. Lee.** 2005. Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women. *Int J Gynecol Cancer* **15**:107-12.
147. **Kayes, O., H. U. Ahmed, M. Arya, and S. Minhas.** 2007. Molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet Oncol* **8**:420-9.

148. **Kieback, E., and M. Muller.** 2006. Factors influencing subcellular localization of the human papillomavirus L2 minor structural protein. *Virology* **345**:199-208.
149. **Kim, D., R. Gambhira, B. Karanam, A. Monie, C. F. Hung, R. Roden, and T. C. Wu.** 2008. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine* **26**:351-60.
150. **Kirkpatrick, A., J. Bidwell, A. J. van den Brule, C. J. Meijer, J. Pawade, and S. Glew.** 2004. TNFalpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* **92**:675-9.
151. **Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:12180-4.
152. **Kirnbauer, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Durst, L. Gissmann, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* **67**:6929-36.
153. **Kodner, C. M., and S. Nasraty.** 2004. Management of genital warts. *Am Fam Physician* **70**:2335-42.
154. **Kordi Tamandani, D. M., R. C. Sobti, M. Shekari, S. Kaur, and A. Huria.** 2007. Impact of polymorphism in IL-1RA gene on the risk of cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* **277**:527-33.
155. **Koushik, A., A. Ghosh, E. Duarte-Franco, P. Forest, H. Voyer, G. Matlashewski, F. Coutlee, and E. L. Franco.** 2005. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detect Prev* **29**:307-16.
156. **Koutsky, L.** 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* **102**:3-8.
157. **Koutsky, L. A., K. A. Ault, C. M. Wheeler, D. R. Brown, E. Barr, F. B. Alvarez, L. M. Chiacchierini, and K. U. Jansen.** 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347**:1645-51.
158. **Kurvinen, K., M. Yliskoski, S. Saarikoski, K. Syrjanen, and S. Syrjanen.** 2000. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer* **36**:1402-10.
159. **Lai, H. C., C. C. Chang, Y. W. Lin, S. F. Chen, M. H. Yu, S. Nieh, T. W. Chu, and T. Y. Chu.** 2005. Genetic polymorphism of the interferon-gamma gene in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* **113**:712-8.
160. **Lai, H. C., W. Y. Lin, Y. W. Lin, C. C. Chang, M. H. Yu, C. C. Chen, and T. Y. Chu.** 2005. Genetic polymorphisms of FAS and FASL (CD95/CD95L) genes in cervical carcinogenesis: An analysis of haplotype and gene-gene interaction. *Gynecol Oncol* **99**:113-8.
161. **Lazo, P. A.** 1999. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* **80**:2008-18.
162. **Lechner, M. S., D. H. Mack, A. B. Finicle, T. Crook, K. H. Vousden, and L. A. Laimins.** 1992. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J* **11**:3045-52.
163. **Lehtinen, M., D. Apter, G. Dubin, E. Kosunen, R. Isaksson, E. L. Korpivaara, L. Kyha-Osterlund, T. Lunnas, T. Luostarinen, L. Niemi, J. Palmroth, T. Petaja, S. Rekonen, S. Salmivesi, M. Siitari-Mattila, S. Svartsjo, L. Tuomivaara, M. Vilkki, E. Pukkala, and J. Paavonen.** 2006. Enrolment of 22,000 adolescent women to cancer registry follow-up for long-term human papillomavirus vaccine efficacy: guarding against guessing. *Int J STD AIDS* **17**:517-21.
164. **Lehtinen, M., P. Koskela, E. Jellum, A. Bloigu, T. Anttila, G. Hallmans, T. Luukkaala, S. Thoresen, L. Youngman, J. Dillner, and M. Hakama.** 2002. Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *Am J Epidemiol* **156**:687-92.
165. **Liaw, K. L., A. Hildesheim, R. D. Burk, P. Gravitt, S. Wacholder, M. M. Manos, D. R. Scott, M. E. Sherman, R. J. Kurman, A. G. Glass, S. M. Anderson, and M. Schiffman.** 2001. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* **183**:8-15.
166. **Liddington, R. C., Y. Yan, J. Moulai, R. Sahli, T. L. Benjamin, and S. C. Harrison.** 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* **354**:278-84.
167. **Lipke, M. M.** 2006. An armamentarium of wart treatments. *Clin Med Res* **4**:273-93.

168. **Lizano, M., and A. Garcia-Carranca.** 1997. [Molecular variants of human papillomaviruses types 16, 18, and 45 in tumors of the uterine cervix in Mexico]. *Gac Med Mex* **133 Suppl 1**:43-8.
169. **Londesborough, P., L. Ho, G. Terry, J. Cuzick, C. Wheeler, and A. Singer.** 1996. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* **69**:364-8.
170. **Longworth, M. S., and L. A. Laimins.** 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:362-72.
171. **Lorincz, A. T., W. D. Lancaster, and G. F. Temple.** 1986. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* **58**:225-9.
172. **Ludmerer, S. W., W. L. McClements, X. M. Wang, J. C. Ling, K. U. Jansen, and N. D. Christensen.** 2000. HPV11 mutant virus-like particles elicit immune responses that neutralize virus and delineate a novel neutralizing domain. *Virology* **266**:237-45.
173. **Mahmud, S. M., A. Koushik, E. Duarte-Franco, J. Costa, G. Fontes, M. Bicho, F. Coutlee, and E. L. Franco.** 2007. Haptoglobin phenotype and risk of cervical neoplasia: a case-control study. *Clin Chim Acta* **385**:67-72.
174. **Manos MM, T. Y., Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM.** 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital human papillomavirus, p. 209-214. *In* M. Furth and M. F. Greaves (ed.), *Cancer cells*, vol. 7. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
175. **Mao, C., L. A. Koutsky, K. A. Ault, C. M. Wheeler, D. R. Brown, D. J. Wiley, F. B. Alvarez, O. M. Bautista, K. U. Jansen, and E. Barr.** 2006. Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* **107**:18-27.
176. **Marais, D., R. C. Rose, and A. L. Williamson.** 1997. Age distribution of antibodies to human papillomavirus in children, women with cervical intraepithelial neoplasia and blood donors from South Africa. *J Med Virol* **51**:126-31.
177. **Marcoux, D., K. Nadeau, C. McCuaig, J. Powell, and L. L. Oligny.** 2006. Pediatric anogenital warts: a 7-year review of children referred to a tertiary-care hospital in Montreal, Canada. *Pediatr Dermatol* **23**:199-207.
178. **Markowitz, L. E., E. F. Dunne, M. Saraiya, H. W. Lawson, H. Chesson, and E. R. Unger.** 2007. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **56**:1-24.
179. **Marrazzo, J. M., L. A. Koutsky, N. B. Kiviat, J. M. Kuypers, and K. Stine.** 2001. Papanicolaou test screening and prevalence of genital human papillomavirus among women who have sex with women. *Am J Public Health* **91**:947-52.
180. **Marrazzo, J. M., L. A. Koutsky, K. L. Stine, J. M. Kuypers, T. A. Grubert, D. A. Galloway, N. B. Kiviat, and H. H. Handsfield.** 1998. Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women. *J Infect Dis* **178**:1604-9.
181. **Matsukura, T., and M. Sugase.** 2008. Pitfalls in the epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer using polymerase chain reaction: driver and passenger. *Int J Gynecol Cancer*.
182. **Matsumoto, K., T. Yasugi, S. Nakagawa, M. Okubo, R. Hirata, H. Maeda, H. Yoshikawa, and Y. Taketani.** 2003. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer. *Int J Cancer* **106**:919-22.
183. **Matsumoto, K., H. Yoshikawa, S. Nakagawa, X. Tang, T. Yasugi, K. Kawana, S. Sekiya, Y. Hirai, I. Kukimoto, T. Kanda, and Y. Taketani.** 2000. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett* **156**:159-65.
184. **May, M., X. P. Dong, E. Beyer-Finkler, F. Stubenrauch, P. G. Fuchs, and H. Pfister.** 1994. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *Embo J* **13**:1460-6.
185. **Mayrand, M. H., E. Duarte-Franco, I. Rodrigues, S. D. Walter, J. Hanley, A. Ferenczy, S. Ratnam, F. Coutlee, and E. L. Franco.** 2007. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* **357**:1579-88.
186. **McMillan, N. A., E. Payne, I. H. Frazer, and M. Evander.** 1999. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **261**:271-9.

187. **Menczer, J.** 2003. The low incidence of cervical cancer in Jewish women: has the puzzle finally been solved? *Isr Med Assoc J* **5**:120-3.
188. **Micali, G., M. R. Nasca, D. Innocenzi, and R. A. Schwartz.** 2006. Penile cancer. *J Am Acad Dermatol* **54**:369-91; quiz 391-4.
189. **Minkoff, H., L. Ahdieh, L. S. Massad, K. Anastos, D. H. Watts, S. Melnick, L. Muderspach, R. Burk, and J. Palefsky.** 2001. The effect of highly active antiretroviral therapy on cervical cytologic changes associated with oncogenic HPV among HIV-infected women. *Aids* **15**:2157-64.
190. **Mistry, N., M. Simonsson, and M. Evander.** 2007. Transcriptional activation of the human papillomavirus type 5 and 16 long control region in cells from cutaneous and mucosal origin. *Virology* **4**:27.
191. **Mitrani-Rosenbaum, S., R. Tsvieli, and R. Tur-Kaspa.** 1989. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J Gen Virol* **70** (Pt 8):2227-32.
192. **Modis, Y., B. L. Trus, and S. C. Harrison.** 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *Embo J* **21**:4754-62.
193. **Molijn, A., B. Kleter, W. Quint, and L. J. van Doorn.** 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**:S43-51.
194. **Moreno, V., F. X. Bosch, N. Munoz, C. J. Meijer, K. V. Shah, J. M. Walboomers, R. Herrero, and S. Franceschi.** 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**:1085-92.
195. **Muller, M., L. Gissmann, R. J. Cristiano, X. Y. Sun, I. H. Frazer, A. B. Jensen, A. Alonso, H. Zentgraf, and J. Zhou.** 1995. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* **69**:948-54.
196. **Munoz, N., F. X. Bosch, X. Castellsague, M. Diaz, S. de Sanjose, D. Hammouda, K. V. Shah, and C. J. Meijer.** 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* **111**:278-85.
197. **Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders, and C. J. Meijer.** 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**:518-27.
198. **Munoz, N., S. Franceschi, C. Bosetti, V. Moreno, R. Herrero, J. S. Smith, K. V. Shah, C. J. Meijer, and F. X. Bosch.** 2002. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**:1093-101.
199. **Myhre, A. K., A. Dalen, K. Berntzen, and D. Bratlid.** 2003. Anogenital human papillomavirus in non-abused preschool children. *Acta Paediatr* **92**:1445-52.
200. **Nees, M., J. M. Geoghegan, T. Hyman, S. Frank, L. Miller, and C. D. Woodworth.** 2001. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* **75**:4283-96.
201. **Nicolau, S. M., C. G. Camargo, J. N. Stavale, A. Castelo, G. B. Dores, A. Lorincz, and G. R. de Lima.** 2005. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. *Urology* **65**:251-5.
202. **Nindl, I., K. Rindfleisch, B. Lotz, A. Schneider, and M. Durst.** 1999. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* **82**:203-7.
203. **Nonnenmacher, B., N. L. Hubbert, R. Kirnbauer, K. V. Shah, N. Munoz, F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Viscidi, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1995. Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis* **172**:19-24.
204. **Olcese, V. A., Y. Chen, R. Schlegel, and H. Yuan.** 2004. Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope. *BMC Microbiol* **4**:29.
205. **Ong, C. K., S. Y. Chan, M. S. Campo, K. Fujinaga, P. Mavromara-Nazos, V. Labropoulou, H. Pfister, S. K. Tay, J. ter Meulen, L. L. Villa, and et al.** 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* **67**:6424-31.
206. **Oriel, J. D.** 1971. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* **47**:1-13.

207. **Paavonen, J., D. Jenkins, F. X. Bosch, P. Naud, J. Salmeron, C. M. Wheeler, S. N. Chow, D. L. Apter, H. C. Kitchener, X. Castellsague, N. S. de Carvalho, S. R. Skinner, D. M. Harper, J. A. Hedrick, U. Jaisamrarn, G. A. Limson, M. Dionne, W. Quint, B. Spiessens, P. Peeters, F. Struyf, S. L. Wieting, M. O. Lehtinen, and G. Dubin.** 2007. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **369**:2161-70.
208. **Palefsky, J.** 2006. Biology of HPV in HIV infection. *Adv Dent Res* **19**:99-105.
209. **Pande, S., N. Jain, B. K. Prusty, S. Bhambhani, S. Gupta, R. Sharma, S. Batra, and B. C. Das.** 2008. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol* **46**:1060-6.
210. **Park, J. S., E. J. Kim, H. J. Kwon, E. S. Hwang, S. E. Namkoong, and S. J. Um.** 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* **275**:6764-9.
211. **Parkin, D. M., and F. Bray.** 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* **24 Suppl 3**:S11-25.
212. **Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani.** 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**:74-108.
213. **Patterson, N. A., J. L. Smith, and M. A. Ozbun.** 2005. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J Virol* **79**:6838-47.
214. **Perrin, K. K., E. M. Daley, S. F. Naoom, J. L. Packing-Ebuen, H. L. Rayko, M. McFarlane, and R. J. McDermott.** 2006. Women's reactions to HPV diagnosis: insights from in-depth interviews. *Women Health* **43**:93-110.
215. **Pfister, H.** 2003. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*:52-6.
216. **Pfister, H.** 1990. General introduction to papillomaviruses; properties of the virions and classification, p. 2-4. *In* H. Pfister (ed.), *Papillomaviruses and human cancer*,. CRC Press, Boca Raton.
217. **Poljak, M., I. J. Marin, K. Seme, and A. Vince.** 2002. Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol* **25 Suppl 3**:S89-97.
218. **Potischman, N., and L. A. Brinton.** 1996. Nutrition and cervical neoplasia. *Cancer Causes Control* **7**:113-26.
219. **Prado, J. C., I. E. Calleja-Macias, H. U. Bernard, M. Kalantari, S. A. Macay, B. Allan, A. L. Williamson, L. P. Chung, R. J. Collins, R. E. Zuna, S. T. Dunn, R. Ortiz-Lopez, H. A. Barrera-Saldana, H. A. Cubie, K. Cuschieri, M. von Knebel-Doeberitz, G. I. Sanchez, F. X. Bosch, and L. L. Villa.** 2005. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology* **340**:95-104.
220. **Prokopczyk, B., J. E. Cox, D. Hoffmann, and S. E. Waggoner.** 1997. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* **89**:868-73.
221. **Pushko, P., T. Sasagawa, J. Cuzick, and L. Crawford.** 1994. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **75 (Pt 4)**:911-6.
222. **Qiu, A. D., E. Q. Wu, X. H. Yu, C. L. Jiang, Y. H. Jin, Y. G. Wu, Y. Chen, Y. Chen, Y. M. Shan, G. N. Zhang, Y. Fan, X. Zha, and W. Kong.** 2007. HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China. *Gynecol Oncol* **104**:77-85.
223. **Radhakrishna Pillai, M., S. Sreevidya, B. H. Pollock, P. G. Jayaprakash, and B. Herman.** 2002. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol Oncol* **87**:268-73.
224. **Ramesar, J. E., E. P. Rybicki, and A. L. Williamson.** 1995. Sequence variation in the L1 gene of human papillomavirus type 16 from Africa. *Arch Virol* **140**:1863-70.

225. **Reeves, W. C., S. S. Ruparelia, K. I. Swanson, C. S. Derkay, A. Marcus, and E. R. Unger.** 2003. National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **129**:976-82.
226. **Revaz, V., R. Zurbriggen, C. Moser, J. T. Schiller, F. Ponci, M. Bobst, and D. Nardelli-Haefliger.** 2007. Humoral and cellular immune responses to airway immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles and mucosal adjuvants. *Antiviral Res* **76**:75-85.
227. **Revzina, N. V., and R. J. Diclemente.** 2005. Prevalence and incidence of human papillomavirus infection in women in the USA: a systematic review. *Int J STD AIDS* **16**:528-37.
228. **Richards, R. M., D. R. Lowy, J. T. Schiller, and P. M. Day.** 2006. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1522-7.
229. **Roden, R., and T. C. Wu.** 2006. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer* **6**:753-63.
230. **Roden, R. B., R. Kirnbauer, A. B. Jenson, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1994. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* **68**:7260-6.
231. **Rose, B., G. Steger, X. P. Dong, C. Thompson, Y. Cossart, M. Tattersall, and H. Pfister.** 1998. Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol* **79 (Pt 7)**:1659-63.
232. **Rose, B. R., C. H. Thompson, J. Zhang, M. Stoeter, A. Stephen, H. Pfister, M. H. Tattersall, and Y. E. Cossart.** 1997. Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV 18 isolates from cervical cancers. *Gynecol Oncol* **66**:282-9.
233. **Rose, R. C., W. I. White, M. Li, J. A. Suzich, C. Lane, and R. L. Garcea.** 1998. Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol* **72**:6151-4.
234. **Rotkin, I. D.** 1973. A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res* **33**:1353-67.
235. **Santiago, E., L. Camacho, M. L. Junquera, and F. Vazquez.** 2006. Full HPV typing by a single restriction enzyme. *J Clin Virol* **37**:38-46.
236. **Sapp, M., C. Fligge, I. Petzak, J. R. Harris, and R. E. Streeck.** 1998. Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol* **72**:6186-9.
237. **Sawaya, G. F., and K. Smith-McCune.** 2007. HPV vaccination--more answers, more questions. *N Engl J Med* **356**:1991-3.
238. **Schlecht, N. F., S. Kulaga, J. Robitaille, S. Ferreira, M. Santos, R. A. Miyamura, E. Duarte-Franco, T. E. Rohan, A. Ferenczy, L. L. Villa, and E. L. Franco.** 2001. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama* **286**:3106-14.
239. **Schmidt, M., W. Kedzia, and A. Gozdziacka-Jozefiak.** 2001. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol* **23**:65-77.
240. **Schmitt, M., B. Dondog, T. Waterboer, and M. Pawlita.** 2008. Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by Novel Broad Spectrum BSGP5+/6+ PCR. *J Clin Microbiol* **46**:1050-59.
241. **Shafti-Keramat, S., A. Handisurya, E. Kriehuber, G. Meneguzzi, K. Slupetzky, and R. Kirnbauer.** 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* **77**:13125-35.
242. **Sherman, M. E., A. T. Lorincz, D. R. Scott, S. Wacholder, P. E. Castle, A. G. Glass, I. Mielzynska-Lohnas, B. B. Rush, and M. Schiffman.** 2003. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* **95**:46-52.
243. **Sibbet, G., C. Romero-Graillet, G. Meneguzzi, and M. S. Campo.** 2000. alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J Gen Virol* **81**:327-34.
244. **Sichero, L., E. L. Franco, and L. L. Villa.** 2005. Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis* **191**:739-42.
245. **Sirera, G., S. Videla, R. Lopez-Blazquez, M. Llatjos, A. Tarrats, E. Castella, N. Grane, C. Alcalde, C. Tural, C. Rey-Joly, and B. Clotet.** 2007. Evolution of cervical cytologic changes

- among HIV-infected women with normal cytology in the HAART era. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**:965-71.
246. **Sirera, G., S. Videla, R. Lopez-Blazquez, M. Llatjos, A. Tarrats, E. Castella, N. Grane, C. Tural, C. Rey-Joly, and B. Clotet.** 2008. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cervical squamous intraepithelial lesions among HIV-infected women with normal cytology and CD4 counts above 350 cells/mm³. *J Antimicrob Chemother* **61**:191-4.
247. **Smith, J. S., R. Herrero, C. Bosetti, N. Munoz, F. X. Bosch, J. Eluf-Neto, X. Castellsague, C. J. Meijer, A. J. Van den Brule, S. Franceschi, and R. Ashley.** 2002. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**:1604-13.
248. **Smith, J. S., L. Lindsay, B. Hoots, J. Keys, S. Franceschi, R. Winer, and G. M. Clifford.** 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* **121**:621-32.
249. **Snijders, P. J., A. J. van den Brule, H. F. Schrijnemakers, G. Snow, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers.** 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* **71 (Pt 1)**:173-81.
250. **Song, Y. S., S. H. Kee, J. W. Kim, N. H. Park, S. B. Kang, W. H. Chang, and H. P. Lee.** 1997. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol* **66**:275-81.
251. **Sousa, H., A. M. Santos, D. Pinto, and R. Medeiros.** 2007. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med* **20**:731-41.
252. **Srodon, M., M. H. Stoler, G. B. Baber, and R. J. Kurman.** 2006. The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN and VaIN). *Am J Surg Pathol* **30**:1513-8.
253. **Stanley, M.** 2003. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections--current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr*:117-24.
254. **Stehle, T., Y. Yan, T. L. Benjamin, and S. C. Harrison.** 1994. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**:160-3.
255. **Stephen, A. L., C. H. Thompson, M. H. Tattersall, Y. E. Cossart, and B. R. Rose.** 2000. Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV 16 cervical cancer isolates from central China. *Int J Cancer* **86**:695-701.
256. **Sterling, J. C.** 2005. Human papillomaviruses and skin cancer. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**:S67-71.
257. **Stern, R. S.** 1999. The mysteries of geographic variability in nonmelanoma skin cancer incidence. *Arch Dermatol* **135**:843-4.
258. **Stewart, A. C., A. M. Eriksson, M. M. Manos, N. Munoz, F. X. Bosch, J. Peto, and C. M. Wheeler.** 1996. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* **70**:3127-36.
259. **Strickler, H. D., R. D. Burk, M. Fazzari, K. Anastos, H. Minkoff, L. S. Massad, C. Hall, M. Bacon, A. M. Levine, D. H. Watts, M. J. Silverberg, X. Xue, N. F. Schlecht, S. Melnick, and J. M. Palefsky.** 2005. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst* **97**:577-86.
260. **Syrjanen, K., M. Hakama, S. Saarikoski, M. Vayrynen, M. Yliskoski, S. Syrjanen, V. Kataja, and O. Castren.** 1990. Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm Dis* **17**:15-9.
261. **Tachezy, R., T. Jirasek, M. Salakova, V. Ludvikova, M. Kubecova, L. Horak, V. Mandys, and E. Hamsikova.** 2007. Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology. *Apmis* **115**:195-203.
262. **Touze, A., S. El Mehdaoui, P. Y. Sizaret, C. Mougin, N. Munoz, and P. Coursaget.** 1998. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol* **36**:2046-51.
263. **Uronis, H. E., and J. C. Bendell.** 2007. Anal cancer: an overview. *Oncologist* **12**:524-34.
264. **van Duin, M., P. J. Snijders, M. T. Vossen, E. Klaassen, F. Voorhorst, R. H. Verheijen, T. J. Helmerhorst, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers.** 2000. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* **81**:317-25.

265. **Van Ranst, M., J. B. Kaplan, and R. D. Burk.** 1992. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* **73 (Pt 10)**:2653-60.
266. **Veress, G., K. Szarka, X. P. Dong, L. Gergely, and H. Pfister.** 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **80 (Pt 4)**:1035-43.
267. **Vernon, S. D., C. E. Hart, W. C. Reeves, and J. P. Icenogle.** 1993. The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus 16 transcription. *Virus Res* **27**:133-45.
268. **Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, J. Paavonen, O. E. Iversen, S. E. Olsson, J. Hoye, M. Steinwall, G. Riis-Johannessen, A. Andersson-Ellstrom, K. Elfgrén, G. Krogh, M. Lehtinen, C. Malm, G. M. Tamms, K. Giacoletti, L. Lupinacci, R. Railkar, F. J. Taddeo, J. Bryan, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah, and E. Barr.** 2006. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* **95**:1459-66.
269. **Villa, L. L., L. Sichero, P. Rahal, O. Caballero, A. Ferenczy, T. Rohan, and E. L. Franco.** 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* **81**:2959-68.
270. **Viviano, E., L. Giovannelli, E. Martorana, M. C. Migliore, V. Caputo, and N. Romano.** 2007. Human papillomavirus is commonly present in psoriatic skin and normal skin samples from healthy subjects. *J Dermatol Sci* **45**:141-3.
271. **Wang, S. S., C. M. Wheeler, A. Hildesheim, M. Schiffman, R. Herrero, M. C. Bratti, M. E. Sherman, M. Alfaro, M. L. Hutchinson, J. Morales, A. Lorincz, R. D. Burk, M. Carrington, H. A. Erlich, and R. J. Apple.** 2001. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: results from a population-based study in Costa Rica. *J Infect Dis* **184**:1310-4.
272. **Wang, X. M., J. C. Cook, J. C. Lee, K. U. Jansen, N. D. Christensen, S. W. Ludmerer, and W. L. McClements.** 2003. Human papillomavirus type 6 virus-like particles present overlapping yet distinct conformational epitopes. *J Gen Virol* **84**:1493-7.
273. **Weissenborn, S. J., R. Hopfl, F. Weber, H. Smola, H. J. Pfister, and P. G. Fuchs.** 1999. High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA. *J Invest Dermatol* **113**:122-6.
274. **Wheeler, C. M., T. Yamada, A. Hildesheim, and S. A. Jenison.** 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* **35**:11-9.
275. **Wiley, D., and E. Masongsong.** 2006. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv* **61**:S3-14.
276. **Wu, Y., Y. Chen, L. Li, G. Yu, Y. He, and Y. Zhang.** 2006. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol* **87**:1181-8.
277. **Wu, Y., Y. Chen, L. Li, G. Yu, Y. Zhang, and Y. He.** 2006. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol* **35**:264-9.
278. **Wu, Y., B. Liu, W. Lin, Y. Xu, L. Li, Y. Zhang, S. Chen, Z. Lin, and A. Xu.** 2007. Human leukocyte antigen class II alleles and risk of cervical cancer in China. *Hum Immunol* **68**:192-200.
279. **Xi, L. F., G. W. Demers, L. A. Koutsky, N. B. Kiviat, J. Kuypers, D. H. Watts, K. K. Holmes, and D. A. Galloway.** 1995. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *J Infect Dis* **172**:747-55.
280. **Xi, L. F., L. A. Koutsky, D. A. Galloway, J. Kuypers, J. P. Hughes, C. M. Wheeler, K. K. Holmes, and N. B. Kiviat.** 1997. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**:796-802.
281. **Yamada, T., M. M. Manos, J. Peto, C. E. Greer, N. Munoz, F. X. Bosch, and C. M. Wheeler.** 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* **71**:2463-72.
282. **Yamada, T., C. M. Wheeler, A. L. Halpern, A. C. Stewart, A. Hildesheim, and S. A. Jenison.** 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* **69**:7743-53.
283. **Yang, B. H., F. I. Bray, D. M. Parkin, J. W. Sellors, and Z. F. Zhang.** 2004. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost. *Int J Cancer* **109**:418-24.

284. **Yang, R., C. M. Wheeler, X. Chen, S. Uematsu, K. Takeda, S. Akira, D. V. Pastrana, R. P. Viscidi, and R. B. Roden.** 2005. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol* **79**:6741-50.
285. **Yeh, S. H., and J. M. Lieberman.** 2007. Update on adolescent immunization: pertussis, meningococcus, HPV, and the future. *Cleve Clin J Med* **74**:714-6, 719-27.
286. **Yu, T., M. J. Ferber, T. H. Cheung, T. K. Chung, Y. F. Wong, and D. I. Smith.** 2005. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **158**:27-34.
287. **Zehbe, I., R. Tachezy, J. Mytilineos, G. Voglino, I. Mikyskova, H. Delius, A. Marongiu, L. Gissmann, E. Wilander, and M. Tommasino.** 2001. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer* **94**:711-6.
288. **Zehbe, I., E. Wilander, H. Delius, and M. Tommasino.** 1998. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* **58**:829-33.
289. **Zeitels, S. M., L. M. Akst, J. A. Burns, R. E. Hillman, M. S. Broadhurst, and R. R. Anderson.** 2006. Office-based 532-nm pulsed KTP laser treatment of glottal papillomatosis and dysplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **115**:679-85.
290. **Zheng, Z. M., and C. C. Baker.** 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* **11**:2286-302.
291. **Zoodma, M., I. M. Nolte, M. Schipper, E. Oosterom, G. van der Steege, E. G. de Vries, G. J. Te Meerman, and A. G. van der Zee.** 2005. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer* **15 Suppl 3**:282-90.
292. **zur Hausen, H.** 1976. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **36**:794.
293. **zur Hausen, H.** 1996. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* **122**:3-13.
294. **zur Hausen, H., W. Meinhof, W. Scheiber, and G. W. Bornkamm.** 1974. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* **13**:650-6.