

Université de Montréal

Charge virale intégrée du papillomavirus de type 16 dans la maladie anale préinvasive

Par

Jennifer Élisabeth Alvarez Orellana

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

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

Août, 2010

©, Jennifer Élisabeth Alvarez Orellana, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Charge virale intégrée du papillomavirus de type 16 dans la maladie anale préinvasive

présenté par :

Jennifer Élisabeth Alvarez Orellana

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Annie-Claude Labbé
(président-rapporteur)

François Coutlée
(directeur de recherche)

Hugo Soudeyns
(membre du jury)

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

L'histoire naturelle de l'infection anale par le virus du papillome de type 16 (VPH-16) est mal définie pour les hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HARSAHs) VIH-séropositifs. Le but de cette étude était d'évaluer l'association entre la charge épisomale et intégrée du VPH-16 et la progression de la néoplasie intraépithéliale anale (AIN). Les charges épisomales et intégrées du VPH-16 furent mesurées par PCR quantitatif en temps réel sur 665 spécimens anaux obtenus de 135 hommes VPH-16-positifs participant à l'étude prospective HIPVIRG (*Human Immunodeficiency and Papilloma Virus Research Group*). Le grade de l'AIN fut déterminé sur des biopsies obtenues lors des anuscopies à haute résolution périodiques. L'intégration du VPH-16 fut confirmée par DIPS-PCR pour démontrer la présence de jonctions virales-cellulaires. La charge épisomale du VPH-16 [ratio de cote (OR) 1.5, intervalle de confiance (IC) à 95%=1.1–2.1], le nombre de types de VPH [OR 1.4 (IC 95%=1.1–1.8)] et le tabagisme actuel [OR 4.8 (IC 95%=1.3–18.6)], mais non la charge intégrée, furent associés aux lésions de haut-grade (AIN-2,3) après ajustement pour l'âge et le décompte des lymphocytes CD4. La charge épisomale du VPH-16 était le seul facteur prédictif de progression de l'AIN de bas-grade (AIN-1) vers l'AIN-2,3 [OR 8.0 (IC 95%=1.2–55.4)]. Les spécimens avec une charge épisomale du VPH-16 élevée étaient moins susceptibles de contenir de l'intégration [OR 0.5 (IC 95%=0.3–0.8)]. L'intégration du VPH-16 fut détectée en absence d'AIN, dans l'AIN-1 et dans l'AIN-2,3. L'analyse des jonctions virales-cellulaires ne permit pas d'identifier un site d'intégration spécifique.

Mots clés: VPH-16, histoire naturelle, charge virale, AIN, intégration, HARSAHs, TAR.

ABSTRACT AND KEYWORDS

The natural history of human papillomavirus type 16 (HPV-16) anal infection is undefined among HIV-seropositive men having sex with men (MSM). The aim of this study was to assess the association between HPV-16 episomal and integrated viral loads and the progression of anal intraepithelial neoplasia (AIN). HPV-16 episomal and integrated loads were measured on 665 specimens from 135 HPV-16-positive men participating in the prospective HIVIRG (*Human Immunodeficiency and Papilloma Virus Research Group*) study. AIN grade was evaluated on biopsies obtained during periodical high-resolution anoscopies. HPV-16 integration was confirmed by DIPS-PCR to demonstrate the presence of viral-cellular junctions. HPV-16 episomal loads [odds ratio (OR) 1.5, 95% confidence interval (CI)=1.1–2.1], burden of HPV infection [OR 1.4 (95% CI=1.1–1.8)] and current smoking [4.8 (95% CI=1.3–18.6)], but not integrated loads, were associated with high-grade lesions (AIN-2,3) after age and CD4 counts adjustment. A high HPV-16 episomal load was the only predictive factor of progression from low-grade AIN to high-grade AIN [OR 8.0 (95% CI=1.2–55.4)]. Specimens with higher HPV-16 episomal loads were less likely to contain integration [OR 0.5 (95% CI=0.3–0.8)]. HPV-16 integration was detected in the absence of AIN, in AIN-1 and in AIN-2,3. The analysis of the viral-cellular junctions did not allow identifying a specific site of integration.

Keywords: HPV-16, natural history, viral load, AIN, integration, MSM, HAART.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	VII
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	IX
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	XI
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	XII
CHAPITRE PREMIER : REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES PAPILLOMAVIRUS	4
<i>1.1.1. Classification</i>	4
<i>1.1.2. Biologie moléculaire des papillomavirus</i>	7
1.1.2.1. Capside et organisation génomique.....	7
1.1.2.2. Fonctions des cadres de lecture et des protéines.....	11
1.1.2.4. Régulation de l'expression des gènes.....	18
1.2. ÉPIDÉMIOLOGIE DE L'INFECTION AU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN	20
<i>1.2.1. Infection du col de l'utérus et cancer du col utérin</i>	21
<i>1.2.2. Infection de l'anus et cancer anal</i>	22
1.2.2.1. Infection chez l'homosexuel mâle.....	23
1.2.2.2. Infection chez l'homosexuel mâle infecté au virus de l'immunodéficience humain.....	24
1.3. INFECTION AU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN ET CARCINOGENÈSE	25
<i>1.3.1. Pathologie</i>	25
<i>1.3.2. Pathogenèse</i>	28
<i>1.3.3. Histoire naturelle de l'infection au virus du papillome humain</i>	34
<i>1.3.4. Facteurs prédictifs de progression de l'infection anale</i>	36

1.3.4.1. Facteurs viraux.....	37
1.3.4.2. Facteurs de l'hôte.....	40
1.3.4.1. Facteurs environnementaux.....	42
CHAPITRE DEUXIÈME : PROJET DE RECHERCHE	43
2.1. PROBLÉMATIQUE.....	45
2.2. PRÉSENTATION DES HYPOTHÈSES ET DES OBJECTIFS.....	47
2.3. MÉTHODOLOGIE.....	48
2.3.1. PCR en temps réel.....	48
2.3.2. DIPS-PCR.....	49
CHAPITRE TROISIÈME : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	51
3.1. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE.....	53
3.2. EPISOMAL AND INTEGRATED HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 LOADS DURING THE COURSE OF ANAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA IN MEN INFECTED WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS.....	54
CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION ET CONCLUSION	78
4.1. DISCUSSION.....	79
4.1.1. Facteurs de risque de l'AIN.....	79
4.1.2. Facteurs de risque pour la progression vers l'AIN-2,3.....	84
4.1.3. Formes intégrées du VPH-16.....	85
4.1.4. Confirmation de l'intégration du VPH-16 par DIPS-PCR.....	88
4.1.5. Histoire naturelle de l'infection au VPH-16.....	91
4.2. CONCLUSION.....	95
LISTE DE LA LITTÉRATURE CITÉE	97

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Tableau I

Classification des virus du papillome humain selon leur potentiel oncogénique et leurs manifestations cliniques. (D'après de Villiers et al. (2004) et Secondy, M. (2008).)

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Tableau I

Characteristics of 135 HIV-seropositive men infected by HPV-16.

Tableau II

Risk factors for the presence of AIN2-3 on the first visit with complete data.

Tableau III

Risk factors for the presence of AIN-1 on the first visit with complete data.

Tableau IV

DIPS-PCR analysis of 18 specimens with confirmed integration status from 10 HIV- and HPV-16-positive men.

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1

Arbre phylogénétique de 118 papillomavirus. D'après de Villiers et al. (2004).

Figure 2

Modélisation de la capside du virus du papillome bovin de type 1. D'après Schiller et al. (2004).

Figure 3

Modèle de l'interaction intermoléculaire entre les pentamères. D'après Modis et al. (2002).

Figure 4

Organisation génomique du virus du papillome humain de type 16 et fonctions principales des cadres de lecture. D'après un auteur inconnu (2005).

Figure 5

Rôle de l'oncoprotéine E6 dans le cycle cellulaire. D'après Delloye et al. (2006).

Figure 6

Rôle de l'oncoprotéine E7 dans le cycle cellulaire. D'après Delloye et al. (2006).

Figure 7

Cycle de réplication du virus du papillome humain et différenciation cellulaire. D'Après Frazer et al. (2004).

Figure 8

Structure de la région régulatrice (*long control region*) du virus du papillome humain de type 16. D'Après Hedge, R.S (2002).

Figure 9

Progression de l'infection au virus du papillome humain. D'après Woodman et al. (2007).

Figure 10

Processus de carcinogenèse lors de l'infection au virus du papillome humain oncogénique.
D'après Delloye et al. (2007).

Figure 11

Intégration du virus du papillome humain. D'après zur Hausen, H. (2002).

Figure 12

Modèle théorique de l'histoire naturelle de l'infection au virus du papillome de type 16
chez des homosexuels mâles VIH-séropositifs dans le cadre de la TAR.

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 1

HPV-16 episomal and integrated loads and grade of AIN on first visit.

1a) HPV-16 episomal load and AIN.

1b) HPV-16 integrated load and grade of AIN on first visit.

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

(par ordre alphabétique)

Å: angstrom (unité de mesure)

ADN : acide désoxyribonucléique

AF1 : africain-1

AF2 : africain-2

AIN : de l'Anglais *anal intraepithelial neoplasia* ou néoplasie intraépithéliale anale

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

As : asiatique

AsAm : asiatique-américain

ASCUS : de l'Anglais *atypical squamous cells of undetermined significance* ou cellule squameuse atypique de signification indéterminée

ASIL : de l'Anglais *anal squamous intraepithelial lesion* ou lésion intraépithéliale squameuse anale

BPV-1 : virus du papillome bovin de type 1

Brd4 : de l'Anglais *bromodomain-containing protein 4*

CFS : de l'Anglais *common fragile site* ou site fragile commun

CI: de l'Anglais *confidence interval* ou intervalle de confiance

CIN : de l'Anglais *cervical intraepithelial neoplasia* ou néoplasie intraépithéliale du col utérin

CIS : carcinome *in situ*

CMI : de l'Anglais *cell-mediated immunity* ou immunité à médiation cellulaire

Ct: de l'Anglais *cycle threshold* ou cycle-seuil

CTL : de l'Anglais *cytotoxic T lymphocyte* ou lymphocyte T cytotoxique

DIPS-PCR: de l'Anglais *detection of integrated papillomavirus sequences polymerase chain reaction*

E: européen

EGF: de l'Anglais *epidermal growth factor*

E2-BS: de l'Anglais *E2-binding site*

E6AP: de l'Anglais *E6-associated protein*

HAART: de l'Anglais *highly active antiretroviral therapy*

HARSAH: homme ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes

HIPVIRG: *Human Immunodeficiency and Papilloma Virus Research Group*

HLA: de l'Anglais *human leucocyte antigen* ou antigène des leucocytes humains

HSIL: de l'Anglais *high-grade squamous intraepithelial lesion* ou lésion intraépithéliale squameuse de haut-grade

hTERT: de l'Anglais *human telomerase reverse transcriptase*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IC: intervalle de confiance

kb: kilobase

kDa: kilodalton

LCR: de l'Anglais *long control region*

LSIL: de l'Anglais *low-grade squamous intraepithelial lesion* ou lésion intraépithéliale squameuse de bas-grade

MSM: de l'Anglais *men having sex with men*

nm: nanomètre

nt: nucléotide

OR: l'Anglais *odds ratio* ou ratio de cote

ORF : de l'Anglais *open reading frame* ou cadre de lecture

ORI : origine de réplication

PCR : de l'Anglais *polymerase chain reaction* ou réaction de polymérase en chaîne

PDG: de l'Anglais *platelet-derived growth factor*

pRb: protéine du rétinoblastome

PV: papillomavirus

RR: risque relatif

SIL: de l'Anglais *squamous intraepithelial lesion* ou lésion intraépithéliale squameuse

TAR : thérapie antirétrovirale

URR: de l'Anglais *upstream regulatory region*

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

VPH : virus du papillome humain

VPH-HR : virus du papillome humain à haut-risque

VPH-LR : virus du papillome humain à faible risque

VPH-16 : virus du papillome humain de type 16

Je dédie ce mémoire à mes parents en témoignage de mon éternelle gratitude et reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont faits et à ma sœur et à mon frère, en leur souhaitant tout le succès dans leur vie.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, Dr François Coutlée, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour le temps qu'il m'a consacré et ce, malgré son emploi du temps chargé.

L'accomplissement de ce projet n'aurait pas été possible sans l'aide des assistants de recherche, Pierre Forest et Véronique Legault. Une pensée particulière est adressée à Hélène Voyer pour m'avoir assisté au début de ce projet.

Enfin, j'exprime ma gratitude à tous mes proches et amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

CHAPITRE PREMIER : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Nos connaissances actuelles sur le rôle du le virus du papillome humain (VPH) dans l'induction du cancer anogénital, principalement du cancer du col de l'utérus, sont le fruit des nombreuses recherches effectuées ce dernier siècle.

Rapidement, les scientifiques se sont interrogés sur la nature du cancer du col utérin, l'incidence de ce cancer étant particulièrement élevée chez les femmes sexuellement actives, mais faible chez les vierges et les religieuses (1). Conséquemment, les médecins postulèrent que ce cancer devait nécessairement être relié aux relations sexuelles. À la même époque, la nature infectieuse des verrues communes (*Verruca vulgaris*) fut démontrée et l'agent viral extrait de ces lésions fut par la suite associé aux verrues génitales et laryngées (1,2). Plus tard, des chercheurs isolèrent le virus responsable des papillomes chez le lapin sauvage et domestique et purent démontrer son potentiel oncogénique (3,4).

Vers la moitié du 20^e siècle, le test Pap fut introduit comme procédure de dépistage des anomalies, notamment pour la détection de la koïlocytose (irrégularité du noyau et clarification du cytoplasme) dans les cellules épithéliales du col (5). Bien que la koïlocytose ne fût initialement observée que dans les verrues, cette anomalie a pu être détectée dans certains frottis et biopsies du col utérin. Il fut également constaté que certaines des patientes qui arboraient ces anomalies cellulaires développaient des carcinomes *in situ*. Les médecins déduisirent donc que la koïlocytose était possiblement un précurseur du cancer utérin et que sa détection dans les frottis du col utérin pourrait servir d'outil de prévention. À présent, l'utilisation du test Pap comme stratégie de dépistage de ces anomalies cellulaires est très répandue, résultant en une nette diminution du nombre de cancer du col de l'utérus dans les pays développés (6).

Plusieurs tentatives furent effectuées pour associer le cancer du col de l'utérus avec un agent transmissible sexuellement. Divers candidats furent avancés comme étant impliqués dans la causalité de ce cancer, notamment le virus de l'herpès simplex de type 2 et le tréponème responsable de la syphilis, mais ces associations ne furent pas confirmées (2). Dans une tentative d'isoler l'ADN viral de condylomes et de tumeurs, Dr Harald zur Hausen démontra la pluralité des PVs et émit l'hypothèse que les VPHs responsable des verrues pouvaient aussi être impliqués dans certains cancers (7).

Plus tard, le VPH de type 6 isolé d'un condylome fut caractérisé, suivi des types 16 et 18, isolés cette fois-ci de cancers du col utérin (8-10). Des recherches poussées sur la pathogenèse du VPH-16 démontrèrent les rôles des oncoprotéines E6 et E7 dans la carcinogenèse, et l'association du VPH-16 avec le cancer du col de l'utérus fut alors confirmée (11-13). Aujourd'hui, il est bien connu que plusieurs types de VPH peuvent induire le développement de cancer et, pour réduire l'incidence du cancer du col utérin, deux vaccins furent développés pour prévenir l'infection aux VPHs oncogéniques, dont le VPH-16. La vaccination globale des jeunes filles avant leur première exposition aux VPHs (donc, avant le début des activités sexuelles) les immuniserait contre ces types. Le risque de développer un CIN ou un cancer relié à une infection par ces types de VPH sera significativement plus faible (14).

Le VPH-16, parmi d'autres types, fut également détecté dans d'autres cancers anogénitaux, notamment le cancer de l'anus (15,16). L'association entre l'infection aux VPHs de type oncogénique et le développement du cancer anal fut démontrée (17). Actuellement, l'incidence du cancer de l'anus est en hausse au Québec, particulièrement chez les hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (HARSAHs) de la région montréalaise (18). Contrairement au cancer du col de l'utérus, il n'existe aucun programme systématique pour le dépistage des AIN qui seraient les précurseurs du cancer anal. Même si les hommes peuvent être également infectés par les types oncogéniques, le vaccin n'est systématiquement pas administré à ces derniers, bien que le vaccin Gardasil (Merck Frosst) soit homologué pour la vaccination des garçons et des jeunes hommes âgés de 9 à 26 ans (19). Pourtant, l'implantation de lignes directrices pour la détection des AIN à risque de progression et la vaccination systématique des jeunes garçons pourraient réduire le nombre de cas de cancer de l'anus tel qu'observé pour le cancer du col utérin (20). Malheureusement, l'histoire naturelle de l'infection au VPH dans le canal anal est mal connue et le perfectionnement de nos connaissances à ce sujet sera nécessaire avant que nous soyons en mesure d'établir un programme de dépistage.

Les prochaines sections de ce chapitre porteront sur nos connaissances actuelles sur les PVs, principalement sur le VPH et sur notre compréhension du rôle des VPHs dans la carcinogenèse.

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES PAPILOMAVIRUS

Les PVs forment un groupe hétérogène qui se traduit par la complexité de la classification taxonomique. Par contre, d'un point de vue de la biologie moléculaire, les PVs sont assez similaires à plusieurs niveaux, notamment pour la structure de la capsid, l'organisation génomique et le cycle de réplication.

La première section de ce chapitre porte sur la classification des PVs et les éléments de la biologie moléculaire qui peuvent être généralisés à tous les PVs. Quelques précisions seront ajoutées pour certains types de PV tels que les VPHs oncogéniques.

1.1.1. Classification

Les PVs regroupent une multitude de virus capable d'infecter un large spectre d'hôtes, dont l'être humain. À ce jour, quelques 100 types de VPH parmi les centaines de PVs détectés ont été décrits et séquencés (21). L'arbre phylogénétique des PVs est présenté en figure 1 (page 5).

Traditionnellement, les PVs furent classés dans la même famille que les polyomavirus, les *Papovaviridae*, d'après la similitude de leur structure capsidique et génomique (22). Néanmoins, les études approfondies de leur génome respectif confirmèrent les divergences au niveau de la taille, de l'organisation génomique et de la séquence nucléotidique. Dès lors, les polyomavirus et les PVs furent classés en deux familles distinctes : les *Polyomaviridae* et les *Papillomaviridae* (21).

La taxonomie actuelle des PVs est basée sur la comparaison de la séquence de l'ADN du cadre de lecture L1 (ORF L1) qui est le gène le plus conservé parmi les PVs. Par conséquent, le séquençage de l'ORF L1 est utilisé pour l'identification de nouveaux types de PVs (21). Ainsi, un nouveau type est établi lorsque la séquence de l'ORF L1 entre le type candidat et de tous les types connus diffère de plus de 10%. Des nouveaux sous-types

et variantes sont décrits quand cette homologie diffère de 2 à 10% et de moins de 2%, respectivement.

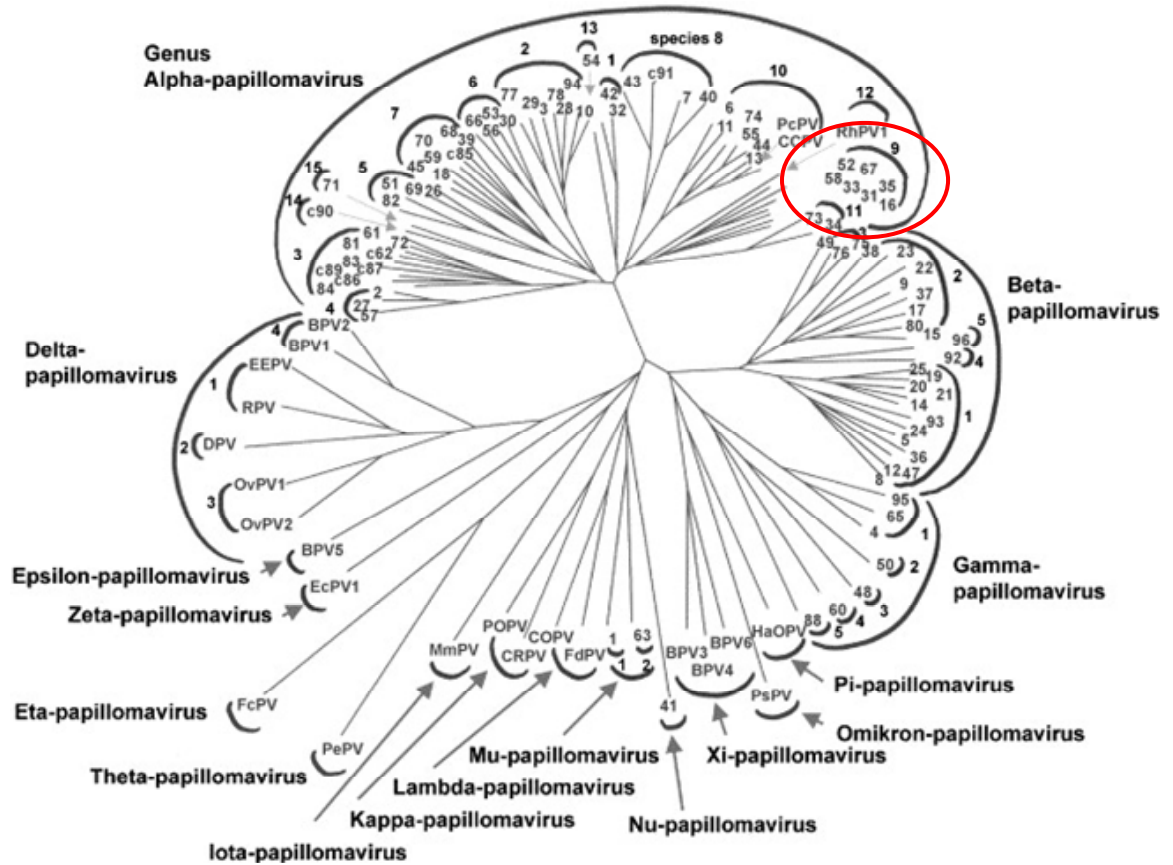


Figure 1. Arbre phylogénétique de 118 papillomavirus. L'arbre phylogénétique fut obtenu suite au séquençage du cadre de lecture L1. Encerclée en rouge: espèce 9 caractérisée par le type de référence VPH-16, genre alpha-papillomavirus. VPH-16, virus du papillome humain de type 16. D'après de Villiers et al. (2004) (21).

Les variantes du VPH-16 furent minutieusement étudiées et mises en évidence pour différents groupes ethniques, donnant lieu à des épellations de variante européenne, africaine-1, africaine-2, asiatique et asiatique-américaine (23). Étant donné la grande multiplicité des PVs, les types furent regroupés en différentes espèces selon l'homologie de

l'ORF L1 afin d'uniformiser la classification des PVs avec la systématique phylogénétique usuelle. Des types sont regroupés en une espèce s'ils partagent plus de 60% d'homologie au niveau du gène L1. Une espèce est caractérisée par le type principal et est désignée par un numéro (24). Ainsi, les VPHs de type 16, 31, 33, 35, 52, 58 et 67 appartiennent à l'espèce 9 dont le type principal est le VPH-16. Les différentes espèces sont à leur tour réparties dans 5 genres : alpha, beta, gamma, mu et nu-papillomavirus.

D'autres classifications des PVs humains sont couramment utilisées dans la littérature. Ainsi, les VPHs peuvent être différenciés selon leur tropisme ou leur capacité de transformation (24). Tout d'abord, le tropisme particulier des VPHs leur permet d'infecter différents épithéliums que ce soit de la peau (tropisme cutanée) ou des muqueuses (tropisme muqueux) (22). Les VPHs à tropisme muqueux peuvent entre autres infecter les muqueuses anogénitales et les muqueuses oropharyngées. Habituellement, les VPHs présentent un tropisme unique, mais certains types, tel que le VPH-57, peuvent infecter tant la peau que les muqueuses (25). Cependant, la classification la plus importante d'un point de vue clinique est certainement basée sur le potentiel oncogénique des VPHs. De nombreuses études ont démontré que certains types de VPH sont fortement associés au cancer invasif du col de l'utérus (13), tandis que d'autres sont associés aux lésions non-cancéreuses (26-28).

Ces VPHs dont le tropisme est typiquement muqueux peuvent être classés en deux groupes distincts dépendant de leur capacité à induire le cancer : les VPH-HR et les VPH-LR. Le tableau I (page 7) résume les principales caractéristiques des VPHs selon le groupe auquel ils appartiennent.

Le premier groupe dit à haut-risque, ou encore les types oncogènes, comprend entre autres les types 16 et 18 (29). L'évidence de leur carcinogénicité a été révisée par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) lors de leur dernier entretien (17). Le deuxième groupe constitué des VPH-LR comprend notamment les types 6 et 11. Ils sont associés au développement de lésions bénignes telles que les verrues génitales et les papillomes (26). Tant les VPH-HR que les VPH-LR sont classés dans le genre alpha-papillomavirus (22).

Tableau I. Classification des virus du papillome humain selon leur potentiel oncogénique et leurs manifestations cliniques*.

Classification	Types	Manifestations cliniques
Haut-risque	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68,82.	Lésion muqueuse (orale ou anogénitale) bénigne ou maligne
Bas-risque	6,11,13,40,42,43,44,54,61,70,72,81,89.	Lésion muqueuse bénigne, lésion cutanée, condylome acuminé, papillomatose laryngée

* D'après de Villiers et al. (2004), Secordy, M. (2008) et Munoz et al. (2003) (21,24,30).

1.1.2. Biologie moléculaire des papillomavirus

Les premières études sur la biologie des PVs portèrent sur le virus du papillome bovin de type 1 (BPV-1), qui servit comme type de référence pour la caractérisation de la capsid, du génome et de la réplication virale pour l'ensemble des PVs. En général, ces éléments diffèrent peu entre les divers types et espèces (31,32).

1.1.2.1. Capsid et organisation génomique

Les PVs sont des virus non-enveloppés possédant une capsid icosaédrique (figure 2, page 8) dont le diamètre est évalué à 55 nm (600 Å) (32). Cette capsid est formée de 72 pentamères constitués de la protéine majeure L1 en association avec la protéine mineure L2 (33).

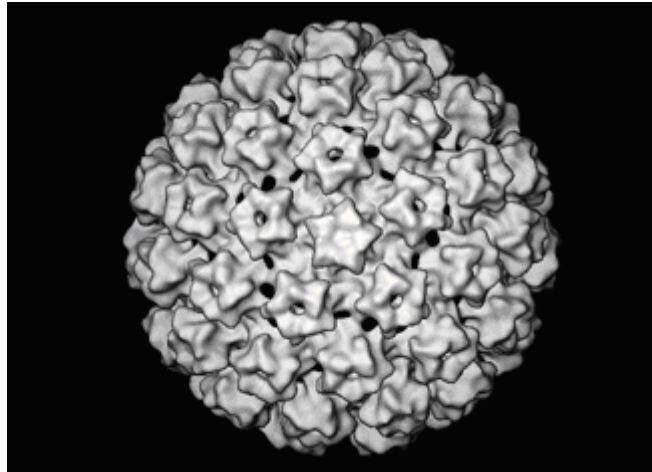


Figure 2. Modélisation de la capside du virus du papillome bovin de type 1.

La capside est formée de 72 pentamères de la protéine structurale majeure L1 en association avec la protéine structurale mineure L2. D'après Schiller et al. (2004) pour le *Center of Cancer Research* [<http://ccr.cancer.gov/staff/gallery.asp?profileid=5637>, page visitée le 29 mars 2010].

L'interaction intermoléculaire entre les pentamères se ferait via les ponts disulfures contenus dans l'extrémité C-terminale de L1. Cette extrémité s'étendrait jusqu'à la protéine adjacente selon le modèle du bras invasif, assurant ainsi la stabilité structurale de la capside tel que montré dans la figure 3 (page 9) (31).

Le génome d'ADN double-brin d'environ 7.9 kb est condensé dans la capside en minichromosome par des histones cellulaires encapsulées lors de l'assemblage (31). Le génome viral est normalement retrouvé sous la forme épisomale ou circulaire. Chez certains types de PVs, l'ADN peut subir une linéarisation lors de l'intégration dans le génome de l'hôte, ce qui engendrerait certaines anomalies au sein de la cellule infectée, tel que discuté plus loin (34).

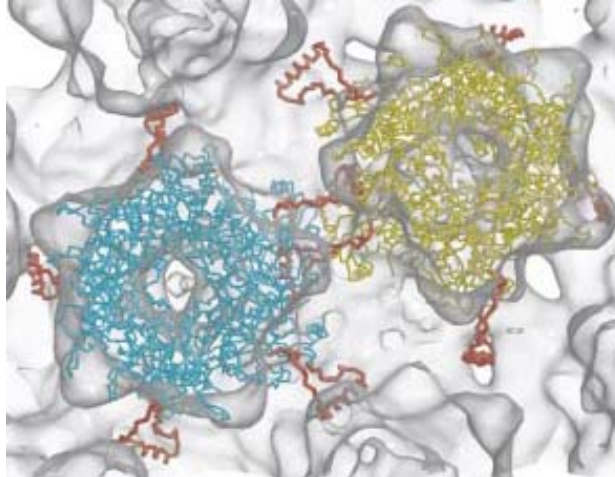


Figure 3. Modèle de l'interaction intermoléculaire entre les pentamères. Le bras C-terminal s'étend jusqu'à la sous-unité du pentamère adjacent. Chaque pentamère reçoit 5 bras C-terminals et en donne 5 aux pentamères qui l'entourent. En jaune et en bleu, pentamère de L1; en orange, C-terminal de la protéine L1. D'après Modis et al. (2002) (31).

Le génome viral est divisé en trois régions : la région précoce E (*early*), la région tardive L (*late*) et la région régulatrice LCR (*long control region*) ou URR (*upstream regulatory region*) (35). L'organisation génomique est présentée à la figure 4 (page 10). La région précoce porte une multitude de cadres de lecture (ORFs) qui codent pour les protéines E1, E2, E4 à E7. La région tardive code pour les protéines structurales L1 et L2. Le LCR est, quant à lui, une région non-codante constituée d'environ 800 paires de bases (36). Sa fonction est de réguler la réplication, la transcription, la ségrégation et l'assemblage des virions. L'URR est formé de l'origine de réplication virale (ORI) flanquée par des éléments en *cis* régulateurs tels que les sites de liaisons du facteur de transcription E2 (E2-BSs) et quelques promoteurs transcriptionnels (32,37). Les E2-BSs sont des séquences consensus palindromiques retrouvées en différents nombres selon le type de PVs. Le nombre de promoteurs varie également entre les PVs. Deux promoteurs ont été décrits pour le VPH-16: P97, le promoteur précoce situé en amont de l'ORF E6 et P670, le promoteur tardif situé à l'intérieur de l'ORF E7. P97 régule l'expression des gènes E1, E2, E6 et E7 dans les cellules basales non-différenciées, tandis que P670 induit l'expression des gènes L1 et L2 uniquement dans les kératinocytes différenciés (32,36).

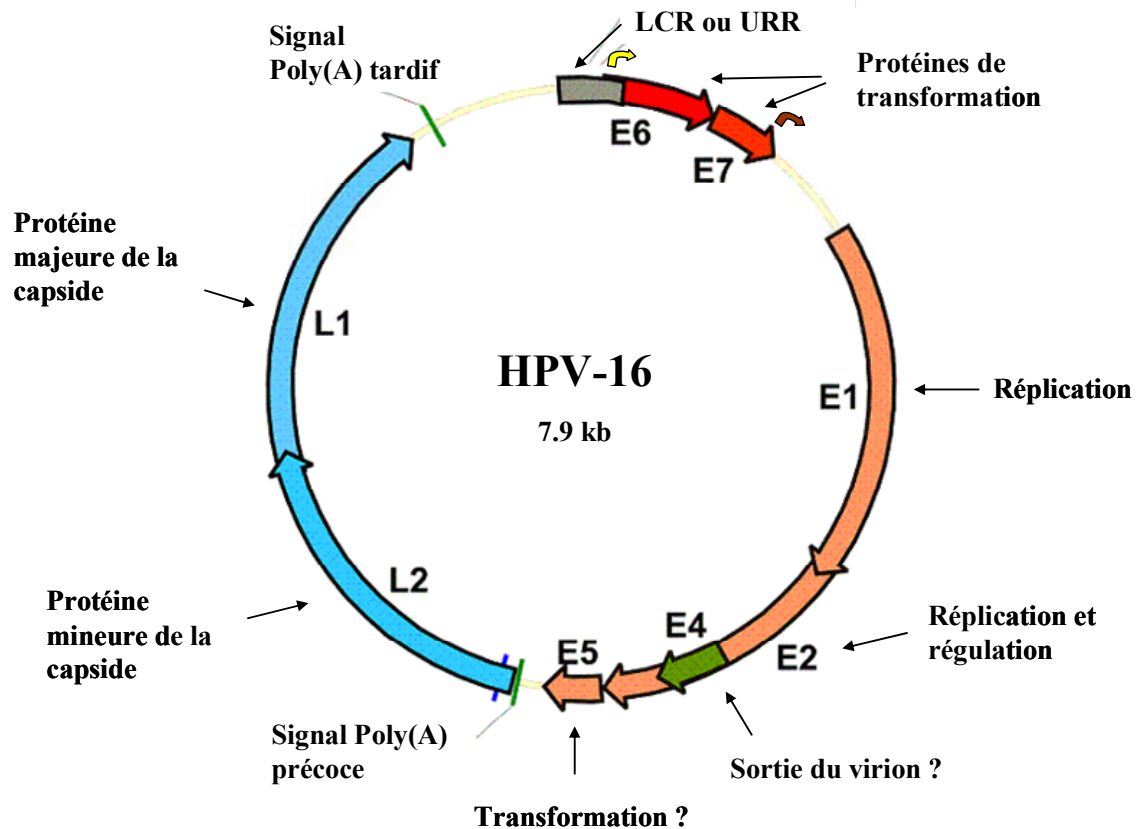


Figure 4. Organisation génomique du virus du papillome humain de type 16 et fonctions principales des cadres de lecture. Le génome est divisé en trois sections: 1) la région précoce contenant les gènes E6, E7, E1, E2, E4 et E5; 2) la région tardive contenant les gènes L1 et L2 et 3) la région régulatrice LCR (*long control region*). Les flèches en jaune et en brun correspondent, respectivement, au promoteur précoce P97 et au promoteur tardif P670. E, *early* ou précoce; L, *late* ou tardif. D'après un auteur inconnu (2005) [http://en.wikipedia.org/wiki/File:HPV-16_genome_organization.png, page visitée le 29 mars 2010].

1.1.2.2. Fonctions des cadres de lecture et des protéines

Les protéines les mieux connues codées par les ORFs des PVs sont E1, E2, E4 à E7, L1 et L2. Ces protéines jouent des rôles différents au cours de l'infection, que se soit au niveau du cycle de réplication du virus ou de la pathogenèse. Un seul des deux brins d'ADN sert de matrice pour la transcription (21).

Le cadre de lecture E1 (ORF E1) code pour une protéine dont le rôle est essentiel dans la réplication virale, particulièrement pour la réplication des épisomes. Il est par conséquent le plus large et un des mieux conservés parmi les PVs (38). La protéine produite, qui est une hélicase ADN-dépendante avec une fonction ATPase, initie la réplication virale en déroulant l'ADN viral suite à son assemblage en un complexe hexamérique. L'affinité de ce complexe pour l'origine de réplication est accrue quand il s'associe avec la protéine E2 (39).

La protéine codée par l'ORF E2 a un poids moléculaire d'environ 50 kDa et est active sous la forme dimérique (40). Elle est constituée de deux domaines séparés par une région charnière qui est variable selon les PVs. Le premier domaine contient le site d'attachement à l'ADN et le site de dimérisation. Ce domaine se situe dans la région C-terminale de la protéine (37). Le deuxième domaine localisé dans l'extrémité N-terminale, possède une fonction transactivatrice qui permet de réguler l'expression des gènes précoces et de moduler l'activité des promoteurs via les interactions avec les E2-BSs (36). L'effet de la protéine E2 sur la transcription varie selon l'épissage alternatif effectué sur son ARNm. En effet, plusieurs conformations de la protéine E2 du BPV-1, dont la taille et les fonctions diffèrent, peuvent être obtenues avec un seul transcrit (41). Ainsi, E2 peut agir comme activateur ou comme répresseur si la protéine traduite est complète ou tronquée. La perte de l'ORF E2 lors de l'intégration génomique entraîne la dérégulation de l'expression des gènes E6 et E7, qui sont alors surexprimés. La surexpression de ces oncogènes dans le cas des VPH-HR peut engendrer la transformation et la prolifération cellulaire (35).

Le cadre de lecture du gène E4, situé dans la région précoce, chevauche celui du gène E2. Puisque son expression est sous le contrôle du promoteur tardif, E4 est en prédominance exprimé durant la phase tardive de l'infection (40). La protéine semblerait

jouer un rôle dans la sortie du virion en déstabilisant le cytosquelette de kératine des cellules infectées (32).

Le gène E5 code pour une protéine de transformation pouvant stimuler la prolifération cellulaire. Les protéines E5 du BPV-1 et du VPH-16 interagiraient au niveau de certaines voies de signalisation en s'associant respectivement aux récepteurs de facteurs de croissance PDGF (facteur de croissance des plaquettes) et EGF (facteur de croissance épidermique). Toutefois, le rôle de cette protéine dans la carcinogenèse semble minime (40).

Les fonctions des protéines codées par les ORFs E6 (figure 5, page 13) et E7 (figure 6, page 14) sont les mieux caractérisées des VPHs. Les effets des protéines E6 et E7 sur les cellules infectées varient grandement entre les VPH-HR et les VPH-LR. Leur activité dépend du degré d'affinité avec leur cible respective; les protéines E6 et E7 des VPH-HR ayant une plus grande affinité que celles des VPH-LR pour leurs cibles cellulaires (42). L'expression de ces ORFs est régulée par la protéine E2.

La protéine monomérique E6 est constituée d'environ 150 acides aminés et contient deux motifs en doigt de zinc (43). Pour les VPHs de type oncogénique, elle altère plusieurs voies de signalisation cellulaire quand elle interagit avec les protéines cibles. Le partenaire premier de la protéine E6 est E6AP, une E3 ligase d'ubiquitine. Le complexe E6-E6AP inactive plusieurs protéines dont p53, une protéine suppressive de tumeur, en engendrant sa dégradation par les voies protéasomales après ubiquitination (44,45). Les fonctions de p53 sont multiples, mais elles conduisent principalement à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort programmée en réponse à un signal de stress (46). La protéine E6 active également la sous-unité de la télomérase hTERT (transcriptase inverse de la télomérase humaine), permettant de prolonger les extrémités télomériques des chromosomes cellulaires pour éventuellement empêcher la sénescence des cellules (35,43). D'autres fonctions sont attribuables à E6, dont l'induction d'anomalies chromosomiques et la perturbation de la polarité et de l'adhésion cellulaire (43).

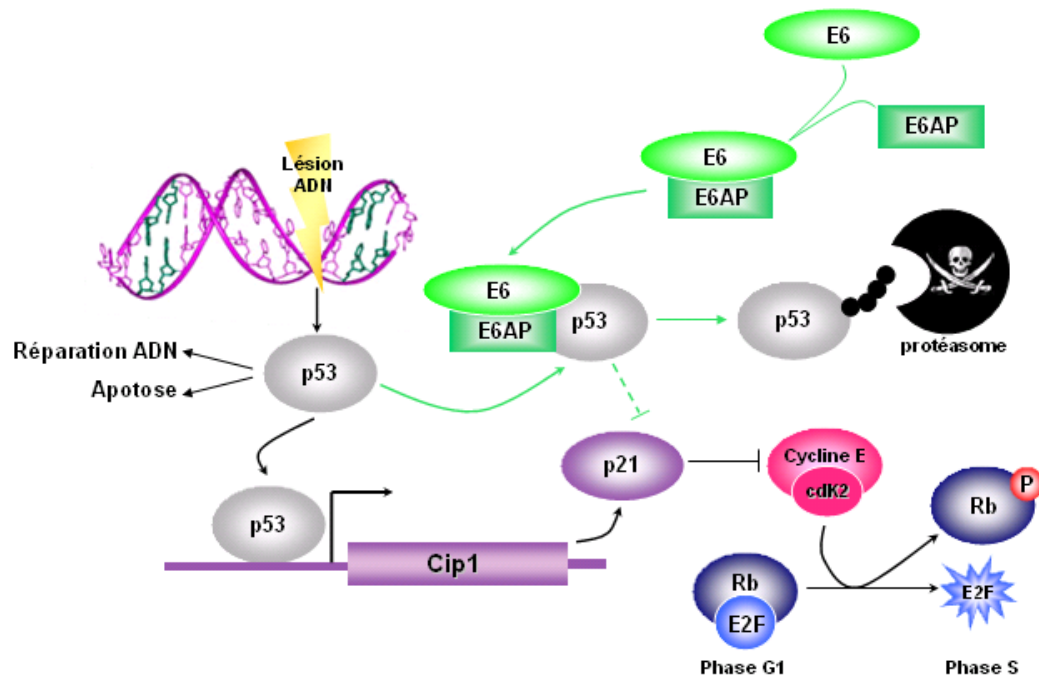


Figure 5. Rôle de l'oncoprotéine E6 dans le cycle cellulaire. La protéine E6 interagit avec la protéine E6AP qui est le partenaire habituel de la protéine suppressive tumorale p53. La protéine p53 est alors dégradée dans le protéasome et l'arrêt cellulaire ne se produit plus. D'après Delloye et al. (2006) pour l'École normale supérieure ENS de Lyon [http://dicos.enslyon.fr/vie/viro/XML/db/bio/viro/metadata/LOM_V05_3D1_Papilloma_Oncogenese_b.xml, page visitée le 29 mars 2010].

La protéine dimérique E7 est constituée d'environ une centaine d'acides aminés et contient un doigt de zinc requis pour son activité. Son poids moléculaire se situe entre 18 et 20 kDa (47). Tout comme la protéine E6 des VPHs à haut-risque, E7 possède un pouvoir oncogénique et joue un rôle dans le cycle de réplication virale et dans la transformation cellulaire. E7 interagit avec les protéines du rétinoblastome (pRbs), qui sont également des protéines suppressives tumorales (44). Les pRbs provoquent l'arrêt cellulaire en phase G₁ en inhibant la transcription des gènes requis pour la progression du cycle lorsqu'elles s'associent aux facteurs régulateurs de la prolifération cellulaire E2Fs (48). La protéine E7 induit la dégradation des pRbs via le protéasome, ce qui résulte en l'activation constitutive de la transcription par E2F et l'entrée des cellules en phase S.

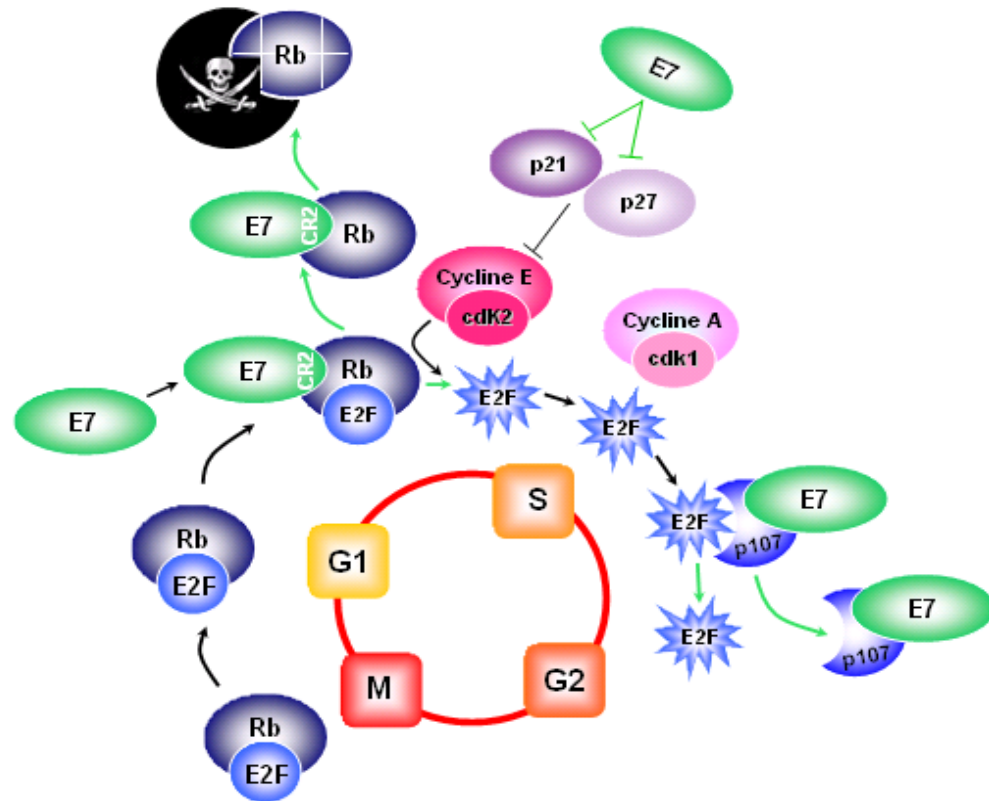


Figure 6. Rôle de l'oncoprotéine E7 dans le cycle cellulaire. La protéine E7 interagit avec la protéine pRb et induit sa dégradation dans le protéasome. Le facteur E2F est constitutivement actif, ce qui résulte en la progression des cellules vers la phase S du cycle cellulaire. D'après Delloye et al. (2006) pour l'École normale supérieure ENS de Lyon [http://dicos.enslyon.fr/vie/viro/XML/db/bio/viro/metadata/LOM_V05_3D1_Papilloma_Oncogenese.b.xml, page visitée le 29 mars 2010].

E7 agit aussi sur d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire telles que les kinases cycline-dépendantes (cdks) et les protéines p21 et p27 (35,40). La protéine E7, en association avec la protéine E6, induit également l'instabilité chromosomique en engendrant des mutations, des délétions et l'aneuploïdie (47).

D'autres cadres de lecture codant pour des protéines précoces tels que les ORFs E3 et E8 sont retrouvés pour quelques types de PVs comme BPV-1, mais leur présence et leur fonction pour les autres types restent à confirmer (32).

Les ORFs L1 et L2 codent respectivement pour les protéines structurales majeures L1 et mineures L2 de la capsid. Leur expression est strictement induite dans les cellules en différenciation lors de la phase tardive de l'infection (32).

1.1.2.3. Cycle de réplication des papillomavirus

Les PVs sont des particules virales à tropisme particulier pour les épithéliums de la peau et des muqueuses (49). Nécessairement, leur cycle de réplication (figure 7, page 16) est étroitement lié à la différenciation cellulaire des tissus de l'hôte qu'ils infectent. Les tissus épidermiques et les muqueuses sont constitués de plusieurs couches d'épithélium. La plus profonde de ces couches est composée de deux différents types cellulaires adhérant à la membrane basale: les cellules souches et les cellules d'amplification transitoire (50). Ces premières ont la capacité de s'auto-renouveler continuellement ou de devenir elles-mêmes des cellules du deuxième type. Les cellules d'amplification transitoire, qui ont un potentiel prolifératif limité, peuvent se détacher de la membrane basale et migrer vers les couches suprabasales de l'épiderme (51). Durant cette migration, les kératinocytes acquièrent différents changements morphologiques et biochimiques jusqu'à atteindre un statut terminal de différenciation menant ultimement à leur mort programmée (52). Dans ce cycle normal de différenciation, seules les cellules situées dans la couche basale peuvent entreprendre la mitose. Les cellules se détachant de cette couche perdent la capacité de division cellulaire au cours de leur différenciation. Conséquemment, les PVs ont dû développer des stratégies leur permettant de s'adapter au cycle cellulaire afin de pouvoir répliquer leur génome dans toutes les phases de différenciation.

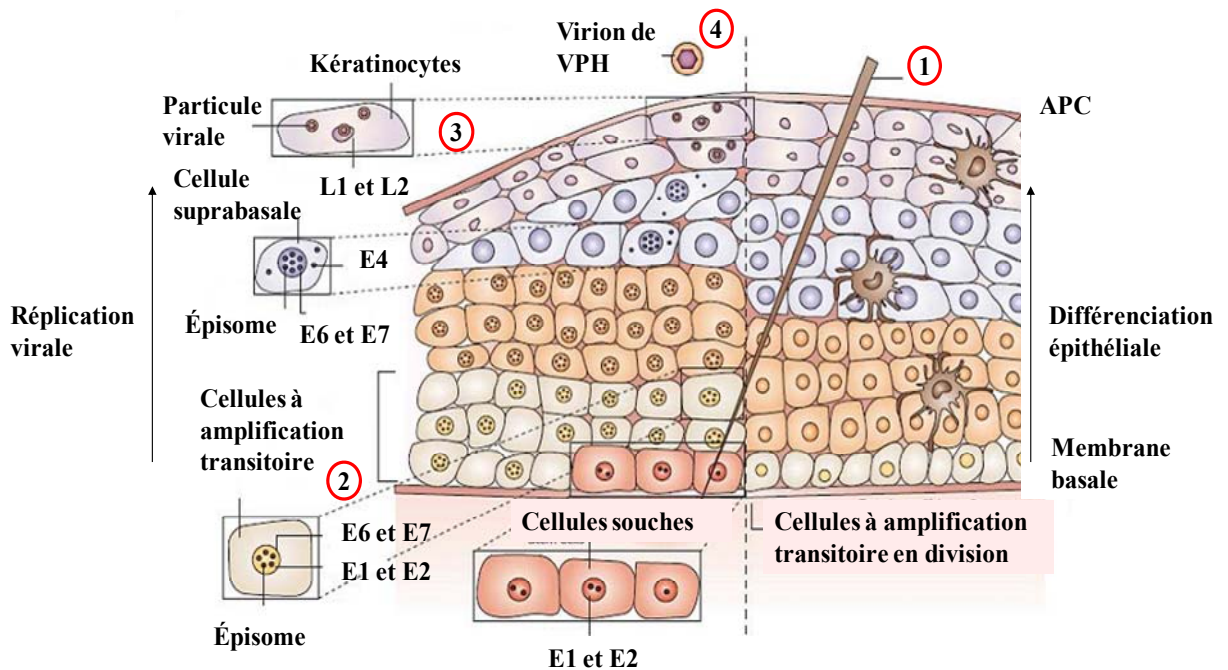


Figure 7. Cycle de répllication du virus du papillome humain et différenciation cellulaire. Le cycle de répllication peut se résumer en 4 étapes principales: 1) l'entrée du VPH via une microlésion de l'épithélium et la décapsidation, 2) plusieurs rondes d'amplification de l'ADN viral, 3) synthèse des protéines de la capside et 4) assemblage et relâche des virions nouvellement formés. À droite, la différenciation normale des cellules épithéliales et à gauche, le cycle de répllication du VPH. VPH, virus du papillome humain; APC, cellule dendritique présentatrice d'antigène. D'après Frazer et al. (2004) (53).

L'infection des cellules épithéliales par les PVs surviendrait suite à l'exposition de la membrane basale possiblement via une microlésion de l'épithélium (étape 1, figure 7, page 16) (40). Le mécanisme d'entrée dans les cibles préférentielles du PV, les cellules d'amplification transitoire, ainsi que les récepteurs impliqués sont mal connus. Lors de l'entrée dans la cellule, les récepteurs de sulfate héparine sont sollicités et possiblement les récepteurs α -6-intégrine aussi (54,55).

Trois types d'amplification de l'ADN ont lieu soit l'amplification initiale, l'amplification à maintien stable et l'amplification végétative (étape 2, figure 7, page 16) (41). Le lieu et le moment de leur exécution dépendent du stade de différenciation des

kératinocytes qui est en cours. L'amplification initiale débute dans la phase précoce de l'infection lorsque la particule virale est internalisée dans la cellule et importée dans le noyau. Le promoteur situé dans l'URR est alors activé, initiant ainsi l'expression des gènes précoces tels les ORFs E1 et E2 (56). Le complexe protéinique E1/E2 recrute les facteurs de réplication cellulaires à l'origine de la réplication virale et initie la synthèse d'ADN viral donnant lieu à l'augmentation rapide du nombre de copies d'ADN viral au sein d'une cellule. L'amplification à maintien stable a lieu quand les cellules basales infectées se divisent (41). L'ADN viral se répartit de façon quasi-égale dans les cellules-filles, par les voies Brd4-dépendantes (57) et Brd4-indépendantes (58). Le niveau de génomes viraux reste stable dans les cellules. Finalement, l'amplification végétative se déclenche dans les kératinocytes différenciés qui ne se divisent plus. À cette étape de différenciation cellulaire, les facteurs de réplication ne sont plus produits (41). Donc, le PV doit, par nécessité, subvertir les signaux d'arrêt du cycle cellulaire pour ainsi maintenir un milieu propice à la réplication. Les voies de signalisation pro-apoptotiques sont perturbées par l'expression des gènes E6 et E7 (42).

Le cycle de réplication virale se termine par la phase tardive de l'infection durant laquelle les gènes tardifs sont exprimés pour la production des protéines de la capsid (étape 3, figure 7, page 16). Par la suite, les protéines structurales L1 et L2 s'assemblent et incorporent une copie du génome viral pour former un virion qui sera relâché à la surface de l'épithélium par desquamation (étape 4, figure 7, page 16) (40). L'encapsidation du génome serait plus efficace en présence de la protéine E2 (35).

Ce cycle de réplication virale permet la formation de nouvelles particules infectieuses intactes et se produit dans le cas où le PV est sous la forme épisomale (41). Dans les circonstances où l'ADN viral s'intègre dans le génome de l'hôte, le mécanisme de réplication est différent. Lors de l'intégration, le cadre de lecture du gène E2 est détruit et la protéine associée n'est plus produite (32). Il est plausible que le complexe E1/E2 des PVs épisomaux résiduels présents dans la cellule-cible puisse initier la réplication des formes intégrées par complémentation (59). La réplication des formes intégrées peut amener une instabilité génomique, ce qui pourrait éventuellement transformer les cellules infectées et entraîner une infection proliférative plutôt que productive (35).

1.1.2.4. Régulation de l'expression des gènes

Les cadres de lecture jouent des rôles distincts au cours du cycle de réplication des PVs. Leur expression doit être régulée afin que les protéines soient produites au moment nécessaire. Ainsi, les gènes précoces doivent être exprimés dans les premières étapes de la réplication, tandis que les gènes tardifs doivent l'être dans les dernières phases du cycle de réplication.

L'expression des gènes précoces est rigoureusement régulée par la protéine E2. Les protéines E2 lient les E2-BSs et selon si ces sites sont saturés ou non, le promoteur précoce est activé ou inhibé. La fonction activatrice ou répressive de la protéine E2 dépendrait de sa concentration. À de faibles concentrations, E2 activerait l'expression des gènes précoces, tandis qu'à de hautes concentrations, E2 inhiberait plutôt leur transcription, ce qui suggère que la protéine E2 contrôlerait le nombre de copies virales en régulant indirectement l'activité des protéines précoces (44). Tel que mentionné précédemment, le nombre de sites E2-BSs varie entre PVs. Le VPH-16 possède quatre E2-BSs en amont du promoteur P97 (36), tel qu'illustré en figure 8 (page 19). Enfin, les E2-BSs peuvent aussi interagir avec certains facteurs de transcription cellulaire. Donc, en l'absence de la protéine E2, il est possible que certains de ces facteurs puissent activer l'expression des gènes précoces (60).

L'expression des gènes précoces peut également être régulée par épissage alternatif post-transcriptionnel. Ainsi, à partir d'un seul transcrit, plusieurs ARNm peuvent être obtenus, ce qui est le cas pour les ORFs E2 et E6. L'épissage des pré-ARNm génère des ARNm de différentes longueurs. Lors de leur traduction, les protéines produites peuvent avoir des fonctions différentes et peuvent interférer avec les fonctions de la protéine complète dont le nombre est alors limité (41,45).

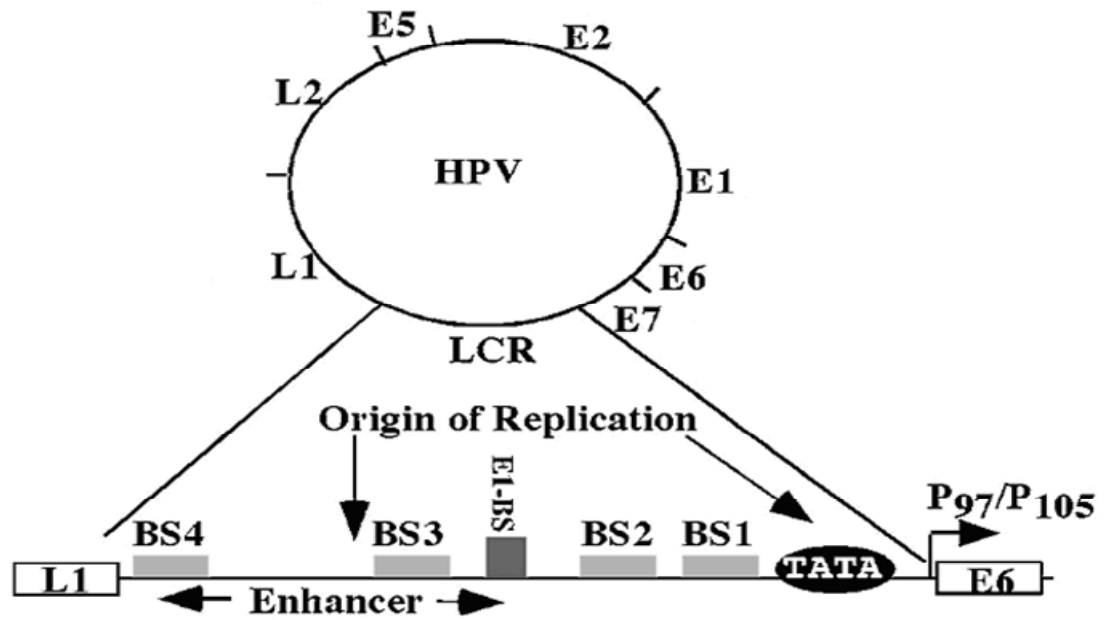


Figure 8. Structure de la région régulatrice (*long control region*) du virus du papillome humain de type 16. Le VPH-16 porte 4 E2-BSs (*E2 binding site*). La protéine virale E2 interagit avec les E2-BSs et l'interaction résultante peut provoquer l'activation ou la répression de la transcription ou de la réplication virale. D'après Hedge, R.S. (2002) (36).

L'expression des gènes tardifs est régulée de telle façon que les protéines L1 et L2 sont produites uniquement en fin de cycle de réplication. Plusieurs VPHs, notamment le BPV-1 et le VPH-16, possèdent des éléments en *cis* ARN-régulateurs dans le LCR en amont du site de poly-adénylation ou poly(A) tardif. Ces éléments inhibent la poly-adénylation des ARNm tardifs. Les ARNm non-adénylés sont rapidement dégradés et ne sont donc pas transportés vers le cytoplasme pour traduction (61). Pour certains PVs, l'expression génique tardive est également régulée par épissage alternatif. Chez le BPV-1, les transcrits sont normalement clivés au nucléotide (nt) 3 225 et la poly-adénylation a lieu au site poly(A) précoce pour l'obtention des protéines précoces. Pour exprimer les gènes tardifs, les pré-ARNm sont clivés au second site de clivage situé au nt 3 605 et la poly-adénylation a lieu au site poly(A) tardif. La sélection du site de clivage serait régulée par des éléments en *cis* situés en amont du site au nt 3 225 (62). Les processus d'inhibition de la poly-adénylation tardive pour l'expression des gènes précoces sont encore inconnus (61).

1.2. ÉPIDÉMIOLOGIE DE L'INFECTION AU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN

L'acquisition d'une infection au VPH est très commune dans la population générale sexuellement active pour laquelle plus de 75% des individus contracteront au moins une infection au VPH au cours de leur vie (63). Les facteurs de risque pour l'acquisition d'une infection au VPH sont nombreux. Le nombre de partenaires sexuels, l'âge au moment des premières relations sexuelles, l'utilisation de contraceptifs oraux, la co-infection avec d'autres agents pathogènes, l'immunosuppression et le tabagisme en sont quelques exemples (64,65).

Les infections au VPH sont pour la plupart asymptomatiques et régressent spontanément après quelques mois. Par contre, pour une faible minorité des personnes infectées, l'infection persiste et un cancer des muqueuses anogénitales pourrait se développer au cours des années. Le VPH-16 est le plus souvent impliqué dans ces cancers: plus de 50% des individus atteints sont infectés par ce type (66,67). Le développement d'un tel cancer associé à l'infection au VPH reste un événement rare dans la population générale.

Tant les hommes que les femmes peuvent contracter une infection anale au VPH. Le cancer de l'anus est plus fréquent chez ces dernières pour l'ensemble de la population générale (65,67). Ainsi, dans une étude sur une population américaine, les taux annuels, ajustés pour l'âge, calculés pour les femmes et pour les hommes étaient respectivement de 1.79 et de 1.55 par 100 000 personnes (65). Par contre, certains individus-cibles sont plus susceptibles que d'autres de développer un cancer de l'anus suite à une infection au VPH. Ainsi, des études épidémiologiques portant sur les HARSAs VIH-séropositifs les ont identifiés comme étant le groupe le plus à risque de cancer anal. Le taux d'incidence de cancer anal chez ces derniers (70 par 100 000 HARSAs/an) est beaucoup plus élevé que chez les femmes (68-70).

Cette deuxième section du chapitre premier porte sur l'épidémiologie du VPH dans le cadre de l'infection du col utérin et de l'anus avec un accent sur l'épidémiologie particulière de l'infection anale chez les HARSAs VIH-séropositifs.

1.2.1. Infection du col de l'utérus et cancer du col utérin

L'incidence du cancer du col utérin a diminué significativement ces dernières décennies depuis l'implantation d'un programme de dépistage des néoplasies intraépithéliales du col utérin (CIN) (6). Initialement, le taux d'incidence de ce cancer était de plus de 25 cas par 100 000 femmes (20), mais ce chiffre a considérablement diminué depuis l'introduction du test Pap. Effectivement, les statistiques compilées de 1975-2004 montrent une incidence du cancer du col utérin à la baisse aux États-Unis, avec un taux de 7 cas par 100 000 femmes en 2004 (20). Le même phénomène est observable au Canada, où le taux d'incidence en 1979 était de 14.2 par 100 000 femmes et, celui de 2004, de 7.5 par 100 000 femmes (71). En 2008, le taux d'incidence était estimé à 7 nouveaux cas de cancer du col utérin par 100 000 femmes (72). Le taux d'incidence au Québec était de 6 par 100 000 femmes (72). La baisse du taux d'incidence de cancer du col utérin illustre le succès du programme de dépistage dans la réduction du nombre de nouveaux cas de cancer du col de l'utérus.

De façon générale, la prévalence globale de l'infection au VPH au niveau du col tend à diminuer avec l'âge (73,74). Néanmoins, une augmentation de la prévalence âge-spécifique est observable pour deux groupes de femmes, soient les femmes de moins de 25 ans et les femmes de plus de 65 ans. Herrero et al. évaluèrent que la prévalence pour ces deux groupes se situait autour de 20% (75). Par contre, d'autres études démontrèrent que la prévalence d'infection était nettement plus élevée pour les jeunes femmes et pouvait atteindre jusqu'à 50-60% (76,77). L'infection au VPH est associée au début précoce des relations sexuelles pour les jeunes femmes, tandis que pour les femmes plus âgées, la hausse de la prévalence serait possiblement due à la réactivation d'une infection latente, à une exposition récente occasionnée par un changement de partenaires ou à une déficience du système immunitaire reliée à l'âge (73,78,79).

En comparaison aux Canadiennes VIH-séronégatives, les femmes VIH-séropositives ont une prévalence d'infection au VPH beaucoup plus élevée (80). Le risque de développer un cancer du col utérin chez ces dernières l'est tout autant (81,82). Massad et al. estimèrent dans l'étude sur la cohorte *Women's Interagency HIV Study* (WIHS) que

38.3% des femmes VIH-séropositives contre 16.2% des femmes VIH-séronégatives montraient des anomalies au niveau de la cytologie du col utérin (83). Les facteurs de risque associés à la présence de ces anomalies étaient entre autres le décompte des lymphocytes CD4, la charge virale du VIH et l'infection au VPH (83). L'incidence de HSIL ou de cancer du col utérin pour les femmes VIH-séropositives et VIH-séronégatives étaient de 4.4 et de 1.3 cas par 1 000 personne/ans, respectivement (84).

1.2.2. Infection de l'anus et cancer anal

La prévalence de l'infection anale au VPH reste incertaine dans la population générale. La plupart des études réalisées sur l'épidémiologie de l'infection anale portèrent sur des groupes spécifiques d'individus. Dans une étude de 222 mâles hétérosexuels, la prévalence globale de l'infection anale était estimée à 24.8% (85). Dans une autre étude portant sur des femmes saines, 27% de 1 378 patientes étaient positives pour les VPHs dans l'anus (86). Ces résultats indiquent que l'infection anale serait assez commune dans la population. Les facteurs de risque pour l'acquisition d'une infection anale varient selon la sous-population étudiée. Le comportement sexuel, dont la pratique sexuelle anale et le nombre de partenaires, l'immunosuppression, la présence simultanée d'une autre infection à VPH (principalement du col de l'utérus pour la femme) et/ou le tabagisme en sont des exemples (67,86).

Comme le cancer du col de l'utérus, le cancer de l'anus est associé à l'infection au VPH, en particulier le type 16 (87). L'incidence du cancer anal a augmenté ces dernières années (88). Ainsi, en 2009, la société américaine du cancer a estimé le nombre de nouveaux cas de cancer de l'anus à 5 290 et le nombre de décès à 710 comparativement aux estimations de 2004 qui étaient de 4 010 nouveaux cas et de 580 décès (89,90). Au Canada, entre 2003 et 2004, le nombre de nouveaux cas répertorié de cancer de l'anus était de 491, dont 76 ont été rapporté au Québec (91). Durant la période 2005-2006, le nombre de nouveaux cas au pays était de 513, dont 96 au Québec (92). Globalement, les femmes sont plus atteintes par le cancer de l'anus que les hommes (67). Toutefois, depuis l'introduction de la trithérapie, les études démontrent une hausse des cas de cancer de l'anus chez les HARSAs VIH-séropositifs (93) ainsi que chez les HARSAs VIH-séronégatifs (65,94).

L'épidémiologie de l'infection anale chez les HARSAs VIH-séronégatifs et chez les HARSAs VIH-séropositifs est différente par rapport à celle de la population générale et il est nécessaire de l'examiner en profondeur.

1.2.2.1. Infection chez l'homosexuel mâle

L'infection anale au VPH parmi les HARSAs est fréquente. La prévalence d'infection pour les HARSAs VIH-séronégatifs a été évaluée dans l'étude EXPLORE (95). Globalement, la prévalence d'infection était de 57%, le type 16 étant le plus fréquemment détecté (12% des participants). La prévalence des VPH-HR était de 26%. L'infection multiple était fréquente (45% des individus étaient infectés par le VPH) avec une moyenne de 1.8 type. Les prédictors de l'infection anale au VPH étaient un historique de relations anales réceptives et d'avoir plus de 5 partenaires sexuels mâles durant les 6 derniers mois (95).

Quant au cancer de l'anus, les études épidémiologiques américaines évaluent que près de 35 par 100 000 HARSAs (68-70,96) développeront un cancer anal, ce qui est largement plus élevé que l'incidence du cancer du col utérin qui était pour la période 2000-2004 de 9.04 (IC 95% : 8.95 - 9.13) (97). Malheureusement, le taux d'incidence du cancer de l'anus associé à l'infection par le VPH pour les HARSAs canadiens n'est pas connu. Des études épidémiologiques sur ce groupe de personnes sont nécessaires, particulièrement pour la région de Montréal, où est concentrée la majeure partie des individus ayant développé un cancer anal au Québec (18).

Les facteurs de risque pour développer un cancer de l'anus furent évalués dans une publication de Daling et al. (64). Ainsi, les hommes bisexuels ou homosexuels pratiquant le sexe anal avaient 17.3 fois plus de risque de développer un cancer anal que les hommes exclusivement hétérosexuels (IC 95%= 8.2 – 36.1) (64). Tseng et al. calculèrent un risque semblable chez les individus ayant rapportés plus de 130 relations anales, comparativement aux individus hétérosexuels [OR= 17.6 (IC 95%= 1.3 - 234)] (98).

1.2.2.2. Infection chez l'homosexuel mâle infecté au virus de l'immunodéficience humain

Chez les HARSAHs VIH-séropositifs, près de 70 par 100 000 individus développeront un cancer anal (68-70). Le risque de ce cancer chez ces personnes est de plus de 42 fois celui de la population générale (82,99). L'introduction de la TAR ne semble pas avoir d'impact sur l'incidence de cancer anal pour ce groupe (100,101). Elle contribuerait plutôt à l'augmentation du nombre de HARSAHs VIH-séropositifs progressant vers le cancer en prolongeant l'espérance de vie de ces derniers. Une récente étude prospective de HARSAHs VIH-séronégatifs et VIH-séropositifs sur une période s'échelonnant de 1984 à 2006 a montré que pour ces derniers, l'incidence était plus élevée dans l'ère du TAR qu'avant l'introduction de cette thérapie (137 contre 30 par 100 000 personne/années, respectivement) (102).

L'infection au VPH est nécessaire, mais non exclusive pour le développement du cancer anal chez les HARSAHs VIH-séropositifs. D'autres facteurs y sont associés, tels que le nombre de partenaires sexuels, le tabagisme, la présence de verrues génitales et la co-infection avec d'autres agents pathogènes (98). Les rapports sexuels anaux sembleraient plutôt associés à l'acquisition de l'infection anale.

1.3. INFECTION AU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN ET CARCINOGENÈSE

Cette section illustre les aspects se rapportant à la biologie de l'infection au VPH, la pathologie et la pathogenèse, et leur rôle dans la carcinogenèse. Aussi, l'histoire naturelle de l'infection et les facteurs impliqués dans la progression des lésions seront révisés plus en détail, toujours avec une attention particulière pour l'infection anale par les VPHs.

1.3.1. Pathologie

Les zones de transformation sont les sites préférentiels de l'infection par les VPHs à tropisme muqueux. Une zone de transformation est la jonction où a lieu la conversion des cellules cylindriques en cellules stratifiées squameuses par le processus de métaplasie (103). Le col de l'utérus, l'anus ainsi que les amygdales sont des tissus qui contiennent ces zones (104).

La plupart des individus infectés par le VPH ne présentent aucune lésion et résultent d'une infection transitoire ou d'une infection non-productive. Dans certains cas, les personnes infectées développent des lésions dont la sévérité varie selon le stade de l'infection. Les lésions sont décrites conformément à leur phénotype (bénin ou malin) et se répartissent en différents grades allant des condylomes aux cancers anogénitaux (105). La progression d'une lésion vers un grade plus élevé dépend entre autres du potentiel oncogénique des VPHs détectés dans les tissus atteints (105). Les lésions plus sévères sont associées à l'infection par les VPHs à haut-risque.

Les lésions du col utérin préinvasives qu'occasionne l'infection au VPH peuvent être classées selon deux systèmes dont les terminologies sont distinctes, mais comparables. Ainsi, les termes de néoplasie intraépithéliale du col utérin (CIN) et lésion intraépithéliale squameuse (SIL) sont employés dans la classification histopathologique et cytopathologique, respectivement. Le premier système classe les CIN en trois catégories gradées de 1 à 3, où le premier grade est considéré comme bénin (bas-grade) et les deux

autres sont plus sévères (haut-grade) (105). La deuxième classification est basée sur le système Bethesda, qui divise plutôt les lésions préinvasives en deux groupes : les SIL de bas-grade (LSIL) et les SIL de haut-grade (HSIL) (106). À titre comparatif, les CIN de grade 1 (CIN-1) et les CIN de grade 2 et 3 (CIN-2,3) correspondent, respectivement, aux LSIL et aux HSIL (voir figure 9, page 27).

Les lésions du col utérin se manifestent au cours de l'infection dans un processus de continuum où les CIN et les SIL de bas-grade sont souvent précurseurs des CIN et des SIL de haut-grade. Par contre, pour certaines femmes, les SIL de haut-grade se développent rapidement après l'infection par les VPHs sans nécessairement être précédés par les SIL de bas-grade (78). Il est possible dans ces cas que les SIL de bas-grade n'aient pas été détectés, ce qui impliquerait que la progression des lésions vers un haut-grade soit beaucoup plus rapide qu'estimée. Néanmoins, les lésions de haut-grade sont les vrais précurseurs du cancer invasif (107,108). La présence d'une lésion de bas-grade n'est pas nécessairement reliée au développement d'un cancer invasif. La progression des lésions de bas-grade vers un degré plus élevé survient pour moins du tiers des patients (104). Par contre, plus la lésion est sévère, plus grand est le risque de progression vers la phase invasive (104).

La classification des lésions dans un des groupes précédemment décrits est assez complexe dans la mesure où les anomalies au niveau morphologique et nucléaire ne permettent pas toujours de différencier à quelle classe appartiennent les lésions. En théorie, les lésions de bas-grade affectent le premier tiers de l'épithélium. Les anomalies cellulaires visibles sont souvent la koïlocytose, i.e. l'irrégularité du noyau et la clarification du cytoplasme (109). Les condylomes sont classés dans cette catégorie. Dans le cas d'une lésion de grade 2, près de la moitié aux deux tiers de l'épithélium est atteint, tandis que dans une lésion de troisième grade ou CIS (carcinome *in situ*), l'épithélium en totalité a subi des modifications (105,110). Peu de koïlocytose est observable dans les lésions de grade 2 (surtout restreinte à la surface de la lésion) alors qu'elle est absente dans les lésions de grade 3.

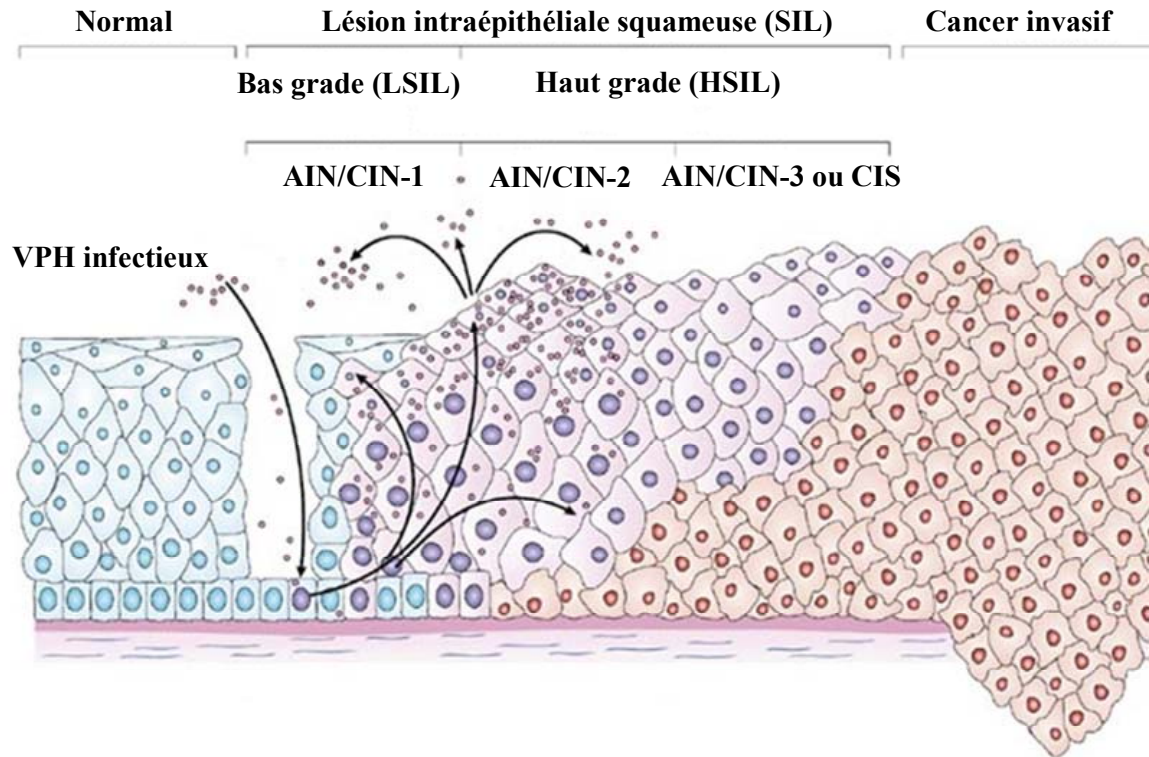


Figure 9. Progression de l'infection au virus du papillome humain.

L'infection au VPH peut être décrite comme un processus en continu. Les lésions de bas-grade sont précurseurs des lésions de haut-grade et ces dernières sont précurseurs du cancer invasif. Au début de l'infection, l'ADN est majoritairement retrouvé sous la forme épisomale et vers les phases de lésions cancéreuses, sous la forme intégrée. Dernièrement, la forme intégrée fut détectée dans les épithéliums normaux et dans les LSIL. Aussi, dans certains cancers anogénitaux, seul le VPH épisomale fut retrouvé mettant en doute la théorie que l'intégration ne se produirait que tardivement dans l'infection. AIN, néoplasie intraépithéliale anale; CIN, néoplasie intraépithéliale cervicale; CIS, carcinome *in situ*; VPH, virus du papillome humain. D'après Woodman et al. (2007) (111).

La pathologie des lésions anales s'inspire des terminologies utilisées pour la caractérisation des lésions du col utérin. De ce fait, les lésions observées au niveau de l'anus sont semblables à celles qui se manifestent pendant l'infection du col de l'utérus. Donc, l'utilisation des termes de néoplasie intraépithéliale anale (AIN) et ASIL (lésion intraépithéliale squameuse anale) est courante et leur hiérarchisation en bas-grade et en haut-grade reste de mise.

1.3.2. Pathogenèse

Le potentiel oncogénique des VPHs est déterminé par leur capacité à engendrer des cancers anogénitaux lors de la progression des lésions intraépithéliales. Les VPHs les plus souvent en cause sont les types 16, 18, 31, 33 et 45 (40). Le VPH-16 est à lui seul retrouvé dans 50% et jusqu'à 70% des cancers du col utérin et anaux, respectivement (108,112). La pathogénicité des VPHs oncogéniques est médiée par l'activité des protéines E6 et E7 qui diffère selon que les VPHs soient des VPH-HR ou des VPH-LR (113). Le processus de carcinogenèse est illustré dans la figure 10 (page 29). Sommairement, le développement d'un cancer anogénital relié à l'infection au VPH s'étale sur une période de plus de 10 ans. Plusieurs phénomènes se produisent au cours de l'infection, notamment la dérégulation de l'expression des gènes E6 et E7 suite à l'intégration du VPH à haut-risque et les changements épigénétiques. Ces phénomènes seraient en partie responsables de la progression vers le cancer.

L'infection persistante au VPH-HR est associée au développement de cancer anogénital (114,115). Ces VPHs oncogéniques ont la capacité de transformer les cellules infectées en un phénotype malin. Le rôle principal dans le processus de carcinogenèse est tenu par la protéine E7 qui induit la prolifération cellulaire. L'activité de la protéine E7 est facilitée par la protéine E6 qui altère les voies de signalisation de l'apoptose, empêchant la mort cellulaire de se produire lorsqu'engendrée suite à l'expression de la protéine E7 (113). La protéine E5 aurait un rôle mineur dans la carcinogenèse, mais ses fonctions exactes n'ont pas encore été élucidées (40).

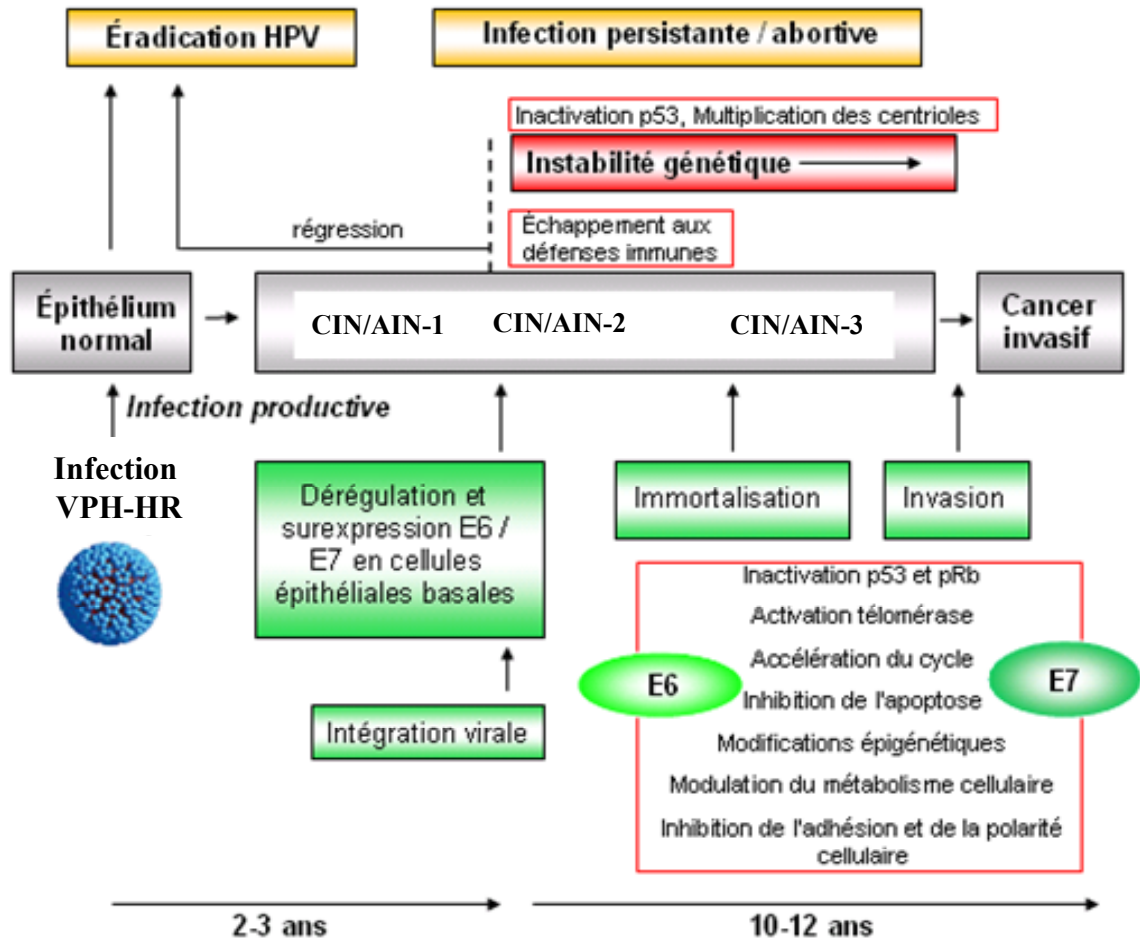


Figure 10. Processus de carcinogénèse lors de l'infection au virus du papillome humain oncogénique. La majorité des infections régressent spontanément. Par contre, une minorité des personnes infectées développent des lésions qui, dans certains cas, progressent vers un état malin. Les oncoprotéines E6 et E7 induisent certaines anomalies dans les cellules de l'hôte et seraient donc responsable, en partie, de la progression des lésions de bas-grade (CIN/AIN-1) vers des lésions de haut-grade (CIN/AIN-2,3) et vers le cancer invasif. CIN, néoplasie intraépithéliale cervicale; AIN, néoplasie intraépithéliale anale; HPV ou VPH: virus du papillome humain. D'après Delloye et al. (2006) pour l'École normale supérieure ENS de Lyon. [http://dicos.enslyon.fr/vie/viro/XML/db/bio/viro/metadata/LOM_V05_3D1_Papilloma_Oncogenese_b.xml, page visitée le 29 mars 2010].

Brièvement, la protéine E7 stimule l'entrée des cellules en phase S en induisant la dégradation de pRb. La dégradation de pRb entraîne l'activation constitutive d'E2F qui est nécessaire à la transition de la phase G₁ à la phase S (116,117). La protéine E7 lie aussi d'autres protéines, dont p107 et p130, qui sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (42). La protéine E6 induit la dégradation de p53, ce qui inhibe l'apoptose. D'autres fonctions lui sont attribuables, telles que l'induction de la télomérase hTERT et la perte de la polarité cellulaire. Ensemble, ces deux oncoprotéines subvertissent l'inactivation de la réplication de l'ADN qui a normalement lieu lors de la différenciation des cellules épithéliales. Conséquemment, l'ADN viral peut être amplifié dans les cellules différenciées.

Habituellement, l'expression des gènes E6 et E7 est étroitement régulée par la protéine E2 (36,118). Toutefois, lors de l'intégration du VPH dans le génome de l'hôte, l'ADN circulaire viral se rompt au niveau du cadre de lecture du gène E2 (ORF E2) qui est souvent détruit (voir la figure 11, page 31) (49). Arias-Pulido et al. montrèrent que le VPH était souvent intégré aux nucléotides (nt) 2 783 à 3 063 (extrémité N-terminale) et aux nt 3 243 à 3 539 (région charnière) qui se situent dans le cadre de lecture E2, dans 70.3% et 78.4% des spécimens à l'étude, respectivement (119). La destruction de l'ORF E2 entraîne la surexpression des oncogènes E6 et E7. La surexpression de ces ORFs résulte en la dérégulation du cycle cellulaire et provoque l'accumulation d'anomalies générées par les protéines E6 et E7. La transformation des cellules confère souvent un avantage de croissance aux cellules (120) et, éventuellement, l'immortalisation des cellules infectées par la forme intégrée de VPH est induite (42).

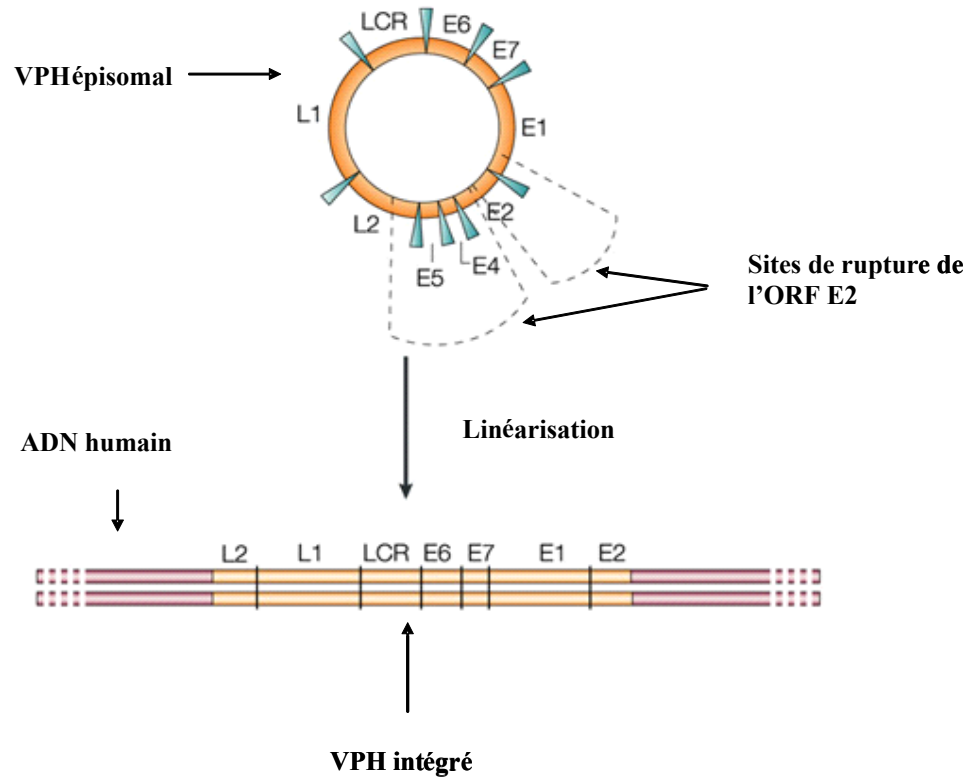


Figure 11. Intégration du virus du papillome humain. Les VPHs sont normalement retrouvés sous forme épisomale. Dans certains cas, le génome viral se linéarise lors de la destruction du cadre de lecture du gène E2 et s'intègre dans l'ADN humain. Le gène E2 est un répresseur de l'expression des gènes E6 et E7. En absence de la protéine E2, l'expression des gènes E6 et E7 est dérégulée. ADN, acide désoxyribonucléique; ORF, cadre de lecture; VPH, virus du papillome humain. D'après zur Hausen, H. (2002) (121).

Lors de la carcinogenèse, divers changements dits épigénétiques peuvent survenir. Les changements les plus souvent répertoriés sont la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones (122). Dans le cas de l'infection au VPH, la méthylation peut se produire sur l'ADN de l'hôte et sur l'ADN viral (111). La méthylation de l'ORF E2 peut restreindre l'accès des E2-BSs, ce qui, conséquemment, interfère avec le cycle de réplication du VPH (122) et peut résulter en deux situations pour le virus. Dans le premier cas, la réplication virale est interrompue et le VPH est plus facilement éliminé, ce qui est à l'avantage de

l'hôte. Par contre, dans le deuxième cas, l'expression des gènes viraux est seulement inactivée, ce qui n'induirait pas de réponse immune. Cette inactivation permet au VPH de s'évader du système immunitaire et donc de persister dans un état latent (111), ce qui évidemment serait à l'avantage du virus. Cette dernière option serait la plus plausible, d'autant plus qu'il a été démontré que les VPHs oncogéniques pouvaient moduler la méthylation pour leur bénéfice (122).

L'oncoprotéine E7 est capable de s'associer à certaines enzymes, comme Dnmt1, qui sont impliquées dans la méthylation de l'ADN. Ces interactions potentialisent l'activité de ces protéines (123). Ces dernières peuvent donc méthyler l'ADN davantage et cette hyperméthylation peut engendrer l'inactivation de certains gènes impliqués dans les voies de contrôle de la prolifération cellulaire (111). Ainsi, certains gènes tels que *DAPK1* et *RARB* sont plus fréquemment méthylés chez les femmes atteintes de cancer du col utérin ou présentant un CIN-2,3 que chez les femmes saines ou avec un CIN-1 (111,124). Quant à l'acétylation des histones, ce phénomène induit la décondensation de la chromatine, ce qui facilite l'accès aux sites d'attachement des facteurs de transcription (122). L'ADN du VPH est aussi associé aux histones cellulaires. Ainsi, la décondensation de l'ADN viral faciliterait la transcription des gènes viraux.

L'intégration est considérée comme un élément-clé dans la progression de l'infection vers la phase invasive. Ainsi, dans une grande proportion des cancers, l'ADN est retrouvé sous la forme intégrée dans le génome de l'hôte (93,125). Puisque l'ADN viral est généralement détecté sous la forme épisomale dans les lésions précurseurs de cancer (49), il y aurait donc au cours de l'infection virale un changement du statut génomique qui initialement semblait être un processus graduel. Les premières évidences montraient que l'intégration était un événement tardif dans la carcinogenèse (125,126). Toutefois, grâce à l'innovation des techniques de détection de l'ADN des VPHs, comme le PCR en temps réel (127), des études démontrèrent que l'intégration ne se manifestait pas que dans les lésions de haut-grade, mais aussi dans les lésions de bas-grade (128-130). Dernièrement, d'autres études montrèrent que l'intégration était détectable dans les tissus normaux de femmes infectées par les VPHs de type 16 et 33 (131,132). Quant à l'histoire naturelle des formes intégrées au cours de l'infection anale, elle n'est pas connue. Toutefois, l'analyse du statut

physique de l'ADN du VPH contenu dans les cas de cancer de l'anus révéla que le VPH était majoritairement retrouvé sous la forme intégrée (133-135). Il serait donc possible que l'intégration du VPH se produise également dans les lésions préinvasives anales, mais ce phénomène reste encore à être vérifié.

Il semblerait que le processus d'intégration soit aléatoire dans la mesure où il n'y aurait pas de site spécifique où l'ADN s'intègre dans le génome de l'hôte. Par contre, certaines études indiquent que les sites communs fragiles (CFS) sont des sites préférentiels pour l'intégration, probablement dû à la facilité d'accès à ces sites (136,137). Il a également été suggéré que l'insertion du VPH à proximité ou dans un oncogène cellulaire connu pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse (138). Toutefois, il n'est pas encore certain que l'intégration puisse influencer l'expression de ces gènes.

Enfin, la co-infection au VIH pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse du VPH par plusieurs mécanismes (82). Certaines études ont suggéré que l'immunité cellulaire (CMI) était associée avec un effet protecteur contre le développement de lésions. Une étude réalisée chez des jeunes femmes dont les résultats du test Pap démontrèrent la présence d'anomalies cellulaires montra que celles qui ne présentaient pas de lésions avaient généralement une meilleure réponse du CMI à 6 peptides du VPH-16 (mesurée par le taux de prolifération des cellules T) que les femmes présentant un CIN-1 (139). Dans une autre étude mesurant la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), les femmes VPH-16-positives ne présentant aucune lésion réagissaient généralement plus fréquemment aux peptides E6 et E7 que les femmes présentant une CIN (140). Également, chez des individus VIH-séropositifs dont le décompte des lymphocytes CD4 était plus élevé, la réponse immune semblait être plus forte et, conséquemment, ils développaient moins de lésions comparativement aux personnes dont le décompte des lymphocytes CD4 était plus faible (68).

Ces résultats montrent que la réponse immunitaire cellulaire est importante dans le contrôle de l'infection, surtout au niveau du développement des lésions. L'immunosuppression cellulaire expliquerait pourquoi les individus VIH-séropositifs ont un taux d'infection au VPH et une prévalence de lésions plus élevés.

D'un autre côté, les protéines du VIH pourraient interagir directement avec le VPH. Vernon et al. démontrèrent dans un système de culture cellulaire que la protéine Tat du VIH-1 pouvait augmenter l'expression de certains gènes du VPH-16, dont E6 et E7, en modulant la régulation de l'expression du génome du VPH par le LCR (141). Ceci fut confirmé dans la lignée cellulaire HeLa, où une augmentation de l'expression du gène E7 du VPH-18 fut observée (142). La surexpression de ces gènes engendrerait les anomalies précédemment énumérées, ce qui serait aussi associé à la plus grande prévalence des lésions chez les individus VIH-séropositifs.

1.3.3. Histoire naturelle de l'infection au virus du papillome humain

Les nombreuses études prospectives sur l'infection du col de l'utérus par le VPH ont permis de bien définir son histoire naturelle. Plusieurs aspects s'y rapportant peuvent être généralisés aux autres infections anogénitales, notamment l'infection de l'anus. Ainsi, tout comme le cancer du col utérin, le cancer anal est fortement associé à l'infection au VPH oncogénique (15,98,143). Également, l'infection anale est caractérisée par des lésions semblables à celles retrouvées lors de l'infection du col utérin et se manifestent selon un continuum jusqu'à la néoplasie invasive. Toutefois, l'effet de certains facteurs viraux sur l'histoire naturelle de l'infection anale au VPH reste inconnu. Les taux de régression et de progression de l'infection commencent à être évalués, notamment dans l'étude de la cohorte HIM (HIM study) qui est toujours en cours (144), mais les rôles de la charge virale et de l'intégration sur la progression de l'infection anale n'ont encore jamais été définis.

Il est tout à fait justifié de s'interroger et de vouloir définir l'histoire naturelle de l'infection anale au VPH chez les HARSAs VIH-séropositifs qui sont, après tout, les personnes les plus à risque de développer un cancer anal. L'infection anale est particulièrement répandue chez ces derniers à cause du type de relations sexuelles pratiquées, mais aussi à cause de leur statut d'immunosuppression (145,146). L'étude EXPLORE portant sur des HARSAs VIH-séronégatifs a montré que la pratique de relations anales était un facteur de risque pour l'infection anale par le VPH et également pour l'infection au VIH (95,147).

La prévalence d'infection est très élevée chez les HARSAHs VIH-séropositifs. Une étude a montré qu'au moment de recrutement, 95% des individus avaient une infection anale au VPH (94). Parmi ces personnes, 81% avaient des lésions apparentes (AIN) dont 52% présentaient des lésions de haut-grade (AIN-2,3). Une autre étude a montré que la progression chez les HARSAHs VIH-séropositifs était relativement fréquente : 38 à 49% des 277 HARSAHs VIH-séropositifs sans lésions ou avec AIN-1 au début de l'étude ont progressé vers des lésions d'AIN-2,3 sur une période de 4 ans (148). La progression fréquente des AIN a également été observée dans une étude impliquant des hommes VIH-séropositifs réalisée à San Francisco, où 62% de ces individus présentant une AIN initiale de grade 1 ont évolué vers un haut-grade en deux ans (149). À Seattle, 15% des HARSAHs VIH-séropositifs sans lésion progressèrent vers un AIN-2,3 par rapport à 8% des HARSAHs VIH-séronégatifs pendant une période moyenne de 21 mois (150).

Le taux de régression des lésions anales n'est pas bien connu chez les HARSAHs VIH-séropositifs. La pratique médicale actuelle suggère qu'une fois que des lésions de haut-grade se sont développées, les lésions régressent rarement (151). Le même phénomène est observé dans le cas de l'infection du col utérin, où le taux de régression diminue parallèlement avec l'évolution des lésions vers un grade plus élevé (152). Par ailleurs, une étude réalisée à Montréal sur une cohorte de HARSAHs VIH-séropositifs, la HIPVIRG (*Human Immunodeficiency and Papilloma Virus Research Group*) cohort study, a estimé les taux d'élimination de l'infection au VPH de type-spécifique. Les résultats indiquent que le VPH-16 a le taux d'élimination le plus faible, avec 12.2 épisodes d'élimination par 1 000 personnes-mois et une période de rétention moyenne de 36 mois (153). Dans cette cohorte, l'infection multiple était commune, ce qui a également été observé par d'autres groupes (87,154). Palefsky et al. démontrèrent l'association entre l'infection multiple et la présence et la progression de l'AIN vers un grade plus élevé. Ainsi, 73% des HARSAHs VIH-séropositifs à l'étude comparativement à 23% des HARSAHs VIH-séronégatifs étaient infectés par plus d'un type de VPH (87).

Enfin, l'introduction de la TAR a eu peu d'impact positif sur l'histoire naturelle de l'infection au VPH, sinon qu'elle a amélioré le taux de survie des personnes VIH-

séropositives donnant suffisamment de temps au cancer pour se développer chez ces dernières (99,101).

Finalement, aucune étude à ce jour n'a encore examiné l'histoire naturelle de l'infection anale par le VPH le plus prévalent, le VPH-16. L'élucidation de l'histoire naturelle de VPH-16 dans le cadre de l'infection anale chez les HARSAs VIH-séropositifs est pourtant nécessaire pour deux raisons majeures. D'un côté, ces individus sont les plus à risque de développer un cancer de l'anus et, de l'autre, le VPH-16 est détecté dans la majorité de ces cancers, ce qui suggère que l'apport de ce type dans la carcinogenèse comparativement aux autres types est éminent. Les résultats de telles études permettront de déterminer quels sont les facteurs pouvant servir de marqueur pour la détection des individus à risque plus élevé de progression de l'AIN.

1.3.4. Facteurs prédictifs de progression de l'infection anale

L'infection par les VPHs est très commune au sein de la population générale. Seulement une minorité des personnes infectées développeront des néoplasies intraépithéliales qui souvent régressent spontanément. Par contre, chez certains individus, ces lésions peuvent évoluer en cancer invasif. La progression jusqu'au stade cancéreux est inhabituelle et sa faible fréquence dans la population suggère que plusieurs facteurs doivent être impliqués dans le processus de carcinogenèse pour qu'il y ait développement d'un cancer. Ces facteurs peuvent être divisés en trois classes : les facteurs viraux, les facteurs de l'hôte et les facteurs environnementaux.

L'implication de ces facteurs dans la progression des lésions est moins connue dans le cas de l'infection anale. Pourtant, ces déterminants, principalement les facteurs viraux et les facteurs de l'hôte, seraient extrêmement utiles pour la détection des individus à risque de progression et leur suivi pourrait être inclus comme ligne directrice dans un programme de dépistage des AIN.

1.3.4.1. Facteurs viraux

Le facteur le plus important associé au développement d'un cancer du col utérin ou anal est certainement l'infection aux VPHs, car plus de 99% des cancers du col utérin et une majeure partie des cancers de l'anus sont positifs pour les VPH-HR (13,15,155). L'oncogénicité d'un type est déterminée par l'activité des protéines E6 et E7, des oncoprotéines ayant la capacité d'engendrer la transformation des cellules infectées suite à l'accumulation d'anomalies. En termes de fréquence, le VPH-16 et le VPH-18 sont les types les plus souvent détectés dans les cancers du col de l'utérus et de l'anus. L'infection par ces types progresserait plus rapidement que les infections aux autres VPHs. Insinga et al. analysèrent les taux de progression et de régression des infections des types 6, 11, 16 et 18 chez des jeunes femmes après 36 mois de suivi. Les VPH-HR, VPH-16 et VPH-18, obtinrent les taux de progression vers une lésion CIN-2,3 cumulatifs les plus élevés avec des taux respectifs de 16.5% et 8.2% comparativement à 2.1% et 0% pour les types 6 et 11 (156).

Un second facteur prédictif de progression est le nombre de types retrouvés dans une lésion. L'infection simultanée avec plusieurs types a été observée dans maintes études (154,157). Toutefois, son rôle dans la progression des lésions est encore indéterminé. Certaines études rapportèrent que le risque de progression était plus élevé chez les femmes arborant plusieurs types comparativement à celles infectées avec un seul type (158,159). Par contre, d'autres études évaluèrent que le risque n'était pas plus élevé avec une infection unique ou multiple (27,160). Dernièrement, il fut rapporté que le nombre de types pourrait influencer le cours de la carcinogenèse dans le sens qu'une infection multiple était associée à des HSIL (157). Dans le cas du cancer anal, l'association entre le nombre de types de VPH et la progression de la maladie reste encore à déterminer, mais l'infection multiple est très fréquente (94,161) et le nombre de types retrouvés dans les lésions est plus élevé chez les HARSAs VIH-séropositifs comparé aux HARSAs VIH-séronégatifs (154). Toutefois, dans une étude de Salit et al. portant sur des HARSAs VIH-séropositifs, plusieurs VPH-HR furent détectés dans 58% des spécimens anaux. L'infection multiple était significativement associée aux lésions de haut-grade (AIN-2,3) (162).

Un troisième facteur prédictif de progression serait les variantes virales. Cinq variantes ont été identifiées pour le VPH-16 : la variante européenne (E), africaine-1 (Af1), africaine-2 (Af2), asiatique (As) et asiatique-américaine (AsAm). Le risque de développer un cancer serait grandement influencé par le type de variante de VPH-16 impliquée dans l'infection. Ainsi, les variantes non-européennes (Af1, Af2, As et AsAm) seraient plus oncogéniques lorsqu'elles induisent une infection persistante (163,164). D'ailleurs, Villa et al. trouvèrent que les variantes non-européennes persistaient plus souvent [OR : 4 ± 5 ; IC 95%: 1 ± 6 – 12 ± 4] que les variantes européennes et que le risque de HSIL était plus élevé chez les femmes infectées par les variantes non-européennes (164).

Plusieurs études démontrèrent l'association entre la persistance de l'infection aux VPHs oncogéniques et la progression de la maladie. Dans une étude réalisée récemment, il fut rapporté que seules les femmes arborant une infection persistante développaient une lésion CIN-2,3 lorsqu'elles présentaient un LSIL ou un ASCUS (165). L'association entre la persistance d'une infection et l'incidence de SIL fut également confirmée par Schlecht et al., qui montrèrent que les risques relatifs (RRs) de SIL et de HSIL étaient généralement plus élevés avec une infection persistante par les types 16 et 18 (166). Récemment, une équipe démontra qu'une infection qui persistait plus de 6 mois était le plus important prédicteur de progression vers un plus haut-grade que CIN-1 (OR = 18.6; IC 95% = 2.5 – 136.5) (167). Dans le cas de l'infection anale, le rôle de la persistance est difficile à déterminer vu le haut taux de progression de l'AIN et la grande prévalence des AIN de haut-grade (94,148,149). À ce jour, peu d'études ont analysé prospectivement le cours de l'infection anale. Lacey et al. rapportèrent dans une étude sur des HARSAs VIH-séropositifs que pour 24 des 38 sujets ayant complété toutes les visites de suivi, les mêmes types étaient détectés durant une période de 18 mois (168). Ces résultats suggèrent que la persistance de l'infection est très fréquente chez les HARSAs VIH-séropositifs. Toutefois, cette étude ne tient pas compte de la possibilité qu'il y ait eu des réinfections suite à la clairance de l'infection initiale. La fréquence de l'infection persistante rapportée chez les individus à l'étude pourrait être inexacte et d'autres études sont nécessaires pour confirmer ce fait.

La charge virale fut initialement suggérée comme marqueur prédictif de progression. Le risque de développer un cancer était plus élevé chez les femmes ayant une plus importante charge virale, ce qui augmenterait les chances d'intégration (169). Les infections avec une charge virale élevée avaient plus de chance de persister, surtout lorsque le type 16 était impliqué (170). Une charge virale élevée fut également associée à la présence de lésions de haut-grade pour les femmes à risque ou infectées par le VIH (132). Les femmes avec une charge virale élevée avaient plus de risque de développer une LSIL ou HSIL dans une population de femmes non-infectées par le VIH au Brésil, bien que dans ce dernier cas, le risque était moins significatif (171). Ainsi, pour les types 16 et 33, une grande charge virale épisomale était prédictrice de CIN-2,3 (131,172). Dans le cas de l'infection anale, l'association entre la charge virale et la progression de l'infection n'a pas encore été étudiée. Salit et al. démontrèrent que dans une cohorte de HARSAs VIH-séropositifs, une charge virale du VPH-16 élevée était associée avec un plus haut-grade d'AIN (162). Par contre, une autre équipe, travaillant cette fois autant chez les hommes que chez les femmes VIH-séropositifs, ne purent déterminer une association significative entre la charge virale des VPHs de type 16 et 18 et la présence d'anomalies visibles par anoscopie (16).

Dans la majorité des cancers anogénitaux, le VPH est retrouvé sous la forme intégrée, tandis que dans les lésions précancéreuses, le VPH est souvent retrouvé sous la forme épisomale (173). La présence d'intégration n'est pas exclusivement restreinte aux cancers et aux lésions de haut-grade (174). Tel que mentionné précédemment, il arrive que l'ADN viral intégré soit détecté dans les épithéliums normaux et dans les lésions de faible grade (128,131). D'un point de vue théorique, il est possible que la manifestation de l'intégration dans les premières phases de l'infection chez un individu provoque la progression des lésions de bas-grade vers un grade plus élevé. Donc, l'intégration pourrait représenter un biomarqueur prometteur pour la détection des lésions à risque de progression.

1.3.4.2. Facteurs de l'hôte

Le tabagisme ne semble pas avoir un rôle immédiat dans la progression de l'infection, mais représenterait un cofacteur important dans l'acquisition d'une infection aux VPH-HR et serait associé au cancer du col utérin et de l'anus (98,175). Ainsi, plusieurs groupes démontrèrent que le risque d'acquérir une infection par un VPH-HR était élevé chez les femmes qui fumaient au moment de l'étude et que ce risque augmentait avec le nombre de cigarettes consommées (176,177). Toutefois, l'association entre l'infection anale et le tabagisme est encore incertaine, même si le tabagisme a été associé au cancer anal. Park et al. ne trouvèrent aucune association entre l'infection anale au VPH et le tabagisme (178). Un autre groupe démontra une association entre l'infection anale et une histoire de tabagisme ($p=0.03$) et entre la présence d'anomalies cytologiques avec le tabagisme actuel ($p=0.03$) chez des HARSAs (179). L'effet du tabagisme sur la progression de l'infection anale reste controversé. Ces résultats contraires pourraient résulter de la difficulté de mesurer l'exposition réelle aux dérivés carcinogènes du tabac.

L'immunosuppression associée à l'infection au VIH permet le développement d'infections opportunistes. Les individus VIH-positifs sont particulièrement à risque de contracter une infection au VPH. La prévalence d'infection du col utérin ou anale augmente avec la diminution du décompte cellulaire des CD4 (180,181). Les individus VIH-positifs sont aussi plus à risque de développer un cancer anogénital relié à l'infection au VPH par rapport à la population générale (99). Palefsky et al. démontrèrent que la progression de l'AIN de bas-grade vers un AIN de haut-grade au cours de l'infection au VPH était associée à un faible nombre de lymphocytes CD4 (149). Par contre, Strickler et al. démontrèrent que l'infection au VPH-16 était indépendante du nombre de lymphocytes CD4 comparativement à l'infection par les autres VPHs (182). Donc, un décompte des lymphocytes CD4 élevé diminuerait le risque de progression de l'infection aux VPHs excepté pour l'infection au VPH-16. Quant au rôle de la TAR sur le cours de l'infection anale, il ne semble pas y avoir d'effet sur l'éradication de l'infection au VPH même si l'immunité est partiellement reconstituée (68,183). La TAR permettrait d'allonger l'espérance de vie des individus traités et de ce fait, de donner le temps nécessaire au cancer de se développer.

Les pratiques sexuelles auraient un impact à plusieurs niveaux sur le cours de l'infection au VPH. Le nombre de partenaires sexuels serait associé avec l'acquisition d'une infection au VPH (143,184). L'âge à la première relation sexuelle aurait un impact sur la présence de lésions de haut-grade (CIN-3), les femmes ayant eu des relations précoces (avant l'âge de 16 ans), ayant plus de risque de développer un CIN-3 (OR = 3.23; IC 95% = 1.33 – 7.69) (184). Le risque de développer un cancer de l'an us est grand chez les hommes ou les femmes pratiquant le sexe anal, mais particulièrement chez les hommes (98). L'incidence de cancer anal est élevée chez les HARSAHs et l'est encore plus chez les HARSAHs VIH-séropositifs (68). Chez les HARSAHs, le risque de développer un cancer de l'an us est le plus élevé chez les hommes rapportant avoir plus de 130 relations homosexuelles par rapport aux hommes sans historique de relations anales (OR = 17.6; IC 95% = 1.3 – 234) (98).

Quant aux facteurs génétiques, il semblerait que certains allèles du HLA (antigène des leucocytes humains) de l'hôte infecté puissent jouer un rôle dans la progression de l'infection au VPH. Les gènes du HLA sont très polymorphiques dans la population et le niveau de réponse des lymphocytes T envers un antigène varierait conséquemment. Ainsi, les femmes arborant certains allèles seraient moins susceptibles de développer un cancer du col utérin tandis que la présence d'autres allèles serait associée à un plus grand risque de cancer.

Tout d'abord, Cuzick et al. conclurent que l'allèle DQB1*0301 était fortement associé au cancer du col causé par les types autres que le VPH-16, tandis que l'allèle DQB1*0501 semblait avoir un effet protecteur contre le développement du cancer chez des femmes britanniques (185). Dans une autre étude, cette fois-ci sur des femmes brésiliennes, l'haplotype DRB1*1602-DQB1*0201 était associé à un risque plus faible de développer une infection, qu'elle soit transitoire ou persistante, et les haplotypes DRB1*1602-DQB1*0502 et DRB1*0807-DQB1*0404 étaient plutôt associés à un risque accru de persistance (186). Ainsi, les femmes arborant ces deux derniers haplotypes avaient un plus grand risque de développer une infection persistante et conséquemment de développer un cancer du col de l'utérus. Chez des japonaises atteintes de cancer du col, les allèles DRB1*1501 et DQB1*0602 étaient plus fréquentes chez les femmes infectées par le

prototype du VPH-16 (187). Ainsi, selon la population à l'étude, l'association entre le risque de cancer du col et le HLA varie grandement.

Ces différences dans les associations pourraient être dues aux types impliqués dans l'infection. Araujo et al. montrèrent que la variabilité génétique du VPH-16 pouvait influencer ces associations (188). Par exemple, les femmes portant l'allèle DQB1*05 et infectées par la variante AA du VPH-16 avaient un risque de cancer du col plus faible que les femmes arborant le même allèle et infectées par le prototype E. Cette différence pourrait être attribuée aux différentes propriétés biologiques des variantes. Quant au cancer anal, peu d'études investiguèrent le rôle du HLA et des variantes sur le risque de développer ce cancer. Da Costa et al. montrèrent que le risque d'AIN de haut-grade (AIN-2,3) était plus élevé pour les individus infectés par la variante G131 du VPH-16 comparativement aux individus infectés par le prototype (189).

1.3.4.1. Facteurs environnementaux

Plusieurs autres co-facteurs peuvent être impliqués dans la carcinogenèse du VPH. Ainsi, l'utilisation de contraceptifs oraux à long terme et une parité élevée sont des facteurs de risque de progression de l'infection du col de l'utérus vers des HSIL ou un cancer (190). La co-infection avec d'autres agents infectieux transmissibles sexuellement autre que le VIH, tel que la chlamydia, peuvent augmenter le risque de développer un cancer du col utérin ou de l'anus (191).

En résumé, le suivi de tous ces facteurs (viraux, de l'hôte ou environnementaux) pourrait servir à déterminer quels sont les individus les plus à risque de développer un cancer anogénital relié à l'infection au VPH.

CHAPITRE DEUXIÈME : PROJET DE RECHERCHE

Le présent projet de recherche s'inscrit dans une lignée d'études qui ont pour but de mieux définir le rôle du VPH dans l'étiologie des cancers anogénitaux. Les prochains chapitres présentent de nouvelles évidences de l'impact du VPH-16 sur le développement et la progression des néoplasies intraépithéliales anales chez des HARSAs VIH-séropositifs et accroît notre compréhension de l'histoire naturelle de l'infection de l'anus au VPH-16. L'application clinique de ces concepts dans le cadre d'un programme de dépistage du cancer de l'anus permettra de mieux orienter les patients à risque vers le traitement approprié pour ainsi réduire l'incidence de ce cancer.

Les prochaines sections de ce chapitre étaleront l'importance de réaliser un tel projet et détailleront l'approche utilisée pour l'étude de l'histoire naturelle de l'infection anale par le VPH-16.

2.1. PROBLÉMATIQUE

Les programmes de dépistage des CIN implantés depuis 30 ans se sont révélés efficaces dans la prévention du cancer du col de l'utérus, ce qui porte à croire que l'implantation de telles stratégies pour la prévention du cancer de l'anus pourrait également réduire son incidence dans la population. L'absence de lignes directrices pour le dépistage des AIN est le résultat de notre pauvre compréhension de l'histoire naturelle du VPH lors de l'infection anale chez les individus à risque, notamment les HARSAs VIH-séropositifs. De ce fait, il est important de déterminer quels sont les facteurs pouvant intervenir dans la progression de l'infection anale. Deux de ces facteurs, la charge virale et l'intégration, semblent tenir des rôles décisifs sur l'issue de l'infection de l'anus.

Pourquoi analyser l'association entre la charge virale et l'intégration du VPH oncogénique dans la maladie pré-néoplasique anale? Les études le démontrent : la charge virale du VPH et le cancer du col de l'utérus sont étroitement associés. De plus, l'intégration du VPH est considérée comme une étape importante dans la transformation des cellules infectées du col de l'utérus et serait, conséquemment, un prérequis pour le développement d'un phénotype malin. Donc, il serait logiquement possible que ces paramètres soient aussi impliqués dans les processus de carcinogenèse anale, puisque d'un point de vue étiologique et histopathologique, plusieurs similitudes entre le cancer du col utérin et le cancer anal ont été répertoriées dans la littérature (110). Par contre, les rôles de la charge virale et de l'intégration n'ont jamais vraiment été investigués dans le cadre de l'infection anale. (119)

Suite à cette interrogation, une autre question peut se poser : pourquoi étudier ces facteurs chez les HARSAs VIH-séropositifs? L'infection anale au VPH a été associée à l'homosexualité et à la séropositivité au VIH. Conséquemment, c'est chez les HARSAs VIH-séropositifs que la prévalence de l'infection anale et le risque de développer un cancer de l'anus sont les plus élevés. L'histoire naturelle de l'infection anale doit donc être rigoureusement examinée chez ces individus pour déterminer les rôles exacts de la charge virale et de l'intégration sur la progression de l'infection.

Finalement, l'étude de l'infection par le VPH-16 revêt une importance particulière, puisque la détection de son ADN est très fréquente chez les HARSAs VIH-séropositifs et que son pouvoir oncogène est le plus grand parmi les autres types oncogéniques. Le suivi particulier de la charge virale et de l'intégration de ce type au cours de l'infection anale pourrait représenter une bonne stratégie à inclure dans un programme de dépistage de l'AIN pour l'identification des personnes à haut-risque de progression.

2.2. PRÉSENTATION DES HYPOTHÈSES ET DES OBJECTIFS

Les études sur l'infection anale par les VPHs chez les HARSAs VIH-séropositifs font défaut sur le plan de l'histoire naturelle. Pourtant, il est nécessaire d'entreprendre de telles études afin de définir les déterminants pouvant influencer la progression maligne des lésions précancéreuses. Ainsi, comme il a été suggéré pour l'infection du col de l'utérus, notre groupe de recherche propose que la charge virale et l'intégration puissent représenter des biomarqueurs de progression de l'infection anale dans la phase précancéreuse i.e. la progression de l'AIN de bas-grade (AIN-1) vers un grade plus élevé (AIN-2,3). À notre connaissance, cette investigation n'a encore jamais été réalisée chez des HARSAs VIH-séropositifs dans le cadre d'une infection anale.

Le but premier de ce projet est de mieux définir l'évolution en cours d'infection des charges virales épisodiques et intégrées et de l'intégration du VPH-16 pour des HARSAs VIH-séropositifs dans le cadre de l'infection anale. Dans ce contexte, l'association entre les charges virales épisodiques et intégrées du VPH-16 et le grade de l'AIN sera déterminée. L'intégration du VPH-16 sera confirmée par une seconde méthode afin de démontrer la présence d'une jonction virale-cellulaire et ainsi identifier le site d'intégration dans le génome de l'hôte.

L'étude porte sur 135 HARSAs VIH-séropositifs et infectés par le VPH-16 recrutés pour l'étude de la cohorte HIPVIRG qui a été décrite précédemment (153). Globalement, des questionnaires ont été soumis aux participants au recrutement et en cours de suivi. Des échantillons anaux ont été prélevés et des biopsies ont été effectuées au cours de l'anuscopie à haute résolution faite aux 6 mois, pour des analyses par PCR en temps réel et pour des études d'histologie.

2.3. MÉTHODOLOGIE

Pour répondre aux objectifs, deux techniques seront utilisées. La première, le PCR en temps réel, est une méthode quantitative qui permettra de mesurer les charges virales épisomales et intégrées du VPH-16. La deuxième technique, le DIPS-PCR, permettra de confirmer l'intégration du VPH-16 et de caractériser les jonctions virales-cellulaires. Les manipulations effectuées sont détaillées dans l'article ci-joint.

2.3.1. PCR en temps réel

Pour la quantification des charges virales, les deux tests de PCR en temps réel utilisés pour la détection des formes épisomales et intégrées sont basés, pour le premier test, sur les méthodes initialement décrites par Peitsaro et al. et Gravitt et al., et pour le deuxième test, sur la méthode par Azizi et al. (129,172,192). Sommairement, le PCR en temps réel permet de détecter l'accumulation de la fluorescence émise par une sonde fluorogénique (127). La quantité d'émission du marqueur fluorescent est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés et est mesurée à chaque cycle d'amplification. Lorsque la réaction atteint la phase exponentielle d'amplification, le cycle seuil (Ct) où il y a la première augmentation significative du signal émis (le niveau de fluorescence est plus élevé que le bruit de fond) peut être déterminé (193). Le Ct peut ensuite être reporté sur une courbe standard et servira à déterminer la quantité d'ADN initiale (avant réaction).

Pour la quantification du VPH-16, deux gènes seront ciblés: E6 et E2. L'estimation de la charge virale totale (épisomale et intégrée) se fait par la mesure du gène E6. La charge virale épisomale correspond au nombre de copies du gène E2. La charge virale intégrée est évaluée en soustrayant le nombre de copies du gène E2 du nombre de copies du gène E6. Ces charges virales brutes doivent par après être normalisées selon la quantité de cellules du spécimen en quantifiant cette fois-ci un gène cellulaire dit constitutif (β -actine ou β -globine) (162,172,194). La normalisation des charges virales se fait à l'aide des formules suivantes : (nombre de copies du gène E2 / nombre de copies du gène de la β -globine) x 2 pour la charge virale épisomale et (nombre de copies du gène E6 / nombre de copies du

gène de la β -globine) x 2 pour la charge virale totale. La charge virale intégrée est toujours obtenue par la soustraction de la charge épisomale de la charge totale. Ces charges virales sont donc exprimées en nombre de copies de génome viral par équivalent cellule. Les charges virales ainsi obtenues seront ensuite comparées avec le grade d'AIN déterminé par histologie.

La présence d'intégration peut être évaluée par PCR en temps réel. Habituellement, quand le VPH s'intègre, le cadre de lecture du gène E2 est détruit (49). Ainsi, lors de la quantification des charges virales, le nombre de copies du gène E2 (E2) doit forcément être plus faible que le nombre de copies du gène E6 (E6) qui reste intact. Un ratio $E6/E2 \geq 2.0$ ou un ratio $E2/E6 < 0.5$ fut déterminé comme point de référence pour la présence d'intégration (129,131,170).

2.3.2. DIPS-PCR

La deuxième technique utilisée au cours de ce projet est le DIPS-PCR (*Detection of Integrated Papillomavirus Sequences by ligation-mediated PCR*) précédemment décrite par Luft et al. (195). Cette méthode consiste à détecter le site de rupture dans l'ADN viral et le site d'intégration dans le génome de l'hôte en amplifiant les jonctions virales-cellulaires. Le produit de PCR final peut ensuite être séquencé et comparé aux séquences génomiques virales et humaines dans les bases de données pour déterminer quelle portion du gène E2 est détruite et dans quel chromosome et gène humain le VPH s'est intégré. Cette dernière application du DIPS-PCR est particulièrement intéressante, puisqu'elle permettrait de déterminer si l'intégration dans ou à proximité d'un gène cellulaire spécifique pourrait affecter le processus de carcinogenèse. Par exemple, les patients chez qui certains proto-oncogènes pourraient être activés à cause de l'intégration du VPH pourront être identifiés et traités en conséquence du risque potentiellement accru de développer un cancer.

Le PCR en temps réel est un test sensible pour la détection de copies de génome viral en faible nombre. Par contre, la détection de la forme intégrée du VPH peut être compromise quand la forme épisomale est en excès (196). Son application en parallèle avec le DIPS-PCR permettra de déterminer avec une meilleure précision le statut physique du génome du VPH. Une quantité trop grande d'ADN cellulaire peut également compromettre la quantification de certains gènes du VPH-16 (196).

La méthode du DIPS-PCR présente l'avantage, par rapport à une autre technique comme l'amplification des transcrits dérivés des PVs intégrés (APOT) (197), d'être basée sur la détection de l'ADN et non de transcrits et, par conséquent, elle est plus adaptable peu importe le type d'échantillon clinique. Toutefois, la technique dans son ensemble est assez fastidieuse et les mêmes problèmes retrouvés dans le PCR en temps réel peuvent avoir lieu, notamment la contamination croisée, d'où l'importance d'effectuer les manipulations de façon rigoureuse.

CHAPITRE TROISIÈME : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Le manuscrit qui suit présente les résultats de notre analyse de l'histoire naturelle de l'infection au VPH-16 chez des HARSAs VIH-séropositifs. Les résultats décrits dans ce manuscrit furent présentés en partie lors des journées étudiantes organisées par le Centre de recherche de l'Université de Montréal, par le département de microbiologie et d'immunologie de l'Université de Montréal et par le Réseau SIDA/MI. Enfin, ce manuscrit sera soumis pour publication prochainement.

3.1. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE

J'ai participé à la réalisation de ce projet au niveau de l'optimisation de la technique du DIPS-PCR : choix de certaines des amorces, choix des réactifs, choix des paramètres des PCR. J'ai procédé aux manipulations pour la mesure des charges virales du VPH-16 (PCR en temps réel), sauf pour la quantification de la β -globine et la détermination de la présence d'inhibiteurs dans les spécimens anaux qui ont été préalablement effectuées. J'ai effectué toutes les manipulations pour la confirmation de l'intégration du VPH-16 par le DIPS-PCR. Finalement, j'ai participé à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

3.2. EPISOMAL AND INTEGRATED HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPE 16 LOADS DURING THE COURSE OF ANAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA IN MEN INFECTED WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS.

Short Title: HPV-16 episomal and integrated loads in AIN

Jennifer Alvarez ^{1,2}, Alexandra de Pokomandy^{3,4}, Danielle Rouleau ^{1,2}, George Ghattas ^{4,5}, Sylvie Vézina ⁶, Pierre Coté ⁷, John Macleod ⁴, Guy Allaire ¹, Rachid Hadjeres¹, Eduardo L. Franco³, François Coutlée ^{1,2,3}

1- Départements de Microbiologie et Infectiologie, Pathologie, et Laboratoire de virologie moléculaire, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

2- Départements de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

3- Division of Cancer Epidemiology, McGill University, Montreal, Qc, Canada.

4- Department of Medicine and Immunodeficiency Clinic, McGill University Health Center, Montreal, Qc, Canada.

5- Department of Medicine, McGill University, Qc, Canada.

6- Clinique Médicale l'Actuel, Montréal, Qc, Canada.

7- Clinique Médicale du Quartier Latin, Montréal, Qc, Canada.

Address correspondence to: François Coutlée, 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.

Disclaimers: The authors do not have conflicts of interest to declare.

Word count: 3488 words. 5 figures and tables.

ABSTRACT (250 words)

Objectives. To assess levels of episomal and integrated HPV-16 loads in HIV-seropositive men having sex with men (MSM) during anal infection and to study the association between HPV-16 loads and anal intraepithelial neoplasia (AIN).

Study design. A cohort study of 247 HIV-positive MSM followed each 6 month for 3 years. During the study period, 135 (54.7%) men provided 665 HPV-16-positive anal samples.

Methods. Episomal and integrated HPV-16 loads were measured with quantitative real-time PCR assays. HPV-16 integration was confirmed in samples with a HPV-16 E6/E2 ≥ 2.0 with PCR-sequencing to demonstrate the presence of viral-cellular junctions.

Results. HPV-16 DNA forms in anal samples were characterized as episomal only in 627 samples (94.3%), mixed in 22 samples (3.3%) and integrated only in 9 samples (1.4%). HPV-16 episomal load (odds ratio (OR)=1.5, 95% confidence interval (CI):1.1–2.1), number of HPV types (OR=1.4, 95% CI:1.1–1.8) and current smoking (OR=4.8, 95% CI:1.3–18.6) were associated with high-grade AIN (AIN-2,3) after adjusting for age and CD4 cell counts. Integrated HPV-16 load was not associated with AIN-2,3 (OR=1.1, 95% CI:0.4–1.1). Considering men with AIN-1 at baseline, 17 (70.8%) of the 24 men who progressed to AIN-2,3 had episomal HPV-16 loads ≥ 72.3 HPV-16 copies per cell compared to 3 (23.1%) of 13 men who did not progress (OR 6.7, 95% CI:1.3–33.0). Integration was detected in samples from men without AIN, with AIN-1 or AIN-2,3.

Conclusions. High episomal HPV-16 loads but not HPV-16 integration were predictive of AIN-2,3 or progression from AIN-1 to AIN-2,3.

Key words: HPV-16, HPV natural history, HPV load, AIN, integration, MSM, HIV

Introduction

Previous studies have shown that high-grade anal intraepithelial neoplasia (AIN-2,3), the precursor lesion for anal cancer, will be detected in up to 50% of HIV-seropositive men over four years (24,29,38). Human papillomavirus (HPV) is a necessary cause for AIN and anal cancer and more than 95% of HIV-seropositive MSM are infected by HPV in the anal canal (14,28,36). AIN is detected in HIV-seropositive men by anal cytology and high-resolution anoscopy (HRA) (6). Since HRA is an invasive technique and since cytology lacks sensitivity (5,7), it would be desirable to find HPV biomarkers identifying HPV-infected individuals at higher risk for disease progression who could benefit the most from HRA.

Prevalent AIN-2,3 or progression to higher grades of AIN have been associated with anal HPV infection with types 16, 18 or 31, multiple type HPV infections, HPV-16 E6 variants and lower blood CD4 T cell counts (8,9,11,18,25,26,28,29,34,36,40). HPV-16 is the most common genotype detected in high-grade anogenital intraepithelial neoplasia and invasive cancer (14,37,39). We have previously shown in HIV-seropositive women that HPV-16 DNA viral load was associated with HPV-16 persistence and high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN-2,3), a disease sharing clinical and histological similarities with AIN (12,13,42). A recent study on HIV-seropositive men also reported that high HPV-16 viral loads were associated with AIN-2,3 (36). In genital samples, HPV-16 genome can be detected as an episome or can be integrated into the host cellular DNA. Integration of high-risk HPV types into cellular DNA is considered to be a key event in the progression of intraepithelial neoplasia to invasive cancer (32). The HPV-16 E2 gene is disrupted when HPV-16 integrates into cellular DNA, resulting in overexpression of HPV oncogenes (32). The contribution of episomal and integrated HPV-16 forms to the role of HPV-16 load in AIN-2,3 as well as the longitudinal assessment of HPV-16 load and integration in the natural history of HPV infection have not been well defined.

The objectives of the current study were to describe HPV-16 loads of episomal and integrated forms in the course of anal infection and assess if they were associated with prevalent AIN-2,3 or progression to low-grade AIN (AIN-1) and AIN-2,3.

Materials and methods

Study protocol. Subjects for the current report were selected from individuals participating in the Human Immunodeficiency and Papilloma Virus Research Group (HIPVIRG) cohort, a longitudinal study on the natural history of HPV infection and AIN in HIV-seropositive MSM. The eligibility criteria and study protocol of the HIPVIRG cohort have been described previously (11). Briefly, MSM aged 18 to 65 years under HAART or expected to be treated with HAART within the next 6 months, were enrolled from January 2002 through January 2005 after giving written informed consent. The study was approved by institutional review boards at all sites. For the current analysis, we included only participants who tested positive for anal HPV-16 DNA at least once in the study.

Participants were evaluated at a baseline visit and every 6 months for 3 years with a self-administered questionnaire, blood CD4 T cell counts and plasma HIV RNA load (11). Epithelial cells from the anal canal were collected with a Dacron swab and resuspended in 1.5 ml of PreservCyt (Cytoc Corporation, Boxborough, MA), as previously described (11). HRA was performed after application of 3% acetic acid at baseline and repeated yearly thereafter for those without AIN or with AIN-1, and every 6 months for individuals with AIN-2,3 (11). Subjects without anoscopically visible anomaly were classified as negative for AIN and did not have a biopsy. Biopsies of all aceto-white areas were obtained. Histological slides were reviewed by two pathologists and graded using the criteria routinely used for CIN into normal, AIN-1, AIN-2, AIN-3 (21).

Real-time PCR assays for HPV16 E6 and E2 loads. Sample DNA from anal cells in Preservcyt was extracted with Master pure™ (Epicentre, Madison, WI) (14). β -globin DNA was detected by amplification with PC04 and GH20 primers (14). β -globin-positive samples were amplified for HPV DNA with PGMY primers and genotyped with the reverse Line-blot detection system for 36 genital types, as previously described (11,14). HPV-16 positive samples were screened for the presence of inhibitors by amplification of internal controls for β -globin and HPV-16 E6 in a Light Cycler PCR and detection system (Roche Molecular Systems, Laval, Quebec), as reported previously (2,12). The presence of

PCR inhibitors was suspected when 1000 copies of one or both internal controls generated a signal corresponding to less than 700 copies (12). All samples tested were free of inhibitors. Two μ l of purified sample were tested in duplicate in each real-time PCR assay according to published protocols for quantification of HPV-16 E6, HPV-16 E2 DNA, and β -globin DNA to estimate the cell content of samples (2,12). Since HPV-16 integration often disrupts the HPV-16 E2 gene (1), the presence of integrated HPV-16 DNA was suspected for specimens with ratios of HPV-16 E6 and E2 (HPV-16 E6/E2) ≥ 2 , as previously demonstrated for HPV-16 and HPV-33 (2,12,17,35). Integrated viral loads were obtained by subtracting the number of HPV-16 E2 copies (episomal form) from the number of HPV-16 E6 copies (episomal and integrated forms).

Detection of integrated papillomavirus sequences with PCR (DIPS-PCR). The physical state of HPV-16 DNA for samples with an E6/E2 ratio ≥ 1.5 was confirmed with DIPS-PCR as described by Luft *et al* (20). Due to limitations in the amount of sample available, 0.6 μ g of extracted DNA was digested with 10 units Sau3A I but not with Taq1. Briefly, digested DNA was ligated with the enzyme-specific adaptor AL1-AS1 overnight with T4 DNA ligase and then amplified with 0.2 μ M of one of each of the HPV-16 primers described by Luft *et al* (20) and 16E2-3 (2). The exponential PCR reaction was performed with each nested HPV-16 primers and adaptor-specific primer AP1 on products from the first PCR run (20). A control reaction amplifying a chromosome 21 locus was also performed using primers DIPS1L for the first round of PCR and DIPS2L for the nested PCR (20). To determine if they contained both viral and cellular DNA, amplicons of unexpected length were excised from the agarose gel after electrophoresis and were sequenced with the forward and reverse primers using the fluorescent cycle-sequencing method (BigDye terminator ready reaction kit, Perkin-Elmer) on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer system (Applied Biosystems). The sequences obtained were compared with sequences in the NCBI database using the BLAST program to determine the presence of HPV-16 and human sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Statistical analysis. The biopsy with the highest grade was considered if multiple biopsies were obtained at the same visit. Univariate analysis was first performed to identify factors associated with AIN-2,3 or AIN progression. We used a Fisher's exact test for categorical

variables and the Mann-Whitney test and the Student T test for continuous variables (including CD4 counts, HPV-16 viral loads and age). The normality of the data distribution was determined using the Shapiro-Wilk W normality test. The magnitude of the association between HPV-16 load and AIN was assessed by calculating odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (CI) by unconditional multiple logistic regression while controlling for factors significant in univariate analysis. Episomal HPV-16 loads at the first visit, at the visit before progression, at progression or at the last HPV-16-positive visit for non-progressors, were compared by Wilcoxon rank sum test. Correlation between HPV-16 loads and CD4 T cell counts, HIV viral load or age was measured with the Spearman rank correlation coefficient. Statistical analyses were performed with STATISTICA version 6 software (StatSoft, Tulsa, OK). All statistical tests were two-sided and considered being statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Study population at base line. The baseline characteristics of the 247 participants in the HIPVIRG cohort have been described recently (11). The current analysis only included participants infected with HPV-16 at least once. The demographic and clinical characteristics of these 135 subjects are provided in Table 1. HPV-16 episomal and integrated loads measured on the first HPV-16-positive sample for each participant extended over a wide range of 0.1-31,289.0 HPV-16 DNA copies per cell (median, 22.3) and 0-31.7 HPV-16 DNA copies per cell (median, 0), respectively. Episomal HPV-16 load correlated significantly with CD4 cell counts (correlation coefficient $R = -0.23$, $P = 0.007$) and with HIV RNA load ($R = 0.20$, $P = 0.02$), but not with age ($P = 0.90$). There was no correlation between integrated HPV-16 load and CD4 cell counts or HIV RNA load ($P \geq 0.10$).

Risk factors for AIN-2,3. Considering the first HPV-16-positive visit with complete histological and virological results, 18.5%, 37.8% and 42.9% of 135 men had no AIN, AIN-1 and AIN-2,3, respectively (Table 1). Logarithm-transformed HPV-16 episomal loads but not HPV-16 integrated loads were distributed normally. Compared to men

without AIN, episomal HPV-16 loads were nearly two logs higher in anal samples from men with AIN-2,3 (P=0.002) and one log higher in men with AIN-1 (P=0.05) (Figure 1a). The levels of episomal HPV-16 DNA in men without AIN overlapped substantially with those in men with AIN-1 or AIN-2,3. In contrast, HPV-16 integrated loads were similar across all grades of anal lesions (Figure 1b). An HPV-16 E6/E2 ratio ≥ 2 was obtained on samples from 3 (12%, 95% CI: 3.3-30.8) of 25 men without AIN, 5 (9.8%, 95% CI: 3.8-21.4) of 51 with AIN-1 and 2 (3.5%, 95% CI: 2.7-12.4) of 58 men with AIN-2,3.

In univariate analysis, current smoking, a higher number of HPV types and a higher episomal HPV-16 but not integrated HPV-16 load increased the risk for AIN-2,3 (Table 2). These factors remained significant in multivariate analysis, with current smoking being the most significant factor (Table 2). In multivariate analysis, a higher number of HPV types and lower CD4 counts were significantly associated with AIN-1 (Table 3).

Progression to AIN-2,3. We then investigated if HPV-16 episomal and integrated loads could identify men at higher risk of progression to higher grades of AIN over three years. Of the 62 HPV-positive men followed for at least three visits over ≥ 1 year, 17 men without AIN or with AIN-1 at accrual did not progress (designated as ‘non-progressors’) while 45 progressed (‘progressors’) from no AIN to AIN or from AIN-1 to AIN-2,3 (Table 1). Only one man with diffuse AIN-2,3 developed invasive cancer. HPV-16 integrated forms were detected as frequently in men with progressive AIN (8 (17.8%, 95% CI 9.0%-31.6%) of 45) compared to those without progression of AIN-1 or no AIN (4 (23.5%, 95% CI 9.1%-47.8%) of 17, p=0.72). Similar results were obtained considering separately each category of progression, although the number of participants was small in each category (data not shown).

Episomal HPV-16 loads were higher in progressors (51.3 \pm 17.8 HPV-16 copies per cell) compared to non-progressors (12.0 \pm 22.4 HPV-16 copies per cell), but the difference was not statistically significant (p=0.12). The 37 men with AIN-1 at baseline had a median HPV-16 episomal load of 72.3 HPV-16 copies per cell. Of these 37 participants with AIN-1 at baseline, 17 (70.8%) of the 24 men who progressed to AIN-2,3 had episomal HPV-16 loads ≥ 72.3 HPV-16 copies per cell, compared to 3 (23.1%) of 13 men who did not

progress (OR 6.7, 95% CI 1.3-33.0; $p=0.017$). Current smoking (OR 0.5, 95% CI 0.1-2.6), CD4 cell count (OR 0.7, 95% CI 0.3-1.7), number of HPV types (OR 1.3, 95% CI 0.9-1.8), and integrated HPV-16 load (0.5, 95% CI 0-3.0) were not associated with progression from AIN-1 to AIN-2,3.

To further demonstrate that loads of HPV-16 DNA increased over time in men progressing to AIN-2,3, HPV-16 episomal HPV loads at the first HPV-16-positive visit were compared to those obtained at the visit before progression or at progression for progressors, and to those obtained at the last HPV-16-positive visit for non-progressors. Compared to HPV-16 episomal load measured in the first HPV-16-positive sample (median of 37 copies per cell), HPV-16 episomal loads were higher in men who progressed to AIN-2,3 in the sample obtained at progression (median load, 129 copies per cell, $p=0.003$) or at the visit before progression (median load, 96 copies per cell, $p=0.002$). There was no difference between the first and last samples obtained for those without progression (28.9 versus 9.8 copies per cell, $p=0.53$). The ratio of the HPV-16 episomal load measured at progression over that measured on the first HPV-16 sample was also significantly different for men progressing from AIN-1 to AIN-2,3 (median ratio of 4.72) than men with AIN-1 for the duration of follow-up (median ratio of 0.47; $p=0.047$).

HPV-16 integrated forms in anal samples. Overall, 16 samples from 14 men had an HPV-16 E6/E2 ratio between 1.5 and 2.0 and 31 samples from 17 men had a ratio ≥ 2.0 suggestive of HPV-16 integration. The latter 17 participants had a mean of 4.2 ± 0.5 (range 1 – 7) HPV-16-positive samples of which a mean of 1.8 ± 0.4 (range 1–7) samples per participant generated a HPV-16 E6/E2 ratio ≥ 2.0 . At the visit at which integration was first detected, 4 men did not have AIN, 7 had AIN-1 and 6 had AIN-2,3. There was no pattern of HPV-16 integration during the course of HPV infection: HPV-16 integrated forms could be detected in the first HPV-16-positive sample only ($n=6$), at the middle visit of many HPV-16-positive samples during follow-up ($n=6$), at the last HPV-16-positive visit ($n=2$) or in all samples ($n=3$).

The correlates of having a HPV-16 E6/E2 ratio ≥ 2.0 were then assessed. In univariate analysis, the number of HPV types in sample (OR=0.8, 95% CI: 0.6-0.9) and

HPV-16 episomal load (OR=0.5, 95% CI: 0.3-0.7) reduced the risk of having a HPV-16 E6/E2 ratio ≥ 2.0 , while HPV-16 persistence, AIN grade, age, current smoking, CD4 counts and time on HAART were not significant (data not shown). In multivariate analysis, only HPV-16 episomal load remained statistically significant (OR=0.5, 95% CI: 0.3-0.8).

Episomal HPV-16 DNA will generate amplicons of an expected size with DIPS-PCR. Of the 31 samples from 17 men with E6/E2 ratios ≥ 2.0 , 6 samples did not generate a band with any primers. Twenty five specimens generated fragment(s) of a size different than expected, suggesting HPV-16 integration: sequencing of large amplicons failed in 6 samples, due to unknown reasons as described by others (23), fragments containing viral and cellular sequences were identified in 18 samples while DIPS-PCR failed to resolve the status of HPV due to the small amount of DNA available (Table 4). In all 9 samples from 3 men in which only integrated forms were detected by real-time PCR, the presence of integrated forms was confirmed by DIPS-PCR. Of the 16 samples obtained from 14 men with a E6/E2 ratio between 1.5 and 2.0, only one sample (6.3%) generated a fragment of unexpected size that was shown to contain viral and human sequences. Sites of integration in the human genome are presented in Table 4. In three participants, HPV-16 integration occurred within cellular genes. In one sample, HPV-16 was integrated in a the C1ORF24 gene on chromosome 1, a gene associated with carcinomas (22). Three participants provided more than one sample containing integrated forms (3 of 5, 3 of 3 and 6 of 7 visits): integration sites in the human genome varied from visit to visit for two participants while for a third one, the site of insertion in the genome could not be established with certainty.

DISCUSSION

The findings of this study underscore the importance of episomal but not integrated HPV-16 loads to predict AIN-2,3, similarly to CIN-2,3 in HIV-seropositive women (2). Previous work had demonstrated the association between total HPV-16 load and AIN-2,3 (36) but had not evaluated if the quantity of episomal, integrated or mixed forms increased with the grade of disease. Men with progression from AIN-1 to AIN-2,3 also had higher

quantities of episomal HPV-16 DNA before or at progression. No other factor was associated with progression in that subgroup of participants, possibly due to our small sample size. A greater quantity of episomal HPV-16 could result from greater viral replication and could expose epithelial cells to a greater quantity of HPV oncoproteins, increasing the risk for transformation. As encountered in HIV-seropositive women, there was an important overlap of episomal HPV-16 load values between men without and with AIN (12,36).

Current but not past smoking as well as a higher number of HPV types detected in a sample increased the risk of AIN-2,3. The association between smoking and AIN or anal cancer has been reported by others (10,27). Counseling men to stop smoking could have an impact on the occurrence of AIN-2,3. Several studies have reported that a greater number of HPV types increased the likelihood of AIN-2,3 (14,24,26,27,36). A higher number of HPV types may reflect a lower anti-HPV immunity although there was no correlation between number of HPV types and CD4 cell counts. Multiple types could also act synergistically to induce transformation of epithelial cells.

HPV-16 integration often disrupts the E2 gene, resulting in unregulated expression of HPV oncogenes and activation of human telomerase (32). This process causes deregulated cellular proliferation and increases genomic instability that both contribute to transform cells. Nevertheless, HPV-16 integrated loads and presence of integrated forms were similar across AIN grades in our study. Recent data also showed that integrated HPV-16 DNA can be detected in women with CIN-1 and without CIN (1,4,12,15,31). Others had reported a marginal or no association between integration and CIN-2,3 or cancer in women (4,19). With an optimized assay, integrated HPV-16 loads were similar between HIV-seropositive women without and with CIN-2,3 (2). HPV-33 integration was also not associated with CIN-2,3 (17). Our study suggests that integration occurs in normal mucosal cells or any grade of AIN, and that it is not the driving force for progression of AIN. Considering the important proportion of invasive anogenital cancer containing integrated HPV-16 forms, however, integration may be an important factor in progression from AIN-2,3 to cancer. We could not test this hypothesis as only one individual developed invasive

cancer. One study reported a significant difference in proportion of samples with HPV-16 integration between cervical cancer and CIN-2,3 (16).

One of the newly proposed models of HPV carcinogenesis suggests that HPV integration occurs initially at many sites in the human genome during persistent HPV infection, and that only some integrated HPV molecules will contribute to transformation eventually (41). Episomal HPV-16 DNA inhibits expression from integrated HPV-16 (3). Considering that episomal loads are associated with AIN-2,3, it is unlikely that AIN-2,3 results from uncontrolled expression of E6 and E7 from integrated forms. On the other hand, higher copy number of episomal HPV-16 could result in increased expression of these viral oncogenes. In vitro, high level expression of HPV oncogenes from integrated HPV forms is preceded by the loss of episomal HPV (30,33). If this is so, then integrated HPV may have a role in transformation after the loss of episomal HPV-16 that is the highest in AIN-2,3. Future studies should evaluate expression of HPV-16 E6 and E2 mRNA correlated with episomal and integrated loads. HPV-16 integrated forms were inconsistently detected overtime possibly because they are present at low levels or are a transient phenomenon.

HPV-16 integration is believed to be favored by viral persistence, high viral loads and genomic instability in transformed cells (32). The only factor associated with HPV-16 integration in our study was a low episomal viral load, similarly to previous work on HPV-33 in CIN (17). This association between low episomal HPV-16 loads and integration may reflect the absence of replication of HPV-16 or that integration occurred when HPV-16 replication was shut down by viral or hosts factors.

Our study has several strengths. The status of anal disease was well established. The virology and pathology laboratories were blinded to the results of each other and to the anoscopy findings. Two pathologists examined independently anal biopsies to establish the presence and grade of AIN. The quantitative assays was optimized and controlled for the cellular content and the presence of sample inhibition (2,12). Theoretically, a HPV-16 E6/E2 ratio above 1.0 could suggest integration. Previous work on HPV-6, HPV-16 and 33 have demonstrated that E6/E2 ratios below 2.0 could be caused by assay variability rather

than true differences between E6 and E2 quantities (2,12,17,35). Only one sample with an HPV-16 E6/E2 below 2.0 contained integrated forms. The amounts of cellular DNA tested in our samples were below the levels that can alter HPV-16 E6 quantitation (35). We may still have underestimated HPV-16 integration because of disruptions in genes other than E2 (1,43). Recently, Arias-Pulido et al. demonstrated on micro-dissected samples of invasive cancer in women living in North America that 78.4% of cancers harboured HPV-16 forms with rupture in the E2 hinge (1). DIPS-PCR allowed to accurately assess the physical state of the HPV-16 genome for samples with enough DNA was available for testing. The main limitation of our study was the relatively low number of cohort participants.

In conclusion, our study confirms the association between HPV-16 viral load and AIN. Our results demonstrate that this association is driven by episomal HPV DNA and not because of an increase in the quantity of integrated HPV-16 DNA. Integration of HPV-16 DNA can occur at all stages of AIN and even before. HPV-16 integration seems to be a polyclonal and transient phenomenon initially before invasive cancer. Factors involved in the loss of episomal HPV-16 and clonal expansion of cells containing integrated HPV-16 forms still need to be resolved.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research. We thank Roche Molecular Systems for reagents for PGMY Assays. We thank the Réseau FRSQ-SIDA Maladies Infectieuses for facilitating the recruitment of participants. The Canadian Cancer Society and National Cancer Institute of Canada support the HIPVIRG cohort. A Canadian Institutes of Health Research Team grant supports JA. A.de P. was supported by the Canadian HIV Trials Network post-doctoral fellowship. We would like to thank Jean-Marc Trépanier and Serge Côté for the maintenance of database of the HIPVIRG study and sampling.

Table I. Characteristics of 135 HIV-seropositive men infected by HPV-16.

Variable	No of men (%)	Variable value
<u>Age</u>		
Age categories (years)		
≤ 20	0 (0.0)	
>20 – 30	6 (4.4)	
>30 – 40	42 (31.1)	
>40 – 50	68 (50.3)	
>50 – 60	16 (11.9)	
>60	3 (2.2)	
Average (years)		42.8 ± 7.4
Median (years)		42.3
Range (years)		26.3 – 65.3
<u>Ethnicity</u>		
Caucasian	131 (97.0)	
Asian	1 (0.7)	
Unknown	3 (2.2)	
<u>Smoking</u>		
Current smoker	51 (37.8)	
Past smoker	41 (30.4)	
Never smoked	43 (31.9)	
<u>Illicit IV drug use</u>		
Current user	5 (3.7)	
Past user	8 (5.9)	
Never used	122 (90.03)	
<u>CD4 cell count (cells per µl)</u>		
CD4 < 200	28 (20.7)	
CD4 200 – 400	42 (31.1)	
CD4 > 400	62 (45.9)	
CD4 count not available	3 (2.2)	
Average		413±242
Median		370
Range		0 – 1 260
<u>HIV viral load (copies per mL plasma)</u>		
Average		14 289±57 057
Median		0
Range		0 – 530 690
<u>Anti HIV treatment at inclusion</u>		
Treatment other than HAART	40 (29.6)	
HAART for ≥ 6 months and failure	29 (21.5)	
HAART for ≥ 6 months and success	41 (30.3)	
HAART for < 6 months	21 (15.6)	

No treatment	4 (3.0)
<u>Histology results at first visit</u>	
No AIN	25 (18.5)
AIN-1	51 (37.8)
AIN-2	33 (24.4)
AIN-3	25 (18.5)
AIN of unknown grade	1 (0.7)
<u>Progression to Higher grade of AIN during follow-up for 62 men.¹</u>	
No progression	17 (27.4)
Without AIN	4 (6.5)
With AIN-1	13 (20.9)
Progression	45 (72.6)
no AIN => AIN-1	9 (14.5)
no AIN => AIN-2,3	11 (17.7)
AIN-1 => AIN-2	24 (38.7)
AIN-3 => cancer	1 (1.6)
<u>Persistence of HPV-16</u>	
Persistent infection	91 (67.4)
Transient infection	12 (8.9)
Unknown status	32 (23.7)

Average are means \pm 1 SD. AIN is for cervical intraepithelial neoplasia. HAART is for highly active antiretroviral therapy. Data are no. (%) of subjects, unless otherwise indicated. ¹ 23 men had less than three visits of follow-up and were excluded from the analysis of progression. HPV-16 persistence was defined as the detection on at least three visits (over one year) of HPV-16 DNA.

Table II. Risk factors for the presence of AIN2-3 on the first visit with complete data.

Risk Factors	OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p
Age	1.0 (0.9-1.1)	1.0 (0.9-1.1)	0.91
Current Smoking	4.6 (1.4-15.3)	4.8 (1.3-18.6)	0.02
CD4 cell count	1.7 (0.9-3.5)	nc	
Nadir CD4 cell count	0.9 (0.8-1.1)	nc	
Time on HAART	0.9 (0.7-1.1)	nc	
Burden of HPV infection	1.4 (1.1-1.8)	1.4 (1.1-1.8)	0.01
Episomal HPV-16 load	1.6 (1.2-2.3)	1.5 (1.1-2.1)	0.01
Integrated HPV-16 load	0.7 (0.4-1.1)	nc	
Integrated HPV-16 forms	0.4 (0.1-1.7)	nc	

nc is for not calculated

Table III. Risk factors for the presence of AIN-1 on the first visit with complete data.

Risk Factors	OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p
Age	0.9 (0.8-1.0)	1.0 (0.9-1.1)	0.14
Current Smoking	3.2 (0.9-10.6)	nc	
CD4 cell count	0.6 (0.2-1.0)	0.5 (0.2-1.0)	0.05
Nadir CD4 cell count	0.6 (0.3-1.1)	nc	
Time on HAART	0.9 (0.7-1.3)	nc	
Burden of HPV infection	1.4 (1.1-1.7)	1.4 (1.1-1.7)	0.005
Episomal HPV-16 load	1.4 (1.0-1.9)	1.3 (0.9-1.9)	0.14
Integrated HPV-16 load	1.0 (0.6-1.5)	nc	
Integrated HPV-16 forms	0.8 (0.2-3.7)	nc	

nc is for not calculated

Table IV. DIPS-PCR analysis of 19 specimens with confirmed integration status from 10 HIV- and HPV-16-positive men.

Patient no.	Sample no.	Lesion grade	E6/E2 ratio	Integration status	Chromosomal integration site		
					Chromosome	5' nt	GenBank ref. (gene)
006	A-533	AIN-1	8,4	mixed	chr 11	88 636	AC024341.9
019	A-7	Normal	1,6	mixed	undetermined	-	-
040	A-1124	AIN-3	2,2	mixed	undetermined	-	-
059	A-568	Normal	8,9	mixed	undetermined	-	-
090	A-1360	AIN-2	7,1	mixed	chr 10	70 622	AL731559.8 (CAMK1D)
102	A-113	Normal	+++	integrated	chr 16	59 163	
	A-294	Normal	+++	integrated	undetermined	-	-
	A-1314	Normal	+++	integrated	chr 8	32 491	AC107918.5
114	A-154	AIN-1	2,4	mixed	chr 8	42 070	AC079015.8
C-002	A-435	AIN-1	2,1	mixed	chr 16	1 035 503	NG_011698.1 (WWOX)*
C-011	A-129	Normal	+++	integrated	chr 1	123 915	AL109865.36 (C1ORF24)
	A-278	Normal	+++	integrated	undetermined	-	-
	A-479	AIN-1	5,1	mixed	chr 8	32 492	AC107918.5
	A-669	AIN-1	1723,4	mixed	chr 8	32 644	AC107918.5
	A-849	AIN-1	+++	integrated	chr 8	32 479	AC107918.5
	A-1065	AIN-1	+++	integrated	chr 8	32 535	AC107918.5
C-037	A-467	AIN-3	+++	Integrated	undetermined	-	-
	A-658	AIN-3	7,0	mixed	undetermined	-	-
	A-1104	AIN-3	+++	integrated	undetermined	-	-

The C1ORF24 has been associated with thyroid carcinoma.

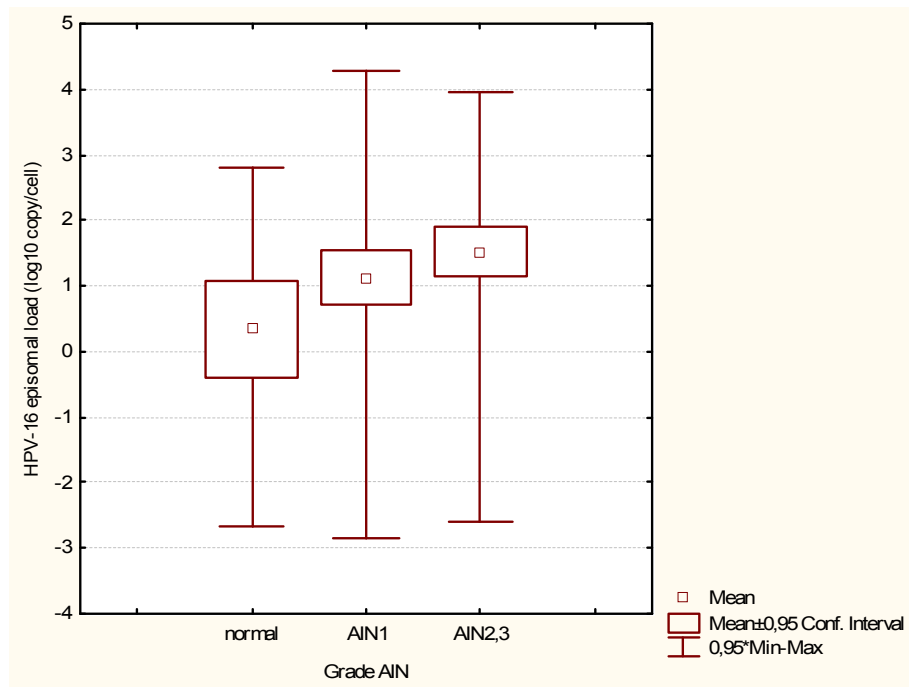
* Fragile site: FRA16D

chr is for chromosome

E6/E2 ratios mentioned as +++ could not be calculated because only the E6 gene was detected suggesting the presence of only integrated forms.

Figure 1. HPV-16 episomal and integrated loads and grade of AIN on first visit.

1a) HPV-16 episomal load and AIN



1b) HPV-16 integrated load and grade of AIN on first visit.

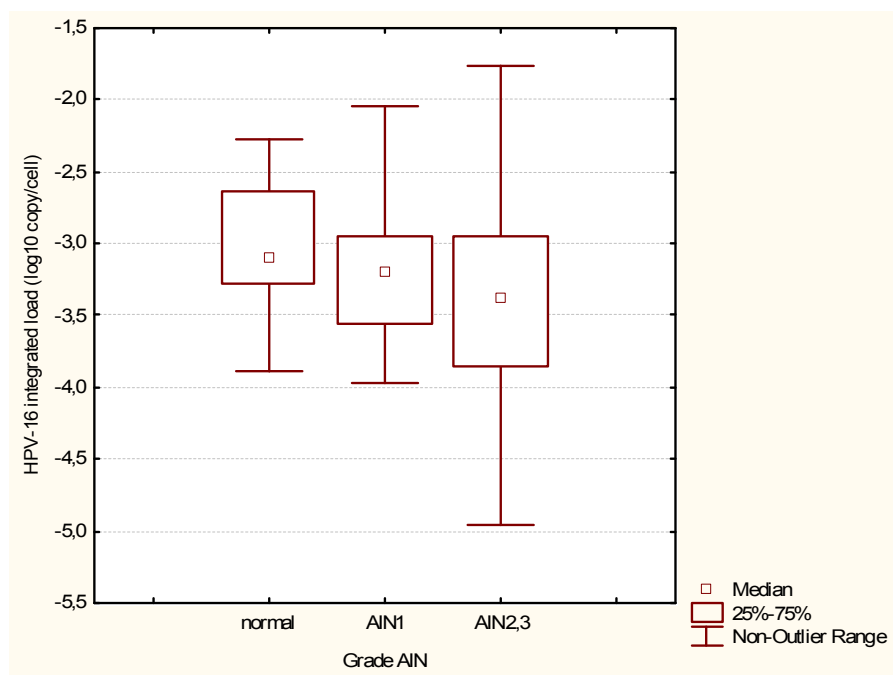


Figure 1. HPV-16 total and episomal loads were distributed normally (Shapiro-Wilk W normality test). The difference between the HPV-16 episomal load measured in samples from men without AIN (normal) and HPV-16 episomal load in men with AIN-1 was significant ($p=0.05$, Student t test). The difference between the HPV-16 episomal load measured in samples from men without AIN (normal) and HPV-16 episomal load in men with AIN-2,3 was significant ($p=0.002$, Student t test). Not shown on this graph, but the difference of HPV-16 episomal load was significant between men without AIN and men with AIN-2 ($p=0.002$) or men with AIN-3 ($p=0.03$). HPV-16 integrated loads were not distributed normally. The difference between the HPV-16 integrated load measured in samples from men without AIN (normal) and HPV-16 integrated load in men with AIN-1 was not significant ($p=0.77$, Mann Whitney test). The difference between the HPV-16 integrated load measured in samples from men without AIN (normal) and men with AIN-2,3 was not significant ($p=0.12$, Mann Whitney test).

Reference List

1. **Palefsky, J. M., E. A. Holly, M. L. Ralston, N. Jay, J. M. Berry, and T. M. Darragh.** 1998. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *AIDS* **12**:495-503.
2. **Sobhani, I., F. Walker, F. Roudot-Thoraval, L. Abramowitz, H. Johanet, D. Hénin, J. C. Delchier, and J. C. Soulé.** 2004. Anal carcinoma: incidence and effect of cumulative infections. *AIDS* **18**:1561-1569.
3. **Palefsky, J. M., E. A. Holly, J. T. Efird, M. Da-Costa, N. Jay, J. M. Berry, and T. M. Darragh.** 2005. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. *AIDS* **19**:1407-1414.
4. **Salit, I., J. Tinmouth, S. Chong, J. Raboud, C. Diong, and D. Su.** 2010. Screening for HIV-associated anal cancer: correlation of HPV genotypes, p16, and E6 transcripts with anal pathology. *Cancer Epidemiol Biom Prev* **18**:1986-92.
5. **Palefsky, J. M., E. A. Holly, M. L. Ralston, and N. Jay.** 1998. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. *J Inf Dis* **177**:361-367.
6. **Gohy, L., I. Gorska, A. de Pokomandy, D. Rouleau, G. Ghattas, G. Allaire, P. Cote, D. Vézina, J. Macleod, E. L. Franco, and F. Coutlee.** 2008. Genotyping of Human papillomavirus in anal biopsies and anal swabs collected from HIV-seropositive men with anal dysplasia. *J Acq Imm Def Syndr* **49**:32-39.
7. **Chin-Hong, P. V. and J. M. Palefsky.** 2002. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Inf Dis* **35**:1127-1134.
8. **Cranston, R. D., T. M. Darragh, E. A. Holly, N. Jay, J. M. Berry, M. Da Costa, J. T. Efird, and J. M. Palefsky.** 2004. Self-collected versus clinician-collected anal cytology specimens to diagnose anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **36**:915-920.
9. **Chiao, E. Y., T. P. Giordano, J. M. Palefsky, S. Tyring, and H. El-Serag.** 2006. Screening HIV-infected individuals for anal cancer precursor lesions: a systematic review. *Clin Infect Dis* **43**:223-233.
10. **Kiviat, N. B., C. W. Critchlow, K. K. Holmes, J. Kuypers, J. Sayer, C. Dunphy, C. Surawicz, P. Kirby, R. Wood, and J. R. Daling.** 1993. Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. *AIDS* **7**:43-49.

11. **de Pokomandy, A., D. Rouleau, G. Ghattas, S. Vezina, P. Cote, J. Macleod, G. Allaire, E. L. Franco, and F. Coutlee.** 2009. Prevalence, clearance and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *Journal of Infectious Disease* **199**:965-973.
12. **Rowhani Rahbar, A., S. E. Hawes, P. S. Sow, P. Toure, Q. Feng, A. Dem, B. Dembele, C. W. Critchlow, I. N'Doye, and N. B. Kiviat.** 2007. The impact of HIV status and type on the clearance of human papillomavirus infection among Senegalese women. *J. Infect. Dis.* **196**:887-894.
13. **Palefsky, J. M., E. A. Holly, J. Gonzales, K. Lamborn, and H. Hollander.** 1992. Natural history of anal cytologic abnormalities and papillomavirus infection among homosexual men with group IV HIV disease. *J Acquired Immune Def Synd* **5**:1258-1265.
14. **Critchlow, C. W., C. M. Surawicz, K. K. Holmes, J. Kuypers, J. R. Daling, S. E. Hawes, G. M. Goldbaum, J. Sayer, C. Hurt, C. Dunphy, and N. B. Kiviat.** 1995. Prospective study of high grade anal squamous intraepithelial neoplasia in a cohort of homosexual men: Influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. *AIDS* **9**:1255-1262.
15. **Palefsky, J. M., E. A. Holly, C. J. Hogeboom, M. L. Ralston, M. M. DaCosta, R. Botts, J. M. Berry, N. Jay, and T. M. Darragh.** 1998. Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *JAIDS: Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **17**:314-319.
16. **Wilkin, T. J., S. Palmer, K. F. Brudney, M. A. Chiasson, and T. C. Wright.** 2004. Anal intraepithelial neoplasia in heterosexual and homosexual HIV-positive men with access to antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **190**:1685-1691.
17. **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 Inf Dis* **185**:1229-1237.
18. **Snijders, P. J., R. D. M. Steenbergen, D. A. M. Heideman, and C. J. L. M. Meijer.** 2006. HPV-mediated cervical carcinogenesis: current concepts and clinical implications. *J Pathol* **208**:152-164.
19. **Varnai, A. D., M. Bollmann, H. Griefingholt, N. Speich, C. Schmitt, R. Bollmann, and D. Decker.** 2006. HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN). Impact of HPV analysis of anal lesions on diagnosis and prognosis. *Int J Colorectal Dis* **21**:135-142.
20. **Zbar, A. P., C. Fenger, J. Efron, M. Beer-Gabel, and S. D. Wexner.** 2002. The pathology and molecular biology of anal intraepithelial neoplasia: comparisons with cervical and vulvar intraepithelial carcinoma. *International Journal of Colorectal Disease* **17**:203-215.

21. **Fontaine, J., C. Hankins, D. Money, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, and F. Coutlee.** 2008. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) viral load and persistence of HPV-16 infection in women infected or at risk for HIV. *J. Clin. Virol.* **43**:307-312.
22. **Fontaine, J., C. Hankins, M. H. Mayrand, J. Lefevre, D. Money, S. Gagnon, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, 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.
23. **Pett, M. and N. Coleman.** 2007. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* **212**:356-367.
24. **Lytwyn, A., I. Salit, and et al.** 2004. Anal cancer screening: observer variation among pathologists for cytological and histological diagnoses. 21st international papillomavirus conference **1**:218.
25. **Azizi, N., J. Brazete, C. Hankins, D. Money, J. Fontaine, A. Koushik, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, E. Franco, and F. Coutlee.** 2008. Influence of HPV-16 E2 polymorphism on quantitation of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* **89**:1716-1728.
26. **Arias-Pulido, H., C. L. Peyton, N. E. Joste, H. Vargas, and C. M. Wheeler.** 2006. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* **44**:1755-1762.
27. **Khouadri, S., L. L. Villa, S. Gagnon, A. Koushik, H. Richardson, A. Ferenczy, G. Matlashewski, M. Roger, E. L. F. Franco, and F. Coutlée.** 2007. Viral load of episomal and integrated forms of Human papillomavirus type 33 in High-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Int J Cancer* **121**:2674-2681.
28. **Ruutu, M. P., S. M. Kulmala, P. Peitsaro, and S. M. Syrjanen.** 2008. The performance of the HPV16 real-time PCR integration assay. *Clinical Cancer Research* **41**:423-428.
29. **Luft, F., R. Klaes, M. Nees, M. Durst, V. Heilmann, P. Melsheimer, and M. von-Knebel-Doeberitz.** 2001. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* **92**:9-17.
30. **Matovina, M., I. Sabol, G. Grubisic, N. M. Gasperov, and M. Grce.** 2009. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gyn Oncol* **113**:120-127.
31. **Maciel, R. M., E. T. Kimura, and J. M. Cerutti.** 2005. Patogenese dos tumores diferenciados da tiroide (papilifero e folicular). [Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular)]. *Arq Bra . Endocrinol Metabol* **49**:691-700.

32. **Palefsky, J. M., E. A. Holly, M. L. Ralston, S. P. Arthur, C. J. Hogeboom, Darragh, and TM.** 1997. Anal cytological abnormalities and anal HPV infection in men with Centers for Disease Control group IV HIV disease. *Genitourin. Med.* **73**:174-180.
33. **Daling, J. R., M. M. Madeleine, L. G. Johnson, S. M. Schwartz, K. A. SHERA, M. A. Wurscher, J. J. Carter, P. L. Porter, D. A. Galloway, and J. K. McDougall.** 2004. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* **101**:270-280.
34. **Peitsaro, P., B. Johansson, and S. Syrjanen.** 2002. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* **40**:886-891.
35. **Cheung, J. L., K. W. Lo, T. H. Cheung, J. W. Tang, and P. K. Chan.** 2006. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis* **194**:1706-1712.
36. **Guo, M., N. Sneige, E. G. Silva, Y. J. Jan, D. E. Cogdell, E. Lin, R. Luthra, and W. Zhang.** 2007. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol* **20**:256-266.
37. **kulmala, S.-M. A., S. M. Syrjanen, U. B. Gyllensten, I. P. Shabalova, N. Petrovichev, P. T. Tosi, K. J. Syrjanen, and B. C. Johansson.** 2007. Early integration of high copy HPV-16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* **59**:513-517.
38. **Guo, M., N. Sneige, E. G. Silva, Y. J. Jan, D. E. Cogdell, E. Lin, R. Luthra, and W. Zhang.** 2007. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol* **20**:256-266.
39. **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.
40. **Bechtold, V., P. Beard, and K. Raj.** 2003. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* **77**:2021-2028.
41. **Pett, M. R., M. T. Herdman, R. D. Palmer, G. S. Yeo, M. K. Shivji, M. A. Stanley, and N. Coleman.** 2006. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:3822-3827.
42. **Peitsaro, P., S. Hietanen, B. Johansson, T. Lakkala, and S. Syrjanen.** 2002. Single copy heterozygote integration of HPV 33 in chromosomal band 5p14 is found in an epithelial cell clone with selective growth advantage. *Carcinogen* **23**:1057-1064.

43. **Ziegert, C., N. Wentzensen, S. Vinokurova, F. Kisseljov, J. Eienkel, M. Hoeckel, and M. von-Knebel-Doeberitz.** 2003. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* **22**:3977-3984.

CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1. DISCUSSION

L'infection anale causée par le VPH est très fréquente parmi les HARSAHs. Malgré la prévalence élevée de l'infection anale chez ces individus, la progression des ASIL vers un état invasif reste un phénomène rare. Par contre, le risque de développer un cancer de l'anus est le plus élevé parmi cette population surtout si les hommes sont infectés par le VIH (82,99). Des études sur l'histoire naturelle de l'infection au VPH sont nécessaires dans cette population pour déterminer quelles sont les composantes importantes impliquées dans la progression de l'infection anale afin d'identifier les hommes les plus à risque de cancer anal. Les HARSAHs VIH-séropositifs avec un AIN-2,3 (lésion de haut-grade), le véritable précurseur du cancer invasif de l'anus (108), nécessitent des traitements puisqu'ils sont les plus susceptibles de développer ce cancer.

Le but de cette étude était d'évaluer le rôle de certains facteurs tels que la charge virale épisomale et intégrée et de l'intégration du VPH-16 dans la progression de l'infection anale préinvasive pour ainsi mieux définir l'histoire naturelle de l'infection au VPH-16. Ces facteurs furent examinés chez 135 HARSAHs VIH-séropositifs suivis prospectivement pendant 3 ans pour évaluer leur utilité comme biomarqueur de progression de l'AIN.

Brièvement, les charges épisomales et intégrées furent mesurées par PCR en temps réel tel qu'expliqué dans le chapitre 2 et dans l'article. Pour les spécimens positifs pour des formes intégrées du VPH-16 (ratio E6/E2 \geq 2.0), l'intégration fut confirmée par DIPS-PCR. Les résultats de ces tests permirent d'analyser, entre autres, l'association entre la charge virale du VPH-16, l'intégration du VPH-16 et la présence d'AIN.

4.1.1. Facteurs de risque de l'AIN

Les ASIL associées à l'infection au VPH sont très fréquentes chez les HARSAHs VIH-séropositifs tel qu'illustré par quelques groupes de recherche (94,162,198) et par notre équipe (199). Chez les sujets à l'étude, 37.8% et 42.9% des individus présentaient de l'AIN-1 ou de l'AIN-2,3, respectivement, lors de la première visite positive pour le VPH-

16. Chez ces individus, le nombre de types de VPH détecté dans la lésion est associé à un AIN-1 en analyse multivariée, ainsi qu'un décompte diminué des lymphocytes CD4. Quant aux HSIL, l'AIN-2,3 a été associé au nombre de VPH détecté dans la lésion, à la charge épisomale du VPH-16 et au tabagisme actuel tels que confirmés par Salit et al., Fontaine et al. et par Roteli-Martins et al. (132,162,200). Toutefois, les HSIL causées par le VPH-16 ne sont pas associées au décompte des lymphocytes CD4 au moment du diagnostic.

Le nombre de types de VPH est associé tant aux HSIL qu'aux LSIL. Ainsi, les sujets arborant une infection multiple sont plus susceptibles de présenter des lésions, ce qui est confirmé par d'autres études portant sur les CIN ou sur les AIN dans diverses populations (158,162,201,202). Il est possible que plusieurs types agissent ensemble en potentialisant différents mécanismes de pathogenèse et facilitent le développement des lésions. Également, il est possible qu'être infecté par le VPH-16 rend plus susceptible d'acquérir d'autres types tel qu'observé ailleurs (203). Aussi, il n'est pas à exclure que la transmission simultanée par plusieurs types d'un partenaire sexuel ait pu se produire. Enfin, l'infection multiple peut être le reflet d'une pauvre immunité anti-VPH chez les immunosupprimés, ce qui peut être évalué entre autres par le nombre de CD4. Les individus avec une immunité amoindrie et exposés aux VPHs seraient ainsi infectés plus facilement. Le faible niveau d'immunité pourrait également favoriser la persistance des cellules anormales qui auraient été éliminées par un système immunitaire normal.

Dans notre analyse, le nombre de lymphocytes CD4 n'est pas associé à l'AIN-2,3 induit par le VPH-16, mais l'est possiblement pour l'AIN-1. Ces résultats suggèrent que l'immunité adaptative joue un rôle contre le développement des HSIL. Par contre, lorsque ces lésions se sont établies, un décompte des lymphocytes CD4 élevé ne protégerait pas contre le développement d'une HSIL. Wilkin et al. ne trouvèrent pas d'association entre le décompte des lymphocytes CD4 et la présence d'anomalies cytologiques dans une cohorte d'hommes hétérosexuels ou homosexuels VIH-séropositifs infectés au VPH (198). Par contre, quand l'analyse est restreinte aux individus infectés par des VPH-HR, ces derniers étaient plus susceptibles de présenter des cytologies anormales. Donc, il est possible qu'un nombre élevé de CD4 permette aux HARSAs VIH-séropositifs de mieux contrôler l'infection avant le développement de l'AIN-1. D'autres groupes de recherche trouvèrent

une association entre la présence d'AIN-2,3 et un décompte des lymphocytes CD4 (68,82,148,204),(148,204) contrairement à ce que nous avons trouvé. Par contre, plusieurs de ces études ont été réalisées avant l'ère du TAR. Il est possible que nous n'ayons pu démontrer une association entre un faible nombre de lymphocytes CD4 et la présence d'AIN-2,3 de par le faible nombre de participants. Notre étude manquait donc de puissance pour établir cette association.

L'initiation de la trithérapie pendant la phase aiguë de l'infection au VIH permet de reconstituer l'immunité adaptative et de mieux contrôler les infections (205). Dans cette mesure, il serait intéressant de vérifier si la durée de la TAR peut avoir une influence sur la prévalence de l'AIN. Dans notre étude, la durée de traitement n'a eu aucun impact sur la prévalence de l'AIN-1 ou de l'AIN-2,3 ce qui a été confirmé par d'autres pour l'AIN de haut-grade (162). Cependant, le nombre de participants étudiés était faible et l'analyse des associations était restreinte aux individus infectés par le VPH-16. Nous aurions pu obtenir des résultats différents en analysant tous les participants à l'étude, analyses qui sont en cours dans le cadre d'une autre publication.

Dans une autre étude, Palefsky et al. conclurent que non seulement la TAR ne diminuait pas la prévalence de l'AIN pour 357 HARSAs VIH-séropositifs, mais le risque d'AIN augmentait avec le temps d'utilisation de la TAR (94). Également, la TAR ne protégerait pas contre le développement d'un cancer invasif (206). Ainsi, le nombre de cancer anal invasif augmenta pour les individus VIH-séropositifs depuis l'introduction de la TAR. L'augmentation des cas de cancer serait due à la reconstitution partielle de l'immunité chez les personnes sous traitement qui contrôlèrent mieux les infections opportunistes exceptées l'infection au VPH. L'espérance de vie de ces personnes est allongée, ce qui leur donne assez de temps pour développer un cancer de l'anus. Toutefois, Wilkin et al. démontrèrent que l'utilisation de la thérapie antirétrovirale au cours de l'étude avait un effet protecteur contre l'AIN (198). Bref, le rôle de la TAR dans la prévention de l'AIN, s'il y en existe un, reste controversé. Ces différentes études n'ont pas évalué de façon identique la prise de médicaments anti-VIH, entre autres l'adhérence au traitement. Cette absence de contrôle de la prise d'antiviraux a sûrement un impact sur la mesure de l'effet de la TAR sur l'évolution des lésions d'AIN.

Dans notre étude, l'association entre la charge virale du VIH et l'AIN n'a pas été rapportée dans l'article. Elle n'a pas été associée avec le grade d'AIN, mais la majorité des individus avaient une charge du VIH nulle, étant sous TAR. Palefsky et al. montrèrent que chez les femmes avec une haute charge virale du VIH, le VPH était plus souvent détecté comparativement aux femmes VIH-séronégatives ou aux femmes avec une charge virale du VIH plus faible (207). Par ailleurs, Vernon et al. montrèrent que la protéine Tat pouvait potentialiser les mécanismes de pathogenèse du VPH en augmentant l'expression des oncogènes E6 et E7 (141). Donc, une charge virale du VIH élevée serait un facteur de risque pour l'acquisition d'une infection au VPH, mais pourrait également être responsable du développement de lésions par l'intermédiaire de la surexpression de certains oncogènes.

Le tabagisme fut associé à divers cancers, notamment au cancer de l'anus, mais son rôle dans la carcinogenèse du VPH-16 n'est pas bien compris (98). Nos résultats montrent que les HSIL sont associées au tabagisme actuel qui serait le plus grand facteur prédictif d'AIN-2,3 pour les hommes infectés par le VPH-16. Ainsi, les hommes qui fument ont plus de risque de développer un AIN-2,3 comparativement aux ex-fumeurs. Le tabagisme pourrait altérer l'immunité en réduisant le nombre de cellules de Langerhans et de lymphocytes T au site d'infection (208-210), ce qui contribuerait à augmenter le risque d'acquérir une infection persistante et donc, de développer des HSIL. Une immunité cellulaire locale réduite permettrait également aux cellules anormales de survivre plus longtemps et devenir immortelles sous l'effet d'autres oncogènes. Quant aux LSIL, le tabagisme actuel ne semble pas avoir de rôle dans le développement de l'AIN-1. Donc, le tabagisme pourrait plutôt contribuer à la carcinogenèse après l'apparition de LSIL. Le tabagisme a également été associé à l'acquisition d'une infection aux VPH-HR (211).

Quant à la charge épisomale du VPH-16, une association fut démontrée aussi dans notre étude: les individus avec une plus grande charge virale épisomale du VPH-16 étaient plus susceptibles d'avoir un AIN-2,3. Il est possible que dans ces cas, un plus grand nombre d'épisomes du VPH-16 au sein d'une cellule puisse augmenter la quantité d'oncoprotéines E6 et E7. Le risque de développer des anomalies cellulaires dues à ces oncoprotéines serait alors plus élevé et par conséquent, le risque de développer un AIN-2,3 aussi. Cette association n'a jamais été trouvée dans le cadre de l'infection anale chez des

HARSAHs VIH-séropositifs. Toutefois, cette association a déjà été démontrée lors de l'infection du col utérin par les VPH-16 et VPH-33 (131,172). Dans une étude récente réalisée par Salit et al., les HARSAHs VIH-séropositifs avec des HSIL (AIN-2,3) avaient des charges virales totales du VPH-16 (sans distinction du statut physique du génome) beaucoup plus élevées que les hommes sans lésion ou avec un AIN-1 (162). Toutefois, ce groupe n'évalua pas si c'était la charge épisomale ou la charge intégrée du VPH-16 qui augmentait avec le grade d'AIN. Dans notre étude, la charge virale intégrée du VPH-16 et la présence d'intégration du VPH-16 n'étaient pas associées à un AIN. Seule la charge virale épisomale du VPH-16 augmentait avec la sévérité des lésions.

Il est à noter que les charges virales mesurées furent normalisées selon la quantité du gène de la β -globine dans l'échantillon. La normalisation des charges virales est importante pour les études d'association avec le grade des lésions. Initialement, plusieurs études mesurèrent les charges virales dites brutes (sans normalisation) et conclurent à l'existence d'une association de la charge virale avec la sévérité des lésions (212,213). Cheung et al. arrivèrent à la même conclusion dans le cas de l'infection du col utérin au VPH-18, mais une fois que la charge virale fut normalisée, l'association ne subsista plus (170). Dans le cas d'un échantillonnage clinique, la quantité de virus mesurée dépendra du nombre de cellules recueillies et de la qualité du spécimen. Ainsi, en normalisant les charges virales, nous obtenons une mesure plus précise qui tient en compte le nombre de cellules dans le spécimen. La charge virale est donc exprimée en nombre de copies de génome du VPH à l'étude par l'équivalent d'une cellule.

Également, tous les spécimens anaux furent initialement analysés pour la présence d'inhibiteurs par l'amplification de contrôles internes pour la β -globine et pour le gène E6 du VPH-16. Il a été démontré que certains échantillons cliniques peuvent contenir des inhibiteurs du PCR (214). Ces inhibiteurs peuvent se lier à l'ADN pour faire interférence aux polymérase et préviennent l'amplification de l'ADN. La présence d'inhibiteurs dans les spécimens produirait des résultats faux-négatifs (absence du gène cible quand, en réalité, le gène est présent) et fausserait les associations. Ainsi, les charges virales mesurées ne seraient pas exactes ce qui serait particulièrement problématique pour la détection de l'intégration dont la présence est confirmé quand le ratio E6/E2 est plus grand que 2.0.

L'utilisation de contrôles internes permet de détecter la présence d'inhibiteurs (215). Les spécimens qui contiennent des inhibiteurs peuvent également être identifiés en suivant l'amplification de gènes que l'on sait sont contenus dans le spécimen, dans notre cas, un gène humain (la β -globine). La réussite de l'amplification est validée quand un signal positif est obtenu. Dans notre étude, aucun des échantillons ne contenait des inhibiteurs suite à l'amplification des contrôles internes pour VPH-16 E6 et la β -globine.

4.1.2. Facteurs de risque pour la progression vers l'AIN-2,3

La progression de l'infection est particulièrement difficile à étudier dans cette cohorte puisqu'une grande proportion des hommes présentait une AIN de haut-grade (AIN-2,3) dès le recrutement. De plus, peu de sujets n'avaient pas de lésion apparente au cours de l'étude. Malgré ces contraintes, la progression vers un grade plus élevé d'AIN a pu être étudiée pour les individus présentant initialement une AIN-1 à l'histologie. La détermination de prédicteurs de progression vers l'AIN-2,3 pourrait nous aider à identifier les hommes à risque de cancer de l'anus lorsqu'ils présentent une LSIL.

Parmi les facteurs de risque de lésions énumérés précédemment, seule la charge virale épisodale du VPH-16 est associée à la progression de l'AIN-1 vers un AIN-2,3. Ainsi, les hommes dont la charge virale épisodale est plus élevée que le seuil établi de 72.3 copies de VPH-16 par cellule (qui correspond à la médiane de la charge épisodale du VPH-16 pour les 37 individus avec de l'AIN-1 à l'enrôlement) avaient 8 fois plus de risque de progresser vers un AIN-2,3 que les individus avec une AIN-1 et une charge épisodale plus faible que 72.3 copies de VPH-16 par cellule. Ce résultat pourrait encore être expliqué par le nombre d'oncoprotéines produites dans une cellule infectée. Ainsi, dans un AIN-1 où le nombre d'épisomes est très élevé, la réplication virale serait plus grande. L'expression globale des gènes E6 et E7 permettrait une plus grande production des oncoprotéines E6 et E7. Par ailleurs, la charge virale intégrée n'est aucunement associée à la progression de l'infection. Donc, nos résultats suggèrent qu'il existe d'autres mécanismes de pathogenèse pour l'induction d'anomalies cellulaires que l'intégration du VPH. Ainsi, l'intégration du VPH n'est pas la force motrice pour la progression de l'AIN.

Palefsky et al. est un des rares groupes à avoir étudié la progression des LSIL anaux en HSIL (149). Ainsi, contrairement aux résultats de la présente étude, ils démontrèrent l'association entre la progression de l'AIN de bas-grade vers un AIN de haut-grade et le statut d'immunosuppression illustré par le décompte des lymphocytes CD4 et la présence d'infection par de multiples types (149). La différence entre notre étude et celle de Palefsky et al. peut être due au trop faible nombre de participants étudiés dans la nôtre. De plus, cette association a été démontrée dans le cadre d'une infection spécifique au VPH, le VPH-16, tandis que Palefsky et al. incluaient dans leur analyse tous les types. Or, Strickler et al. démontrèrent que pour les femmes VIH-séropositives, le VPH-16 prévalent et incident ne semblait pas associé au décompte des lymphocytes CD4 contrairement aux autres VPHs (182). L'infection au VPH-16 serait donc indépendante du nombre de lymphocytes CD4 ce qui suggère que la progression de l'infection au VPH-16 l'est aussi. Le VPH-16 pourrait donc avoir développé des mécanismes d'évasion du système immunitaire qui lui sont propres.

4.1.3. Formes intégrées du VPH-16

L'intégration du VPH à haut-risque semble être importante pour la carcinogénèse. L'intégration du VPH à haut-risque rompt souvent le cadre de lecture E2, ce qui résulte en la surexpression des oncogènes E6 et E7. Cette surexpression cause la dérégulation de la prolifération cellulaire et induit certains changements qui contribuent à la transformation des cellules. L'intégration peut être mesurée en quantifiant le gène E6, qui reste intact durant le processus, et le gène E2, dont le cadre de lecture est détruit. Un ratio $E6/E2 \geq 2.0$ est généralement utilisé pour déterminer la présence de formes intégrées du VPH.

Certaines études montrèrent que l'intégration était associée aux phases tardives de l'infection au VPH i.e. que l'intégration était détectée principalement dans les HSIL et/ou dans les cancers invasifs (125,126,136). Par contre, d'autres études ont montré que l'intégration du VPH pouvait se produire tôt au cours de l'infection au VPH (128-131). Ainsi, l'intégration du VPH-16 et du VPH-33 a été détectée chez des femmes sans lésions et avec un CIN-1 (lésion de bas-grade) par notre laboratoire (128,131). Dans notre étude,

l'intégration du VPH-16 n'était pas un événement qui se produisait uniquement dans la phase avancée de l'infection au VPH tel que décrit auparavant (125,126,136). Chez les participants à l'étude, l'intégration du VPH-16 a été détectée autant dans les tissus normaux que dans l'AIN-1 et l'AIN-2,3. C'est la première fois que ce phénomène est signalé dans le cas de l'infection anale chez des HARSAs VIH-séropositifs. La présence de l'intégration du VPH-16 n'était pas associée à un grade d'AIN particulier. Khouadri et al. ne trouvèrent pas d'association entre l'intégration du VPH-133 et un CIN-2,3 (131).

La présence de facteurs favorisant l'intégration a été examinée dans notre étude. L'âge, le tabagisme actuel et passé, le décompte des lymphocytes CD4, la persistance de l'infection et le nombre de types ne sont pas associés à la présence d'intégration du VPH-16. Par contre, nous avons montré qu'il existe une association entre la charge virale épisomale du VPH-16 et l'intégration du VPH-16. Ainsi, les hommes dont la charge virale épisomale du VPH-16 est élevée seraient moins susceptibles d'avoir des formes intégrées du VPH-16 détectées dans le spécimen. Ceci a déjà été observé dans le cas d'une infection au VPH-33 chez les femmes (131). Ces résultats doivent par contre être interprétés avec prudence. Une étude réalisée par Ruutu et al. a montré qu'une charge virale épisomale en excès pouvait interférer avec la détection de la forme intégrée par le test du PCR en temps réel (196). Ainsi, dans les spécimens avec des charges épisomales élevées, il est possible que les formes intégrées n'aient pu être décelées. Dans ce cas, l'intégration pourrait être détectée suite à l'expansion clonale de la forme intégrée. Dans notre étude, 17 hommes étaient positifs pour les formes intégrées du VPH-16 dont seulement 4 hommes avaient plus d'un échantillon positif pour la forme intégrée en cours de suivi. L'expansion clonale des formes intégrées n'a pu être confirmée que chez un de ces participants. Par ailleurs, l'impact de l'intégration du VPH-16 sur la carcinogenèse dans le contexte où la charge virale épisomale est élevée serait moindre dans la mesure où l'expression des oncogènes E6 et E7 du VPH intégré pourrait être régulé par les protéines E2 des formes épisomales. De ce fait, l'intégration du VPH pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse une fois que la charge virale épisomale serait réduite. Par contre, cette théorie n'a pu être vérifiée puisqu'un seul des participants à l'étude développa un cancer anal invasif.

De plus, il est possible que les méthodes utilisées aient mal évalué la prévalence de l'intégration. Ainsi, le ratio E6/E2 a pu être faussé par la variation dans la détection du gène E2 due à la diversité intratypique des variantes tel qu'observé dans certaines études sur le polymorphisme du gène E2 (172,216). Cependant, nous avons sélectionné nos amorces dans des zones non-polymorphiques. Aussi, la différence entre la charge virale d'E6 et d'E2 peut être due au polymorphisme des gènes ciblés. Par contre, la reproductibilité inter- et intra-test est très bonne et les coefficients de variation obtenus étaient moins de 30% pour la quantification entre 100 et 100 000 copies de VPH-16 (résultats non-présentés dans l'article). L'ensemble de nos spécimens avaient des charges virales du VPH-16 compris entre 100 et 100 000 copies de VPH-16 par cellule. Par contre, 5 spécimens avec un ratio E6/E2 > 2.0 avaient des charges virales de moins de 100 copies de VPH-16 par cellule. Néanmoins, l'intégration du VPH-16 a pu être confirmée par DIPS-PCR pour tous ces échantillons tel que montré dans le tableau IV de l'article (page 70).

Aussi, nous avons utilisé des amorces qui ont été optimisées et sélectionnées dans des régions conservées du génome du VPH-16 pour réduire l'effet de la variation du gène E2 sur la détection des formes intégrées. Dans un spécimen, ayant obtenu un ratio E6/E2 = 1.6, l'intégration a tout de même pu être confirmée par DIPS-PCR et dans un spécimen dont le ratio était de plus de 63 (donc mixte avec majoritairement la forme intégrée selon le test de PCR en temps réel), l'intégration n'a pu être confirmée par DIPS-PCR. Néanmoins, le patron de migration de l'ADN amplifié du DIPS-PCR suggérait qu'il y a bel et bien eu intégration. Il est donc possible qu'un certain nombre de spécimens avec un ratio plus faible que 2 contiennent en fait des formes intégrées de VPH-16 et qu'un certain nombre de spécimens dont le ratio est plus grand que 2 ne contiennent effectivement que des formes épisomales. Bien sûr, la quantité de l'ADN a pu faire en sorte que les conditions n'étaient pas propices pour réaliser les différents PCR.

Dans une étude sur le VPH-6, un VPH-LR qui ne s'intègre pas, les spécimens avaient des ratios E6/E2 variant entre 0.41 et 2.0 (131). D'autres études mesurèrent des ratios E6/E2 du VPH-16 et du VPH-33 aussi bas que 0.5 (131,132,172). Ceci suggère qu'un ratio E6/E2 \geq 2.0 est raisonnable pour conclure qu'il y a intégration dans le spécimen, les ratios entre 0.5 et 2.0 étant reliés à la variabilité analytique des deux tests effectués pour

calculer ce ratio. La sensibilité du PCR en temps réel pour la détection de l'intégration est donc limitée par le fait que le ratio E6/E2 doit être plus grand que le seuil de 2.0. Néanmoins, la sensibilité de notre test est bonne puisqu'un seul spécimen avec un ratio $E6/E2 < 2.0$ avait des formes intégrées du VPH-16 tel que confirmé par l'analyse par DIPS-PCR (voir tableau IV dans l'article, page 70).

Également, il n'est pas à exclure que l'intégration de génomes du VPH-16 en tandem ait pu se produire ce qui a déjà été observé par d'autres (217-219). Dans ce modèle, plusieurs copies de VPH s'intègrent en concatémères et même si un seul ORF E2 est détruit, le gène E2 serait tout de même détectable grâce aux autres VPHs ce qui se traduirait par un ratio E6/E2 près de 1 (présence de formes épisomales seulement) si les formes impliquées se linéarisent par scission des gènes autres qu'E2.

4.1.4. Confirmation de l'intégration du VPH-16 par DIPS-PCR

Le DIPS-PCR est une technique de confirmation de l'intégration du VPH. Elle est surtout réalisable quand la charge virale intégrée excède la charge virale épisomale. Nos résultats montrent que l'intégration du VPH-16 rompt divers cadres de lecture en majorité les ORFs E1, E2 et L2. Ainsi, pour l'étude de l'intégration, il est impératif d'analyser l'ensemble des ORFs pouvant être scindés. Puisque la majeure partie des études sur l'intégration ne portèrent que sur l'ORF E2 (129,170,174), nous supposons qu'elles ont pu sous-estimer la présence de la forme intégrée du VPH. Toutefois, Arias-Pulido et al. estimèrent que la rupture des ORFs E1 et E2 surviendrait dans 78% des cas (119). L'intégration du VPH a donc été peu sous-estimée.

L'intégration du VPH dans le génome humain ne semble pas être aléatoire. En effet, chez 3 des participants à notre étude, le VPH-16 s'était intégré dans le chromosome 8. Chez deux de ces individus (C-011 et 102), le même site d'intégration a été identifié tandis que chez le troisième (114), le locus atteint était différent (voir tableau IV de l'article, page 70). Cette similitude ne peut être expliquée par la contamination croisée puisque l'analyse par DIPS-PCR chez les deux premiers individus s'est fait à des jours différents. Toutefois, il est

possible que ce site soit particulièrement enclin à la recombinaison ou à tout autre réarrangement de l'ADN dont l'intégration du VPH.

Pour le participant C-011, le VPH-16 intégré dans le chromosome 8 a semblé persister; le même site d'intégration fut identifié dans plusieurs spécimens séquentiels. Ces résultats indiquent que l'intégration du VPH-16 dans un site particulier peut procurer un avantage de croissance aux cellules, ce qui est reflété par la persistance et l'expansion clonale des VPHs intégrées chez le participant C-011. Toutefois, l'intégration du VPH-16 ne serait pas le seul facteur expliquant cet avantage de croissance, car chez le sujet 102, qui présentait le même site d'intégration, la forme intégrée ne semble pas persister. Toutefois, le DIPS-PCR n'a pu confirmer l'intégration dans l'échantillon subséquent et ce, même si le ratio E6/E2 était de plus de 544 (statut d'intégration mixte avec une prédominance de la forme intégrée). Ceci ne peut être expliqué par le fait que les molécules intégrées du VPH-16 aient pu se maintenir à un niveau indétectable par DIPS-PCR, puisque la charge virale intégrée mesurée pour cet échantillon était de 1 086.38 copies/cellules. Néanmoins, il serait intéressant de comparer le génome de ces deux participants selon, par exemple, le patron de méthylation de l'ADN pour vérifier, en premier, s'il y a eu des changements épigénétiques et, en deuxième, si ces changements ont pu favoriser le maintien de la persistance. Bien sûr, il serait intéressant d'investiguer si certains allèles du HLA pourraient être associés à la persistance du VPH intégré ou des lésions. Le nombre faible de participants à notre étude ne permet pas d'analyses du HLA. Les analyses de méthylation du VPH-16 sont en cours.

D'un autre côté, si l'on examine l'évolution de l'intégration en cours de suivi chez ces deux participants, nous remarquons que l'intégration s'est produite à plusieurs sites du génome humain. Ainsi, chez le participant C-011, le VPH-16 s'est intégré dans le premier échantillon au chromosome 1 (chr 1) et par la suite dans le chromosome 8 (chr 8), en excluant les spécimens des visites 2 et 7 pour lesquels le site n'a pu être identifié. De plus, le VPH intégré dans le chr 1 ne fut pas détecté dans les spécimens subséquents. Deux raisons peuvent expliquer cette situation : 1) ce VPH intégré n'a pas persisté et a donc été éliminé entre la première visite et la seconde ou 2) le VPH intégré a persisté, mais à des niveaux indétectables. Quant au VPH intégré dans le chr 8, il n'est pas détecté dans le premier échantillon. Ainsi, il est soit déjà présent dans ce spécimen en un nombre de copies

trop faible pour être décelé, soit qu'il ne s'est pas encore intégré au moment de la visite. Malheureusement, aucune de ces hypothèses n'a pu être vérifiée puisque le site d'intégration du spécimen de la visite 2 (A-278) n'a pu être déterminé. Donc, pour le spécimen de la visite 3 (A-479), il pourrait s'agir d'un nouvel événement d'intégration qui a pu se produire entre les visites 1 et 3. Dans ce cas, la détection du VPH intégré dans le chr 8 dans les autres échantillons qui suivent pourrait être le résultat de l'avantage de croissance qui lui a été conféré par cette intégration et pourrait expliquer pourquoi le VPH intégré dans le chr 1 n'est plus détectable (en supposant que ce dernier a un plus faible avantage de croissance et qu'il y a eu compétition).

Le même phénomène a pu se produire pour le participant 102. Ainsi, le VPH s'est intégré dans le chromosome 16 (chr 16) dans le premier échantillon (A-113) et dans le chr 8 dans le spécimen de la visite 6 (A-1314). Malheureusement, que le VPH intégré dans le chr 8 ait pu conférer un avantage de croissance par rapport au VPH intégré dans le chr 16 ne peut être vérifié puisque pour le spécimen suivant (A-1538, visite 7), le statut d'intégration n'a pu être déterminé. Néanmoins, nos résultats supportent la théorie que l'intégration du VPH est polyclonale et peut donc se produire à divers sites dans le génome humain au cours de l'infection et que seulement quelques VPHs intégrées contribuent à la carcinogenèse, tel que proposée ailleurs (220).

L'étude approfondie des chromosomes atteints lors de l'intégration du VPH-16 permet d'identifier quelques gènes cellulaires localisés près du site d'intégration, notamment *CAMK1D* et *CIORF24*, qui peuvent être associés d'une manière ou d'une autre au processus de carcinogenèse (221,222). Chez un participant, un CFS (site commun fragile) a été identifié, soit *FRA16D* à proximité du gène *WWOX*. Les CFS semblent être les sites privilégiés pour l'intégration, ce qui n'a pu être vérifié dans notre étude puisque pour la plupart des échantillons contenant des formes intégrées du VPH-16, les sites d'intégration n'ont pu être déterminés (136,220). En résumé, le DIPS-PCR reste une bonne méthode pour confirmer l'intégration surtout quand la charge intégrée du VPH est plus élevée que la charge épisomale.

4.1.5. Histoire naturelle de l'infection au VPH-16

Grâce aux résultats obtenus dans cette étude, il est possible de faire un premier modèle théorique sur l'histoire naturelle de l'infection anale au VPH-16 chez des HARSAs VIH-séropositifs dans le cadre de la TAR. La figure 12 (page 93) présente les facteurs de risque impliqués dans la carcinogenèse du VPH-16 au niveau du développement et de la progression de l'AIN dans le cadre de l'infection de l'anus préinvasive. Ainsi, les participants qui présentent ces facteurs de risque sont les plus à risque de cancer anal et devront être traités médicalement en conséquence.

Tout d'abord, les facteurs prédictifs de l'AIN-1 sont possiblement un décompte des lymphocytes CD4 bas et l'infection multiple. Tel que mentionné précédemment, la présence de plusieurs types de VPH est probablement le reflet d'une faible immunité cellulaire. La diminution de l'immunité cellulaire favoriserait la persistance de l'infection au VPH. La quantité de virus présents dans les lésions augmente avec la baisse de cette immunité, ce qui favoriserait également la persistance virale. Les cellules ayant acquis des anomalies ont un risque plus faible d'être éliminées par le système immunitaire déficient chez les individus VIH-séropositifs et elles sont plus susceptibles de persister et de s'immortaliser par d'autres processus.

Les facteurs prédictifs de l'AIN-2,3 sont le tabagisme actuel, l'infection multiple et une charge virale épisodique élevée du VPH-16. Le tabac contient plusieurs éléments carcinogènes qui peuvent agir de façon prolongée sur la cellule infectée par un VPH à haut-risque pour induire la transformation et l'immortalisation cellulaire (223). Les changements induits par ce cofacteur et, possiblement par d'autres cofacteurs non-identifiés dans ce mémoire, sont conservés dans la cellule immortalisée et peuvent s'accumuler (175). La réplication atteint alors son apogée en produisant une grande quantité d'oncoprotéines virales. Le tabac peut aussi atténuer la réponse immunitaire en réduisant le nombre de cellules immunitaires au site d'infection (210). Les VPHs ainsi que les cellules anormales ont moins de risque d'être éliminés.

Finalement, le facteur prédictif de progression de l'AIN-1 vers l'AIN-2,3 le plus significatif est une charge épisodique élevée du VPH-16. Une charge épisodique du VPH-16

semble être le seul facteur important dans la progression de l'infection dans la phase préinvasive. Bien que l'intégration du VPH-16 puisse se produire à n'importe quel grade d'AIN, elle ne serait pas un phénomène important pour la progression de l'AIN de bas-grade vers un grade plus élevé. Nos résultats suggèrent que l'intégration du VPH-16 aurait un impact majeur dans la carcinogenèse une fois que l'AIN-2,3 se soit développé et que la charge virale épisomale ait chuté. Toutefois, d'autres facteurs de progression vers la malignité des lésions restent à définir. Ainsi, une charge virale épisomale élevée augmenterait les chances d'intégration du VPH-16, mais la surexpression des oncogènes E6 et E7 serait contrôlée par les protéines E2 résiduelles. Donc, le développement et la progression des lésions seraient dus à la grande quantité d'oncoprotéines produites par les épisomes qui sont retrouvés en grand nombre. La perte des formes épisomales du VPH peut être expliquée par le fait que les VPHs intégrés ont souvent un avantage de croissance plus grand que les épisomes. Par conséquent, la charge virale épisomale diminuerait progressivement, ce qui entraînerait une diminution du nombre de protéine E2 produites. Les oncogènes seraient alors surexprimés et cette surexpression engendrerait des anomalies. Toutefois, d'autres analyses seront nécessaires pour déterminer quelles sont les facteurs responsables de la diminution de la charge virale épisomale du VPH-16.

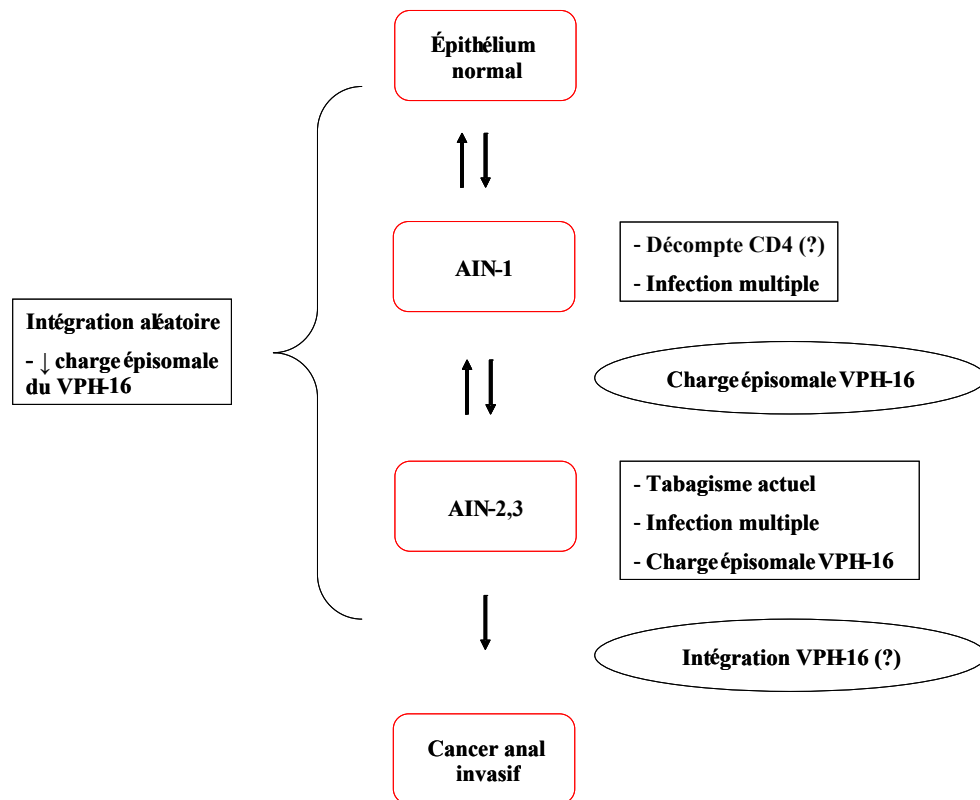


Figure 12. Modèle théorique de l'histoire naturelle de l'infection au virus du papillome de type 16 chez des homosexuels mâles VIH-séropositifs dans le cadre de la TAR. Une immunité cellulaire amoindrie et une infection par plusieurs types de VPH favoriseraient le développement de lésions de bas-grade (AIN-1). Le tabagisme actuel, l'infection multiple et une charge épisomale du VPH-16 élevée favoriseraient le développement de lésions de haut-grade (AIN-2,3). Les individus avec un AIN-1 et une charge virale épisomale élevée seraient plus susceptibles de progresser vers un AIN-2,3. L'intégration du VPH-16 semble être un événement aléatoire dans la mesure où elle peut se produire autant dans tous les grades d'AIN que dans un épithélium normal. La persistance de formes intégrées est précédée par une diminution de la charge épisomale du VPH-16. L'intégration du VPH-16 pourrait jouer un rôle dans la progression de l'AIN-2,3 vers le cancer invasif. Encadrés en rouge et en noir : différents grade des lésions et prédictors d'AIN, respectivement. Ellipses : prédictors de progression. AIN, néoplasie intraépithéliale anale; VPH-16, virus du papillome humain de type 16.

Pour terminer, dans un programme de dépistage de cancer de l'anus, la charge virale épisomale du VPH-16 devrait être suivie périodiquement pour identifier les individus à risque de progression. La surveillance de l'intégration ne serait pas nécessaire chez les participants arborant des LSIL. Des études futures devraient être réalisées pour évaluer le rôle de la détection de l'intégration dans le suivi d'individus avec un AIN-2,3. Toutefois, nous avons noté un chevauchement important des charges virales épisomales entre les individus avec ou sans AIN tel qu'illustré dans la figure 1 de l'article (page 71). Ce chevauchement rend l'application pratique de la charge virale épisomale du VPH-16 problématique. Également, les médecins devraient conseiller à leurs patients fumeurs d'arrêter de fumer, le tabac étant un cofacteur carcinogène important.

4.2. CONCLUSION

Aucune étude à ce jour n'avait encore investigué le rôle de la charge virale épisomale et intégrée du VPH-16 sur la progression de l'AIN au cours de l'infection anale préinvasive. Pourtant, la détermination des facteurs responsables de la progression de l'AIN pourrait nous être utile pour l'identification des individus à risque de progression et le suivi de ces déterminants pourrait être inclus comme ligne directrice dans un programme de dépistage des AIN.

Dans cette étude, nous avons pu confirmer l'association entre certains facteurs et la prévalence ou la progression de l'AIN. Nous avons démontré qu'une charge virale épisomale élevée du VPH-16 était associée à l'AIN de haut-grade (AIN-2,3) prévalent et à la progression de l'AIN de bas-grade (AIN-1) vers l'AIN de haut-grade (AIN-2,3). L'infection multiple était associée à l'AIN-1 et possiblement le décompte des lymphocytes CD4 aussi. L'infection à plusieurs types de VPH fut également associée à l'AIN-2,3 ainsi que le tabagisme actuel, mais non le tabagisme passé. Également, nous avons démontré que la charge intégrée du VPH-16 ainsi que la présence de formes intégrées ne jouent pas de rôle dans la progression de l'AIN-1 vers l'AIN-2,3. Toutefois, l'intégration du VPH-16 semblerait importante dans la progression de l'AIN-2,3 vers le cancer anal invasif. Enfin, nous avons montré que l'intégration du VPH-16 pouvait se produire au cours de toutes les phases de l'infection anale préinvasive soient dans les épithéliums normaux, l'AIN-1 et l'AIN-2,3. La présence de l'intégration du VPH-16 serait associée à une diminution de la charge virale épisomale du VPH-16.

Les avantages de cette étude sont multiples. Elle est une des premières à se pencher sur l'histoire naturelle de l'infection anale par le VPH-16 chez des HARSAs VIH-séropositifs dans le cadre de la TAR, ce qui nous donne un premier aperçu sur le dynamisme de l'infection-spécifique au VPH-16 anale. Le suivi prospectif des sujets dans cette étude nous permet d'étudier non seulement les facteurs de risque associés à l'AIN prévalent, mais aussi les déterminants impliqués dans la progression de la maladie anale préinvasive. Aussi, puisque les analyses clinico-pathologiques et les mesures des charges virales ont été effectuées par des laboratoires différents (laboratoire de pathologie et

laboratoire de virologie, respectivement), l'interprétation biaisée des résultats a été éliminée. Par contre, le faible nombre de participants (135 hommes) ne nous permet pas dans tous les cas de confirmer les associations entre les facteurs et le grade de l'AIN ou la progression de l'AIN.

Pour conclure, nous avons malgré tout atteint notre but qui était de mieux définir l'histoire naturelle des charges virales épisodiques et intégrées et de l'intégration du VPH-16 chez des HARSAs VIH-séropositifs dans le cadre de l'infection anale préinvasive. Les résultats présentés dans ce mémoire montrent que plusieurs facteurs sont impliqués dans la carcinogenèse du VPH-16. Il est donc nécessaire d'implanter un programme de dépistage de l'AIN systématique afin de suivre les patients à risque de progression pour les diriger vers le traitement approprié.

LISTE DE LA LITTÉRATURE CITÉE

- (1) Syrjanen S, Syrjanen K. The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health*. 2008;16 Suppl:S7-13.
- (2) zur-Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-265.
- (3) Shope RE, Hurst EW. Infectious Papillomatosis Of Rabbits : With A Note On The Histopathology . *J Exp Med*. 1933;58:607-624.
- (4) Rous P, Beard JW. The Progression To Carcinoma Of Virus-Induced Rabbit Papillomas . *J Exp Med*. 1935;62:523-548.
- (5) Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci*. 1956;63(6):1245-1261.
- (6) Valdespino VM, Valdespino VE. Cervical cancer screening: state of the art. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18:35-40.
- (7) zur-Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*. 1974;13(5):650-656.
- (8) Gissmann L, zur-Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). *Int J Cancer*. 1980;25(5):605-609.
- (9) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur-Hausen H. 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*. 1983;80(12):3812-3815.
- (10) Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*. 1984;3(5):1151-1157.
- (11) Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243(4893):934-937.
- (12) Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76-79.
- (13) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-19.

- (14) Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa MI et al. Efficacy of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19(7):1166-1176.
- (15) Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J et al. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res*. 1991;51(3):1014-1019.
- (16) Poizot-Martin I, Henry M, Benhaim S et al. High level of HPV 16 and 18 DNA load in anal swabs from male and female HIV-1 infected patients. *J Clin Virol*. 2009;44(4):314-317.
- (17) IARC. Human papillomaviruses. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 90, 1-670. 2007.
- (18) Goggin, P., Louchini, R, and Steben, M. Trends in Anal Cancer Incidence in Quebec. 26e Conférence internationale sur le virus du papillome humain . 2005.
- (19) Santé et Service sociaux du Québec. 10.4.4 Vaccin contre le virus du papillome humain. Protocole d'immunisation du Québec. 2010.
- (20) Waxman AG, Zsemlye MM. Preventing cervical cancer: the Pap test and the HPV vaccine. *Med Clin North Am*. 2008;92(5):1059-82,x.
- (21) de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
- (22) Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S1-S6.
- (23) Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol*. 1997;35(1):11-19.
- (24) Secondy, M. Classification des papillomavirus (HPV). *Revue Francophone des Laboratoires* 405, 23-25. 2008.
- (25) de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol*. 1989;63(11):4898-4903.
- (26) Lacey CJ, Lowndes CM, Shah KV. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*. 2006;24S3:S35-S41.
- (27) Bosch FX, Lorincz A, Munoz N et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-265.
- (28) Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(12):958-964.

- (29) Castle PE. The evolving definition of carcinogenic human papillomavirus. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:7.
- (30) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-527.
- (31) Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002;21(18):4754-4762.
- (32) Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006;11:2286-2302.
- (33) Baker TS, Newcomb WW, Olson NH et al. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*. 1991;60(6):1445-1456.
- (34) Ostrow RS, Faras AJ. The molecular biology of human papillomaviruses and the pathogenesis of genital papillomas and neoplasms. *Cancer Metastasis Rev*. 1987;6(3):383-395.
- (35) Gonzalez-Martin A. Molecular biology of cervical cancer. *Clin Transl Oncol*. 2007;9(6):347-354.
- (36) Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2002;31:343-360.
- (37) Hegde RS, Androphy EJ. Crystal structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus type 16: implications for its DNA binding-site selection mechanism. *J Mol Biol*. 1998;284(5):1479-1489.
- (38) Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002;24(3):275-290.
- (39) Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(25):5817-5823.
- (40) Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):362-372.
- (41) Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology*. 2009;384(2):360-368.
- (42) Ghittoni R, Accardi R, Hasan U et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010;40(1):1-13.
- (43) Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 2009;384(2):324-334.

- (44) Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006;16(2):83-97.
- (45) Nomine Y, Masson M, Charbonnier S et al. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell.* 2006;21(5):665-678.
- (46) Bensaad K, Vousden KH. p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* 2007;17(6):286-291.
- (47) McLaughlin-Drubin ME, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 2009;384(2):335-344.
- (48) Poznic M. Retinoblastoma protein: a central processing unit. *J Biosci.* 2009;34(2):305-312.
- (49) Fields Virology. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- (50) Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development.* 1989;106(4):619-633.
- (51) Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13473-13475.
- (52) Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol.* 1990;111(6 Pt 2):2807-2814.
- (53) Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(1):46-54.
- (54) Bousarghin L, Touze A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol.* 2003;77(6):3846-3850.
- (55) Sapp M, Day PM. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology.* 2009;384(2):400-409.
- (56) Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(6):379-386.
- (57) Wu SY, Chiang CM. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13141-13145.
- (58) McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE et al. Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol.* 2006;80(19):9530-9543.
- (59) Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T et al. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000397.

- (60) Haugen TH, Lacey MJ, Ishiji T et al. Cellular factors are required to activate bovine papillomavirus-1 early gene transcription and to establish viral plasmid persistence but are not required for cellular transformation. *Virology*. 2009;389(1-2):82-90.
- (61) Cumming SA, Cheun-Im T, Milligan SG, Graham SV. Human papillomavirus type 16 late gene expression is regulated by cellular RNA processing factors in response to epithelial differentiation. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 3):522-524.
- (62) Zheng ZM, He P, Baker CC. Selection of the bovine papillomavirus type 1 nucleotide 3225 3' splice site is regulated through an exonic splicing enhancer and its juxtaposed exonic splicing suppressor. *J Virol*. 1996;70(7):4691-4699.
- (63) Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev*. 1988;10:122-163.
- (64) Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer*. 2004;101(2):270-280.
- (65) Johnson LG, Madeleine MM, Newcomer LM et al. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. *Cancer*. 2004;101(2):281-288.
- (66) Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(3 Suppl 2):S4-S7.
- (67) Palefsky JM, Rubin M. The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2009;36(1):187-200.
- (68) Palefsky JM. Anal squamous intraepithelial lesions: relation to HIV and human papillomavirus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;21 Suppl 1:S42-S48.
- (69) Piketty C, Darragh TM, Da Costa M et al. High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. *Ann Intern Med*. 2003;138(6):453-459.
- (70) Daling JR, Weiss NS, Hislop TG et al. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. *N Engl J Med*. 1987;317(16):973-977.
- (71) Société canadienne du cancer and Institut national du cancer du Canada. Statistiques canadiennes sur le cancer. 2008.
- (72) Institut national de santé publique du Québec. Avis sur l'optimisation du dépistage du cancer du col utérin au Québec. 2009.
- (73) Franceschi S, Herrero R, Clifford GM et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2677-2684.
- (74) Dunne EF, Unger ER, Sternberg M et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007;297(8):813-819.

- (75) Herrero R, Hildesheim A, Bratti C et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(6):464-474.
- (76) Fey MC, Beal MW. Role of human papilloma virus testing in cervical cancer prevention. *J Midwifery Womens Health.* 2004;49(1):4-13.
- (77) Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C et al. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *Int J Cancer.* 2008;123(8):1864-1870.
- (78) Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis.* 2005;191(5):731-738.
- (79) Garcia-Pineros AJ, Hildesheim A, Herrero R et al. Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. *Cancer Res.* 2006;66(22):11070-11076.
- (80) Hankins C, Coutlee F, Lapointe N et al. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. Canadian Women's HIV Study Group. *CMAJ.* 1999;160(2):185-91.
- (81) Singh DK, Anastos K, Hoover DR et al. Human papillomavirus infection and cervical cytology in HIV-infected and HIV-uninfected Rwandan women. *J Infect Dis.* 2009;199(12):1851-1861.
- (82) Palefsky JM. Human papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1998;(23):15-20.
- (83) Massad LS, Riestler KA, Anastos KM et al. Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. Women's Interagency HIV Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;21(1):33-41.
- (84) Massad LS, Seaberg EC, Wright RL et al. Squamous cervical lesions in women with human immunodeficiency virus: long-term follow-up. *Obstet Gynecol.* 2008;111(6):1388-1393.
- (85) Nyitray A, Nielson CM, Harris RB et al. Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection in heterosexual men. *J Infect Dis.* 2008;197(12):1676-1684.
- (86) Hernandez BY, McDuffie K, Zhu X et al. Anal human papillomavirus infection in women and its relationship with cervical infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(11 Pt 1):2550-2556.

- (87) Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Jay N. Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. *J Infect Dis.* 1998;177(2):361-367.
- (88) Frisch M, Melbye M, Moller H. Trends in incidence of anal cancer in Denmark. *BMJ.* 1993;306(6875):419-422.
- (89) Jemal A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54(1):8-29.
- (90) Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225-249.
- (91) Statistics Canada. Cancer Incidence in Canada. 2007.
- (92) Statistics Canada. Cancer incidence in Canada. 2009.
- (93) Diamond C, Taylor TH, Aboumrad T et al. Increased incidence of squamous cell anal cancer among men with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. *Sex Transm Dis.* 2005;32(5):314-320.
- (94) Palefsky JM, Holly EA, Efirdc JT et al. Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. *AIDS.* 2005;19(13):1407-1414.
- (95) Chin-Hong PV, Vittinghoff E, Cranston RD et al. 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.* 2004;190(12):2070-2076.
- (96) Shiels MS, Cole SR, Kirk GD, Poole C. A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;52(5):611-622.
- (97) Barnholtz-Sloan J, Patel N, Rollison D et al. Incidence trends of invasive cervical cancer in the United States by combined race and ethnicity. *Cancer Causes Control.* 2009;20(7):1129-1138.
- (98) Tseng HF, Morgenstern H, Mack TM, Peters RK. Risk factors for anal cancer: results of a population-based case-control study. *Cancer Causes Control.* 2003;14(9):837-846.
- (99) Fox PA. Human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(1):62-66.
- (100) Piketty C, Darragh TM, Heard I et al. High prevalence of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive men despite the use of highly active antiretroviral therapy. *Sex Transm Dis.* 2004;31(2):96-99.

- (101) Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on the natural history of anal squamous intraepithelial lesions and anal human papillomavirus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;28(5):422-428.
- (102) D'Souza G, Wiley DJ, Li X et al. Incidence and epidemiology of anal cancer in the multicenter AIDS cohort study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;48(4):491-499.
- (103) Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(5):525-541.
- (104) Moscicki, A-B., Schiffman, M., Kjaer, S., and Villa, L. L. Chapter 5 : Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24S3, S42-S51. 6-6-2006.
- (105) Wright, T. C. CHAPTER 3 Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system. *Obstet.Gynecol*. 94[Supplement 1], S22-S31. 2006.
- (106) Apgar BS, Zoschnick L, Wright T-CJ. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician*. 2003;68(10):1992-1998.
- (107) Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S16-S24.
- (108) Wong, A. K., Chan, R. C., Aggarwal, N., Singh, M. K., Nichols, W. S., and Bose, S. Human papillomavirus genotypes in anal intraepithelial neoplasia and anal carcinoma as detected in tissue biopsies. *Mod Pathol*. 23[1], 144-150. 2010.
- (109) Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(18):1500-1510.
- (110) Zbar AP, Fenger C, Efron J et al. The pathology and molecular biology of anal intraepithelial neoplasia: comparisons with cervical and vulvar intraepithelial carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2002;17(4):203-215.
- (111) Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11-22.
- (112) Bratcher J, Palefsky JM. Anogenital human papillomavirus coinfection and associated neoplasia in HIV-positive men and women. *The PRN Notebook*. 2008;13:1-8.
- (113) McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*. 2009;143(2):195-208.
- (114) Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer*. 2003;106(3):396-403.

- (115) Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002;3(1):11-16.
- (116) Munger K, Phelps WC, Bubb V et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.* 1989;63(10):4417-4421.
- (117) Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C et al. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(2):348-370.
- (118) Gammoh N, Isaacson E, Tomaic V et al. Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2. *Oncogene.* 2009;28(23):2299-2304.
- (119) Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1755-1762.
- (120) Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 1995;69(5):2989-2997.
- (121) zur-Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342-350.
- (122) Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M et al. Epigenetic of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer.* 2005;4(38):1-24.
- (123) Szalmas A, Konya J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(3):144-152.
- (124) Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE et al. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(4):273-282.
- (125) Cullen AP, Reid R, Champion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.* 1991;65(2):606-612.
- (126) Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 2001;10(1):46-54.
- (127) Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):80-88.
- (128) Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol.* 2006;59(5):513-517.

- (129) Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):886-891.
- (130) Gallo G, Bibbo M, Bagella L et al. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol.* 2003;56(7):532-536.
- (131) Khouadri S, Villa LL, Gagnon S et al. Viral load of episomal and integrated forms of human papillomavirus type 33 in high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Int J Cancer.* 2007;121(12):2674-2681.
- (132) Fontaine J, Hankins C, Mayrand MH et al. High levels of HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical lesions in women at risk or infected with HIV. *AIDS.* 2005;19(8):785-794.
- (133) Scholefield JH, Palmer JG, Shepherd NA et al. Clinical and pathological correlates of HPV type 16 DNA in anal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 1990;5(4):219-222.
- (134) Palmer JG, Scholefield JH, Coates PJ et al. Anal cancer and human papillomaviruses. *Dis Colon Rectum.* 1989;32(12):1016-1022.
- (135) Holm R, Tanum G, Karlsen F, Nesland JM. Prevalence and physical state of human papillomavirus DNA in anal carcinomas. *Mod Pathol.* 1994;7(4):449-453.
- (136) Matovina M, Sabol I, Grubisic G et al. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol.* 2009;113(1):120-127.
- (137) Thorland EC, Myers SL, Persing DH et al. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.* 2000;60(21):5916-5921.
- (138) Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol.* 2007;212(4):356-367.
- (139) Nakagawa M, Stites DP, Farhat S et al. T-cell proliferative response to human papillomavirus type 16 peptides: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3(2):205-210.
- (140) Nakagawa M, Stites DP, Farhat S et al. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis.* 1997;175(4):927-931.
- (141) Vernon SD, Hart CE, Reeves WC, Icenogle JP. The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus 16 transcription. *Virus Res.* 1993;27(2):133-145.
- (142) Tornesello ML, Buonaguro FM, Beth-Giraldo E, Giraldo G. Human immunodeficiency virus type 1 tat gene enhances human papillomavirus early gene expression. *Intervirology.* 1993;36(2):57-64.

- (143) Tilston P. Anal human papillomavirus and anal cancer. *J Clin Pathol*. 1997;50(8):625-634.
- (144) Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K17-K28.
- (145) Critchlow CW, Hawes SE, Kuypers JM et al. Effect of HIV infection on the natural history of anal human papillomavirus infection. *AIDS*. 1998;12(10):1177-1184.
- (146) Daling JR, Weiss NS, Hislop TG et al. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. *N Engl J Med*. 1987;317(16):973-977.
- (147) Koblin BA, Husnik MJ, Colfax G et al. Risk factors for HIV infection among men who have sex with men. *AIDS*. 2006;20(5):731-739.
- (148) Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML et al. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. *AIDS*. 1998;12(5):495-503.
- (149) Palefsky JM, Holly EA, Hogeboom CJ et al. Virologic, immunologic, and clinical parameters in the incidence and progression of anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998;17(4):314-319.
- (150) Critchlow CW, Surawicz CM, Holmes KK et al. Prospective study of high grade anal squamous intraepithelial neoplasia in a cohort of homosexual men: influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. *AIDS*. 1995;9(11):1255-1262.
- (151) Chin-Hong PV, Palefsky JM. Natural history and clinical management of anal human papillomavirus disease in men and women infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2002;35(9):1127-1134.
- (152) Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12(2):186-192.
- (153) de Pokomandy A, Rouleau D, Ghattas G et al. Prevalence, clearance, and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *J Infect Dis*. 2009;199(7):965-973.
- (154) Vajdic CM, van Leeuwen MT, Jin F et al. Anal human papillomavirus genotype diversity and co-infection in a community-based sample of homosexual men. *Sex Transm Infect*. 2009;85(5):330-335.
- (155) Bosch FX, Manos MM, Munoz N et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(11):796-802.

- (156) Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH et al. Progression and regression of incident cervical HPV 6, 11, 16 and 18 infections in young women. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:15.
- (157) Trottier H, Mahmud S, Costa MC et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(7):1274-1280.
- (158) Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol*. 2001;64(4):550-559.
- (159) van der Graaf Y, Molijn A, Doornewaard H et al. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol*. 2002;156(2):158-164.
- (160) Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res*. 2007;125(2):176-182.
- (161) Nielson CM, Harris RB, Flores R et al. Multiple-type human papillomavirus infection in male anogenital sites: prevalence and associated factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1077-1083.
- (162) Salit, I. E., Tinmouth, J., Chong, S., Raboud, J., Diong, C., Su, D., Sano, M., Lytwyn, A., Chapman, W., and Mahony, J. Screening for HIV-Associated Anal Cancer: Correlation of Genotypes, p16, and E6 Transcripts with Anal Pathology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18[7], 1986-1992. 2009.
- (163) Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):35-40.
- (164) Villa LL, Sichero L, Rahal P et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 12):2959-2968.
- (165) Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer*. 2003;106(3):396-403.
- (166) Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001;286(24):3106-3114.
- (167) Syrjanen K, Shabalova I, Naud P et al. Persistent high-risk human papillomavirus infections and other end-point markers of progressive cervical disease among women prospectively followed up in the New Independent States of the Former Soviet Union and the Latin American Screening study cohorts. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19(5):934-942.

- (168) Lacey HB, Wilson GE, Tilston P et al. A study of anal intraepithelial neoplasia in HIV positive homosexual men. *Sex Transm Infect.* 1999;75(3):172-177.
- (169) Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer.* 2005;92(5):891-894.
- (170) Cheung JL, Cheung TH, Ng CW et al. Analysis of human papillomavirus type 18 load and integration status from low-grade cervical lesion to invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 2009;47(2):287-293.
- (171) Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2003;103(4):519-524.
- (172) Azizi N, Brazete J, Hankins C et al. Influence of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E2 polymorphism on quantification of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 7):1716-1728.
- (173) Hopman AH, Smedts F, Dignef W et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol.* 2004;202(1):23-33.
- (174) Boulet, G. A. V., Benoy, I. H., Depuydt, C. E., Horvath, C. A. J., Aerts, M., Hens, N., Vereecken, A. J., and Bogers, J. J. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18[11], 2992-2999. 2009.
- (175) IARC. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* 83, 1-1452. 2004. Ref Type: Generic
- (176) Syrjanen K, Shabalova I, Petrovichev N et al. Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. *Eur J Epidemiol.* 2007;22(10):723-735.
- (177) Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJ et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol.* 2008;37(3):536-546.
- (178) Park IU, Ogilvie J-WJ, Anderson KE et al. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2009;114(3):399-403.
- (179) Palefsky JM, Shiboski S, Moss A. Risk factors for anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994;7(6):599-606.

- (180) Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):41-46.
- (181) Chaturvedi AK, Madeleine MM, Biggar RJ, Engels EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(16):1120-1130.
- (182) Strickler HD, Palefsky JM, Shah KV et al. Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus-seropositive women. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(14):1062-1071.
- (183) Einstein MH, Kadish AS. Anogenital neoplasia in AIDS. *Curr Opin Oncol.* 2004;16(5):455-462.
- (184) Deacon JM, Evans CD, Yule R et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer.* 2000;83(11):1565-1572.
- (185) Cuzick J, Terry G, Ho L et al. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British women. *Br J Cancer.* 2000;82(7):1348-1352.
- (186) Araujo-Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. *Mutat Res.* 2003;544(2-3):375-383.
- (187) Matsumoto K, Yasugi T, Nakagawa S et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer. *Int J Cancer.* 2003;106(6):919-922.
- (188) Araujo-Souza PS, Maciag PC, Ribeiro KB et al. Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:246.
- (189) Da Costa MM, Hogeboom CJ, Holly EA, Palefsky JM. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Infect Dis.* 2002;185(9):1229-1237.
- (190) Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002;89(2):191-199.
- (191) Koskela P, Anttila T, Bjorge T et al. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer.* 2000;85(1):35-39.
- (192) Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C et al. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods.* 2003;112(1-2):23-33.

- (193) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.
- (194) Cheung JL, Lo KW, Cheung TH et al. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis.* 2006;194(12):1706-1712.
- (195) Luft F, Klaes R, Nees M et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer.* 2001;92(1):9-17.
- (196) Ruutu MP, Kulmala SM, Peitsaro P, Syrjanen SM. The performance of the HPV16 real-time PCR integration assay. *Clin Biochem.* 2008;41(6):423-428.
- (197) Klaes R, Woerner SM, Ridder R et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999;59(24):6132-6136.
- (198) Wilkin TJ, Palmer S, Brudney KF et al. Anal intraepithelial neoplasia in heterosexual and homosexual HIV-positive men with access to antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2004;190(9):1685-1691.
- (199) Gohy L, Gorska I, Rouleau D et al. Genotyping of human papillomavirus DNA in anal biopsies and anal swabs collected from HIV-seropositive men with anal dysplasia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;49(1):32-39.
- (200) Roteli-Martins CM, Panetta K, Alves VA et al. Cigarette smoking and high-risk HPV DNA as predisposing factors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in young Brazilian women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1998;77(6):678-682.
- (201) Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B et al. Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol.* 2009;113(1):115-119.
- (202) Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML et al. Anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men: prevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998;17(4):320-326.
- (203) Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD et al. 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.* 2001;183(1):8-15.
- (204) Kiviat NB, Critchlow CW, Holmes KK et al. Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. *AIDS.* 1993;7(1):43-49.

- (205) Walensky RP, Paltiel AD, Losina E et al. The survival benefits of AIDS treatment in the United States. *J Infect Dis.* 2006;194(1):11-19.
- (206) D'Souza G, Wiley DJ, Li X et al. Incidence and epidemiology of anal cancer in the multicenter AIDS cohort study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;48(4):491-499.
- (207) Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(3):226-236.
- (208) Barton SE, Maddox PH, Jenkins D et al. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet.* 1988;2(8612):652-654.
- (209) Campaner AB, Nadais RF, Galvao MA. The effect of cigarette smoking on cervical langerhans cells and T and B lymphocytes in normal uterine cervix epithelium. *Int J Gynecol Pathol.* 2009;28(6):549-553.
- (210) Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP et al. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest.* 1995;39(1):34-38.
- (211) Syrjanen K, Shabalova I, Petrovichev N et al. Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. *Eur J Epidemiol.* 2007;22(10):723-735.
- (212) Bavin PJ, Giles JA, Deery A et al. Use of semi-quantitative PCR for human papillomavirus DNA type 16 to identify women with high grade cervical disease in a population presenting with a mildly dyskaryotic smear report. *Br J Cancer.* 1993;67(3):602-605.
- (213) Flannelly G, Jiang G, Anderson D et al. Serial quantitation of HPV-16 in the smears of women with mild and moderate dyskaryosis. *J Med Virol.* 1995;47(1):6-9.
- (214) Lefevre J, Hankins C, Pourreaux K et al. Prevalence of selective inhibition of HPV-16 DNA amplification in cervicovaginal lavages. *J Med Virol.* 2004;72(1):132-137.
- (215) Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY et al. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):191-197.
- (216) Jiang M, Baseman JG, Koutsky LA et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2009;47(3):521-526.
- (217) Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol.* 1985;66(Pt 7):1515-1522.

- (218) Lacey MJ, Anson JR, Klingelhutz AJ et al. Human Papillomavirus (HPV) Type 18 Induces Extended Growth in Primary Human Cervical, Tonsillar, or Foreskin Keratinocytes More Effectively than Other High-Risk Mucosal HPVs. *J Virol.* 2009;83(22):11784-11794.
- (219) Wagatsuma M, Hashimoto K, Matsukura T. Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol.* 1990;64(2):813-821.
- (220) Yu T, Ferber MJ, Cheung TH et al. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;158(1):27-34.
- (221) Bergamaschi A, Kim YH, Kwei KA et al. CAMK1D amplification implicated in epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Mol Oncol.* 2008;2(4):327-339.
- (222) Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ et al. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J Clin Invest.* 2004;113(8):1234-1242.
- (223) Garrett LR, Perez-Reyes N, Smith PP, McDougall JK. Interaction of HPV-18 and nitrosomethylurea in the induction of squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 1993;14(2):329-332.