



Université de Montréal

L'impact du polymorphisme du gène E2 sur la quantification de la charge virale du  
VPH-16 dans les maladies précancéreuses du col utérin

Par

Naoufel Azizi

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise es sciences (M.Sc)

en Microbiologie/ immunologie

©Naoufel Azizi, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'impact du polymorphisme du gène E2 sur la quantification de la charge virale du  
VPH-16 dans les maladies précancéreuses du col utérin

Présenté par :  
Naoufel Azizi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Louise Labrecque : Président-rapporteur  
Dr François Coutlée : Directeur de recherche  
Dr Jacques Archambault : Membre du jury

## Résumé

Le VPH-16 de même que certains VPH, dont le VPH-18, causent le cancer du col utérin. Son intégration dans le génome humain pourrait être un marqueur de progression de l'infection.

Les charges virales totale et intégrée sont présentement mesurées en quantifiant par PCR en temps réel les gènes E6 (RT-E6) et E2 (RT-E2-1) du VPH-16.

Nous avons évalué l'impact du polymorphisme du gène E2 sur la quantification de l'ADN du VPH-16 dans des spécimens cliniques. Dans un premier temps, le gène E2 de 135 isolats de VPH-16 (123 appartenaient au clade Européen et 12 à des clades non- Européens) fut séquencé. Ensuite, un test de PCR en temps réel ciblant les séquences conservées dans E2 (RT-E2-2) fut développé et optimisé.

Cent trente-neuf spécimens (lavages cervicaux et vaginaux) provenant de 74 participantes (58 séropositives pour le VIH, 16 séronégatives pour le VIH) ont été étudiés avec les trois tests E2 (RT-E2-2), E6 (RT-E6) et E2 (RT-E2-1).

Les ratios de la quantité d'ADN de VPH-16 mesuré avec RT-E2-2 et RT-E2-1 dans les isolats Européens (médiane, 1.02; intervalle, 0.64-1.80) et Africains 1 (médiane, 0.80; intervalle, 0.53-1.09) sont similaires ( $P=0.08$ ). Par contre, les ratios mesurés avec les isolats Africains 2 (médiane, 3.23; intervalle, 1.92-3.49) ou Asiatique-Américains (médiane, 3.78; intervalle, 1.47-37) sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec les isolats Européens ( $P<0.02$  pour chaque comparaison). Les distributions des quantités de E2 contenues dans les 139 échantillons mesurées avec RT-E2-2 (médiane, 6150) et RT-E2-1 (médiane, 8960) étaient statistiquement différentes ( $P<0.0001$ ).

Nous avons observé que les charges virales totale (odds ratio (OR) OR, 2.16 95% intervalle de confiance (IC) 1.11-4.19), et épisomale du VPH-16 (OR, 2.14 95% IC 1.09-4.19), mais pas la présence de formes intégrées (OR, 3.72 95% IC 1.03-13.4), sont associées aux néoplasies intraépithéliales cervicales de haut grade (CIN-2,3), et ce, en contrôlant pour des facteurs confondants tels que l'âge, le taux de CD4 sanguin, l'infection au VIH, et le polymorphisme de VPH-16. La proportion des échantillons ayant un ratio E6/E2  $> 2$  pour les femmes sans lésion intraépithéliale (7

de 35) est similaire à celle des femmes avec CIN-2,3 (5 de 11,  $p=0.24$ ) ou avec CIN-1 (4 de 14,  $P=0.65$ ).

Le polymorphisme du gène E2 est un facteur qui influence la quantification des charges intégrées de VPH-16.

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

## Abstract

Episomal and integrated HPV-16 loads are currently estimated by quantitation with real-time PCR of HPV-16 E6 (RT-E6) and E2 (RT-E2-1) DNA. We assessed the impact of HPV-16 E2 polymorphism on quantitation of integrated HPV-16 DNA in clinical specimens. First, HPV-16 E2 was sequenced from 135 isolates (123 from European and 12 from non-European lineages). A novel assay targeting conserved HPV-16 E2 sequences (RT-E2-2) was optimized and applied with RT-E6 and RT-E2-1 on 139 HPV-16-positive cervicovaginal lavages collected from 74 women (58 HIV-seropositive, 16 HIV-seronegative). Ratios of HPV-16 DNA copies measured with RT-E2-2 and RT-E2-1 with European (median, 1.02; range, 0.64-1.80) and African 1 (median, 0.80; range, 0.53-1.09) isolates were similar ( $P=0.08$ ). Ratios obtained with African 2 (median, 3.23; range, 1.92-3.49) or Asian-American (median, 3.78; range, 1.47-37) isolates were greater than those with European isolates ( $P<0.02$  for each comparison). Distributions of HPV-16 E2 copies measured in 139 samples with RT-E2-2 (median, 6150) and RT-E2-1 (median, 8960) were different ( $P<0.0001$ ). HPV-16 total (odds ratio (OR) OR, 2.16 95% confidence interval (CI) 1.11-4.19), episomal (OR, 2.14 95% CI 1.09-4.19) but not integrated (OR, 3.72 95% CI 1.03-13.4) load, were associated with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN-2,3) after controlling for age, CD4 count and HIV, and HPV-16 polymorphism. The proportion of samples with an E6/E2 ratio  $>2$  in women without SIL (7 of 35) was similar to that of women with CIN-2,3 (5 of 11,  $P=0.24$ ) or CIN-1 (4 of 14,  $P=0.65$ ). E2 polymorphism was a factor that influenced measures of HPV-16 integrated load.

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

## PRÉSENTATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Cette étude a été présentée dans le cadre de quatre congrès scientifiques :

### **1. Présentation par affiche :**

N. Azizi, F. Coutlée, C. Hankins, D. Money, J. Fontaine, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, E. Franco, for The Canadian Women's HIV Study Group. «*Polymorphisme du gène E2 du papillomavirus humain de type 16 (VPH-16)*».

9<sup>ème</sup> congrès du CHUM, 18 décembre 2006.

### **2. Présentations orales :**

N. Azizi, F. Coutlée, C. Hankins, D. Money, J. Fontaine, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, E. Franco, for The Canadian Women's HIV Study Group. «*Polymorphisme du gène E2 du papillomavirus humain de type 16 (VPH-16)*»

17<sup>ème</sup> journée scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal (ICM), 20 décembre 2006.

N. Azizi, F. Coutlée, C. Hankins, D. Money, J. Fontaine, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, E. Franco, for The Canadian Women's HIV Study Group. «*Évolution de la charge virale et de l'intégration du VPH-16 dans les maladies pre-cancéreuses du col utérin*».

16<sup>ème</sup> conférence sur la recherche contre le VIH et le SIDA, Montréal, 5 novembre 2007.

N. Azizi, F. Coutlée, C. Hankins, D. Money, J. Fontaine, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, E. Franco, for The Canadian Women's HIV Study Group. «*Évolution de la charge virale et de l'intégration du VPH-16 dans les maladies pre-cancéreuses du col utérin*».

10<sup>ème</sup> congrès du CHUM, 18 décembre 2007.

### **3. Publication:**

N. Azizi, J. Brazete, C. Hankins, D. Money, J. Fontaine, A. Koushik, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, E. Franco and F. Coutlée for The Canadian Women's HIV Study Group. (2008).

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. **Journal of General Virology**, **89**, 1716–1728.



## TABLE DE MATIÈRES

Résumé .....	iv
Abstract .....	vi
<u>PRÉSENTATIONS À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES</u> .....	vii
1. Présentation par affiche .....	vii
2. Présentations orales .....	vii
3. Publication .....	viii
<u>TABLE DES MATIÈRES</u> .....	ix
<u>LISTE DES FIGURES</u> .....	xi
<u>Revue de littérature</u> .....	xi
<u>Article</u> .....	xii
<u>LISTE DES TABLEAUX</u> .....	xiii
<u>Revue de littérature</u> .....	xiii
<u>Article</u> .....	xiii
<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u> .....	xiv
<u>DÉDICACE</u> .....	xvi
<u>REMERCIEMENTS</u> .....	xvii
<u>REVUE DE LITTÉRATURE</u> .....	1
<u>INTRODUCTION</u> .....	2
<u>1. Le virus du papillome humain</u> .....	4
1.1 Historique .....	4
1.2 Taxonomie .....	4
1.3 Organisation génomique .....	6
1.4 Cycle de réplication .....	8
1.5 Tropisme cellulaire .....	11
<u>2. Oncogenèse médiée par le VPH</u> .....	13
2.1 Épidémiologie du cancer du col utérin .....	13
2.2 Pathogenèse du Papillomavirus .....	15
2.3 Persistance .....	16
2.4 Mécanisme moléculaire de l'oncogenèse .....	17
2.5 Facteurs de risques de l'infection au VPH .....	25
2.5.1 Facteurs du virus .....	25

2.5.2 Facteurs de l'hôte .....	25
Système immunitaire.....	25
Co-infection par VIH et VPH .....	26
L'âge .....	27
Facteurs héréditaires.....	28
Statut socio-économique.....	28
Activités sexuelles.....	28
2.5.3 Facteurs environnementaux .....	29
Tabagisme .....	29
Diète .....	29
Contraceptifs oraux .....	29
<u>3. Les mesures de la charge virale</u> .....	30
3.1 Importance clinique .....	30
<u>4. les variantes moléculaires du VPH</u> .....	32
4.1 Les variantes E6.....	32
4.2 Les variantes E2 de VPH-16.....	33
<u>5. l'intégration du VPH</u> .....	34
5.1 Site de rupture.....	34
5.2 Conséquence de l'intégration .....	35
<u>OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE</u> .....	37
<u>Déclaration de l'étudiant concernant l'article contenu dans ce mémoire</u> .....	38
<u>ARTICLE</u> .....	39
<u>DISCUSSION</u> .....	71
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	82
<u>Revue scientifique</u> .....	83
<u>Manuel de référence</u> .....	129
<u>Sites Internet:</u> .....	129

## **LISTE DES FIGURES**

### **Revue de littérature:**

**Figure 1 :** L'arbre phylogénique des Papillomaviridae basé sur l'étude du gène L1. Les 16 genres des VPH sont indiqués en couleur et les espèces sont indiquées par un numéro.

Source: <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/papillomaviridae>

**Figure 2 :** Organisation génomique des VPH. Le génome des VPH est composé de trois régions. Une région régulatrice (LCR), une région précoce qui comprend les gènes non-structuraux E ou early et une région tardive qui code pour les protéines de la capsid L ou late.

Source: <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/papillomaviridae>

**Figure 3 :** Progression de l'infection du VPH durant le processus de différenciation des cellules épithéliales.

Source: <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/papillomaviridae>

**Figure 4 :** Un modèle de recrutement du double-hexamère de E1 par E2 à l'origine de la réplication de l'ADN viral

Source : Figure adaptée à l'article de Titolo et al., 2003.

**Figure 5 :** Histoire naturelle du VPH à haut risque

Source: Figure adaptée à l'article de Wright TC and Schiffman M. *New England Journal of Medicine* 2003.

**Figure 6 :** Interaction entre la protéine E6 et p53.

Source: <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/papillomaviridae>

**Figure 7 :** Interaction de l'oncoprotéine E6 et de la sous-unité hTERT de la télomérase.

Source: <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/papillomaviridae>

**Figure 8 :** Interaction de l'oncoprotéine E7 avec la Rb.

Source: <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/papillomaviridae>

**Figure 9 :** Vue générale du dérèglement du cycle cellulaire par les oncoprotéines E6 et E7.

Source : Southern et al. 2000

**Article:**

**Figure 1:** Quantitation of HPV-16 DNA with real-time PCR assays for E6 and E2.

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Revue de littérature:**

**Tableau 1:** Moyenne annuelle des taux d'incidence et de mortalité du cancer cervical en 2000 au Canada.

Source : Tableau adapté à l'article d'Eduardo L Franco et al Canadian Medical association, 2001.

### **Article:**

**Tableau 1:** HPV16 primers and probes and HPV-16 E2 polymorphism

**Tableau 2:** Variation sites in HPV-16 E2.

**Tableau 3:** Interrun variability of estimating HPV-16 E6/E2 ratio with real-time PCR.

**Tableau 4:** Impact of HPV-16 polymorphism on HPV-16 E2 quantitation and E6/E2 ratio.

**Tableau 5:** HPV-16 total, episomal and integrated loads in cervicovaginal lavages from women with SIL on cytology smears or CIN proven histologically.

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN: acide ribonucléique  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
ATP: adenosine triphosphate  
CDK: Cyclin dependent kinase  
CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia  
CV: coefficients of variation  
CRPV: cotton tail rabbit papillomavirus  
FHIT: Fragile histidine triad  
HLA: Human Leukocyte Antigen  
HPV: Human Papillomavirus  
HSIL: High Grade Squamous Intraepithelial Lesions  
hTERT: Human Telomerase Reverse transcriptase  
IL: Interleukine  
INF: Interféron  
IC: Intervalle de confiance  
KIR : Killer immunoglobulin-like receptor  
LCV : lavages cervico-vaginaux  
LCR: Long control region  
LSIL: Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions  
ml: Millilitre  
 $\mu$ l: Microlitre  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OR: Odds ratio  
pb : Paire de bases  
PCR-RT: real time polymerase chain reaction amplification  
Rb : Retinoblastoma  
Tap1: Transporter associated with antigen processing 1  
Tap2: Transporter associated with antigen processing 2

TNF : Tumor necrosis factor

TRAIL: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

VIH: Virus d'immunodéficience humaine

VPH : Virus du papillome humain

## DÉDICACE

La réalisation d'un tel ouvrage exige souvent de nos proches une forme d'implication, une participation souvent discrète mais combien importante. Pour cette raison je tiens à souligner cet apport si apprécié de gens qui me sont chers.

Je dédie ce mémoire

**À mes parents** qui, malgré la distance, m'ont aidé et motivé tout au long de mon projet.

**À mes parents**, pour leur soutien, leur amour et les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

**À mes soeurs et mon frère**, avec qui je forme une équipe qui m'est très chère.

**À mon frère et mes sœurs**, pour leurs conseils, leur présence et leur soutien.

**À Jade**, pour son support inébranlable, son encouragement et son aide si précieuse.

**À mes amis Nelly, Alain et Hichame** qui m'ont fourni toute l'énergie pour mener à terme ce mémoire.



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier mon directeur de recherche pour son aide et son soutien tout au long de ma maîtrise malgré un horaire extrêmement chargé. Je remercie également Hélène Voyer et Pierre Forest pour leur aide technique. Finalement, je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler avec mon amie Soraya Khoudri, et mon collègue Simon Gagnon.

# **REVUE DE LITTÉRATURE**

## INTRODUCTION

L'infection par le VIH est un facteur de risque pour les infections anogénitales par le virus du papillome humain (VPH) et pour le développement de néoplasies cervicales intraépithéliales (CIN) (Ferenczy et al., 2003). Les génotypes de VPH à haut-risque causent des lésions CIN de haut-grade (CIN-2,3) et sont responsables du développement du cancer du col utérin chez les femmes séropositives et séronégatives pour le VIH. Le VPH-16 est le génotype le plus fréquemment détecté en ce qui a trait au cancer du col utérin et aux lésions CIN-2,3 (Clifford et al., 2003).

Quoique la plupart des femmes soient infectées par le VPH, seule une minorité d'entre elles développera une infection persistante par le VPH qui pourra progresser vers une néoplasie cervicale de haut grade (CIN-2,3) et possiblement par la suite, un cancer invasif (Ferenczy et al., 2002).

Des facteurs viraux et des facteurs de l'hôte sont impliqués dans la progression de lésions cervicales induites par le VPH (Wang and Hildesheim, 2003). Des charges élevées de VPH-16 ont été associées avec les CIN-2,3 lors d'études cas-contrôles ou d'études longitudinales (Dalstein et al., 2003; Flores et al., 2006; Josefsson et al., 2000; Moberg et al., 2004; Schlecht et al., 2003). Quoiqu'une charge accrue d'ADN du VPH-16 pourrait aider à identifier les femmes infectées par le VPH-16 et à risque plus élevé de développer une lésion CIN-2,3, il reste que le chevauchement important des valeurs de charge virale entre les femmes avec et sans CIN-2,3 est une limitation à l'utilisation de ce test en clinique (Cheung et al., 2006; Fontaine et al., 2005a; Guo et al., 2007).

L'intégration du VPH-16 est considérée comme un événement-clé dans la progression de l'infection persistante par VPH-16 vers un cancer envahissant (Hopman et al., 2004; Kalantari et al., 1998). En effet, l'intégration du VPH-16 interrompt le gène E2, résultant en une expression non-contrôlée des oncogènes E6 et E7. La détermination de la quantité des formes intégrées de VPH-16 pourrait s'avérer être un meilleur biomarqueur que la charge virale de VPH-16, pour les lésions de CIN-2,3. Bien que des études sur des lignées cellulaires dérivées de lésions de CIN de bas-grade (CIN-1) suggèrent que l'intégration est un événement précoce conférant un avantage sélectif de croissance pour les cellules transformées (Alazawi et al., 2002), l'intégration à des phases précoces

d'infection n'a pas été démontrée *in vivo*. Récemment, plusieurs publications ont suggéré que l'intégration pourrait avoir lieu dans des lésions de CIN-1 (Fontaine et al., 2005; Gallo et al., 2003; Peitsaro et al., 2002).

Les tests actuels mesurant l'intégration du VPH-16, sont basés sur la quantification par PCR en temps réel (PCR-RT – *real time polymerase chain reaction amplification*) du gène E6 relativement au gène E2 du VPH-16. La détection d'une plus grande quantité de E6 comparativement au E2, suggère la présence de formes intégrées de VPH-16 (Arias-Pulido et al., 2006; Peitsaro et al., 2002).

Dans cette étude, nous évaluerons l'impact du polymorphisme du gène E2 sur la quantification de l'ADN du VPH-16 dans des spécimens cliniques. En effet, le polymorphisme du VPH-16 peut introduire des erreurs significative dans le PCR quantitatif, affectant par ce fait l'efficacité de l'amplification ou la réaction d'hybridation (Whiley et al., 2005). Dans un premier temps, nous procéderons au séquençage du gène E2 de cent trente-neuf isolats de VPH-16. Ensuite, un test de PCR en temps réel ciblant les séquences conservées dans E2 (RT-E2-2) sera développé et optimisé.

# **1. Le virus du papillome humain**

## **1.1 Historique**

L'étiologie infectieuse des verrues cutanées a été établie en 1907, lorsque Ciuffo a induit cette infection avec un filtrat dépourvu de cellules. Toutefois, ce n'est qu'en 1933 que Robert Shop parvient à isoler et caractériser le premier virus du papillome, le « cotton tail rabbit papillomavirus » (CRPV), un virus impliqué dans le développement de la papillomatose cutanée chez le lapin (White livanos et Tlsty, 1994). Deux ans après, Beard et Rous ont démontré le potentiel oncogénique du CRPV chez les lapins domestiques (Fields, volume II, chapitre 62, p 2300).

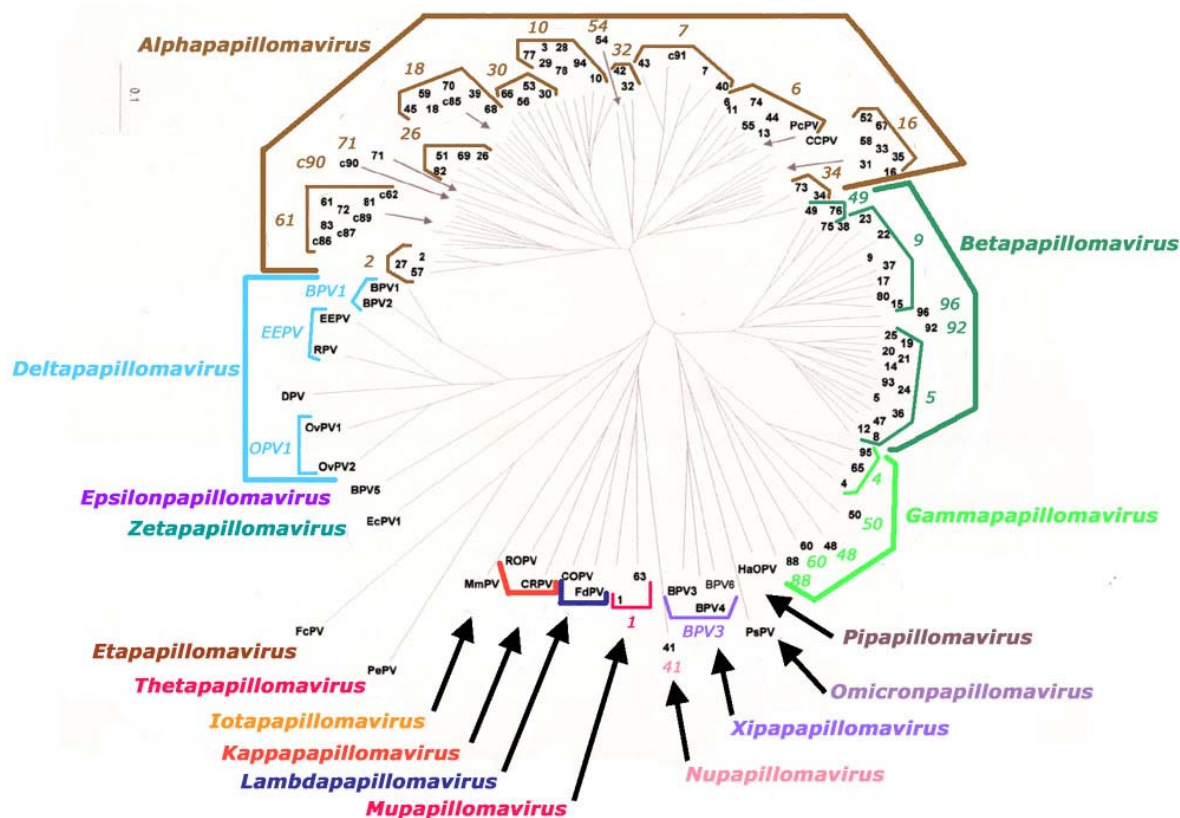
Au milieu des années 70, zur Hansen a soupçonné l'implication du VPH dans le développement des néoplasies génitales chez l'humain (zur Hansen, 1996). Avec l'évolution de la science et le développement des techniques de biologie moléculaire, le virus du papillome humain (VPH) est maintenant reconnu comme étant l'agent responsable du cancer du col utérin. Aujourd'hui, on compte plus que 120 différents types de VPH. De plus, en 2006, le premier vaccin de prévention contre le cancer du col utérin et les dysplasies de haut-grade a été mis sur le marché. Ce vaccin, dont l'efficacité s'approche de 100%, protège contre les VPH de type 6, 11, 16 et 18 (Hildesheim et al., 2007).

## **1.2 Taxonomie**

Initialement, le VP a été classifié avec le virus du polyome sous la famille des *papovaviridae*. Des études phylogénétiques ont cependant démontré des différences majeures entre ces deux virus justifiant ainsi la création de la famille des *papillomaviridae* (Bernard, 2004).

La classification des VP fut établie grâce à la comparaison des différents génomes de VP. Elle est établie sur l'analyse des séquences du gène L1 qui code pour la protéine majeure de la capsid. L1 est considéré comme étant le cadre de lecture le plus conservé chez des VP (Doorbar et al., 2005).

Les VP sont divisés en 16 genres, chacun désigné par une lettre de l'alphabet grec conformément aux règles de nomenclature en vigueur (figure 1).

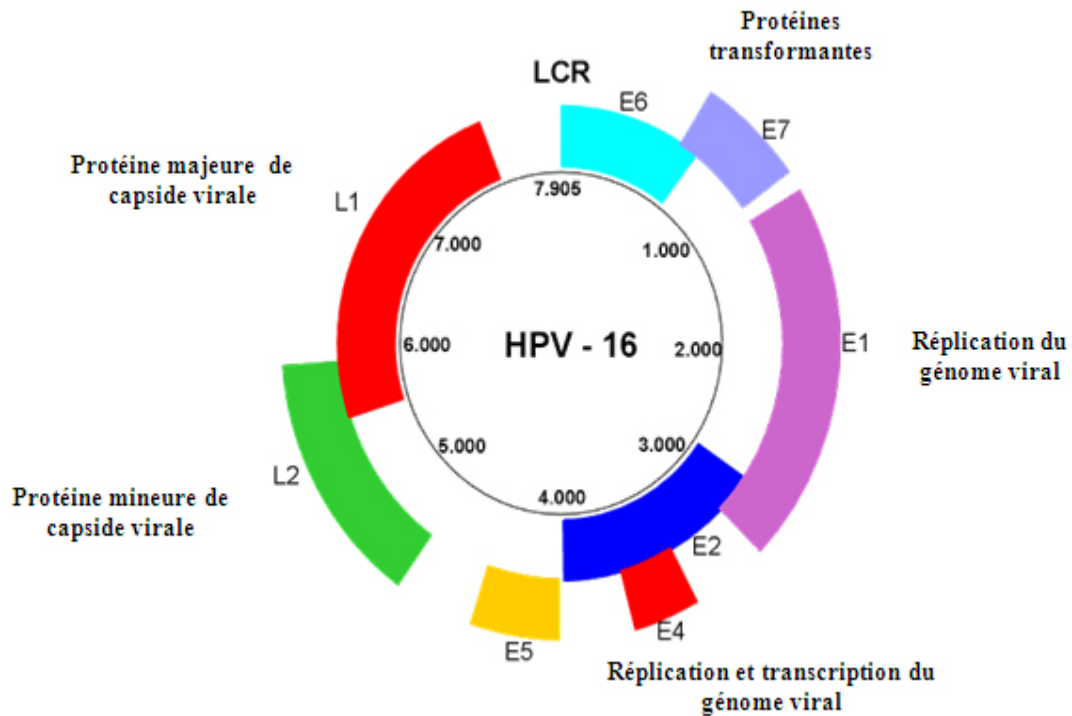


**Figure 1 :** L'arbre phylogénique des *Papillomaviridae* basé sur l'étude du gène L1. Les 16 genres des VP sont indiqués en couleur et les espèces sont indiquées par un numéro (Doorbar et al., 2005).

Les VP appartiennent au même genre lorsqu'ils partagent plus de 60% d'homologie au niveau du gène L1. Toutefois, lorsque certains types d'un même genre sont étroitement apparentés (présentent des homologies de 71% à 89% du gène L1), ceux-ci sont regroupés au sein d'une même espèce. En ce qui a trait au statut taxonomique des types, sous-types ou variantes des VP, il demeure inchangé et est basé sur les critères traditionnels du « Papillomavirus Nomenclature Committee» selon lesquels la différence de la séquence de leurs gènes L1, doit être d'au moins 10%, de 2-10% et d'au plus 5%, respectivement ( De villiers et al., 2004; Fields, volume II, chapitre 62, p 2301).

En ce qui concerne le VPH-16 sur lequel notre étude se concentre, il appartient au genre Alpha-papillomavirus qui regroupe la plupart des souches à haut-risque.

### 1.3 Organisation génomique



**Figure 2 :** Organisation génomique des VPH. Le génome des VPH est composé de trois régions. Une région régulatrice (LCR), une région précoce qui comprend les gènes non-structuraux E ou early et une région tardive qui code pour les protéines de la capsid L ou late (Doorbar et al., 2005).

L'organisation génomique est conservée entre les papillomavirus. Le génome des VP est constitué d'un ADN bicaténaire, circulaire d'environ 8 kb, et est associé à des histones cellulaires. On distingue trois régions fonctionnelles majeures :

- Une région régulatrice non-codante appelée LCR (Long Control Region) contenant des sites impliqués dans la transcription des gènes viraux et dans la réplication de l'ADN viral (site ORI) (Fields, volume II, chapitre 62, p 2303).

- Une région précoce (ou E pour Early) constituée de gènes régulateurs de la transcription virale, de la réplication et du contrôle du cycle cellulaire (Fields, volume II, chapitre 62, p 2304).
- Et enfin une région tardive (ou L pour Late) qui code pour les deux protéines de structure L1 et L2 (Fields, volume II, chapitre 62, p 2947).

Examinons de près le rôle de chacune des protéines virales. Parmi les gènes précoces, on retrouve le gène E1 qui code pour une phosphoprotéine initiatrice, essentielle pour la réplication du génome viral des VPH. Dans un premier temps, E1 interagit avec E2 et se lie à l'origine de réplication. Le complexe E1-E2 sert de plate-forme pour la formation d'un hexamère doté d'une activité hélicase qui déroule l'ADN viral en amont de la fourche de réplication. Par la suite, plusieurs composantes de la machinerie cellulaire (telle que l'ADN polymérase alpha) sont recrutés, formant ainsi un complexe de réplication capable de synthétiser un nouvel ADN viral (Loo et Medenly, 2004; Fields, volume II, chapitre 62, p 2312).

En plus de son rôle cité auparavant, E2 joue un rôle-clé dans la régulation de la transcription des gènes viraux, en particulier des gènes E6 et E7. En effet, sous sa forme complète, E2 se fixe à la région promotrice des gènes E6 et E7 (p97 pour le VPH-16 et p108 pour le VPH-18) agissant ainsi en activateur. Toutefois, sous sa forme tronquée, exprimée à partir d'un codon d'initiation méthionine, elle agit en tant que répresseur de l'expression de ces gènes (Fields, volume II, chapitre 62, p 2308- p 2310).

E4, pour sa part, code pour une protéine qui joue un rôle important dans l'infection productive en interagissant avec le processus de différenciation cellulaire permettant ainsi la maturation des virions (encapsidation du génome viral et diffusion de virions) (Fields, volume II, chapitre 62, p 2310; Doorbar, 1991).

Pour ce qui est du gène E5, il code pour une protéine mitogène qui se lie à certains récepteurs des facteurs de croissance stimulant par ce fait une croissance cellulaire non-contrôlée. De plus, elle se lie à la sous-unité 16 kd de l'ATPase vacuolaire en inhibant ainsi l'acidification des endosomes (Fields, volume II, chapitre 62, p 2314).

Les gènes E6 et E7 codent pour deux oncoprotéines impliquées dans la transformation cellulaire. Elles interfèrent avec l'action de p53 et pRb, deux suppresseurs

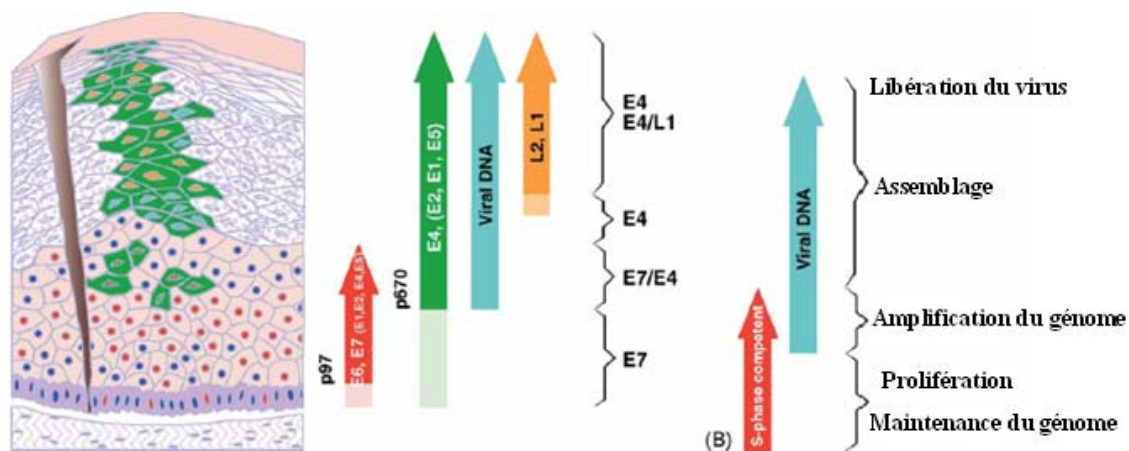


cellulaires de tumeur, respectivement. Ceci sera décrit plus en détails dans la section «2.4» (Fields, volume II, chapitre 62, p 2317).

En ce qui a trait à la région tardive L, elle code pour deux protéines. La protéine majeure de la capside (L1) est très immunogène. La protéine mineure de la capside (L2) lie l'ADN viral durant l'assemblage de la capside et stabilise la capside par la suite (Christensen et al., 1994; le Cann et al., 1994; Fields, volume II, chapitre 62, p 2310).

#### 1.4 Cycle de réplication

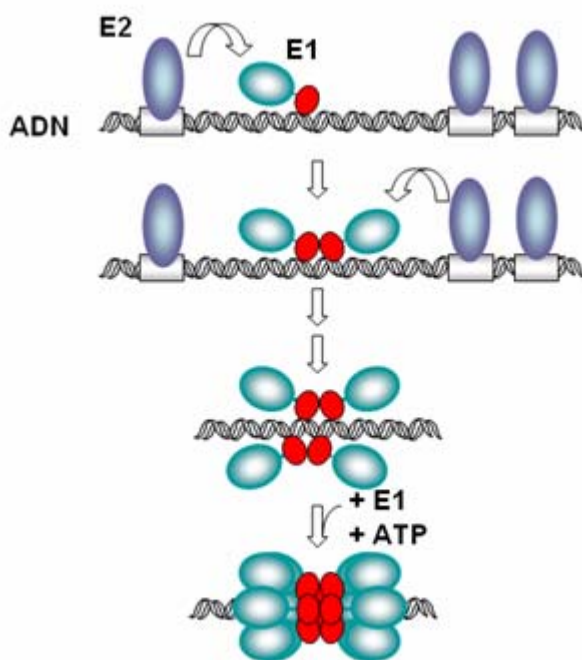
Le cycle de vie des VPH est lié au processus de différenciation cellulaire des kératinocytes.



**Figure 3 :** Progression de l'infection du VPH durant le processus de différenciation des cellules épithéliales (Doorbar et al., 2004).

L'infection par le papillomavirus, suite à une blessure de l'épithélium, se produit au niveau des cellules de la couche basale. L'entrée virale s'effectue via un récepteur cellulaire qui demeure inconnu. Cependant, il a été démontré que le sulfate d'héparine sert de point d'attachement initial des virions, ce qui facilite leur entrée dans les cellules de la couche basale (Fig. 3) (Giroglou et al., 2001; Joyce et al., 1999). Cette dernière est composée de cellules germinatives qui sont continuellement en division formant ainsi un réservoir de cellules pour les régions supra-basales (Hummel et al., 1992; Egawa et al., 2003).

L'infection de ces cellules par le VPH est suivie de réplication épisomale virale, qui entraîne la production d'environ 20 à 100 copies d'ADN viral par cellule. Cette moyenne du nombre de copies est maintenue stable dans les cellules basales indifférenciées au cours de l'infection. Parmi les premières protéines virales qui sont exprimées, on retrouve les facteurs viraux de réplication E1 et E2. Ces protéines forment un complexe qui se lie à l'origine du site de réplication virale, recrute des polymérases cellulaires et des protéines accessoires, et déclenche par ce fait la réplication (Conger et al., 1999; Frattini et al., 1994; Fields, volume II, p 2310). La protéine E1 est dotée d'une activité hélicase permettant la séparation des brins d'ADN viral en aval du complexe de réplication (65). E2 aide à recruter E1 au site d'origine de réplication mais joue également le rôle de régulateur de la transcription virale (Stanley et al., 2007). Les sites de liaison de E2 sont situés à proximité des sites des facteurs de transcription cellulaire qui activent le promoteur précoce (Stubenrauch et al., 1998; Stanley et al., 2007). À faible concentration, E2 se lie à l'origine de réplication et active le promoteur précoce, alors que, à de fortes concentrations, elle le réprime en bloquant la liaison de facteurs de transcription cellulaire (Steger et al., 1997). E1 et E2 étant exprimés à partir des promoteurs précoces, la capacité de E2 à activer et à réprimer l'expression contribue au contrôle du nombre de copies virales dans les cellules indifférenciées (Titolo et al., 2003).



**Figure 4 :** Un modèle de recrutement du double-hexamère de E1 par E2 à l'origine de réplication de l'ADN viral (Titolo et al., 2003).

Pour les VPH à haut-risque, les protéines E6 et E7 sont des oncoprotéines virales. La protéine E6 lie la protéine suppresseur de tumeur p53 dans le cadre d'un complexe trimérique cellulaire ubiquitine-ligase-E6AP, conduisant à sa dégradation (Scheffner et al., 1994, Fields, volume II, chapitre 62, p 2316). Quant à elle, E7 se lie à la protéine du rétinoblastome (Rb) de la famille des suppresseurs de tumeur, ainsi qu'à d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Fields, volume II, chapitre 62, p 2319).

Durant le processus de division des cellules basales infectées, les génomes viraux sont compartimentés dans les cellules-filles naissantes, qui sont générées par la couche basale, et migrent vers la couche granulum, où elles subissent la différenciation.

Dans un épithélium non-infecté, les cellules sortent du cycle cellulaire quittant la couche basale, se différencient et cela se traduit par la perte des noyaux dans les cellules supra-basales superficielles éventuellement. Dans le cas des cellules infectées, celles-ci continuent à se répliquer grâce à l'oncoprotéine E7 (15). Les cellules les plus

différenciées entrent alors en phase S, et activent l'expression des facteurs cellulaires nécessaires à la réplication virale. La présence de E7 conduit à la rétention des noyaux à travers toutes les couches de l'épithélium infecté. La cellule continue donc à se répliquer au lieu de se différencier (Longworth et al., 2004).

En plus de leur rôle d'immortalisation cellulaire, les oncoprotéines virales E6 et E7 jouent un rôle-clef dans le maintien de la forme extrachromosomique du VPH dans les cellules basales non-différenciées (Thomas et al., 1999). Notre connaissance du mécanisme par lequel cela se produit est limitée, mais il implique vraisemblablement d'autres facteurs qui restent indéterminés. Les fonctions des protéines E4 et E5 n'ont pas été entièrement élucidées. Cependant des études ont démontré l'implication de la protéine E5 dans les propriétés oncogènes des VPH à haut risque (Fields, volume II, chapitre 62, p 2314). En ce qui a trait aux protéines L1 et L2, elles sont assemblées spontanément sous forme d'une capsidie icosaédrique qui contiendra le génome viral et formera le virion. Suite à cet assemblage, les virus matures sont libérés à partir des cellules de la couche supérieure de l'épithélium (Fig.2) (Doorbar, 2005).

Initialement, les génomes des VPH à haut-risque sont présents sous forme épisomale, alors que lors de la progression vers les lésions de haut-grade ou cancéreuses, ils sont souvent intégrés dans le génome cellulaire. Cette intégration se produit habituellement dans le cadre de lecture E2 ce qui conduit à la sur-expression de E6 et E7 (Longworth et al., 2004).

On ne sait toujours pas comment le programme de différenciation cellulaire est capable d'activer un cycle de réplication productive du VPH.

## **1.5 Tropisme cellulaire**

Les papillomavirus sont des virus épithéliotropes qui démontrent un tropisme cellulaire restreint aux cellules épithéliales de la peau (tropisme cutané) ou des muqueuses (tropisme muqueux). De plus, la progression de leur cycle de réplication nécessite la différenciation des cellules infectées. En effet, les VPH infectent les kératinocytes de la couche basale, utilisant ainsi leur capacité d'auto-renouvellement pour établir une infection persistante et par la suite productive (Egawa et al., 2003).

Cette spécificité cellulaire est due à une interaction entre la protéine majeure de la capsid L1 et une intégrine cellulaire  $\alpha 6$ , soupçonnée d'être le récepteur. Toutefois, d'autres facteurs doivent nécessairement intervenir dans cette spécificité, mais qui demeurent à nos jours inconnus, l'intégrine  $\alpha 6$  n'étant pas spécifique aux kératinocytes (Evander et al., 1997).

En plus de leur grande spécificité pour l'hôte, les VPH ont une spécificité pour les sites anatomiques infectés. À titre d'exemple, le VPH-1 n'infecte que des épithéliums très kératinisés de la paume ou de la plante des pieds, tandis que le VPH-16 infecte l'épithélium squameux des organes ano-génitaux et n'infecte jamais les cellules de la plante des pieds (Fields, volume II, chapitre 62, p 2334).

## **2. Oncogenèse médiée par le VPH**

### **2.1 Épidémiologie du cancer du col utérin**

Le cancer du col utérin est le deuxième cancer le plus fréquent chez les femmes, plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Chaque année, on estime à environ 500 000 nouveaux cas de cancer du col, ce qui conduit à environ 239 000 décès chaque année (Rapport sur la santé mondiale, 2004).

Plus de 99% des cancers du col utérin sont causés par une infection par le virus du papillome, l'infection transmissible sexuellement la plus fréquente au monde. Près de 660 millions de personnes sont infectées par le VPH (Rapport sur la santé mondiale, 2004).

Bien que l'infection par ce virus régresse spontanément dans la majorité des cas, elle peut évoluer en infection chronique chez certaines femmes, et mener ainsi au cancer du col utérin.

Le pic d'incidence de l'infection par le VPH est observé chez les adolescentes et les jeunes femmes, tandis que le cancer du col de l'utérus apparaît généralement 20-30 ans plus tard (Stone et al., 2000; Ross et al., 1996; Clavell et al., 2001, Sellors et al., 2000).

Les plus hauts taux d'incidence sont observés en Afrique sub-saharienne et en Amérique latine. Ces taux d'incidence ont diminué dans les pays développés (83 400 cas) grâce à l'introduction des programmes de dépistage dans les années 1960 et 1970. Ces derniers sont coûteux et difficiles à établir dans les pays plus pauvres ce qui explique pourquoi 80% des victimes du cancer du col utérin vivent dans les pays en voie de développement. Avec plus de 130 000 nouveaux cas estimés en 2002, l'Inde représente environ 25% du fardeau mondial du cancer du col utérin (Institut national de la santé publique du Québec, 2003).

En Amérique du nord, le taux de mortalité est relativement faible et celui du Canada est le plus bas entre toutes les régions. Près de 1500 nouveaux cas de cancer du col de l'utérus ont été diagnostiqués chez les Canadiennes en 2000, et environ 430 femmes sont mortes de ce cancer. Les provinces ayant les taux d'incidence les plus élevés sont la Nouvelle-Écosse, Terre-Neuve et l'île du Prince-Édouard. Le cancer du col utérin

est particulièrement plus fréquent dans les populations autochtones, noires et hispaniques. A titre d'exemple, ce cancer représente chez les Inuits du Canada près de 15% de tous les cancers chez les femmes. Cette proportion est encore plus grande chez les autochtones canadiens de Saskatchewan (29%), avec un taux (standardisé pour l'âge) 6 fois plus élevé que la moyenne nationale (tableau 1) (Healey, 2001).

**Tableau 1:** Moyenne annuelle des taux d'incidence et de mortalité du cancer cervical en 2000 au Canada (Franco et al., 2001).

Provinces	Taux d'incidence annuel par	Taux de mortalité annuel par
	100000 †	100000 ‡
Terre-Neuve	12.6	3.6
L'Île du Prince Édouard	12.0	4.0
Nouvelle-Écosse	13.0	3.7
Nouveau Brunswick	8.3	2.2
Québec	8.4	2.0
Ontario	10.2	2.7
Manitoba	10.7	3.2
Saskatchewan	9.5	2.3
Alberta	10.7	2.9
Colombie-Britannique	8.5	2.3
Canada	9.7	2.5

Les taux sont normalisés selon l'âge de la population canadienne en 1991.

† Taux annuel moyen pour la période 1990-1994.

‡ Taux annuel moyen pour la période 1992-1996.

En ce qui a trait à la province de Québec, selon une étude publiée par Richardson et al. en 2002 sur un groupe de 621 étudiantes universitaires de Montréal, la prévalence de l'infection au VPH a été évaluée à 29 % en 1996. Les types à haut-risque étaient présents dans 21,8 % des participants, tandis que les types à faible-risque causaient 14,8 % des infections.

Dans toutes les régions du globe, les VPH-16 et 18 sont les types les plus fréquemment retrouvés dans les cas du cancer du col utérin, représentant ensemble 73,5% des cancers en Asie, environ 65% en Afrique et en Amérique Centrale et du Sud, et 71,5% en Europe et aux États-Unis. Les autres génotypes les plus communs dans les cancers du col sont VPH-45 en Afrique et en Asie, VPH-31 en Amérique latine, VPH-33 en Europe et en Amérique du Nord, alors que VPH-58 et 52 sont dominants en Asie.

Dans l'étude signalée plus haut de Richardson et al., les types de VPH les plus fréquents au Québec étaient les VPH-16 (7 %), VPH-53 (4,3 %) et VPH-84 (3,8 %), et ce chez des jeunes femmes sans cancer.

## **2.2 Pathogenèse des infections au Papillomavirus**

À ce jour, plus de 100 types différents de VPH ont été identifiés. Quarante génotypes infectant des cellules épithéliales du tractus génital. Les génotypes peuvent être dits à risque élevé ou faible. Ce qui les distingue les uns des autres est la capacité des VPH à risque élevé à s'intégrer dans le chromosome de la cellule-hôte, tandis que les autres restent sous forme épisomale. Également, la capacité de lier et dégrader le p53 par E6 est une propriété des types oncogènes (Zur hausen, 1996).

Les types à haut-risque sont associés au développement de lésions au niveau du col utérin qui peuvent évoluer en cancer du col. Dans ce groupe de VPH, on retrouve les types les plus répandus, VPH-16 et 18 étant responsables à eux seuls de 70% des cas de cancer du col.

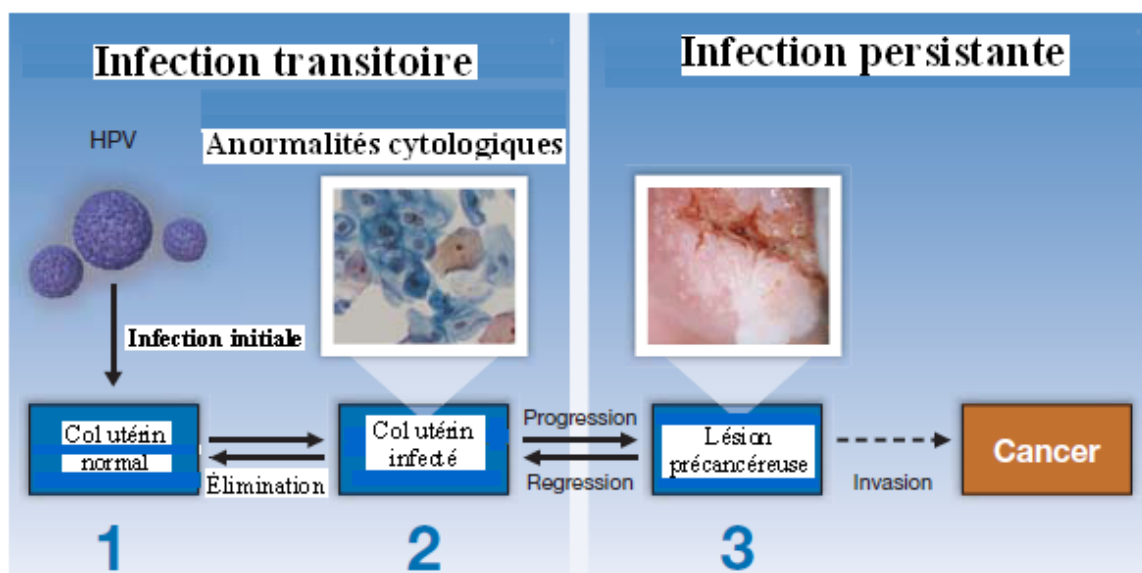
L'infection des voies génitales par un VPH à risque élevé peut d'abord se traduire par des dysplasies du col de l'utérus. Un bon nombre de ces lésions sont éliminées par le système immunitaire en moins d'un an. Cependant, certaines d'entre elles ne sont pas éradiquées et pouvant persister pendant de longues périodes. Cette persistance de l'infection représente le facteur de risque prédominant de tumeurs malignes des organes génitaux (Longworth et al., 2004).

Les facteurs de risque pour le développement tumoral incluent la persistance du VPH, un nombre de partenaires sexuels élevé qui est un facteur d'exposition au VPH, la



co-infection avec le VIH, l'immunosuppression, le nombre de grossesses, la coïnfection avec la *Chlamydia trachomatis* et la cigarette (Fields, volume II, chapitre 62, p 2331).

En Amérique du Nord, le nombre de cas de cancer du col de l'utérus a diminué de plus de 80% au cours des 50 dernières années en raison de l'utilisation du test PAP. Alors que ce nombre a nettement diminué, il reste qu'environ 10.000 femmes sont diagnostiquées avec un carcinome, qui sera fatal pour la moitié d'entre elles (Fields, volume II, chapitre 62, p 2323).



**Figure 5 :** Histoire naturelle du VPH à haut risque (Schiffman et al., 2003).

### 2.3 Persistance

La persistance de l'infection au VPH est considérée comme étant l'élément-clé de la progression des néoplasies du col utérin vers un cancer invasif. Les femmes infectées par un VPH de façon persistante sont plus susceptibles de développer une lésion pré-néoplasique de haut-grade ou un cancer du col de l'utérus que les femmes qui éliminent rapidement l'infection. Aussi, des études démontrent que l'expression continue du VPH oncogène est essentielle pour le maintien des lésions et leur évolution vers un cancer (Schiffman et al., 2005; Wallin et al., 1999).

Plusieurs facteurs de risque associés à la persistance du VPH ont été identifiés. Selon une étude menée par Long Fu Xi et collaborateurs de l'Université de Washington à Seattle, certaines variantes des types 16 et 18 persistent plus longtemps chez certaines personnes. Ils ont étudié environ 1100 femmes infectées par le VPH-16 et / ou 18 avec des lésions de bas-grade, et suivies tous les 6 mois pendant 2 ans. Ils ont remarqué que les variantes africaines des types 16 et 18 persistent plus longtemps chez les femmes africaines-américaines tandis que les variantes européennes persistent plus longtemps chez les femmes de race blanche (Long Fu Xi et al., 2006).

Une autre étude a révélé que l'immunosuppression, y compris l'infection par le VIH, augmente le risque de persistance. La persistance du VPH est plus fréquente chez les femmes séropositives que celles séronégatives pour le VIH. Aussi, le taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est associé avec la durée de l'infection par le VPH. Toutefois, on sait peu de chose sur les déterminants immunologiques de la persistance du VPH (Jill Koshiol et al., 2008; Strickler et al., 2003).

Aussi, plusieurs études cas-témoins démontrent une légère association statistiquement significative entre le tabagisme et la persistance. En outre, d'autres facteurs épidémiologiques sont associés à la persistance dont l'utilisation des contraceptifs oraux, ainsi que la nutrition (Jill Koshiol et al., 2008).

#### **2.4 Mécanisme moléculaire de l'oncogénèse**

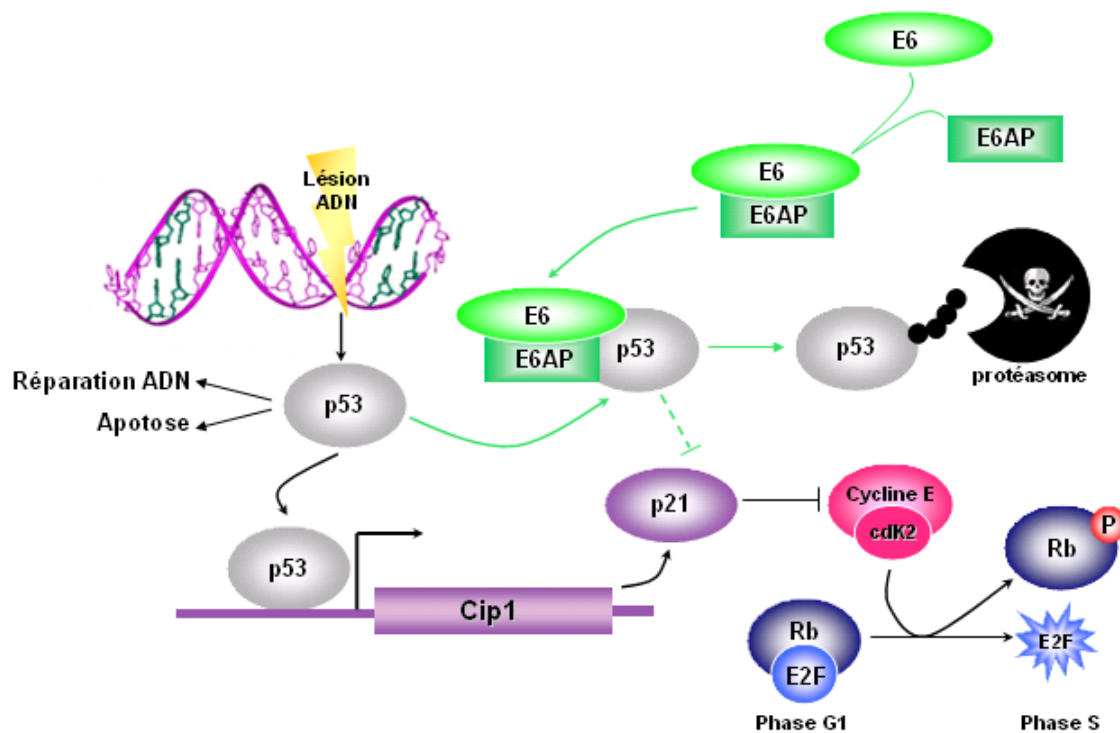
L'immortalisation des kératinocytes humains exige l'expression de deux oncoprotéines, E6 et E7 (Longworth et al., 2004). Dans le cas du VPH-16, la transcription des gènes E6 et E7 est sous le contrôle d'un promoteur unique, appelé p97. La protéine E2 régule la transcription des gènes E6 et E7 en se liant à ce promoteur. Lors de l'intégration du VPH-16, le cadre de lecture de E2 est interrompu, menant à la surexpression d'ARNm codant pour les oncogènes E6 et E7, ce qui contribue à l'immortalisation cellulaire (Jeon et al., 1995).

Le rôle principal de E6 repose sur sa fonction transformante en induisant la dégradation de l'anti-oncogène p53. Ce dernier est un suppresseur de tumeur qui régule l'expression des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, y compris

l'inhibiteur de la cycline kinase (cdks) p21 (Ko et al., 1996; Longworth et al., 2004 ). Face à un stress physiologique ou des dommages affligés à l'ADN, la p53 devient active et induit la surexpression de p21, résultant en un arrêt du cycle cellulaire, voire à l'apoptose des cellules altérées (Ko et al., 1996; Longworth et al., 2004 ). L'activation de la voie apoptotique est utilisée comme un moyen de protection en vue d'empêcher la propagation de cellules anormales ou infectées.

De nombreux virus ont développé des mécanismes visant à bloquer l'induction de l'apoptose, mais cela peut, dans certains cas, permettre le développement de tumeurs malignes. Dans les cas des VPH à haut-risque, afin de surmonter les activités pro-apoptotiques de p53 et permettre la progression du cycle cellulaire (nécessaire pour l'activation du cycle viral du VPH), E6 interagit avec p53 pour former un complexe ternaire avec une ubiquitine ligase appelée E6AP (Huibregtse et al., 1991; Longworth et al., 2004). La formation de ce complexe mène à l'ubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome 26S, conduisant à une réduction de la demi-vie de p53 de plusieurs heures à moins de 20 minutes dans les kératinocytes (Hubbert et al., 1999; Huibregtse et al., 1993; Longworth et al., 2004). p53 régule à la fois le point de transition G1/S et G2/M du cycle cellulaire. L'abrogation de ces deux points de contrôle conduisant à des duplications chromosomiques et des anomalies centrosomales (Foster et al., 1994; Kesis et al., 1993; Thompson et al., 1997).

De plus, E6 régule négativement et indirectement l'activité de p53 en interagissant avec p300/CBP, un coactivateur de p53 (Lechner et al., 1994; Zimmermann et al., 1999).



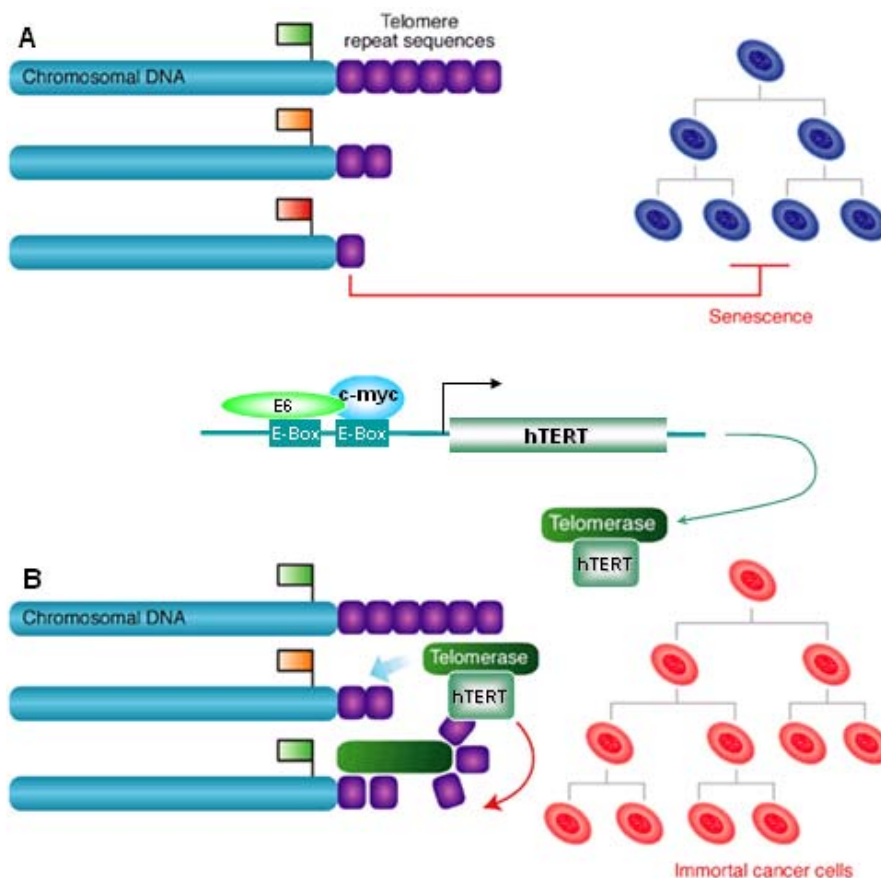
**Figure 6** : Interaction entre la protéine E6 et p53 (Talis et al., 1998).

Il est important de signaler qu'il existe une autre forme de E6, appelé E6\*, générée à la suite de l'épissage du gène E6 (Pim et al., 1994, Scheffner et al., 1994). Sa fonction n'est pas encore déterminée mais elle pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la dégradation de p53.

Des études récentes ont identifié des activités importantes de la protéine E6 pour l'immortalisation des cellules humaines indépendantes de p53. Des mutants E6 de VPH-16 incapables de dégrader p53 ont été identifiés, mais conservent toujours la possibilité d'immortaliser les cellules épithéliales mammaires. D'autres mutants E6 capables de dégrader p53, mais ayant perdu la capacité d'immortaliser ont été identifiés (Longworth et al., 2004). Ces données suggèrent que les interactions avec des protéines autres que p53 pourraient être essentielles pour l'immortalisation des cellules. L'une de ces interactions importantes semble être celle de E6 avec la famille de protéines PDZ. Celle-ci contiennent un domaine conservé qui associe les protéines PSD-95,Dlg et ZO-1 (d'où le nom PDZ). Le domaine PDZ est souvent présent dans les protéines localisées dans les zones de contact entre les cellules, telles que les jonctions des cellules épithéliales. Cette

interaction a été confirmée par des expériences effectuées sur des souris transgéniques exprimant la protéine E6 dont le domaine de liaison aux PDZ est manquant. Ces souris conservent la capacité d'inactiver p53, mais ne développent pas d'hyperplasie qui est souvent observée avec le type sauvage. L'élucidation de ces voies reste d'une importance capitale pour la compréhension de la pathogenèse de VPH.

Une autre fonction importante de E6 nécessaire pour l'immortalisation est sa capacité à activer l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT (Klingelutz et al., 1996; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). La télomérase est une enzyme de quatre sous-unités qui ajoute des répétitions d'hexamères aux extrémités télomériques des chromosomes. Cette activité est généralement limitée aux cellules embryonnaires et absente dans les cellules somatiques. Le manque d'activité de la télomérase mène à un raccourcissement des télomères au fil des divisions cellulaires, conduisant éventuellement à la sénescence (Liu et al. 1999). En revanche, la reconstitution de l'activité de la télomérase est observée dans la plupart des cancers. E6 active la transcription de hTERT par l'action combinée de *Myc* et *Sp-1* (Greenberg et al., 1999; Longworth et al., 2004). Des études récentes ont montré que E6 peut interagir avec *myc* et de son cofacteur *max*, conduisant ainsi à l'activation de la transcription du promoteur hTERT (Veldman et al., 2003).



**Figure 7 :** Interaction de l'oncoprotéine E6 et la sous-unité hTERT de la télomérase (Veldman et al., 2003).

Enfin, il semble que la dégradation de p53 est importante pour la pleine transformation néoplasique et que la liaison aux protéines PDZ et l'activation de l'expression de hTERT sont nécessaires pour l'immortalisation (Longworth et al., 2004).

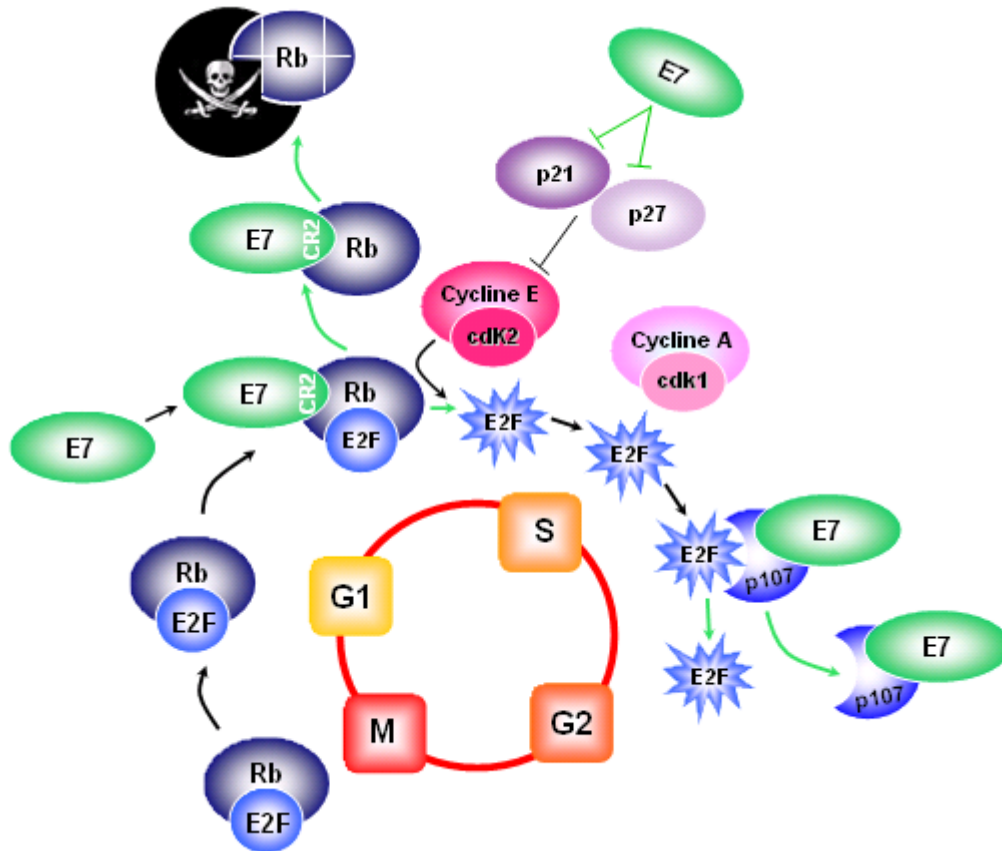
L'activité principale de la protéine E7 se résume par sa capacité à s'associer aux membres de la famille des protéines Rb (Dyson et al., 1989; Longworth et al., 2004). Cette liaison s'établit sur une des trois régions conservées présentes sur E7: CR1 au N terminus; CR2, qui contient un motif LXCXE qui lie la protéine Rb et CR3, qui contient deux doigts de zinc. Les domaines CR1 et CR2 sont homologues à ceux retrouvés sur E1A des adénovirus qui lie aussi la protéine Rb (Phelps et al., 1988; Longworth et al., 2004).

La forme non-phosphorylée de Rb est liée à un complexe de facteurs de transcription (E2F/DP1) liés aux promoteurs des gènes impliqués dans le contrôle du

cycle cellulaire à la phase S et dans le contrôle de l'apoptose. En se liant à Rb, E7 perturbe ce complexe, entraînant ainsi la libération du facteur de transcription E2F impliqué dans la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN. En plus de la séquestration de Rb, E7 déclenche sa dégradation via le protéasome (Longworth et al., 2004).

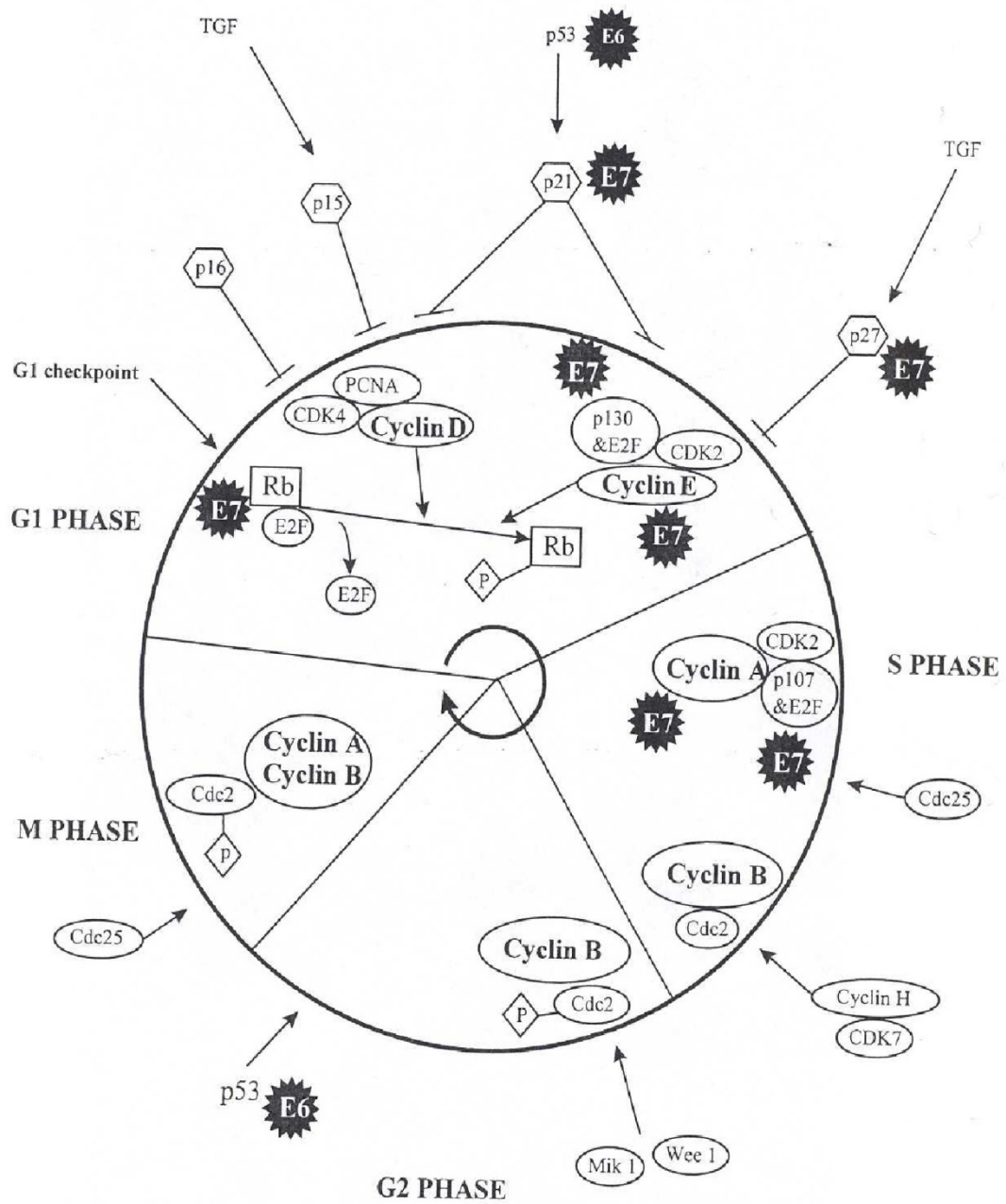
Les membres de la famille des protéines Rb sont des régulateurs majeurs du cycle cellulaire au cours de la différenciation épithéliale. En effet, toute abrogation à cette fonction permet une réplication productive dans les cellules supra-basales en voie de différenciation (Chellappan et al., 1992).

En plus de se lier à des membres de la famille Rb, la protéine E7 s'associe avec les cyclines A et E, ainsi qu'avec p21 et p27, deux inhibiteurs du complexe cycline-kinase (Zerfass-Thomeet al., 1996; Longworth et al., 2004). En se liant à E7, le complexe cycline-kinase (cyclinA-CDK2) phosphoryle Rb, entraînant la cellule dans un cycle cellulaire (Ruesch et al., 1998; McIntyre et al., 1996). De surcroît, E7 augmente les niveaux d'expression des cyclines et renforce leur activité en inhibant l'action de p27 et p21. (Zerfass-Thomeet al., 1996; Longworth et al., 2004).



**Figure 8 :** Interaction de l'oncoprotéine E7 avec la Rb (Dynlacht et al., 2003).





**Figure 9 :** Vue générale du dérèglement du cycle cellulaire par les oncoprotéines E6 et E7 (Southern et al., 2000).

## **2.5 Facteurs de risques de l'infection au VPH**

### **2.5.1 Facteurs du virus**

Le plus important facteur de risque du cancer du col de l'utérus est l'infection par le virus du papillome humain (VPH). Le développement d'un tel cancer est associé avec les VPH à risque élevé. Treize génotypes de VPH sont officiellement reconnus comme oncogènes (Fields, volume II, chapitre 62, p 2323). Environ les deux tiers de tous les cancers du col de l'utérus sont causés par VPH 16 et 18 (Fields, volume II, chapitre 62, p 2327). La majorité des femmes sexuellement actives sont infectées par le VPH, mais très peu vont développer le cancer du col de l'utérus. Pour des raisons encore imprécises, l'infection persiste chez certaines femmes et peut provoquer le cancer du col de l'utérus (Institut national de la santé publique du Québec, 2003). Bien que le VPH soit un facteur nécessaire pour le développement du cancer du col utérin, il existe d'autres facteurs qui jouent un rôle important dans le développement du cancer. Certains de ces facteurs connus sont énumérés ci-dessous.

### **2.5.2 Facteurs de l'hôte**

#### **Système immunitaire**

Le système immunitaire constitue un appareil de défense important pour contrecarrer l'infection au VPH et limiter sa propagation. En raison de la variabilité génétique de chacun, certaines personnes vont éliminer cette infection alors que d'autres vont développer des lésions persistantes qui peuvent évoluer en cancer cervical. Ceci dépend en partie du système immunitaire de l'individu ou encore du type de VPH (Stanley et al., 2007).

Si on analyse le cycle de vie des VPH, il semble avoir été conçu pour réduire au minimum l'exposition des antigènes viraux au système immunitaire. Toutefois, de nombreux aspects de la biologie du VPH soulignent l'importance de la réponse immunitaire dans la détermination du cours de l'infection. La réponse des lymphocytes T semble être la réponse immune prévalente pour éliminer l'infection. L'immunité

humorale contribue à prévenir l'infection initiale et la réinfection (Fields, volume II, chapitre 62, p 2335).

Des études ont démontré que la réponse cellulaire (cellules T auxiliaire et T cytotoxique) dirigée contre les protéines E2, E6 et E7 du VPH-16 est plus fréquente chez les patientes qui ont eu un historique de régression de lésions comparativement à celles avec des lésions persistantes. La réponse cellulaire est modulée par plusieurs cytokines telles que le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), l'interféron (INF $\alpha$ ) et certaines interleukines (IL-1 et IL6). Ces cytokines inhibent la transcription des gènes des VPH ainsi que la prolifération des cellules épithéliales (Stanley et al., 2007).

D'autres évidences indiquent que le polymorphisme des antigènes du HLA de classe I et II, Tap1, Tap2 et KIR pourraient prédisposer certains individus au développement des dysplasies ou du cancer du col de l'utérus (Anna H et al., 2005). A titre d'exemple, une variante E6 du VPH-16 avec une mutation au niveau d'un épitope spécifique pour HLA-B7, a été découverte chez des femmes porteuses de cancers du col utérin. Ceci soulève la possibilité que la mutation au niveau du gène E6, ait rendu l'oncoprotéine moins immunogène. L'idée que les allèles de classe II jouent un rôle important dans la réponse immunitaire contre l'infection par le VPH a été soutenue par des études menées sur la papillomatose cutanée chez le lapin (CPRV). Dans ce modèle, il a été démontré que la sensibilité et la résistance à l'infection persistante ainsi que la progression vers un cancer sont toutes reliées aux allèles de classe II (Fields, volume II, chapitre 62, p 2336; Anna H et al., 2005).

### **Co-infection par VIH et VPH**

L'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est un facteur de risque important pour le développement de lésions associées à une infection au VPH chez les femmes séropositives pour le VIH. Celles-ci sont cinq fois plus susceptibles d'avoir une néoplasie intra-épithéliale que les femmes séronégatives. Ceci suggère que l'infection par le VIH et l'immunosuppression qu'elle induit, augmentent la susceptibilité d'une femme à l'infection au VPH ou encore modifient l'histoire naturelle des infections au VPH établies.

De plus, la coinfection VIH-VPH prédispose à la persistance de l'infection au VPH, d'où la prévalence accrue des néoplasies intra-épithéliales des femmes séropositives au VIH. Aussi, il a été documenté que l'ADN des VPH est détecté plus fréquemment dans les spécimens provenant de femmes séropositives au VIH que dans ceux des femmes séronégatives (Sun *et al.*, 1995; Cu-Vin *et al.*, 1999; Ahdieh *et al.*, 2000, 2001; Duerr *et al.*, 2001).

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'augmentation de la prévalence et de l'agressivité de l'infection au VPH chez les individus séropositifs. Il s'agit notamment des interactions directes entre les deux virus, d'une réponse immunitaire esquivée et une instabilité chromosomique (Palefsky *et al.*, 2006).

Il a été suggéré que le VIH interagit avec le VPH au niveau moléculaire par l'intermédiaire de la protéine *tat*. Celle-ci transactive le LCR, induisant par ce fait une augmentation de l'expression des oncoprotéines E6 et E7 (Vernon *et al.*, 1993). Alors qu'*in vitro* ce mécanisme est reproductible, il n'a jamais été démontré *in vivo*. Aussi, le VIH désorganise le système immunitaire en causant la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ce qui entraîne une diminution de la défense immunitaire et accroît le risque du développement de lésions précurseurs du cancer du col utérin. On pourrait présumer qu'un stade avancé de l'immunosuppression serait une des causes des maladies du col utérin (Palefsky *et al.*, 2006). Toutefois, de faibles associations entre l'incidence des infections causées par VPH-16 et le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont été démontrées.

## **L'âge**

Très peu de femmes de moins de 20 ans ont un cancer du col utérin. Toutefois, plus que la moitié des femmes diagnostiquées avec un cancer du col sont âgées entre 35 et 55 ans. Le risque diminue après l'âge de 55 ans. Cependant 20% des cancers surviennent chez des femmes de plus de 60 ans. Ceci pourrait être expliqué par l'accumulation des mutations génétiques au fil du temps et l'exposition nécessaire à des co-facteurs du VPH (Kataya 1993).

### **Facteurs héréditaires**

Les femmes ayant des antécédents familiaux de cancer du col de l'utérus, en particulier la mère ou la sœur, ont un risque plus élevé de développer un cancer du col de l'utérus, ce qui suggère une prédisposition héréditaire. À titre d'exemple, il a été démontré que certains allèles des gènes HLA de classe II sont associés avec le développement du cancer du col (Cox 2001).

### **Statut socio-économique**

Un niveau socio-économique faible s'est révélé être un facteur important dans le développement du cancer invasif du col de l'utérus en raison de son impact important sur l'éducation et l'accès aux ressources médicales. Les résultats de plusieurs études épidémiologiques indiquent que les Hispaniques et les femmes Africaines-Américaines ont un risque plus élevé de cancer invasif du col de l'utérus que les femmes de race blanche. Ce risque accru est attribué à un manque de dépistage, une incapacité à traiter les conditions précancéreuses, et à un manque de connaissances sur la prévention de l'infection par le VPH (Peyton 2001, Wen 1999).

### **Activité sexuelles**

Des études épidémiologiques ont démontré un risque accru de cancer invasif du col de l'utérus attribuable à l'hygiène et au comportement sexuel. En effet, un nombre élevé de partenaires sexuels et une activité sexuelle précoce, multiplient le risque d'infection par les VPH à risque élevé et donc le risque du cancer cervical (Peto 2001; Suris1999; Kataya 1993).

### **2.5.3 Facteurs environnementaux**

#### **Tabagisme**

Des études ont démontré que les femmes qui fument sont deux fois plus susceptibles de développer le cancer du col que les non-fumeuses. Le tabagisme expose le col à des substances cancérigènes. Des chercheurs pensent que ces substances infligent à l'ADN des cellules du col de l'utérus des dommages considérables qui pourraient contribuer au développement du cancer du col (Hildesheim 2001, Moscicki 2001, Suris 1999, Kataya 1993).

#### **Diète**

La diète semble jouer un rôle important dans le développement du cancer du col utérin. Une étude a révélé que les femmes avec des régimes alimentaires faibles en fruits et légumes pourraient avoir un risque accru de cancer du col de l'utérus. En effet la carence en vitamine E et coenzyme Q10 semble augmenter ce risque (Van eenwyk 1993).

#### **Contraceptifs oraux**

L'implication de l'utilisation des contraceptifs oraux à long terme dans le développement du cancer cervical reste controversée. Tandis qu'il y a des études qui soutiennent cette hypothèse, d'autres la dénie totalement. Toutefois, une étude récente suggère que l'utilisation continue des contraceptifs oraux augmente le risque de cancer du col de l'utérus (Hildesheim, 2001). Cependant il a été noté que ce risque diminue une fois que l'utilisation des contraceptifs est interrompue.

### **3. Les mesures de la charge virale**

#### **3.1 Importance clinique**

Parmi les femmes dont le test pour les types VPH à haut-risque est positif, les anomalies cytologiques sont plus fréquemment observées chez celles ayant une charge virale élevée. On peut dire donc que la charge virale représente un facteur de risque pour les lésions de haut-grade qui pourrait être utilisé comme un marqueur clinique. Toutefois, son rôle dans la prédiction de la progression de la maladie demeure toujours controversé et reste en cours d'étude. De nombreuses études transversales ont démontré que la charge virale du VPH-16 augmentait de manière significative avec le grade de CIN, alors que l'inverse a été noté pour le VPH-18 (Swan DC et al., 1999; Lefevre et al, 2004).

D'autres études mesurant la charge virale de types de VPH autres que VPH-16, démontrent que les femmes avec un CIN-1 possèdent une charge virale plus importante que celles avec un CIN-2,3 (Gravitt PE et al., 2003, Schlecht NF et al., 2003; Swan DC et al., 1999). Toutefois, ces études utilisaient des techniques semi-quantitatives avec une faible sensibilité et spécificité. De plus, ces études ne prenaient pas en considération la présence d'inhibiteurs d'amplification et n'estimaient pas la quantité de l'ADN cellulaire testé (Lefevre et al, 2004).

Aussi, la prévalence des formes intégrées augmente avec la gravité de la maladie, et l'intégration, elle-même, est suivie d'une diminution de la charge virale (Gravitt PE et al., 2003). De plus, il est difficile de mesurer l'intégration avec des méthodes telles que la technique de Southern-blot ou encore le test Hybrid Capture™, car il s'avère souvent difficile de discerner les formes intégrées des formes épisomales dans une infection mixte (Schlecht NF et al., 2003).

Il est maintenant clair que la relation entre la charge virale et la maladie est plus complexe qu'on ne le pensait auparavant.

De nos jours, plusieurs études utilisent le PCR en temps réel, une technique sensible, précise et quantitative. De plus, le PCR en temps réel permet de normaliser la quantité de cellules présentes dans les échantillons, et détecter la présence d'inhibiteurs

qui peuvent fausser les résultats (Lefevre et al, 2004). Aussi, cette technique est reproductible et peut être facilement adaptée à la diversité des souches virales (Lefevre et al, 2004). De surcroît, certaines études, utilisant le PCR en temps réel, ont pu établir une association entre la charge virale, le grade des lésions observées, et le risque de développement de lésions (Gravitt PE et al., 2003; Lefevre et al, 2003; Lefevre et al, 2004; Van Duin M et al.,2002).

En combinant le PCR en temps réel et des contrôles internes, J. Lefevre et al ont démontré que les femmes ayant une charge virale élevée de VPH-16 sont à risque d'avoir un CIN-2,3 (Lefevre et al, 2004). Ceci fut confirmé par une étude prospective réalisée par Ylitalo et al, qui a démontré une association entre la charge virale de VPH-16 et le risque de développer un CIN-2,3. Cette équipe suédoise a même affirmé qu'il était possible de prédire le développement d'un CIN-2,3, plusieurs années avant le diagnostic (Ylitalo et al., 2000) .

Certaines études ont utilisé la méthode d'Hybrid Capture. Toutefois, cette méthode détecte plusieurs types de VPH en même temps. De plus, la méthode Hybrid Capture est semi-quantitative dans une plage des valeurs de charges virales qui ne couvre pas toute la gamme des valeurs observées dans les échantillons cliniques (Gravitt PE et al. 2003; Cox JT, et al., 1995; Nindl I et al., 1998).

Enfin, il existe d'autres facteurs qui peuvent avoir un impact considérable sur la charge virale. D'une part, certaines variantes de VPH se répliquent moins activement que d'autres, dépendamment de leurs variations génomiques. A titre d'exemple, la charge virale des variantes européennes du VPH-16 est plus importante que celle des variantes asiatiques-américaines au niveau du col de l'utérus dans certaines études (Villa LL et al., 2000). D'autre part, la façon avec laquelle on prélève les échantillons peut jouer un rôle crucial dans la détermination de la charge virale. En effet, certaines lésions de haut-grade pourraient être entourées par des lésions de bas-grade. Donc, la charge virale obtenue sur un échantillon du col reflétera une moyenne des deux types de lésions (Arias-Pulido et al., 2006).



## **4. les variantes moléculaires du VPH**

### **4.1 Les variantes E6**

Des mutations peuvent différencier différents isolats d'un même type. Ces souches porteuses de mutations sont considérées comme des variantes, car elles partagent plus de 95% d'homologie au niveau de leur séquence d'ADN. Les variantes VPH ont été décrites pour tous les types de VPH à haut-risque. À ce jour, le polymorphisme du VPH-16 reste le plus étudié. Plusieurs variantes de VPH-16 ont été déterminées suite à l'étude des cadres de lectures L1 et E6 et du LCR (Claire S. Brady et al., 1999).

Le génome du VPH-16 peut être divisé en plusieurs lignées phylogéniques déterminées par des substitutions nucléotidiques. Des études antérieures ont documenté différentes fréquences de ces variantes dans différentes populations. Celles-ci ont été regroupées en différentes branches qui diffèrent selon la répartition géographique des isolats. On retrouve alors des variantes européennes, prédominant dans les cancers en Europe, en Amérique du Nord, Amérique centrale et du Sud, et Asie du Sud-Est, alors qu'en Afrique, la variante Africaine 1 prédomine. D'autres variantes sont incluses dans les branches Africaine 2, Asiatique, ou encore Asiatique-Américaine. Au niveau de la branche Européenne, la plus fréquente des variantes E6 est la variante 350G (E350G), dans laquelle la thymidine à la position 350 est remplacée par une cytosine, substituant ainsi la leucine en position 83 par une valine (Londesborough et al., 1996). Les variantes E6 du VPH-16 ont été étudiées dans les carcinomes du col utérin et les maladies de haut-grade, et certaines études ont indiqué que certaines variantes sont plus fréquentes dans ces lésions. Le rôle des variantes du VPH-16 dans la susceptibilité et la persistance de l'infection par le VPH et le développement de la maladie de haut-grade reste incertain (Stoppler et al., 1996).

## 4.2 Les variantes E2 de VPH-16

La protéine E2 est un modulateur de la transcription et de la réplication des papillomavirus, ayant un rôle majeur dans la réplication de l'ADN viral et dans la répression de la transcription de certains gènes viraux précoces. Tel que décrit auparavant, E2 est composée de trois domaines fonctionnels: le domaine transactivateur N-terminal, la région charnière, et le domaine de liaison à l'ADN C-terminal. En se liant aux promoteurs précoces, E2 réprime la transcription des oncogènes E6 et E7. L'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire perturbe le cadre de lecture E2, ce qui se traduit par une perte de fonction de la protéine E2, conduisant à une surexpression des gènes E6 et E7. Chaque mutation ou perturbation du gène E2 pourrait donc augmenter ou diminuer la capacité d'immortalisation du VPH-16.

Une étude d'Arias-Pulido et al. analysant le polymorphisme de la région charnière de E2 du VPH-18 n'a établi aucun lien entre les différentes variantes décrites et les dysplasies intra-épithéliales ou encore le cancer du col (Arias-Pulido, 2005). De plus en 2006, Bhattacharjee et Sengupta ont étudié le polymorphisme de E2 du VPH-16 détecté chez des femmes indiennes, et ont conclu qu'il n'y avait aucune relation entre les variations de E2 et le grade des lésions néoplasiques (Bhattacharjee et Sengupta, 2006). La plupart des études qui ont été effectuées sur le polymorphisme du gène E2 sont des études descriptives. Toutefois, ceci ne permet pas d'exclure la possibilité que les variantes E2 peuvent différer dans leur capacité à induire la progression de l'infection par le VPH-16 (D A Graham et al, 2000). Des études prospectives à plus grande échelle, sur le polymorphisme d'E2, sont nécessaires afin d'élucider le rôle de ces variations dans le développement des lésions ou encore du cancer invasif.

## **5. L'intégration du VPH**

### **5.1 Site de rupture**

La question de savoir si l'intégration elle-même est essentielle au processus de développement du cancer est l'objet de débats. Il existe deux écoles de pensée et toutes les deux sont d'accord sur le fait que dans le cas des cancers invasifs, l'intégration se produit de préférence au niveau de sites chromosomiques fragiles. Cependant, elles ne partagent pas le même point de vue en ce qui a trait à la distribution de ces sites sur l'ensemble du génome.

Une école de pensée soutient que les VPH ciblent ces sites vu leur grande sensibilité à l'intégration (Wilke C. M. et al., 1996; Yu T. et al., 2005). Cependant, l'autre école soutient que ces sites sont plus accessibles pour les virus (Wentzensen N. et al., 2002; Ziegert C. et al., 2003; Wentzensen et al., 2004). De plus, une des écoles supporte l'idée du regroupement des sites d'intégration dans certaines régions chromosomiques, tandis que l'autre nie l'existence d'un motif cellulaire spécifique dans la séquence de transition entre les séquences virales et le génome cellulaire, ou encore une intégration spécifique dans une région donnée à un même locus. De surcroît, une met l'accent sur le nombre de gènes cellulaires qui sont interrompus par l'intégration virale et qui sont associés à la carcinogenèse à d'autres sites, alors que l'autre souligne l'absence de preuve liant les changements dans l'expression de plusieurs de ces gènes avec l'intégration virale (Wilke C. M. et al., 1996; Yu T. et al., 2005; Wentzensen N. et al., 2002; Ziegert C. et al., 2003; Wentzensen et al., 2004).

Même s'il est raisonnable de penser que l'intégration se produit de préférence au niveau de certains sites qui confèrent un avantage de croissance et de survie des cellules altérées, les sites d'intégration du VPH dans le génome humain ont été systématiquement étudiés chez les femmes atteintes de cancer invasif. Dans diverses études sur les sites chromosomiques cibles de l'intégration du génome de VPH-16 menées sur des lignées cellulaires et des carcinomes, l'intégration a été détectée principalement au niveau des chromosomes 1, 2, 8, 9, 3, 12, 13 et 20 (Choo KB et al., 1996; Kalantari M et al., 2001). Néanmoins, il n'a pas été possible de déterminer un site privilégié d'intégration dans le génome humain.

D'autres études publiées rapportent que le VPH-18 s'intègre souvent dans la bande chromosomique 8q24 près du gène *myc*. En ce qui a trait au VPH-16, il peut s'intégrer au niveau du promoteur du gène de la télomérase humaine, ainsi que celui d'un suppresseur de tumeur le FHIT. (Camille C. Rose Ragin et al., 2004). L'intégration produit, tout d'abord une délétion d'un petit fragment d'ADN pouvant atteindre parfois trois kilobases. Le cadre de lecture E2 a été identifié comme étant le site privilégié de rupture de VPH, et plus spécifiquement au niveau de la région charnière (Arias-Pulido et al, 2006).

Bien que certains chercheurs aient démontré une coexistence de formes épisomales et intégrées dans les lésions pré-néoplasiques du col de l'utérus, l'ADN viral est intégré dans le génome cellulaire dans les lignées dérivées de carcinomes du col de l'utérus et dans les lésions invasives du col (Arias-Pulido et al, 2006). L'identification des formes intégrées de VPH pourrait être un biomarqueur utile pour évaluer le risque de progression de la maladie des femmes infectées par le VPH. Toutefois, il faut que la technique utilisée soit sensible pour détecter les formes intégrées, car elles sont en présence de formes épisomales dans les lésions pré-néoplasiques.

## 5.2 Conséquence de l'intégration

L'intégration du VPH-16 dans le génome de l'hôte est un événement critique dans le développement des néoplasies et leur progression en cancer cervical. Des études *in vitro* ont démontré que les cellules contenant du VPH-16 intégré possèdent un avantage de croissance sélective par rapport aux cellules qui maintiennent les génomes viraux sous forme épisomale. Suite à l'intégration virale, le cadre de lecture E2 est interrompu menant à une surexpression des oncoprotéines E6 et E7 (Fields, volume II, chapitre 62, p 3228). Ces dernières contribuent à un dérèglement cellulaire qui pourrait, comme détaillé auparavant à la section «2.4», conduire à un cancer invasif. Dans une étude récente, une réintroduction de la protéine E2 dans des cellules infectées par un VPH-16 provenant d'un carcinome du col de l'utérus, a entraîné la diminution du taux de croissance tumorale et a déclenché la mort cellulaire par apoptose (Fields, volume II, chapitre 62, p 3228). Le même effet a été décrit précédemment dans d'autres études.

Toutes ces données démontrent le rôle crucial de l'inactivation du gène E2, durant l'intégration virale, dans le développement du cancer cervical.

L'intégration de VPH-16 a été observée au niveau des différents spectres des néoplasies du col utérin, CIN-1, CIN-2,3 et cancer du col (Daniel et al., 1997; Graham et al., 2000; Arias-Pulido et al, 2006). En général, la fréquence de l'intégration des VPH-16 augmente selon la gravité des lésions (Hudelist et al., 2004). Ceci suggère que l'intégration virale pourrait représenter un risque pour la progression tumorale.

## **OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE**

L'intégration du VPH-16 dans le génome humain pourrait être un marqueur de progression vers la maladie. La charge virale intégrée peut être mesurée par la quantification des gènes E6 et E2 du VPH-16.

La quantification de l'ADN VPH-16 peut être influencée par le polymorphisme du VPH-16 (Fontaine et al., 2005b). Lorsque les amorces et la sonde furent sélectionnées pour le premier test de quantification du VPH-16 E2 par PCR-RT (Nagao et al., 2002; Peitsaro et al., 2002), nous avons une connaissance limitée du polymorphisme du gène E2.

Le but de cette étude en premier lieu est de caractériser le polymorphisme du gène E2 et de concevoir des sondes et amorces pour des tests de PCR-RT afin de mesurer l'intégration du VPH-16. Pour une investigation plus poussée de l'association entre la charge des formes intégrées du VPH-16 et les CIN-2,3, un test PCR-RT pour quantifier le gène E2 et ciblant les séquences conservées du VPH-16, a été optimisé. Les tests PCR-RT développés pour la quantification des gènes E6 et E2 seront alors appliqués sur des lavages cervico-vaginaux (LCV) récoltés au cours d'une étude prospective de cohorte sur l'histoire naturelle de l'infection du VPH dans une population de femmes séropositives et séronégatives pour le VIH.

Dans cette étude, nous tenterons de démontrer que le polymorphisme du gène E2 du VPH-16 a un impact sur la quantification de VPH-16 épisomal et intégré d'isolats de différentes lignées. Aussi nous tenterons d'établir le lien entre la charge virale des formes intégrées du VPH-16 et la présence des lésions CIN-2,3 tout en contrôlant pour des variables confondantes.

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

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

## **ARTICLE**

N. Azizi, J. Brazete, C. Hankins, D. Money, J. Fontaine, A. Koushik, A. Rachlis, K. Pourreaux, A. Ferenczy, E. Franco and F. Coutlée for The Canadian Women's HIV Study Group. (2008).

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. **Journal of General Virology**, **89**, 1716–1728.



**Influence of HPV-16 E2 polymorphism on quantitation of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia.**

Word count: 5162; 5 tables. Abstract of 239 words.

Running Head: HPV-16 viral load and integration in CIN

Naoufel Azizi<sup>1</sup>, Jessica Brazete<sup>1</sup>, Catherine Hankins<sup>4</sup>, Deborah Money<sup>5</sup>, Julie Fontaine<sup>1</sup>, Anita Koushik<sup>2</sup>, Anita Rachlis<sup>6</sup>, Karina Pourreaux<sup>4</sup>, Alex Ferenczy<sup>7</sup>, Eduardo Franco<sup>2</sup>, François Coutlée<sup>1,2,3\*</sup> for The Canadian Women's HIV Study Group.

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

2- Departments of Oncology, Division of epidemiology, McGill University, Montreal, Que., Canada.

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

4- Department of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Health Medicine, McGill University, Montreal, Que., Canada.

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

6- Department of Epidemiology and Biostatistics, University of Toronto, Toronto, Ont., Canada

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

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

London: Tom Austin, Ole Hammerberg, Ted Ralph. Montréal: François Coutlée, Julian Falutz, Alex Ferenczy, Catherine Hankins, Marina Klein, Louise Labrecque, Normand Lapointe, Richard Lalonde, John Macleod, Grégoire Noël, Chantal Perron, Jean-Pierre Routy, and Emil Toma. Ottawa: Claire Touchie, Garry Victor. Québec: Louise Côté, Hélène Senay, Sylvie Trottier. Saskatoon: Kurt Williams. Sherbrooke: Alain Piché. Sudbury: Roger Sandre. Toronto: Louise Binder, Donna Keystone, Anne Phillips, Anita Rachlis, Irving Salit, Cheryl Wagner, Sharon Walmsley. Vancouver: Paula Braitstein, David Burdge, Marianne Harris, Deborah Money, Julio Montaner.

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

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

**Abstract (239 words)**

Integrated HPV-16 loads are currently estimated by quantitation with real-time PCR of HPV-16 E6 (RT-E6 and HPV-16 PG) and E2 (RT-E2-1) DNA. We assessed the influence of HPV-16 E2 polymorphism on quantitation of integrated HPV-16 DNA in anogenital specimens. HPV-16 E2 was sequenced from 135 isolates (123 from European and 12 from non-European lineages). An assay targeting conserved HPV-16 E2 sequences (RT-E2-2) was optimized and applied with RT-E6 and RT-E2-1 on 139 HPV-16-positive cervicovaginal lavages collected from 74 women (58 HIV-seropositive, 16 HIV-seronegative). Ratios of HPV-16 copies measured with RT-E2-2 and RT-E2-1 obtained with African 2 (median=3.23, range=1.92-3.49) or Asian-American (median=3.78, range=1.47-37) isolates were greater than those obtained with European isolates (median: 1.02, range: 0.64-1.80;  $P < 0.02$  for each comparison). The Distribution of HPV-16 E2 copies measured in 139 samples with RT-E2-2 (median: 6150) and RT-E2-1 (median: 8960) were different ( $P < 0.0001$ ). The risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN-2,3) compared to women without CIN was increased with higher HPV-16 total (odds ratio (OR) OR=2.17, 95% confidence interval (CI)=1.11-4.23), episomal (OR=2.14, 95% CI=1.09-4.19) but not for HPV-16 integrated load (OR=1.71, 95%CI=0.90-3.26), after controlling for age, race, CD4 count and HIV, and HPV-16 polymorphism. The proportion of samples with an E6/E2 ratio  $> 2$  in women without SIL (7 of 35) was similar to that of women with CIN-2,3 (5 of 11,  $P=0.24$ ) or CIN-1 (5 of 14,  $P=0.50$ ). HPV-16 E2 polymorphism was a significant factor that influenced measures of HPV-16 integrated load.

## Introduction

High-risk HPV genotypes cause CIN and cancer of the uterine cervix in HIV-seronegative and -seropositive women (Ferenczy et al., 2003). HPV-16 is the most oncogenic in terms of progression to CIN2-3 and to cervical cancer (Clifford et al., 2003). Although most women are infected by HPV, only a minority of women will develop persistent HPV infection that may progress to high-grade CIN (CIN-2,3) and cancer (Ferenczy and Franco, 2002). Host and viral factors are involved in progression of HPV-induced cervical lesions (Wang and Hildesheim, 2003). High HPV-16 loads have been associated with CIN-2,3 in case-control studies or with progression to CIN-2,3 or carcinoma in situ in prospective studies (Dalstein et al., 2003; Flores et al., 2006; Josefsson et al., 2000; Moberg et al., 2004; Schlecht et al., 2003). Although increased HPV-16 DNA viral load could help identify women infected with HPV-16 at greater risk for CIN-2,3, the substantial overlap of viral load values between women without and with CIN is a limitation (Cheung et al., 2006; Fontaine et al., 2005a; Guo et al., 2007).

HPV-16 integration is considered to be a key event in the progression of persistent HPV-16 infection to invasive cancer (Hopman et al., 2004; Kalantari et al., 1998), resulting in uncontrolled expression of HPV-16 E6 and E7 oncogenes. Quantitation of load of integrated HPV-16 forms could prove to be a better biomarker for CIN-2,3 than HPV-16 load. Since HPV-16 integration often disrupts the E2 gene, current assays measuring HPV-16 integration are based on quantitation with real-time PCR of HPV-16 E6 relative to E2 DNA (Arias-Pulido et al., 2006; Peitsaro et al., 2002). Detection of a greater quantity of HPV-16 E6 compared to HPV-16 E2 suggests the presence of integrated HPV-16 forms. We have shown recently with these assays that HPV-16 load of integrated forms was associated with CIN-2,3 in HIV-seropositive women (Fontaine et al., 2005a). Quantitation of HPV-16 DNA can be influenced by HPV-16 polymorphism (Fontaine et al., 2005b). Limited knowledge of HPV-16 E2 polymorphism was available when primers and probe were first selected for HPV-16 E2 quantitation by real-time PCR (Nagao et al., 2002; Peitsaro et al., 2002).

The purpose of this study was first to characterize HPV-16 E2 polymorphism. To investigate further the association between the load of HPV-16 integrated forms and CIN-

2,3, we optimized a real-time PCR assay to quantitate HPV-16 E2 targeting conserved sequences of HPV-16 E2. We then applied these real-time PCR assays for quantitation of HPV-16 E6 and E2 on cervicovaginal lavages (CVL) collected in the course of a prospective cohort study on the natural history of persistent HPV infection in a population of HIV-seropositive and –seronegative women. We demonstrate here that HPV-16 E2 polymorphism influences the quantitation of episomal and integrated HPV-16 of isolates from non-European lineages. Viral load of integrated HPV-16 forms, but not the presence of HPV-16 integrated forms, was associated with CIN-2,3.

## **Materials and methods**

*Study protocol of the Canadian Women’s HIV Study.* Study subjects were selected from women infected with HPV-16 participating in the Canadian Women’s HIV Study between May 1993 and March 2002. The Canadian Women’s HIV Study is a cross-sectional and cohort study that investigates the interplay between HPV and HIV infections on cervical precancerous lesions. As described previously, 1055 women were enrolled in that study from sexually transmitted diseases, primary care and outpatient HIV care clinics from across Canada (Fontaine et al., 2005a; Hankins et al., 1999). Women were eligible to participate if they provided written informed consent, were seropositive for HIV-1 or were seronegative for HIV but at risk for sexually transmitted diseases. The research protocol was approved by each local institutional Ethics committees. Since our cohort was initiated in 1993, very few HIV-seropositive women were under highly active anti-retroviral therapy.

A standardized questionnaire was administered upon study entry and at 6-month intervals. For all HIV-seropositive women, CD4 cell counts, Pap smears and CVL were obtained at 6-month intervals (Coutlée et al., 1997; Hankins et al., 1999). For HIV-seronegative women, CVL and Pap smears were collected at one-year intervals. Cytology smears were interpreted in one central pathology laboratory and confirmed by one pathologist. Colposcopy was performed systematically in participants with high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) on cytology smears and was suggested to participants with smears showing low-grade SIL (LSIL). Of 732 HIV-seropositive and

323 HIV-seronegative women screened for HPV infection, 366 HPV-infected women (207 HIV-seropositive with a mean of follow-up of 27.3 months, 159 HIV-seronegative with a mean follow-up of 17.9 months) were followed prospectively.

Of the 1055 participants, 132 (12.5%) had at least one CVL containing HPV-16 DNA at baseline or during follow-up visits. For this report, data were limited to 74 women (58 HIV-seropositive, 16 HIV-seronegative): 38 had colposcopy, 24 had three consecutive normal smears over a period of at least 12 months, 7 had  $\geq 2$  consecutive smears with LSIL, 2 had one smear with HSIL, 3 did not have colposcopy or cytology but were infected by African or Asian-American HPV-16 variants. The 58 HPV-16 positive women who were not included in the study because the diagnosis of CIN or SIL was uncertain or they had less than 3 normal smears, have been described elsewhere (Fontaine et al., 2005a).

***Cervical samples from the Biomarkers of Cervical Cancer Risk (BCCR) study.*** We also included 118 HPV-16-positive cervical samples from women recruited in the BCCR study. This hospital-based case-control study conducted in Montreal, Canada, investigates biomarkers for CIN-2,3 and cancer (Koushik et al., 2005). Controls were women with normal Pap smears while cases had histologically-confirmed CIN-2,3. Exfoliated cervical cells were collected with a cytobrush.

***HPV DNA detection and HPV lineage assessment.*** Cell suspensions from CVL collected in the Canadian Women's HIV Study were lysed with 0.8% Tween and digested with proteinase K (Coutlée et al., 1997). An aliquot of 5  $\mu$ l from each processed sample was amplified for  $\beta$ -globin DNA with PC04-GH20 (Coutlée et al., 1997). Of the 5262 genital specimens collected in all study subjects at enrolment and follow-up visits (mean of 5.7 specimens per subject), 104 (1.9%) failed to amplify  $\beta$ -globin.  $\beta$ -globin-positive samples were tested for HPV DNA detection and typing with MY09-MY11-HMB01 consensus L1 PCR and type-specific probes (Coutlée et al., 1997). DNA was extracted from samples collected in the BCCR study using the Master pure kit as described previously (Koushik et al., 2005).  $\beta$ -globin-positive samples were tested for HPV DNA with PGMV primers and typed with the Line blot assay (Roche Molecular systems, CA). HPV-16

isolates were classified into European, African 1, African 2 or Asian-American lineages by direct PCR-sequencing of the long control region (LCR) as described previously (Fontaine et al., 2005a).

***HPV-16 E2 analysis by PCR-sequencing.*** Two fragments of HPV-16 E2 (nucleotides (nt) 2654 to 3361 and nt 3200 to 3905) were amplified with primer pairs 16-E2-1 (5'-CGAAAATCCAGTGTATGAGC-3')/16-E2-2 (5'GTCGCTAAACACAGATGTAGGAC-3') and 16-E2-3 (5'GAGGGTCAAGTTGACTATTATGG-3')/16-E2-4 (5'AGCAAA GCAAAAAGCACG-3'). For each reaction, 2 µl of processed specimen was amplified in a 100-µL reaction volume containing 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.5 U of AmpliTaq Gold enzyme (Roche Diagnostic Systems, Laval, Canada), 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L each primer, and 0.25 mmol/L each dCTP, dTTP, dGTP, and dATP. HPV-16 E2 amplicons were generated by amplification in a 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer, Montreal, Canada) with an initial step for 9 min at 95°C; 40 cycles for 60 s at 95°C, 60 s at 55°C and 60 s at 72°C; a final step for 7 min at 72°C. Direct double-stranded PCR sequencing was performed on HPV-16 E2 DNA amplicons using the fluorescent cycle-sequencing method (BigDye terminator ready reaction kit; Perkin-Elmer) on 20 ng of purified amplicons using the same primers as above, with 25 cycles for 10 s at 96°C, 5 s at 50°C, and 4 min at 62°C. Sequence analysis was performed on an ABI Prism 3100 genetic-analyzer system at the DNA Sequencing Service of the Centre de Recherche du CHUM. Non-prototypic isolates were sequenced twice and in all cases, confirmed the initial sequencing results. Sequences from HPV-16 E2 variants were aligned for classification with CLUSTAL W (version 1.8) software.

***Real-time PCR for HPV-16 viral load and integration.*** HPV-16-positive CVL had been previously screened for the presence of PCR inhibitors with internal controls for HPV-16 E6, E2 and β-globin DNA (Fontaine et al., 2005a; Lefevre et al., 2004). Two µl of processed sample without inhibition were tested in duplicate in separate capillaries for quantitation of HPV-16 E6 (RT-E6) and HPV-16 E2 (RT-E2-1) using the real-time PCR assays for E6 and E2 described by Peitsaro et al. (Fontaine et al., 2005a; Peitsaro et al., 2002), and for β-globin as described previously (Fontaine et al., 2005a; Lefevre et al.,

2004). HPV-16 E6 DNA was also measured in all samples containing an African or Asian-American HPV-16 variant and in 40 samples randomly selected containing an European HPV-16 variant, with a second real-time PCR assay (HPV-16 E6 PG PCR), as described previously (Gravitt et al., 2003).

HPV-16 E2 was also quantitated in duplicate by a novel real-time PCR, designated RT-E2-2, using in a twenty- $\mu$ l reaction mixture containing 1x DNA Master Hybridization Probe Mix with the Fast Start *Taq* DNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals), 0.3  $\mu$ M of each HPV-16 primers NA-16-F and NA-16-R (Table 1), and 50 nM of fluorogenic probe NA-16-P. Cycling parameters included an activation step at 95°C for 10 min followed by 50 cycles at 95°C for 15 sec and 61°C for 30 sec. Cycle thresholds were compared to those of an HPV-16 titration curve obtained by serial ten-fold dilutions of an HPV-16 plasmid, kindly provided by Professor zur Hausen, in a fixed amount of 75 ng of human genomic DNA (Roche Diagnostics) in 10 mM Tris-HCl [pH 8.2]. HPV-16 E6 and E2 loads were expressed as the number of HPV-16 copies per cell equivalent. The integration status of HPV-16 was assessed by comparing the levels of HPV-16 E2 and E6 genes and was expressed as the E6/E2 ratio. The integrated HPV-16 viral load was calculated by subtracting the copy numbers of E2 (episomal) from the copy numbers of E6 (integrated and episomal) for specimens with an E6/E2 ratio >2.0, as previously discussed (Fontaine et al., 2005a; Khouadri et al., 2007).

**Statistical Analysis.** The intrarun and interrune coefficients of variation (CV) were assessed by amplifying five times 10, 100 and 1,000 copies of HPV-16 DNA mixed in 50 ng of human DNA in the same or in different runs, respectively. The variability between runs of calculating HPV-16 E6/E2 ratios was assessed by testing on three different runs with RT-E6-1 and RT-E2-2 14 clinical samples. The CV was calculated as the ratio of the standard deviation over the mean, multiplied by 100. Amplification efficiencies of HPV-16 E6 and E2 PCR assays were determined by testing 8 times in each assay a HPV-16 titration curve, using the formula  $E=10^{-1/s}-1$  (s being the slope of standard curve). The statistical significance of differences of amplification efficiencies between assays was assessed with the Mann-Whitney U test. Correlation between HPV-16 E2 loads measured with different assays was measured with the Spearman rank correlation coefficient. HPV-16 viral loads



were measured in specimens collected before biopsy that could alter viral load measurement. The statistical significance of differences between log-transformed HPV-16 total and episomal loads between participants with various grades of SIL or CIN was assessed with a Student t-test since they were normally distributed, and the Mann-Whitney U test was used to compare HPV-16 integrated loads. The difference of distribution of HPV-16 E2 copy numbers measured with two real-time PCR assays was assessed with the Sign test. Fisher's exact test was used to assess the statistical significance of differences for categorical variables. Analyses of cytology or histology results were conducted by considering the visit for each participant with the highest grade of SIL or CIN. The magnitude of the association between measures of total, integrated and episomal HPV-16 DNA loads and grade of CIN or SIL was assessed by logistic regression controlling for age, race and a factored variable combining CD4 cell count and HIV status (HIV-negative, HIV-positive with CD4 > 500, 200-500, and <200 cells/ $\mu$ l). The E6 350GT variation was not considered since it was not associated with CIN-2,3 or HSIL in our participants (Fontaine et al., 2005a). All statistical tests were two-sided with statistical significance set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed with STATISTICA version 6 software (StatSoft, Tulsa, OK).

## Results

***HPV-16 E2 polymorphism.*** In order to select primers and probe in conserved sequences of HPV-16 E2 hinge, the complete E2 gene of HPV-16 isolates from various lineages assessed by LCR analysis was sequenced (Table 2). Isolates from 3 Caucasian women identified as the Asian-American LCR variant AY112662 were further classified into two E2 variants that had 20 and 21 variations compared to the E2 prototype. Isolates from 6 women (5 of African origin, 1 Caucasian) identified as LCR variants T4, T8, AF472508 and PF-18 of the African 1 lineage were classified into four E2 variants (median number of variations=17, range=16-19) compared to the E2 prototype. Three Isolates identified as African 2 LCR variant U34089 and collected from women of African origin, were further classified into two E2 variants with 19 and 20 variations each compared to the E2 prototype. Fifty-six variation sites (median variations per variant=2, range=0-6) defined

32 HPV-16 E2 variants in the 118 European isolates (Table 2). Seventy-six of these isolates were HPV-16 E2 prototypes. All HPV-16 E2 variants shared the A2925G variation, as published in a correction to the reference HPV-16 sequence (Meissner, 1997; Swan et al., 2005).

***Performance of HPV-16 E2 real-time PCR assay (RT-E2-2).*** HPV-16 E2 variations reported by others were combined with unique variations identified by us in Table 1 (Casas et al., 1999; Eriksson et al., 1999; Giannoudis et al., 2001; Graham and Herrington, 2000; Meissner, 1997; Sathish et al., 2004; Swan et al., 2005; Veress et al., 1999; Watts et al., 2002). Two primers and one internal probe were selected in conserved areas of E2 to detect the hinge region (Table 1). The *T<sub>m</sub>* of primers NA-16F and NA-16R selected for the RT-E2-2 assay were similar. RT-E2-2 and RT-E6 assays had a wide linear range that covered 10-10,000,000 copies of HPV-16 DNA, generated superimposed titration curves and reached the same endpoint of 10 HPV-16 DNA copies (data not shown). Amplification efficiencies for RT-E2-2 (median=94.8%, range=93.9% to 95.1%) and RT-E6 (median=94.4%, range=93.5% to 95.1%) were similar ( $P=0.81$ ).

The reproducibility of the real-time PCR assays was then evaluated. When 1,000, 100 and 10 HPV-16 DNA copies were measured in the same run, mean HPV-16 E2 copy numbers were  $1,042\pm 23$ ,  $102\pm 12$  and  $12\pm 3$  for intrarun CVs of 2.2%, 11.8% and 25.0%, respectively, and mean HPV-16 E6 copies were  $1,021\pm 69$ ,  $102\pm 8$  and  $9\pm 1$ , for intrarun CVs of 6.8%, 7.8% and 11.1%, respectively. When measured on different runs, mean HPV-16 E2 copy numbers were  $1066\pm 137$ ,  $98\pm 15$  and  $11\pm 4$ , respectively, for interrune CVs of 12.9%, 15.3% and 36.4%, respectively, and HPV-16 E6 copy numbers were  $1031\pm 124$ ,  $94\pm 8$  and  $9\pm 3$ , for interrune CVs of 12.0%, 8.5% and 33.3%, respectively.

To evaluate the variability between runs of calculating HPV-16 E6/E2 ratios, we tested 14 samples on three different runs with RT-E6-1 and RT-E2-2. Table 3 shows that estimation of HPV-16 E6/E2 was reproducible between runs. However, considering the initial and the triplicate estimations of E6/E2 ratio, two specimens with ratios above but near 2.0 falsely gave a ratio below 2 once out of 4 times (Table 3).

***Influence of E2 polymorphism on HPV-16 E2 quantitation.*** To assess if selection of primers and probe in conserved areas of E2 influenced the quantitation of HPV-16 E2 DNA in clinical samples, processed samples containing isolates from each HPV-16 lineage and the prototype were tested with RT-E6, RT-E2-1 and RT-E2-2 at different copy numbers to cover the range of HPV-16 DNA measured in samples (Table 4). HPV-16 E6/E2 ratios  $>2$  were obtained for the six samples containing African 2 (n=3) or Asian-American (n=3) isolates when tested with RT-E2-1 but for only one of these samples when tested with RT-E2-2 (Table 4). Conversely, such a change in E6/E2 ratio with the use of RT-E2-2 was encountered with only one of 12 European isolates. With European isolates, HPV-16 E6/E2 ratios using RT-E2-1 (median=2.14, range=1.12-33.59) and RT-E2-2 (median=2.18, range=0.86-29.66) were similar. HPV-16 E6/E2 ratios calculated with African 1 isolates using RT-E2-1 (median=1.69, range=0.91-2.96) and RT-E2-2 (median=1.83, range=1.16-4.68) were also similar. In contrast, HPV-16 E6/E2 ratios obtained with African 2 isolates using RT-E2-1 (median=4.10, range=2.09-6.41) and RT-E2-2 (median=1.17, range=1.09-1.99) were different, similarly to ratios obtained with Asian-American isolates using RT-E2-1 (median=24.53, range=3.78-30.00) and RT-E2-2 (median=0.99, range=0.81-16.67). For each specimen, the ratio of number of HPV-16 DNA copies measured with RT-E2-2 and RT-E2-1 was calculated. The distribution of ratios of HPV-16 copies with RT-E2-2 and RT-E2-1 (RT-E2-2/RT-E2-1 in Table 4) obtained with European isolates (median=1.02, range=0.64-1.80) and with African 1 isolates (median=0.80, range=0.53-1.09) was similar ( $P=0.08$ ), while ratios with African 2 (median=3.23, range=1.92-3.49) or Asian-American (median=3.78, range=1.47-37) isolates were different from that of European isolates ( $P<0.02$  for each comparison).

To further demonstrate the impact of avoiding polymorphic sites for E2 probe and primers, 139 CVL were tested with RT-E2-1 and RT-E2-2. The distribution of HPV-16 E2 copies measured with RT-E2-2 (median 6150, range 633-129798) and RT-E2-1 (median 8960, range 293-83015) was significantly different ( $P<0.0001$ , data not shown). The difference remained statistically significant considering women without CIN or SIL of any grade ( $P=0.0003$ ), but not with women with CIN-1 ( $p=0.18$ ) or CIN-2,3 ( $P=0.34$ ) (data not shown).

***HPV-16 episomal and integrated loads and grade of cytology smears or CIN.*** Overall, 139 CVL (median=1 CVL/woman, range=1-8) collected from 74 women were analyzed for HPV-16 viral load and integration by measuring HPV-16 E6 and E2 viral loads with the following assays. Samples were all tested with the RT-E2-2 assay to avoid underestimation of HPV-16 E2 load as demonstrated above. We had previously demonstrated that the RT-E6 assay could underestimate the quantity of HPV-16 E6 DNA for isolates belonging to the African phylogenetic branch (Fontaine et al., 2005b). Variations at nucleotide positions 109, 131, 143 and 145 the E6 sequences compared to the European prototype in these isolates are located within probe and primer sequences used in the RT-E6 assay. These mismatches between RT-E6 reagents and HPV-16 E6 DNA sequence may explain the underestimation of viral loads of African isolates. In contrast, we had obtained an excellent correlation between the two assays for European or Asian-American isolates. To avoid underestimating the amount of HPV-16 E6 in our cohort, 8 samples from women infected by African 1 or African 2 isolates were tested with RT-E6 and HPV-16 E6 PG assays to investigate the influence of HPV-16 E6 polymorphism on quantitation of HPV-16 DNA. The quantity of HPV-16 E6 DNA measured with HPV-16 E6 PG were in average  $2.24 \pm 1.25$ -fold higher (range 1.37-5.26) than the quantity measured with RT-E6 (data not shown). In contrast, the ratio of HPV-16 DNA quantity measured with RT-E6 and HPV-16 E6 PG was of  $1.08 \pm 0.47$  for 3 isolates belonging to the Asian-American branch and of  $0.98 \pm 0.25$  for isolates from 40 samples belonging to the European branch. The following analyses used HPV-16 E6 copy numbers obtained with the HPV-16 PG assay for samples containing African variants and RT-E6 results for samples containing European or Asian-American variants.

We first measured HPV-16 viral loads in CVL collected from 70 women for whom Pap smears results were available (45 women with normal smears, 3 with ASCUS, 16 with LSIL and 5 with HSIL). Only one visit per participant with the highest grade of SIL was considered. Of these 70 women, 57 were infected by European variants, 5 by African 1 variants, 3 by African 2 variants, 3 by Asian-American variants and HPV-16 polymorphism was not assessed for two participants. As shown in Table 5, the distributions of HPV-16 total and episomal DNA loads were significantly different between women without SIL and those with LSIL or HSIL. Age, detection of high-risk

HPV types other than 16, CD4 counts, race and HIV status were similar between women with various grades of SIL ( $P > 0.10$  for each comparison, data not shown). Controlling for age, CD4 counts and HIV infection, and the presence of non-European HPV-16 variants, HPV-16 total (OR=2.60, 95%CI=1.01-6.92) or episomal (OR=1.69, 95%CI=1.13-2.52) loads, but not integrated HPV-16 loads (OR=1.31, 95%CI=0.93-1.88), were significantly associated with HSIL.

The association between HPV-16 viral load and CIN-2,3 was investigated in 36 women who had undergone colposcopy with biopsy of suspicious lesion and 24 women for whom three consecutive normal smears had been obtained (Table 5). The latter 60 women (45 HIV-seropositive, 15 HIV-seronegative) had a median age of 29.1 years (range=18-63.3) and median CD4 counts of 287 cells/ $\mu$ l (range=6-960). Of these sixty women, 50 were infected by European HPV-16 variants, 4 by African 1 variants, 2 by African 2 variants and 2 by Asian-American variants. Total and episomal HPV-16 loads were significantly greater in women with CIN-2,3 compared to control women without CIN in univariate analysis ( $P=0.01$ ). These associations remained significant in multivariate analysis controlling for age, HIV and CD4 count, and presence of non-European variant, for HPV-16 total load (OR=2.17, 95%CI=1.11-4.23) and episomal load (OR=2.14, 95%CI=1.09-4.19) but not for HPV-16 integrated load (OR=1.71, 95%CI=0.90-3.26). There was a significant correlation between total and episomal loads ( $r=0.99$ ,  $P < 0.05$ ). We then investigated if the presence of integrated forms irrespective of integrated load was associated with CIN-2,3. There was no difference in the proportion of women with a ratio  $\geq 2.0$  in women without CIN (7 of 35) and with CIN-2,3 (5 of 11,  $P=0.24$ ) or CIN-1 (5 of 14,  $P=0.50$ ).

HPV-16 E6/E2 ratios  $\geq 2$  could also result from variability of quantitation of HPV-16 E2 and E6. The variability of real-time PCR assays is maximal at very low target numbers as demonstrated by CVs calculated above and in the HPV-16 titration curves in Fig. 1. There is thus an advantage of testing HPV-16 DNA copies in the range between 100 to 1,000,000 copies. For specimens from women without SIL and with HPV-16 E6/E2  $> 2$ , 20 samples were within this range with two additional samples being above 1,000,000 but below 5,000,000 copies. We also investigated the reproducibility of obtaining HPV-16 E6/E2  $> 2$  in consecutive samples. Of the 29 women with more than

one consecutive CVL (range, 2-7) tested with real-time PCR, 26 had a cytological and/or histological diagnosis available. Similar HPV-16 E6/E2 ratios ( $<2$  for 17 and  $>2$  for 2 women) were obtained on all consecutive CVL tested for 19 women. One participant with CIN-2,3 provided three samples with HPV-16 E6/E2 ratios between 2.8-4.9 while another woman with CIN-1 provided samples with ratios of 2.4 and 4.2. Discordant HPV-16 E6/E2 ratios were obtained for 10 participants: seven had only one of 2 to 3 samples with  $E6/E2 > 2$ , one had 2 of 3 samples with  $E6/E2 > 2$  and 3 women had more than three samples tested, several of which had  $E6/E2$  ratio  $> 2$  (one had five samples analyzed, three with ratios from 2.1-3.4 and two with ratios from 0.7-0.9; one with CIN-1 had two consecutive samples with ratios of 2.1 and 3.4 and four subsequent samples with ratios from 1.2-1.9; one woman with CIN-1 had two samples with ratios of 2.3 and 2.6 and two samples with ratios of 0.5 and 1.8).

## **Discussion**

In this work, we measured episomal and integrated HPV-16 DNA with truly quantitative assays. The HPV-16 E2 gene was shown in our population to be polymorphic even in isolates classified as prototypes by LCR analysis. Several sites of variation were identified in primer and probe sequences utilized in the assay initially described to quantitate HPV-16 E2 (Peitsaro et al., 2002). HPV-16 E2 DNA polymorphism altered quantitation of E2 in isolates from African 2 and Asian-American lineages, also affecting significantly the E6/E2 ratio measured with these samples. Overall, fewer specimens were considered to contain integrated HPV-16 forms with the novel HPV-16 E2 assay. Episomal and total HPV-16 loads, but not the presence of integrated forms, were associated with CIN-2,3 on biopsy or HSIL on cytology.

Most significant differences between RT-E2-1 and RT-E2-2 were encountered for samples containing Asian-American E2 variants. Sequence mismatches in primers and/or probe with viral sequences can introduce significant errors into quantitative PCR by impeding efficiency of amplification or hybridization reaction (Whiley and Sloots, 2005). Mismatches at the 3' end of primers introduce considerable error in quantitation, with calculated copy numbers being 2-3 logs lower than the actual number of copies (Whiley

et al., 2005). HPV-16 viral load results from studies conducted on populations infected with non-European variants should be interpreted with caution if assays optimized with European variants are applied.

Differences between E6 and E2 viral loads could reflect technical limitations of the assays rather than true integration. Since integration is measured by subtracting E2 from E6, variability inherent to each assay will influence the calculated number of copies of integrated forms. Real-time PCR assays for HPV quantitation have excellent intrarun and interrune reproducibility (Flores-Munguia et al., 2004; Fontaine et al., 2005a; Fontaine et al., 2005b; Gravitt et al., 2003; Lefevre et al., 2003; Moberg et al., 2003). In our work, CVs obtained were less than 30% for quantities of HPV-16  $\geq 100$  copies and above, as reported by others (Arias-Pulido et al., 2006; Fontaine et al., 2005b; Gravitt et al., 2003; Lefevre et al., 2003). Most samples analyzed here were in the range of 100-1,000,000 copies, a range with less variability. Moreover, E6/E2 ratios measured for European isolates with two E2 assays were similar for most samples irrespective of initial quantities of HPV-16 DNA. Assay variability is thus unlikely to explain HPV-16 E6/E2 ratios over 2. Although HPV-16 E2 is the most frequently disrupted gene, some have reported in an American population that the hinge of E2 is the most frequent site of rupture opposed to the 3' end of E2 that was found to be the most frequently disrupted in a study conducted in China (Arias-Pulido et al., 2006; Cheung et al., 2006; Kalantari et al., 1998). The performance of real-time PCR assays to detect integration may be different between populations because of different HPV integration patterns.

Although the analytical sensitivity of real-time PCR for quantitation of HPV-16 E6 and E2 DNA is excellent (Cheung et al., 2006; De Marco et al., 2007; Guo et al., 2007), the clinical sensitivity and specificity of these assays to detect HPV-16 integration against a gold standard method have not been thoroughly assessed (De Marco et al., 2007). Confirmation of the presence of integrated HPV-16 DNA forms detected by real-time PCR has been accomplished on a limited number of samples by various techniques including in situ hybridization (Fujii et al., 2005), Southern blot (Fontaine et al., 2005a; Nagao et al., 2002) and PCR-sequencing methods identifying the presence of HPV-human DNA junctions (De Marco et al., 2007). One of the latter methods, the detection of integrated papillomavirus sequences-PCR, found integrated HPV-16 in all 11 samples

that contained mixed or integrated HPV-16 forms and tested negative for all 20 samples that did not contain integrated HPV-16 by real-time PCR (De Marco et al., 2007). We also confirmed in samples with integrated HPV-33 by real-time PCR the presence of integrated HPV-33 forms with restricted-site PCR (Khouadri et al., 2007). Complete concordance between real-time PCR and a combination of Southern blot and 2D-gel electrophoresis was obtained on 8 specimens containing episomal forms only and 4 specimens with mixed HPV-16 forms (Nagao et al., 2002). Finally, a concordance rate of 86% was obtained on 47 samples analyzed with real-time PCR and in situ hybridization for detection of HPV-16 integrated forms (Fujii et al., 2005). These publications suggest that real-time PCR assays are promising techniques to detect integrated HPV forms but further studies on a greater number of specimens using in parallel several techniques for detection of integrated HPV-16 need to be conducted.

With optimized assays, our findings demonstrate that women infected by HIV or at risk for HIV infection, are infected with higher HPV-16 viral loads when they have CIN-2,3 than women without SIL or CIN. Recent case-control studies also reported that HPV-16 viral load was independently associated with CIN-2,3 (Flores et al., 2006; Fontaine et al., 2005a; Rajeevan et al., 2005; van Duin et al., 2002). In studies with prospective designs, high loads of HPV-16 DNA increased the risk of developing HSIL/CIN-3, carcinoma in situ or invasive cancer (Josefsson et al., 2000; Moberg et al., 2004; Moberg et al., 2005; Schlecht et al., 2003; Ylitalo et al., 2000). In our study, integrated HPV-16 load was not associated with CIN-2,3 in multivariate analysis. Others reported a marginal association between the presence of integrated forms and CIN-2, while there was no significant association with CIN-3 or invasive cancer (Cheung et al., 2006) or between the presence of integration and cytology grade (kulmala et al., 2007). One study reported a significant difference in proportion of samples with HPV-16 integration between cervical cancer and CIN-2,3 (Guo et al., 2007). For specimens harboring a mixture of episomal and integrated forms, the latter form accounts for >75% of the total HPV-16 copy number (Cheung et al., 2006). We also found that in specimens with E6/E2 ratios >2, integrated HPV-16 accounted for 59% to 90% of total HPV-16 DNA copies.



We recognize that our study has limitations. We assessed the association between grade of disease and HPV-16 loads using cross-sectional analysis of cohort study data. We could rely on a high proportion of diagnoses based on histology and colposcopy results, reviewed by a dedicated pathologist. The prospective design of the Canadian Women's HIV Study allowed us to select the visit corresponding to the highest grade of SIL or CIN obtained on consecutive visits and also enabled evaluating the integration results over several visits. Most participants were infected or were at high risk for HIV infection. Our results cannot be extrapolated to the general population because participants in this study were at high risk for sexually transmitted diseases. The small number of participants with CIN or SIL restricted our analysis to test possible associations with potential mediating or confounding factors.

The difference between viral load values for women with CIN-2,3 and those lesion-free, although statistically significant, does not permit reliably classifying women into higher risk categories because of the important overlap of viral load values. More studies are needed to better understand the meaning of detecting integrated forms in normal women. The value of detecting integrated forms in pre-cancerous lesions should be investigated in cohort studies to monitor progression of such lesions. The presence of integrated forms should be investigated in normal women prospectively to assess if it is a determinant of progression to CIN, or progression from low-grade to high-grade CIN lesion. Although studies have suggested that integration could be a useful biomarker for CIN grade or progression, more studies need to be conducted with optimized assays and prospectively collected samples. Longitudinal studies with larger sample sizes are required to set the cut-off of E6/E2 ratios and load of integrated forms as predictive markers of CIN-2,3 or CIN progression and the utility of measuring integration with real time PCR. The value of real-time PCR assays to detect integration needs to be established with standard confirmatory methods of integration.

## **Acknowledgments**

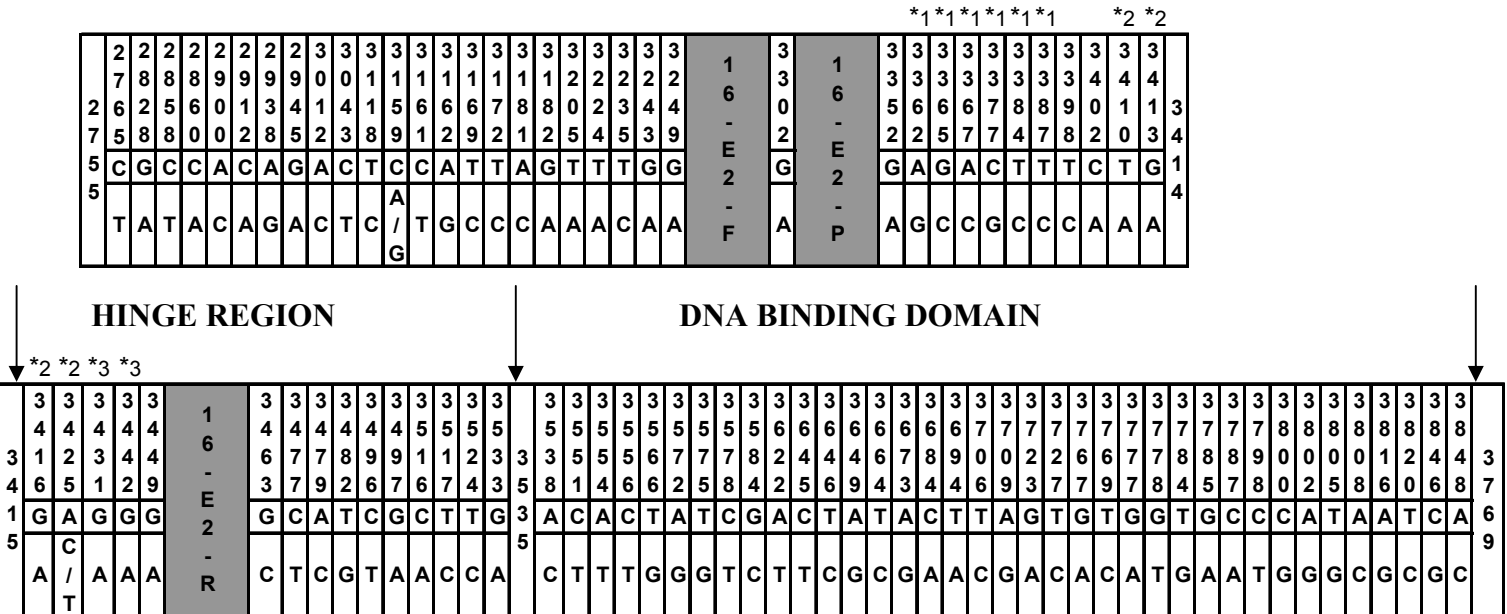
We would like to thank Mme Diane Gaudreault and Mme Diane Bronsard for processing genital samples. This study was supported by Canadian Institutes of Health Research and by The Réseau FRSQ SIDA-Maladies Infectieuses. F.C. is a chercheur national supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. E.F. was supported by Distinguished Scientist Award from the Canadian Institutes for Health Research.

**Table 1: HPV16 primers and probes and HPV-16 E2 polymorphism**

Target	Probes and primers	Sequence (nt positions)	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon size (bp)
<b>E6</b>	Primer 16E6F	5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3' (94-115)	59	81
	Primer 16E6R	5'-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC-3' (150-174)	60	
	Probe 16E6PRO	5'-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-3'(119-147)	69	
	Primer PG16F	5'-ATGACTTTGCTTTTTCGGGAT-3' (231-250)	62	223
	Primer PG16-R	5'-CTTTGCTTTTCTTCAGGACA-3' (415-434)	60	
	Probe PG16-TM	5'-ACGGTTTGTGTATTTCGTGTTCTAA-3' (365-389)	64	
<b>E2</b>	Primer 16E2F	5'-AACGAAGTATCCTCTCCTGAAACTATTAG-3' (3362-3390)	59	82
	Primer 16E2R	5'- CCAAGGCGACGGCTTTG-3' (3427-3443)	60	
	Probe 16E2PRO	5'-CACCCGCGCGACCCATA-3' (3407-3425)	69	
	Primer NA-16-F	5'-GTGCAGTTTAAAGATGATGCAGA-3' (3260-3282)	58	216
	Primer NA-16-R	5'-TCGCTGGATAGTCGTCTGTGT-3' (3455-3475)	58	
	Probe: NA-16-P	5'- TTCATGCGGGTGGTCAGGTAATA-3' (3312-3334)	64	

Nucleotide positions based on the revised, or HPV-16R, HPV-16 sequence (Meissner, 1997; Myers et al., 1995). E6 primers and probe, and E2 primers 16E2F/16E2R and E2 probe 16E2PRO are from Peitsaro et al. (Peitsaro et al., 2002).

**TRANSACTIVATION DOMAIN**



Position of novel primers and probes is shown in shaded areas in the figure above. Sites of polymorphism for primers and probe described by Peitsaro et al (Peitsaro et al., 2002) are also shown : \*1 is for primer 16E2F, \*2 is for probe 16E2PRO, \*3 is for primer 16E2R. African 1 variants could cumulate up to 2 variations in 16-E2F and 1 variation in 16E2PRO. Asian-American E2 variants could cumulate up to 3 variations in primer 16-E2F and 1 variation in probe 16E2PRO while African 2 variants could have up to 2 variations in primer 16-E2F, 1 in 16-E2R primer and 1 in 16E2PRO. Variants from African 2 and Asian-American lineages shared 2 variations in the upstream primer with African 1 isolates, but African 2 isolates carried an additional variation located at the 3' end of upstream primer and Asian-American isolates carried an additional mutation in the downstream primer. European variants had at most one variation in 16-E2F primer or in probe 16E2PRO.





**Table 3: Interrun variability of estimating HPV-16 E6/E2 ratio with real-time PCR.**

Mean HPV-16 DNA copies/ $\mu$ l sample		HPV-16 E6/E2 ratios				CV (%)
E6	E2	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	Mean $\pm$ sd	
13 $\pm$ 3	19 $\pm$ 4	0.56	0.45	1.12	0.71 $\pm$ 0.36	50.2
54 $\pm$ 6	90 $\pm$ 4	0.55	0.54	0.70	0.60 $\pm$ 0.09	14.9
237 $\pm$ 52	189 $\pm$ 25	1.79	0.87	1.27	1.30 $\pm$ 0.48	36.8
316 $\pm$ 40	286 $\pm$ 19	0.88	1.27	1.19	1.11 $\pm$ 0.20	18.2
737 $\pm$ 120	703 $\pm$ 70	1.65	0.70	0.94	1.09 $\pm$ 0.49	45.0
3,525 $\pm$ 442	5,227 $\pm$ 2987	0.88	1.01	0.46	0.78 $\pm$ 0.29	36.6
7,708 $\pm$ 1,197	7,041 $\pm$ 166	0.90	1.11	1.28	1.10 $\pm$ 0.19	17.3
17,587 $\pm$ 2,231	12,433 $\pm$ 455	1.34	1.33	1.56	1.41 $\pm$ 0.21	9.23
20,960 $\pm$ 120	7,737 $\pm$ 972	3.52	2.11	2.58	2.74 $\pm$ 0.72	26.3
24,750 $\pm$ 5,075	8,463 $\pm$ 1,165	3.52	2.70	2.53	2.92 $\pm$ 0.53	18.2
27,093 $\pm$ 3,861	22,713 $\pm$ 574	1.17	1.05	1.35	1.19 $\pm$ 0.15	12.9
161,847 $\pm$ 2,482	174,567 $\pm$ 3,628	1.05	1.24	0.68	0.99 $\pm$ 0.28	28.5
1,111,400 $\pm$ 269,177	494,533 $\pm$ 1,731	2.96	2.16	1.68	2.27 $\pm$ 0.64	26.3
10,149,000 $\pm$ 2,246,055	4,568,333 $\pm$ 866	3.16	2.16	1.62	2.28 $\pm$ 0.79	34.7

The number of copies of HPV-16 E6 and E2 DNA per  $\mu$ l of specimen was measured on three independent runs for 14 samples. E6/E2 ratios are presented for each run. Means are  $\pm$  1 standard deviation. CV is for the coefficient of variation of the three calculations of E6/E2 ratios.

**Table 4: influence of HPV-16 polymorphism on HPV-16 E2 quantitation and E6/E2 ratio.**

Disease	HPV-16		HPV-16 DNA copies/ $\mu$ l sample			E6/E2-1	E6/E2-2	E2-2/E2-1
	Lineage	variant	RT-E2-1	RT-E2-2	RT-E6			
No CIN	E	ref	16 $\pm$ 3	15 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1	2.93	3.1	0.94
LSIL	E	ref	75 $\pm$ 4	78 $\pm$ 9	229 $\pm$ 25	3.07	2.92	1.05
No CIN	E	ref	121 $\pm$ 3	198 $\pm$ 10	257 $\pm$ 6	2.12	1.30	1.64
CIN-2,3	E	ref	434 $\pm$ 3	357 $\pm$ 4	1,216 $\pm$ 62	2.80	3.40	0.82
CIN1	E	ref	8,460 $\pm$ 355	11,092 $\pm$ 1006	9,543 $\pm$ 355	1.13	0.86	1.31
No CIN	E	ref	17,275 $\pm$ 672	11,360 $\pm$ 650	21,470 $\pm$ 28	1.24	1.89	0.66
CIN-2,3	E	ref	386,800 $\pm$ 7637	694,668 $\pm$ 3097	717,300 $\pm$ 9662	1.85	1.03	1.80
No CIN	E	G1	6,000 $\pm$ 57	7,490 $\pm$ 184	15,765 $\pm$ 219	2.63	2.11	1.25
CIN-2,3	E	G10	349,000 $\pm$ 283	344,547 $\pm$ 5827	513,000 $\pm$ 14284	1.47	1.49	0.99
CIN-2,3	E	PF-12	12,750 $\pm$ 240	8,020 $\pm$ 1047	27,170 $\pm$ 1541	2.16	3.39	0.64
No CIN	E	PF-16-5	34 $\pm$ 1	39 $\pm$ 17	1,142 $\pm$ 82	33.5	29.66	1.13
CIN-2,3	E	SA-9	24,550 $\pm$ 183	22,440 $\pm$ 2998	50,700 $\pm$ 1245	2.07	2.26	0.91
No CIN	Af1	T4	293 $\pm$ 9	235 $\pm$ 21	535 $\pm$ 1	1.83	2.28	0.80
HSIL	Af1	T4	97,170 $\pm$ 6039	89,810 $\pm$ 621	164,420 $\pm$ 15217	1.69	1.83	0.92
No CIN	Af1	T4	224 $\pm$ 5	142 $\pm$ 23	662 $\pm$ 29	2.96	4.68	0.63
No CIN	Af1	PF-16-18	6,150 $\pm$ 665	6,732 $\pm$ 1202	7,800 $\pm$ 170	1.27	1.16	1.09
Unknown	Af1	AF472508	1,653,600 $\pm$ 51,477	887,400 $\pm$ 71,559	1,511,100 $\pm$ 13,152	0.91	1.70	0.53
LSIL	Af2	U34089	923 $\pm$ 7	3,220 $\pm$ 735	3,780 $\pm$ 399	4.10	1.17	3.49
No CIN	Af2	U34089	81 $\pm$ 2	260 $\pm$ 1	516 $\pm$ 1	6.40	1.99	3.23
CIN-1	Af2	U34089	83,015 $\pm$ 5833	159,100 $\pm$ 1,499	173,230 $\pm$ 12,657	2.09	1.09	1.91
No SIL	AsAm	IND-8	632 $\pm$ 11	2,391 $\pm$ 54	2,389 $\pm$ 69	3.78	0.99	3.78
CIN-1	AsAm	IND-8	0.5 $\pm$ 1	19 $\pm$ 5	15 $\pm$ 3 30.0	0.81	37.00	
No SIL	AsAm	IND-8	97 $\pm$ 10	143 $\pm$ 7	2,389 $\pm$ 69	24.53	16.67	1.48

Isolates from various lineages assessed by LCR analysis (E: European, Af1: African 1, Af2: African 2, AsAm: Asian-American) were tested for quantification of HPV-16 E6 and E2 with real-time PCR assays devised by Peitsaro et al. (Peitsaro et al., 2002) (RT-E6 and RT-E2-1) and a novel assay taking into consideration E2 polymorphism (RT-E2-2). Ref is for the prototype. Disease is the status of the cervix assessed by histopathology or cytology: CIN is for cervical intraepithelial neoplasia, SIL is for squamous intraepithelial lesion and unknown is when a cytology was not obtained and a colposcopy was not performed.

**Table 5. HPV-16 total, episomal and integrated loads in cervicovaginal lavages from women with SIL on cytology smears or CIN proven histologically.**

<b>SIL or CIN grade</b> (no of women)	<b>Log HPV-16 DNA copies/cell</b>			<b>Significance</b> (P value) <sup>1</sup>
	median	Interquartile range	range	
<b><u>Cytological diagnosis</u></b>				
<b><i>HPV-16 total DNA load</i></b>				
No SIL (n = 45)	2.3	0.2 – 15.2	0.0 – 4914.6	Ref. <sup>2</sup>
LSIL (n = 16)	67.1	0.9 – 404.5	0.1 – 5151.2	0.01
HSIL (n = 5)	1697.1	17.4 – 2841.6	0.4 – 4510.8	0.02
<b><i>HPV-16 episomal DNA load</i></b>				
No SIL (n = 45)	1.1	0.1 – 13.71	0.0 – 2674.6	Ref.
LSIL (n = 16)	47.1	0.5 – 268.7	0.0 – 6025.6	0.01
HSIL (n = 5)	874.2	15.5 – 2055.4	0.2 – 2103.9	0.03
<b><i>HPV-16 integrated DNA load</i></b>				
No SIL (n = 45)	0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 58.33	Ref.
LSIL (n = 16)	0.0	0.0 – 0.2	0.0 – 455.0	0.45
HSIL (n = 5)	0.0	0.0 – 0.3	0.0 – 2455.39	0.39
<b><u>Histological diagnosis</u></b>				
<b><i>HPV-16 total DNA load</i></b>				
No CIN (n = 35)	1.3	0.2 – 16.2	0.0 – 4914.6	Ref.
CIN-1 (n = 14)	11.57	1.0 – 95.9	0.0 – 2841.6	0.14
CIN-2,3 (n = 11)	102.1	0.9 – 865.4	0.2 – 5151.2	0.01
<b><i>HPV-16 episomal DNA load</i></b>				
No CIN (n = 35)	0.9	0.1 – 22.4	0.0 – 2674.6	Ref.
CIN-1 (n = 14)	9.8	0.4 – 45.6	0.0 – 2103.9	0.20
CIN-2,3 (n = 11)	72.3	1.0 – 410.4	0.2 – 6025.6	0.01



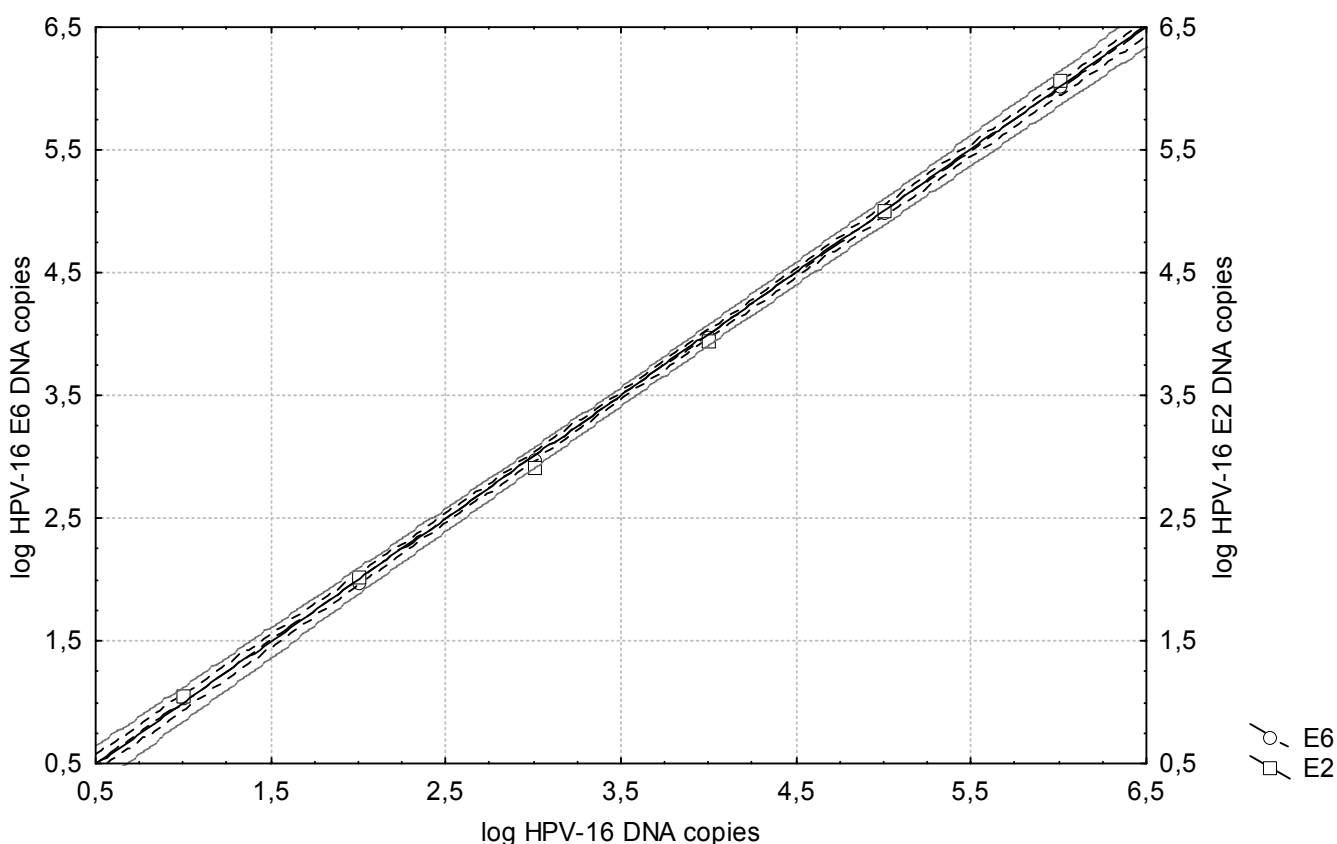
**HPV-16 integrated DNA load**

No CIN (n = 35)	0.0	0.0 – 0.1	0.0 – 6.0	Ref.
CIN-1 (n = 14)	0.0	0.0 – 0.3	0.0 – 58.3	0.4
CIN-2,3 (n = 11)	0.0	0.0 – 6.3	0.0 – 455.0	0.6

Interquartile range was the 25–75% quartile values. <sup>1</sup> The significance of differences of HPV-16 load distributions between disease grades were calculated with a Mann-Whitney U test. <sup>2</sup> Ref. is for the reference category for statistical comparisons (no SIL). Abbreviations are explained in the text.

**Figure 1. Quantitation of HPV-16 DNA with real-time PCR assays for E6 and E2.**

The same dilutions of an HPV-16 DNA plasmid were amplified with two real-time PCR assays for



HPV-16 E2 and E6 as described in the methods section. The mean copy numbers for each dilution in each assay from two independent experiments were used to generate titration curves. The dotted lines are the 95% confidence interval of regression lines.

## Reference List

- 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.
- Casas,L., S.C.Galvan, R.M.Ordonez, N.Lopez, M.Guido, and J.Berumen. 1999. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 83:449-455.
- 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.
- Clifford,G.M., J.S.Smith, T.Aguado, and S.Franceschi. 2003. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British J Cancer* 89:101-105.
- Coutlée,F., C.Hankins, N.Lapointe, The Canadian Women's HIV study group. 1997. Comparison between vaginal tampon and cervicovaginal lavage specimens collection for detection of human papillomavirus DNA by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 51:42-47.
- Dalstein,V., D.Riethmuller, J.L.Pretet, C.Le Bail, J.L.Sautiere, J.P.Carbillet, B.Kantelip, J.P.Schaal, and C.Mougin. 2003. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106:396-403.
- De Marco,L., A.Gillio-Tos, L.Bonello, V.Ghisetti, G.Ronco, and F.Merletti. 2007. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *Journal of Clinical Virology* 38:7-13.

- Eriksson,A., J.R.Herron, T.Yamada, and C.M.Wheeler. 1999. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* 80:595-600.
- Ferenczy,A., F.Coutlée, E.L.Franco, and C.Hankins. 2003. HIV and HPV co-infection and lower genital tract neoplasia: review of recent developments. *Can Med Ass J* 169:431-434.
- Ferenczy,A. and E.L.Franco. 2002. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncology* 3:11-16.
- Flores,R., M.Papenfuss, W.T.Klimecki, and A.R.Giuliano. 2006. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 118:1187-1193.
- Flores-Munguia,R., E.Siegel, W.T.Klimecki, and A.R.Giuliano. 2004. Performance assessment of eight-throughput PCR assays for viral load quantitation of oncogenic HPV types. *Journal of Molecular Diagnostics* 6:115-124.
- Fontaine,J., C.Hankins, M.H.Mayrand, J.Lefevre, D.Money, S.Gagnon, A.Rachlis, K.Pourreaux, and F.Coutlee. 2005a. 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.
- Fontaine,J., P.Gravitt, L.M.Duh, J.Lefevre, K.Pourreaux, C.Hankins, and F.Coutlee. 2005b. High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2200-2207.
- Fujii,T., N.Masumoto, M.Saito, N.Hirao, S.Niimi, M.Mukai, A.Ono, S.Hayashi, K.Kubushiro, E.Sakai, K.Tsukazaki, and S.Nozawa. 2005. Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 14:103-108.

- Giannoudis,A., M.van Duin, P.J.F.Snijders, and C.S.Herrington. 2001. Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *British J Cancer* 84:1058-1063.
- Graham,D.A. and C.S.Herrington. 2000. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Molecular Pathology* 53:201-206.
- Gravitt,P.E., C.Peyton, C.Wheeler, R.Apple, R.Higuchi, and K.V.Shah. 2003. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* 112:23-33.
- 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.
- Hankins,C., F.Coutlee, N.Lapointe, P.Simard, T.Tran, J.Samson, L.Hum, and The Canadian Women's HIV study Group. 1999. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *Can Med Ass J* 160:185-191.
- Hopman,A.H.N., F.Smedts, W.Dignef, M.Ummulen, G.Sonke, M.Mravunac, G.P.Vooijs, E.J.M.Speel, and F.C.S.Ramaekers. 2004. Transition to high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 202:23-33.
- Josefsson,A.M., P.K.E.Magnusson, N.Ylitalo, P.Sorensen, P.Qwarforth-Tubbin, P.K.Anderson, M.Melbye, H.O.adami, and U.B.yllensten. 2000. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355:2189-2193.

- Kalantari,M., F.Karlsen, G.Kristensen, R.Holm, B.Hagmar, and B.Johansson. 1998. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 17:146-153.
- 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* in press.
- Koushik,A., A.Ghosh, E.Duarte-Franco, P.Forest, H.Voyer, G.Matlashewski, F.Coutlee, and E.L.Franco. 2005. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Det Prev* 29:307-316.
- 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.
- Lefevre,J., C.Hankins, K.Pourreaux, The Canadian Women's HIV study Group, and F.Coutlée. 2004. Prevalence of selective inhibition of HPV-16 DNA amplification in cervicovaginal lavages. *J Med Virol* 72:132-137.
- Lefevre,J., C.Hankins, K.Pourreaux, H.Voyer, The Canadian Women's HIV study Group, and F.Coutlée. 2003. Real -time PCR assays using internal Controls for quantitation of HPV-16 and b-globin DNA in cervicovaginal lavages. *J Virol Methods* 144:135-144.
- Meissner,J. 1997. Sequencing errors in reference HPV clones. *In* Human papillomavirus 1997: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. G.Myers, K.Munger, F.Sverdrup, A.A.McBride, H.U.Bernard, and J.Meissner, editors. Los Alamos National Laboratory, NM. 110-123.

- Moberg,M., I.Gustavsson, and U.Gyllensten. 2004. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 112:854-859.
- Moberg,M., I.Gustavsson, E.Wilander, and U.Gyllensten. 2005. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 92:891-894.
- Moberg,M., I.Gustavsson, and U.Gyllensten. 2003. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 41:3221-3228.
- Myers,G., B, H.-U.Bernard, H.Delius, C.C.Baker, J.Icenogle, A.L.Halpern, and C.Wheeler. 1995. Human papillomavirus. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Publication LA-UR 95-3675 ed. Los Alamos, N.M.
- Nagao,S., M.Yoshinouchi, Y.Miyagi, A.Hongo, J.Kodama, S.Itoh, and T.Kudo. 2002. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:863-867.
- 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.
- Rajeevan,M.S., D.C.Swan, R.Nisenbaum, D.R.Lee, S.D.Vernon, M.T.Ruffin, I.R.Horowitz, L.C.Flowers, D.Kmak, T.Tadros, G.Birdsong, M.Husain, S.Srivastava, and E.R.Unger. 2005. Epidemiologic and viral factors associated with cervical neoplasia in HPV-16-positive women. *Int J Cancer* 115:114-120.
- Sathish,N., P.Abraham, A.Peedicayil, G.Sridharan, R.V.Shaji, and G.Chandy. 2004. E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. *Gynecol Oncol* 95:363-369.

- Schlecht,N.F., A.Trevisan, E.Duarte-Franco, T.E.Rohan, A.Ferenczy, Villa, LL, and E.L.Franco. 2003. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 103:519-524.
- Swan,D.C., M.Rajeevan, G.Tortolero-Luna, M.Follen, R.A.Tucker, and E.R.Unger. 2005. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol* 96:695-700.
- van Duin,M., P.J.F.Snidjers, H.F.J.Schrijnemakers, F.J.Voorhorst, L.Rozendaal, M.A.E.Nobbenhuis, A.J.C.van den Brule, R.H.M.Verheijen, T.J.Helmerhorst, and C.J.L.M.Meijer. 2002. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 98:590-595.
- Veress,G., K.Szarka, X.P.Dong, L.Gergely, and H.Pfister. 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 80:1035-1043.
- Wang,S.S. and A.Hildesheim. 2003. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*:35-40.
- Watts,K.J., C.H.Thompson, Y.E.Cossart, and B.R.Rose. 2002. Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. *Int J Cancer* 97:868-874.
- Whiley,D.M. and T.P.Sloots. 2005. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J Clin Virol* 34:104-107.
- Ylitalo,N., P.Sorensen, A.M.Josefsson, P.K.E.Magnusson, P.K.Anderson, J.Ponten, H.O.Adami, U.B.Gyllensten, and M.Melbye. 2000. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355:2194-2198.

## **DISCUSSION**



Dans cet ouvrage, nous avons mesuré l'ADN VPH-16 épisomal et intégré, avec des tests quantitatifs, qui non seulement normalisent la quantité d'ADN VPH-16 par rapport à la quantité d'ADN cellulaire récolté, mais aussi vérifient s'il y a présence d'inhibiteurs du PCR. Dans un premier temps, des amorces et des sondes pour mesurer l'ADN du gène E2 du VPH-16 furent sélectionnées dans des régions conservées du gène E2 afin d'éviter une diminution de l'efficacité d'amplification avec des isolats VPH-16 de différentes lignées. Le gène VPH-16 E2 est polymorphe dans notre population, même pour des isolats classifiés comme étant des prototypes par l'analyse du LCR. Plusieurs sites de variation furent identifiés dans les séquences d'amorce et de sonde utilisées dans le test initialement décrit pour quantifier le VPH-16 E2 (Peitsaro et al., 2002).

Le polymorphisme du gène E2 du VPH-16 a eu un impact sur sa quantification du dans les isolats de lignées Africaines 2 et Asiatiques-Américaines, affectant ainsi significativement le ratio E6/E2 mesuré dans ces échantillons. Ces résultats soulignent l'importance de considérer tous les paramètres dans l'optimisation de tests PCR-RT. Dans son ensemble, avec ce nouveau test de quantification de VPH-16 E2, moins de spécimens furent considérés comme contenant des formes VPH-16 intégrées. Des charges épisomales et intégrées de VPH-16, mais pas la présence de formes intégrées, furent associées avec un CIN-2,3 sur la biopsie ou HSIL (*high-grade squamous intraepithelial lesions* – lésions squameuses intraépithéliales de haut-grade) à la cytologie, dans notre cohorte de patientes infectées ou à risque élevé d'infection au VIH.

Il y a plusieurs avantages à utiliser le PCR-RT pour détecter l'intégration du VPH-16. La relation entre les cycles où l'amplification s'amorce et la concentration d'ADN VPH reste linéaire sur plusieurs logarithmes, tel que rapporté aussi par d'autres chercheurs (Cheung et al., 2006; Peitsaro et al., 2002; Lefevre et al., 2003). Les tests PCR-RT génèrent aussi des résultats quantitatifs qui peuvent permettre d'évaluer le nombre de cellules dans les échantillons. De plus, de petites quantités d'échantillon peuvent être évaluées contrairement à d'autres techniques moins sensibles tel que le Southern blot et le PCR-séquençage traditionnel. Néanmoins, plusieurs facteurs peuvent influencer la performance des tests de PCR-RT, et doivent être pris en considération pour une quantification précise des gènes E6 et E2 du VPH-16.

Le polymorphisme du VPH-16 est un de ces facteurs. Une homologie moindre entre les amorces et/ou les sondes avec les séquences virales peut introduire des erreurs significatives dans le PCR quantitatif, en diminuant l'efficacité de l'amplification ou de la réaction d'hybridation (Whiley et al., 2005). L'analyse des séquences du gène de VPH-16 E2, précédemment publiées ou en provenance de nos travaux, a révélé que les séquences de la sonde et les amorces utilisées dans le test RT-E2-1 initialement décrit contenaient plusieurs sites polymorphes. Les séquences des amorces et sondes du test RT-E2-1 avaient été sélectionnées en utilisant la souche prototypique du VPH-16. Quoique des variantes Africaines 1 pouvaient cumuler jusqu'à deux variations dans l'amorce 16-E2F et une variation dans la sonde 16E2PRO, la quantité de copies de VPH-16 mesurées avec la RT-E2-1 était similaire à celle mesurée par la RT-E2-2. Les variantes E2 Asiatiques-Américaines pouvaient cumuler jusqu'à 3 variations dans l'amorce 16-E2F et une variation dans la sonde 16E2PRO, alors que les variantes Africaines 2 pouvaient avoir jusqu'à deux variations dans l'amorce 16-E2F, une dans l'amorce 16-E2R et une dans la sonde 16E2PRO. Les différences les plus significatives entre les deux tests RT-E2-1 et RT-E2-2 ont été rencontrées pour les échantillons contenant ces isolats. Les variantes des lignées Africaines 2 et Asiatiques-Américaines partageaient deux variations dans l'amorce en amont avec les isolats Africains 1, mais les isolats Africains 2 portaient une variation additionnelle située à l'extrémité 3' de l'amorce en amont, et les isolats Asiatiques-Américains portaient une mutation additionnelle dans l'amorce en aval. En augmentant l'instabilité des hybrides, les discordances de séquence à l'extrémité 3' des amorces introduisent une erreur considérable dans la quantification avec des quantités calculées de copies étant de 2 à 3 logarithmes plus basses que la quantité actuelle de copies (Whiley et al., 2005). En ce qui à trait aux discordances de séquences uniques à l'extrémité 5' des amorces, elles ont moins d'effet sur l'efficacité de l'amplification mais pourraient tout de même accroître l'instabilité entre la séquence de la sonde et celle de la cible. Il a été démontré que des mutations dans les amorces pouvaient affecter la quantification même si elles étaient éloignées de l'extrémité 3' de l'amorce (Whiley et al., 2005). La charge virale du VPH-16, mesurée lors d'études effectuées sur des populations infectées avec des variantes non-européennes, devrait être interprétée avec prudence lorsque les tests utilisés ont été

optimisés avec des variantes européennes. Les variantes européennes avaient tout au plus une variation dans l'amorce 16-E2F ou dans la sonde 16E2PRO utilisées pour le test RT-E2-1.

La qualité de l'échantillon pourrait aussi influencer la quantification du VPH-16. Nous avons démontré, lors de travaux précédents, l'importance de vérifier la présence d'inhibiteurs du PCR qui peuvent affecter de façon significative le processus d'amplification (Lefevre et al., 2003; Lefevre et al., 2004). La co-amplification de l'ADN du VPH-16 et d'un contrôle interne est le meilleur moyen pour mesurer l'effet des inhibiteurs ou de la compétition par d'autres types de VPH contenus dans l'échantillon sur l'amplification du VPH-16. Tous les échantillons évalués avaient été initialement dépistés pour la présence d'inhibiteurs avec des contrôles internes pour la  $\beta$ -globine, VPH-16 E6 et VPH-16 E2 (Fontaine et al., 2005). Plusieurs groupes ont démontré qu'une plus grande quantité d'ADN cellulaire a été récoltée de femmes avec un CIN-2,3 (Schlecht et al., 2003, Cheung et al., 2006; Swan et al., 1999), ce qui fut également démontré par notre équipe (Fontaine et al., 2005). Il est donc important de contrôler pour la quantité de cellules recueillies dans nos analyses.

Les différences entre les quantités mesurées de E6 et E2 pourraient aussi refléter des limitations techniques des tests plutôt qu'une véritable intégration. Comme l'intégration est mesurée en soustrayant le nombre de copies de E2 du nombre de copies de E6, la variabilité inhérente à chaque test influencera la quantité calculée de copies de formes intégrées. Les tests dePCR-RT pour la quantification du VPH ont une excellente reproductibilité intra-série et inter-série (Fontaine et al., 2005; Lefevre et al., 2004; Gravitt et al., 2003; Flores-Munguia et al., 2004). Lors de nos travaux, les coefficients de variation étaient de moins de 30 % pour des quantités de VPH-16  $\geq 100$ , tel que rapporté par d'autres chercheurs (Fontaine et al., 2005; Lefevre et al., 2004; Gravitt et al., 2003; Arias-Pulido et al. 2006). Les charges virales VPH-16 ont varié d'au plus de 30 % après dilution de 10 000 fois de l'échantillon lors d'une étude (Lefevre et al., 2004). Une excellente corrélation a été obtenue entre trois tests différents de PCR-RT mesurant la charge virale du VPH-16 (Fontaine et al., 2005). La plupart des échantillons analysés ici contenaient de 100 à 1 000 000 copies par test, une plage de résultats avec moins de variabilité que pour les valeurs de moins de 100 copies. La reproductibilité du calcul des

ratios VPH-16 E6/E2 pour différentes séries s'est avérée excellente. Cependant, pour un échantillon avec un ratio E6/E2 au dessus mais près de 2, un des ratios calculés était sous 2.0. De plus, les ratios E6/E2 mesurés avec deux tests pour E2 pour des isolats européens étaient similaires pour la plupart des échantillons, peu importe les quantités initiales d'ADN VPH-16 dans l'échantillon. La variabilité du test est donc improbable pour expliquer le ratio VPH-16 E6/E2 de plus de 2 dans certains spécimens.

Afin d'évaluer de manière approfondie la sensibilité et la spécificité cliniques des tests développés, une détection par PCR de séquences de papillomavirus intégrés (DIPS-PCR - *detection of integrated papillomavirus sequences*) a été réalisée dans certaines études. Ceci a permis de déceler la présence de VPH-16 intégré dans 11 échantillons qui contenaient des formes mixtes ou intégrées de VPH-16, et elle a produit des résultats négatifs pour tous les 20 échantillons qui ne contenaient pas le VPH-16 intégré (De Marco et al., 2007). Nous avons aussi confirmé dans des échantillons contenant du VPH-33 intégré par PCR-RT la présence de formes intégrées en utilisant une réaction de PCR en site restreint (Khouadri et al., 2006). Dans une autre étude, une concordance complète entre le PCR-RT et une combinaison de Southern blot et d'électrophorèse 2D-gel a été obtenue sur huit spécimens contenant seulement des formes épisomales, ainsi que sur quatre spécimens contenant des formes mixtes de VPH-16 (Nagao et al., 2002). Finalement, un taux de concordance de 86 % a été obtenu sur 47 échantillons analysés avec PCR-RT et une hybridation *in situ* pour la détection de formes intégrées de VPH-16 (Fujii et al., 2005). Trois échantillons étaient positifs pour des formes VPH-16 intégrées par PCR-RT seulement, et deux étaient positifs par hybridation *in situ* seulement. Ces publications suggèrent que les méthodes de PCR-RT sont des techniques prometteuses pour détecter des formes VPH intégrées, mais de plus amples études sur un plus grand nombre de spécimens utilisant plusieurs techniques en parallèle doivent être effectuées afin d'établir la valeur réelle du PCR-RT pour l'intégration du VPH-16.

Des expériences de reconstitution ont démontré que les formes intégrées de VPH-16 pouvaient être détectées avec le PCR-RT lorsqu'elles excèdent de 100 fois le nombre de copies de forme épisomale, suggérant ainsi une sensibilité moindre de ces méthodes de détection pour la présence d'intégration (Arias-Pulido et al. 2006). Cependant, le taux de détection d'intégration dans les lésions de CIN-2,3 dans cette étude était plus bas que

dans d'autres études qui utilisaient également une technique de PCR-RT (Fontaine et al., 2005; Guo et al., 2007; Fujii et al., 2005). À l'opposé de ces résultats, deux groupes ont détecté avec succès la présence de formes intégrées de VPH-16 avec le PCR-RT (Nagao et al., 2002; Fontaine et al., 2004). L'intégration du VPH-16 était détectée lorsque plus de 50 % des molécules d'ADN du VPH-16 portaient un gène E2 incomplet ou scindé. Donc, des études utilisant différents protocoles et différentes méthodologies d'amplification en temps réel ont généré des résultats contradictoires sur la sensibilité des dosages pour détecter les formes intégrées de VPH-16 dans des préparations complexes d'ADN.

Lorsque des formes intégrées de VPH-16 sont mélangées avec des formes épisomales, le ratio E2/E6 sera d'autant plus près de un lorsqu'il y a un surplus de formes épisomales et près de zéro si seules des formes intégrées sont présentes. Basée sur des ratios obtenus de femmes avec le cancer et un CIN-2,3 comparativement à des femmes sans lésion, une étude a établi un seuil de E2/E6  $< 0,6$  pour conclure une intégration (Guo et al., 2007). D'autres ont établi ce seuil à un ratio de E2/E6  $\leq 0,79$  en calculant le ratio E2/E6 moyen de formes épisomales pures avec un intervalle de confiance (IC) de 99 % (Fujii et al., 2005), ou à  $\leq 0,6$  basé sur des courbes de titration (Nagao et al., 2002). Afin de mieux caractériser la valeur de ratios E6/E2 pour mesurer l'intégration, nous avons précédemment analysé des échantillons positifs pour VPH-6 (Khouadri et al., 2006). Le VPH-6 est un type à faible risque qui demeure épisomal dans les voies génitales. Les ratios de VPH-6 E6/E2 dans les spécimens cliniques se chiffraient de 0,41 à 2,01. Ces résultats et le fait que dans certains échantillons le nombre de copies de E2 de VPH-6, -16 ou -33 étaient le double du nombre de copies de E6, suggèrent que la variabilité des tests pourrait résulter en des ratios E6/E2, ou des ratios E2/E6, entre 0,5 et 2 sans qu'il y ait nécessairement d'intégration (Fontaine et al., 2005; Khouadri et al., 2006). Nous avons préféré ne pas considérer l'intégration sur la base unique d'une soustraction du nombre de copies de E2 des copies de E6, parce que les charges virales intégrées ainsi mesurées seraient le reflet en partie de charges virales totales élevées plus que d'une intégration réelle. Nous avons donc considéré qu'un ratio E6/E2  $> 2$  suggérerait l'intégration (Khouadri et al., 2006). De plus amples études cliniques sont nécessaires pour établir le ratio précis de détection pour l'intégration du VPH, ainsi que le

pourcentage de spécimens contenant des formes intégrées mais avec un ratio E2/E6 plus faible que 2.0.

Avec des méthodes optimisées, les résultats de nos investigations démontrent que les femmes infectées par le VIH, ou à risque d'une infection par le VIH, ont des charges virales du VPH-16 plus élevées lorsqu'elles ont un CIN-2,3 comparativement aux femmes sans lésion ou LSI (lésions squameuses intraépithéliales - *squamous intraepithelial lesions*) ou sans CIN. Des études de cas-témoins ont aussi rapporté que la charge virale du VPH-16 était indépendamment associée avec un CIN-2,3 (Flores et al., 2006; Fontaine et al., 2005; Rajeevan et al., 2005; van Duin et al., 2002). Dans des études de conception prospective, des charges élevées d'ADN de VPH-16 ont accru le risque de développer un HSIL/CIN-3, un carcinome *in situ* ou cancer invasif (Moberg et al., 2004; Schlecht et al., 2003; Moberg et al., 2005; Ylitalo et al., 2000). Comparées aux femmes non- infectées, celles ayant des charges d'ADN du VPH-16 au dessus de 18,22 copies par équivalent de cellule humaine sur des frottis archivés, avaient un risque accru de 51,0 pour un carcinome invasif, alors que celles avec des charges du VPH-16 moins élevées avaient un risque de cancer de 5,6 à 18,5 (Moberg et al., 2005).

La charge virale du VPH-16 a permis de prédire le risque de carcinome *in situ*, même avant la détection de LSI sur un frottis de cytologie (Josefsson et al., 2000). Un carcinome *in situ* était présent chez les femmes avec une charge virale constamment élevée de VPH-16 (Ylitalo et al., 2000). Dans une étude, la charge virale était indépendamment prédictive de LSI incident (Schlecht et al., 2003). Le risque accru pour un carcinome *in situ* associé avec de hautes charges virales est aussi dépendant du type de VPH et il était le plus élevé de tous dans le cas associé au VPH-16 (Moberg et al., 2004). D'autres chercheurs n'ont pas confirmé l'association entre la charge virale et un CIN-2,3, mais ils n'ont pas contrôlé pour certaines variables confondantes (Cheung et al., 2006; Guo et al., 2007; Andersson et al., 2005).

Dans notre étude, une charge intégrée du VPH-16 était associée avec un CIN-2,3 dans une analyse multivariée. Il y avait une forte corrélation entre les charges virales VPH-16 totales et intégrées. Cependant, la détection de la présence de formes intégrées du VPH-16 sans considérer leur quantité n'était pas associée avec une lésion du col. D'autres chercheurs ont rapporté une association marginale entre la présence de formes

intégrées et un CIN-2, alors qu'il n'y avait pas d'association significative avec un CIN-3 ou un cancer invasif (Cheung et al., 2006), ou entre la présence d'intégration et d'un LSI à la cytologie (kulmala et al., 2007). Une étude a rapporté une différence significative dans la portion d'échantillons avec intégration du VPH-16 entre des échantillons de cancer du col et un CIN-2,3 (Guo et al., 2007). Pour les spécimens possédant un mélange de formes physiques du génome du VPH-16, la forme intégrée compte pour > 75 % du nombre total de copies du VPH-16 pour les patientes avec un cancer (Cheung et al., 2006). Nous avons aussi trouvé que dans les spécimens avec des ratios E6/E2 > 2, le VPH-16 intégré comptait pour 59 % à 90 % des copies totales d'ADN du VPH-16. À ce jour, une investigation complète n'a pas été faite afin de déterminer si les formes épisomales détectées par PCR-RT dans le cancer sont toujours des vraies formes épisomales, ou si elles représentent des formes intactes intégrées en tandem tel qu'identifiées dans certaines lignées de cellules dérivées de cancers du col (Baker et al., 1987). Des formes intégrées résultant d'une intégration à un site autre que E2 ne seraient pas détectées par PCR-RT ciblant E2. Pour pallier à ce problème des tests ciblant d'autres gènes que E2 pourraient être développés.

Plusieurs groupes de recherche, incluant le nôtre, ont rapporté la présence de formes intégrées chez des femmes sans LSI. L'intégration a été confirmée dans certaines publications avec une méthode de "PCR restreint de site" ou d'hybridation de "Southern" (Fontaine et al., 2005; Gallo et al., 2003; Peitsaro et al., 2002; Khouadri et al., 2006; Arias-Pulido et al. 2006; kulmala et al., 2007). Une étude a trouvé que presque la moitié des 92 échantillons récoltés de jeunes femmes avec LSI contenaient du VPH-16 intégré (Gallo et al., 2003). Nos travaux actuels confirment notre rapport initial démontrant l'intégration du VPH-16 chez des femmes sans LSI (Fontaine et al., 2005). Le VPH-16 pourrait être linéarisé sans intégration dans des spécimens cliniques, mais cette possibilité serait surprenante et n'a pas encore été prouvée. Il a été démontré *in vitro* que les formes épisomales du VPH inhibent l'expression des gènes E6 et E7 des formes intégrées de VPH-16 (Pett et al., 2006). La progression d'un CIN-1 à un CIN-2,3 peut être reliée à la perte d'épisome plutôt qu'à l'intégration du VPH (Pett et al., 2006). Il est concevable que des formes transitoires intégrées en présence de formes épisomales soient détectées chez des femmes sans LSI, en opposé à la persistance de formes intégrées pour

les femmes progressant à une lésion de CIN-2,3. Ces hypothèses devraient être investiguées dans des études de conception prospective chez des femmes jeunes et âgées.

Nous reconnaissons que notre étude est imparfaite. Les données furent analysées en considérant le plus haut-grade de LSI ou de CIN pour évaluer l'association entre le grade de la maladie et les charges virales du VPH-16. La conception prospective de l'Étude de femmes canadiennes atteintes du VIH (*Canadian Women's HIV Study*) a permis de sélectionner la visite correspondant au plus haut grade de LSI ou de CIN obtenu suite à des visites consécutives, et elle a aussi permis d'évaluer les résultats de l'intégration sur plusieurs visites. La plupart des participantes étaient infectées ou étaient à haut-risque d'infection par le VIH. Nos résultats ne peuvent pas être appliqués à la population en général, considérant que les participantes dans cette étude étaient à haut risque pour les maladies transmises sexuellement. Le petit nombre de participantes avec CIN ou LSI a restreint notre analyse pour estimer des associations possibles en contrôlant pour les facteurs confondants. Le gène E2 est un segment de 1097 paires de bases et les dosages ciblant de petites régions de ce gène, comme nous l'avons fait, peuvent passer outre certains sites de rupture. Une sensibilité accrue pour détecter l'intégration du VPH-16, en utilisant deux dosages ciblant différentes régions du gène E2, a été rapportée lors de deux études (Cheung et al., 2006; Kulmala et al., 2007). Une perte du gène E2 au complet n'est pas commune dans des échantillons cliniques, et elle a été rapportée dans < 10 % des échantillons avec intégration du VPH-16 (Cheung et al., 2006) dans une étude, et jusqu'à 34 % dans une autre (Arias-Pulido et al. 2006). La plupart des femmes avec de grandes délétions dans E2 ont un cancer invasif (Cheung et al., 2006; Arias-Pulido et al. 2006). E1, L2 ou E5 peuvent aussi être interrompus durant l'intégration (Arias-Pulido et al. 2006; Ziegert et al., 2003). Un seul dosage de VPH-16 ciblant une petite région du gène E2 ne détectera probablement pas toutes les formes intégrées. Néanmoins, E2 est le gène le plus fréquemment interrompu (Kalantari et al., 1998). Récemment, Arias-Pulido et al. ont démontré, sur des échantillons de cancer invasif, que 78,4 % des cancers possédaient des formes de VPH-16 avec une intégration dans la région charnière du gène E2 (Arias-Pulido et al. 2006). Cependant, une étude réalisée en Chine sur des femmes avec des formes intégrées de VPH-16, a démontré que dans 87 % des cas, l'intégration a eu lieu au niveau du domaine de liaison à l'ADN à l'extrémité 3' de E2, et pour 12 %



seulement des cas l'intégration de VPH-16 avait eu lieu au niveau de la région charnière (Cheung et al., 2006). La performance du test PCR-RT pour détecter l'intégration pourrait être différente entre les populations à cause de différents modes d'intégration du VPH-16 selon le fond génétique des individus.

La différence des valeurs de charge virale entre les femmes avec un CIN-2,3 et celles sans LSI, quoique significative statistiquement, ne permettait pas de différencier nos participantes à cause du chevauchement important des valeurs de charges virales entre celles-ci. Plus d'études sont nécessaires pour mieux comprendre la signification de la détection de formes intégrées chez les femmes normales. La présence de formes intégrées devrait être investiguée prospectivement chez des femmes sans lésion afin de déterminer si c'est un déterminant de progression vers un CIN, ou une progression d'une lésion CIN de bas-grade en une lésion de haut-grade. Aussi, il faut investiguer prospectivement la relation entre les formes épisomales et intégrées pour surveiller de plus près la progression des lésions en fonction de la charge virale. De plus, l'évolution des formes intégrées dans des lésions pré-cancéreuses devrait être investiguée dans des études de cohorte pour surveiller la progression de lésions de bas-grade en fonction de la charge virale intégrée. La présence de grandes délétions dans E2 pourrait être un marqueur utile pour des lésions de haut-grade, mais nécessiterait plusieurs réactions de PCR par spécimen, à moins qu'un test multiplex soit conçu. Quoique des études aient suggéré que l'intégration pourrait être un bio-marqueur utile pour prédire le grade du CIN ou la progression d'un CIN, d'autres études doivent être effectuées avec des tests optimisés et des échantillons obtenus prospectivement. Des études longitudinales sont requises afin de déterminer l'utilité des ratios E6/E2 et de la charge de formes intégrées en tant que marqueurs prédictifs de CIN-2,3, ou de la progression de la CIN, et l'utilité de mesurer l'intégration avec PCR-RT.

Contrairement au VPH-16, des études transversales ont démontré que la charge virale du VPH-18 diminuait de manière significative avec le grade de CIN. Il serait donc intéressant d'évaluer d'autres types de VPH à haut-risque. Certains pensent que la progression de CIN-1 à CIN-2,3 peut être reliée à la perte d'épisome plutôt qu'à l'intégration du VPH, il serait donc intéressant d'investiguer la présence de formes épisomales en parallèle aux formes intégrées ainsi que leur présence dans les métastases.

Aussi des études plus approfondies doivent être menées pour évaluer l'intégration d'autres variantes du VPH-16 considérant que le polymorphisme pourrait avoir un impact sur la quantification de la charge virale.

En conclusion, nous avons pu démontrer que le polymorphisme du gène E2 du VPH-16 a un impact sur la quantification de VPH-16 épisomal et intégré d'isolats de différentes lignées. Nous avons aussi démontré une association entre les charges virales totale et épisomale du VPH-16, mais pas les formes intégrées, aux néoplasies intraépithéliales cervicales de haut grade (CIN-2,3), et ce, en contrôlant pour des facteurs confondants.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## Revues scientifiques

Ashcroft, M., & Vousden, K.H: (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene*. 18(53), 7637-43.

Ahdieh L, Munoz A, Vlahov D, Trimble CL, Timpson LA, Shah K (2000). Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virusseropositive and -seronegative women. *Am J Epidemiol* 151:1148-1157.

Alazawi, W., M. Pett, B. Arch, L. Scott, T. Freeman, M.A. Stanley, and N. Coleman. 2002. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res* 62:6959-6965.

Andersson, S., H. Safari, M. Mints, I. Lewensohn-Fuchs, U. Gyllensten, and B. Johansson. 2005. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br.J Cancer* 92:2195-2200.

Anna H. Beskow, Malin T. Engelmark, Jessica J. Magnusson and Ulf B.Gyllensten, 2005: Interaction of host and viral risk factors for development of cervical carcinoma in situ. *J. Cancer*: 117, 690–692.

Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ: The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J*. 1996 ;15(8):1950-60.

Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-Martinez N, Anderson DN, Wheeler CM: Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology*. 2005; 338(1):22-34.

- 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.
- Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB: Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J.* 1993; 12(11):4317-24.
- Baker, C.C., W.C. Phelps, V. Lindgren, M.J. Braun, M.A. Gonda, and P.M. Howley. 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61:962-971.
- Baseman, J. G., et Koutsky, L. A., 2005: The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 32(1): 16-24.
- Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G: A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature.* 1986; 321(6067):246-9.
- Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Parmenter CA, Jordan SW, Stidley CA, McPherson RS, Dorin MH: Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA.* 1994 ;271(15):1181-8.
- Bellanger S, Demeret C, Goyat S, Thierry F: Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J Virol.* 2001; (16):7244-51.

- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M: The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol.* 1989; 63(10):4317-24.
- Bernard HU: Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends Microbiol* 1994; 2: 140 - 143.
- Bernard HU: The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005;32:1:S1-6.
- Bernard HU, Chan SY, Delius H: Evolution of papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;186:33-54.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM: Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994; 170(5):1077-85. Erratum in: *J Infect Dis* 1996; 173(2):516.
- Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A: Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer.* 1994;56(5):640-5.
- Bethesda Workshop. 1992. The 1991 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda Workshop. *JAMA* 267:1892

- Bhattacharjee B, Sengupta S: HPV16 E2 gene disruption and polymorphisms of E2 and LCR: some significant associations with cervical cancer in Indian women. *Gynecol Oncol.* 2006; 100(2):372-8.
- Bosch FX, de Sanjose S: Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):3-13.
- Bosch FX, de Sanjose S: Human papillomavirus and cervical cancer- burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003:3-13.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-265
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV : Prevalence of human papillomavirus DNA in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: 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):1151-7.
- Boyd JT, Doll R: A study of the aetiology of carcinoma of the cervix uteri. *Br J Cancer* 1964;18:419-434.
- Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, et al: Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 130:486-496, 1989.

Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldana HA: Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*. 2004 20;319(2):315-23.

Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Chu TY, Cubie HA, Cuschieri K, von Knebel-Doeberitz M, Martins CR, Sanchez GI, Bosch FX, Munoz N, Bernard HU: Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 2005;79(21):13630-40.

Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J: Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 1999;83(4):449-55.

Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Xu LY, Cheng AF: Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Infect Dis*. 2002;186(5):696-700.

Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H: Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol*. 1992 ;66(10):5714-25.



- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, ter Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, et al: Molecular variants of human papillomavirus-16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J. Virol.* 1992;66:2057-2066
- Chaturvedi AK, Brinkman JA, Gaffga AM, Dumestre J, Clark RA, Braly PS, Dunlap K, Kissinger PJ, Hagensee ME: Distribution of human papillomavirus type 16 variants in human immunodeficiency virus type 1-positive and -negative women. *J Gen Virol.* 2004;85:1237-41.
- Chellappan, S., V. B. Kraus, B. Kroger, K. Munger, P. M. Howley, W. C. Phelps, and J. R. Nevins. 1992. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4549–4553.
- Chen SL, Mounts P: Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J Virol.* 1990;64(7):3226-33.
- 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.
- Christensen ND, Hopfl R, DiAngelo SL, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW: Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol.*;75:2271-6.
- Choo KB, Chen CM, Han CP, et al. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in

topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. *J Med Virol* 1996;49:15–22.

Claire S. Brady, Margaret F. Duggan-Keen, Judith A. Davidson, Jenny M. Varley and Peter L. Stern, 1999; Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters, *Journal of General Virology*, 80, 3233–3240.

Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S: Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 7;89(1):101-5.

Cohen BD, Lowy DR, Schiller JT: Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J Virol*. 1990;64(7):3226-33.

Cole ST, Streeck RE: Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *J Virol*. 1986;58(3):991-5.

Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Chow, and T. S. Wang. 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J. Biol. Chem.* 274:2696–2705.

Coutlée, F., et al. 1997. Comparison between vaginal tampon and cervicovaginal lavage specimens collection for detection of human papillomavirus DNA by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 51:42-47.

Cox, J. T. « Natural history of HSIL », *19th International Papillomavirus Conference*, Florianopolis, Brésil, septembre 2001, résumé n° O-21.

- Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, and Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1995; 172:946-954
- Crum CP, Nuovo G, Friedman D, Silverstein SJ: Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *J Virol*. 1988;62(1):84-90.
- Cullen AP, Reid R, Campion M, et al : Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991; 65:606–12.
- Culp, TD., Christensen, ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 2004;319:152-61.
- Cuzick J: Viral load as a surrogate for persistence in cervical human papillomavirus infection. In: Franco E, Monsonogo J, eds. *New developments in cervical cancer screening and prevention*. Oxford:Blackwell, 1997. 373–8.
- Cu-Uvin S, Hogan JW, Warren D, Klein RS, Peipert J, Schuman P, *et al.* (1999). Prevalence of lower genital tract infections among human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and high-risk HIVseronegative women. HIV Epidemiology Research Study Group. *Clin Infect Dis* 29:1145-1150.
- Cuzick J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan I: Association between high-risk HPV types, HLA DRB1\* and DQB1\* alleles and cervical cancer in British women. *Br J Cancer*. 2000;82(7):1348-52.

- Da Costa, M. M., Hogeboom, C. J., Holly, E. A. & Palefsky, J. M: Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Infect Dis* 2002;185, 1229–1237.
- Daling JR, Madeleine MM, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Ashley R, Schwartz SM, Beckmann AM, Hagensee ME, Mandelson MT, Galloway DA: The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(7):541-8.
- Dalstein, V., D. Riethmuller, J.L. Pretet, C. Le Bail, J.L. Sautiere, J.P. Carbillet, B. Kantelip, J.P. Schaal, and C. Mouglin. 2003. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106:396-403.
- Daniel, B., A. Rangarajan, G. Mukherjee, E. Vallikad, and S. Krishna. 1997. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J. Gen. Virol.* 78:1095–1101.
- Danos O, Katinka M, Yaniv M: Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: A novel type of genome organization among Ppovaviridae. *EMBO J* 1982;1:231-6.
- Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, et al : Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1992;73:2327–36

- David-Cordonnier MH, Hamdane M, D'Halluin JC: c-Myb protein binds to the EP element of the HBV enhancer and regulates transcription in synergy with NF-M. *Biochim Biophys Acta*. 1999 7;1446(1-2):82-92.
- Deau MC, Favre M, Jablonska S, Rueda LA, Orth G: Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(11):2918-26.
- Deau MC, Favre M, Orth G: Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes. *Virology*. 1991;184(2):492-503.
- De Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Kolkman-Uljee S, Fleuren GJ: Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol*. 2004;94(2):488-94.
- De Geest, K., Turyk, ME., Hosken, MI., Hudson, JB., Laimins, LA., Wilbanks, GD: Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 1993;49:303-10.
- De Marco, L., A. Gillio-Tos, L. Bonello, V. Ghisetti, G. Ronco, and F. Merletti. 2007. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *Journal of Clinical Virology* 38:7-13.
- Desaintes C, Demeret C: Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol*. 1996;7(6):339-47.

- Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P, Burny A: Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1992;66(1):325-33.
- De Villiers EM, Wagner D, Schneider A, et al. : Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities : results of a 5-year follow-up study. *Gynecol Oncol* 1992; 44:33-39.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004 20;324(1):17-27.
- Dhar R, McClements WL, Enquist LW, Vande Woude GF: Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(7):3937-41.
- Dillner J, Kallings I, Brihmer C, Sikstrom B, Koskela P, Lehtinen M, Schiller JT, Sapp M, Mardh PA: Seropositivities to human papillomavirus types 16, 18, or 33 capsids and to *Chlamydia trachomatis* are markers of sexual behavior. *J Infect Dis.* 1996;173(6):1394-8.
- Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, Pfister H: Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer.* 1994 15;58(6):803-8.
- Doorbar, J: The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford. 1991: Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-827

- Duerr A, Kieke B, Warren D, Shah K, Burk R, Piepert JF, *et al.* (2001). Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 184:584-590.
- 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):3812-5.
- 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 17;243(4893):934-7.
- Egawa, K: Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003; 207:251-4.
- Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K, Wright TC Jr: Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA.* 2000 23;283(8):1031-7.
- Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, *et al.*: The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med.* 1995;1(5):464-70.
- Eluf-Neto, J.m M. Booth, N. Munoz, F. X. Bosch, C. J. L. M. Meijer, and J. M. M. Walboomers: Human papillomaviruse and invasive cervical cancer in Brazil. *Br. J. Cancer.* 1994; 69:114-119.

- Eriksson A, Herron JR, Yamada T, Wheeler CM: Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol.* 1999;80:595-600.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NAJ: Identification of the  $\alpha_6$  integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71: 2249 – 2456.
- Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Gostout BS, Cheung TH, Chung TK, Fu WY, Smith DI: Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene.* 2003;22(46):7233-42.
- Ferenczy A, Franco E: Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002;3(1):11-6.
- Ferenczy, A., F. Coutlée, E.L. Franco, and C. Hankins. 2003. HIV and HPV co-infection and lower genital tract neoplasia: review of recent developments. *Can Med Ass J* 169:431-434.
- Fey MC, Beal MW: Role of human papilloma virus testing in cervical cancer prevention. *J Midwifery Womens Health.* 2004;49(1):4-13.
- Flores-Munguia, R., E. Siegel, W.T. Klimecki, and A.R. Giuliano. 2004. Performance assessment of eight-throughput PCR assays for viral load quantitation of oncogenic HPV types. *Journal of Molecular Diagnostics* 6:115-124.
- Flores, R., M. Papenfuss, W.T. Klimecki, and A.R. Giuliano. 2006. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int.J Cancer* 118:1187-1193.



- Fontaine, J., C. Hankins, M.H. Mayrand, J. Lefevre, D. Money, S. Gagnon, A. Rachlis, K. Pourreaux, and F. Coutlee. 2005. High levels of episomal and integrated HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical lesions in women at risk or infected with HIV. *AIDS* 19:785-794.
- Fontaine, J., P. Gravitt, L.M. Duh, J. Lefevre, K. Pourreaux, C. Hankins, and F. Coutlee. 2005. High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 14:2200-2207.
- Fontaine, J., J. Palefsky, D. Rouleau, E. Franco, and F. Coutlée. 2004. In HIV-seropositive men, increased HPV-16 viral loads and HPV-16 integrated forms are associated with anal intraepithelial lesions. *Can j Inf Dis* 15 Suppl. A:26A
- Foster, S. A., G. W. Demers, B. G. Etscheid, and D. A. Galloway. 1994. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* 68:5698–5705.
- Franco EL, Schlecht NF, Saslow D: The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J.* 2003;9(5):348-59.
- Franco EL, Villa LL, Richardson H, Rohan T, Ferenczy A: Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. In: Franco EL, Monsonégo J, editors. *New developments in cervical cancer screening and prevention.* Oxford (UK): Blackwell Science; 1997. p. 14-22.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M et al: Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human

papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180(5):1415-23.

Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12398–12402.

Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204:799–804.

Fujii, T., N. Masumoto, M. Saito, N. Hirao, S. Niimi, M. Mukai, A. Ono, S. Hayashi, K. Kubushiro, E. Sakai, K. Tsukazaki, and S. Nozawa. 2005. Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 14:103-108.

Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K: Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes*. 1994;(1):85-92.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA: Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997;11(16):2090-100.

Gagnon, S., C. Hankins, C. Tremblay, K. Poudreux; The Canadian Women's HIV study Group, and F. Coutlée: Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect Dis*. 2004;190(9):1575-85.

- Gallo, G., M. Bibbo, L. Bagella, A. Zamparelli, F. Sanseverino, M.R. Giovagnoli, A. Vecchione, and A. Giordano . 2003. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 56:532-536.
- Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M: Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol*. 1988;62(11):4321-30.
- Garcia-Closas R, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA: The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*. 2005 ;117(4):629-37.
- G Gallo, M Bibbo, L Bagella, A Zamparelli, F Sanseverino, M R Giovagnoli, A Vecchione, A Giordano, 2003; Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 56:532–536.
- Giannoudis A, Duin M, Snijders PJ, Herrington CS: Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br J Cancer*. 2001;84(8):1058-63.
- Giannoudis A, Herrington CS: Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol*. 2001;193(3):295-302.
- Giovane C, Trav G, Briones A, Lutz Y, Wasylyk B, Weiss E: Targetting of the N-terminal domain of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with monomeric ScFvs blocks the E6-mediated degradation of cellular p53. *J Mol Recognit*. 1999;12(2):141-52.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, RE., Sapp, M: Human papillomavirus infection requires cell surface heparin sulphate. *J Virol* 2001; 75:1565-70.

- Gissmann L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H: Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol.* 1984;83:26s-28s.
- Goldstein DJ, Schlegel R: The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus binds to a 16 kd cellular protein. *EMBO J.* 1990;9(1):137–145
- Goodwin EC, DiMaio D: Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(23):12513-8.
- Graham, D. A., and C. S. Herrington. 2000. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol. Pathol* 53:201–206.
- Greenberg, R. A., R. C. O'Hagan, H. Deng, Q. Xiao, S. R. Hann, R. R. Adams, S. Lichtsteiner, L. Chin, G. B. Morin, and R. A. DePinho. 1999. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18:1219–1226.
- Gregoire L, Lawrence WD, Kukuruga D, Eisenbrey AB, Lancaster WD: Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. *Int J Cancer.* 1994;57(4):504-7.
- Groopman J: Contagion. *The New Yorker.* 1999:44-49
- Gruss P, Dhar R, Khoury G: Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(2):943-7.

- 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.
- Hankins, C., F. Coutlee, N. Lapointe, P. Simard, T. Tran, J. Samson, L. Hum, and The Canadian Women's HIV study Group. 1999. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *Can Med Ass J* 160:185-191.
- Hatch EE, Herbst AL, Hoover RN, Noller KL, Adam E, Kaufman RH, Palmer JR, Titus-Ernstoff L, Hyer M, Hartge P, Robboy SJ: Incidence of squamous neoplasia of the cervix and vagina in women exposed prenatally to diethylstilbestrol (United States). *Cancer Causes Control*. 2001;12(9):837-45.
- Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD: Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer*. 1995;60(3):369-76.
- Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K: Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4442-6.
- Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H: Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol*. 1995;33(7):1746-1754.

- Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Hutchinson, M., Morales, J., et al: Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(6):464-74.
- Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD: Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):315-8.
- Hildesheim A, et autres. « HPV co-factors related to the development of cervical cancer : results from a population-based study in Costa Rica », *British Journal of Cancer*, vol. 84, n° 9, mai 2001, p.1219-1226.
- Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, et al. Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: A randomized trial. *Journal of the American Medical Association* 2007; 298(7):743–753.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al: The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993;67(11):6413-23.
- Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU: Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol.* 1991;29(9):1765-72.

- Hopman, A.H.N., F. Smedts, W. Dignef, M. Ummulen, G. Sonke, M. Mravunac, G.P. Vooijs, E.J.M. Speel, and F.C.S. Ramaekers. 2004. Transition to high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 202:23-33.
- Horwitz BH, Burkhardt AL, Schlegel R, DiMaio D: 44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Mol Cell Biol*. 1988;8(10):4071-8.
- Howes LA, Ransom N, Papermaster DF, et al.: Apoptosis of retinoblastoma : Alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Gene Dev* 1994; 8:1300-1310.
- Hubbert N. L., S. A. Sedman, and J. T. Schiller. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol*. 1992 66:6237–6241.
- Hudelist, G., M. Manavi, K. I. D. Pischinger, T. Watkins-Riedel, C. F. Singer, E. Kubista, and K. F. Czerwenka. 2004. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol. Oncol.* 92:873–880.
- Hughes FJ, Romanos MA: E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(25):5817-23.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM: Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol*. 1993;13(2):775-84.

- Hummel, M., J. B. Hudson, and L. A. Laimins. 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* 66:6070–6080.
- Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, et al : Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction.  
*Cancer* 1996;77:2275–9.
- Giri I, Yaniv M: Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J.* 1988;7(9):2823-9.
- Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME et al. A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12, 477-484. 2003.
- Gravitt, P.E., C. Peyton, C. Wheeler, R. Apple, R. Higuchi, and K.V. Shah. 2003. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* 112:23-33.
- Institut national de santé publique de Québec, rapport de 2002; l'infection au virus du papillome humain
- Jeon S, Lambert PF: Integration of HPV 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6/E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 1654-1658.
- Jeon S, B L Allen-Hoffmann, et P F Lambert. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective



growth advantage of cells. ». *Journal of virology.*. J. Virol.. 69. 5. 2989-97

Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCance DJ: Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol.* 1992;66(3):1329-35.

Jill Koshiol, Lisa Lindsay, Jeanne M. Pimenta, Charles Poole, David Jenkins<sup>2</sup>, and Jennifer S. Smith, 2008; Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis, *American Journal of Epidemiology* Vol. 168, No. 2

Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllensten UB: Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355:2189 –93.

J. Palefsky , 2006 Biology of HPV in HIV Infection; *Adv. Dent. Res.*; 19; 99

Judson FN. 1992: Interactions between human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections. *Scientific Publications* 119: 199–207.

Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B: Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol.* 1998;17(2):146-53.

Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, et al. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:46–54.

- Kalakun L, Bozzetti MC: Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the state of Rio Grande de Sul, Brazil. *Cas Saude Publica*, 2005 (1):299-309.
- Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H: Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol*. 2000 ;81(Pt 8):1975-81.
- Kanato M, Saranritti K: Early experience of sexual intercourse: a risk factor for cervical cancer requiring specific intervention for teenagers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006. 7(1):151-3é
- Khan MJ, Partridge EE, Wang SS, Schiffman M: Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer*. 2005;104(1):61-70.
- Kayata, V., et autres. « Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections : A case-control study », *American Journal of Epidemiology*, vol. 138, n° 9, 1993, p. 735-745.
- Kesis, T. D., R. J. Slebos, W. G. Nelson, M. B. Kastan, B. S. Plunkett, S. M. Han, A. T. Lorincz, L. Hedrick, and K. R. Cho. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3988–3992.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT: Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):12180-4.

- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT: Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* 1993;67(12):6929-36.
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M: Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11612-6.
- Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T, Dillner J : Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer.* 2000;82(7):1332-8.
- Klingelutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79–82.
- Ko, L., and C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054–1072
- Korodi Z, Dillner J, Jellum E, Lumme S, Hallmans G, Thoresen S, Hakulinen T, Stattin P, Luostarinen T, Lehtinen M, Hakama M: Human papillomavirus 16, 18, and 33 infections and risk of prostate cancer: a Nordic nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(12):2952-5.
- Khouadri, S., L.L. Villa, S. Gagnon, A. Koushik, H. Richardson, A. Ferenczy, G. Matlashewski, M. Roger, E.L.F. Franco, and F. Coutlée. 2006. 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* in press:

- Koushik, A., A. Ghosh, E. Duarte-Franco, P. Forest, H. Voyer, G. Matlashewski, F. Coutlee, and E.L. Franco. 2005. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Det Prev* 29:307-316.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al: A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327(18):1272-8.
- Kreider JW, Howett MK, Stoler MH, Zaino RJ, Welsh P. Susceptibility of various human tissues to transformation in vivo with human papillomavirus type 11. *Int J Cancer* 1987; 39: 459-465.
- Kreiss JK, Kiviat NB, Plummer FA, Roberts PL, Waiyaki P, Ngugi E, Holmes KK: Human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and cervical intraepithelial neoplasia in Nairobi prostitutes. *Sex Transm Dis.* 1992;19(1):54-9.
- 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.
- Kurman RJ, Solomon D: *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnosis*. Springer-Verlag, NY, 1994.
- Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S: Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer.* 2000;36(11):1402-10.

- Lacey JV Jr, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Greene SM, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Silverberg SG, Hildesheim A: Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(12):1079-85.
- Lagrange M, Charbonnier S, Orfanoudakis G, Robinson P, Zanier K, Masson M, Lutz Y, Trave G, Weiss E, Deryckere F: Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 4):1001-7.
- Lefevre, J., C. Hankins, K. Pourreaux, H. Voyer, The Canadian Women's HIV study Group, and F. Coutlée. 2003. Real-time PCR assays using internal Controls for quantitation of HPV-16 and  $\beta$ -globin DNA in cervicovaginal lavages. *J Virol Methods* 144:135-144.
- Lefèvre J, Hankins C, Pourreaux K, Voyer H, The Canadian Women's HIV Study Group and Coutlée F. Prevalence of Selective Inhibition of HPV-16 DNA Amplification in Cervicovaginal Lavages. *Journal of Medical Virology* 72, 132-137. 2004.
- Lefevre J, Hankins C, Money D, Rachlis A, Pourreaux K, CWHS and Coutlée F. Human Papillomavirus Type 16 Viral Load Is Higher in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Women with High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Than in Those with Normal Cytology Smears. *Journal of Clinical Microbiology* 42(5). 2004.
- Le Cann, P., P. Coursaget, S. Iochmann, and A. Touzé. 1994: Self-Assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 117:269-274.

- Lee GJ, Chung HW, Lee KH, Ahn HS: Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Korean Med Sci.* 2005;20(2):267-72
- Lechner, M. S., and L. A. Laimins. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* 68:4262–4273.
- Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, Mei Q, Ke Y : p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China. *Cancer.* 2002;95(12):2571-6.
- Liu, J. P. 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091–2104.
- Lizano, M., J. Berumen, M.C. Guido, L. Casas, and A. Garcia-Carranca: Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer [published erratum appears in *J Natl Cancer Inst* 1997 Oct 1;89(19):1460]. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1227-1231.
- Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A: Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer.* 1996;69(5):364-8.
- Loo YM, Melendy T: Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol.* 2004;78(4):1605-15.

- Lorincz AT, Reid R, Bennett-Jenson A, *et al.* Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79: 328–37.
- Luo X, Sawadogo M: Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(3):1308-13.
- Luscher-Firzlaff JM, Westendorf JM, Zwicker J, Burkhardt H, Henriksson M, Muller R, Pirollet F, Luscher B: Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene.* 1999;18(41):5620-30.
- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML: Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 (11):1183-91.
- Marte C, Kelly P, Cohen M, Fruchter RG, Sedlis A, Gallo L, Ray V, Webber CA: Papanicolaou smear abnormalities in ambulatory care sites for women infected with the human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(4):1232-7.
- Martin P, Vass WC, Schiller JT, Lowy DR, Velu TJ: The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell.* 1989;59(1):21–32.
- M.A. Stanley, M.R. Pett and N. Coleman, 2007; HPV: from infection to cancer, *Biochemical Society Transactions* Volume 35, part 6.

- Matsukura T, Kanda T, Furuno A, Yoshikawa H, Kawana T, Yoshiike K: Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J Virol.* 1986 (3):979-82.
- Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, de Ladurantaye M, Roger M:  
Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol.* 2000 (9):3388-93.
- Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E: Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochem J.* 2001;356:247-56.
- McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA: Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol.* 1993;67(6):3142-50.
- McIntyre, M. C., M. N. Ruesch, and L. A. Laimins. 1996. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 215:73–82.
- Meissner, J. 1997. Sequencing errors in reference HPV clones., p. 110-123. In G. Myers, K. Munger, F. Sverdrup, A.A. McBride, H.U. Bernard, and J. Meissner (eds.), *Human papillomavirus 1997: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos National Laboratory, NM.



- Meinke W, Meinke GC: Isolation and characterization of the major capsid protein of bovine 1 papilloma virus type 1. *J Gen Virol*. 1981;52:15-24.
- Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, P. Steiner, S. D.Caddle, L. Ziaugra, R. L. Beijersbergen, M. J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D. A. Haber, and R. A. Weinberg. 1997. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785–795.
- Michelle S. Longworth and Laimonis A. Laimins, 2004; Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia, *Microbiology and molecular reviews*, June 2004, p. 362–372.
- Middleton, K., Peh, W., Southern, SA., Griffin, HM., Sotlar, K., Nakahara, T., et al: Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003;77:10186-201.
- Moberg, M., I. Gustavsson, and U. Gyllensten. 2003. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 41:3221-3228.
- Moberg, M., I. Gustavsson, and U. Gyllensten. 2004. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 112:854-859.
- Moberg, M., I. Gustavsson, E. Wilander, and U. Gyllensten. 2005. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 92:891-894.

- Moscicki, A. B., et autres. « Risk of incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females », *Journal of the American Medical Association*, vol. 285, n° 23, juin 2001, p. 2995-3002.
- Munoz N: Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology* 2000; 19: 1-5.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al: The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer*. 1992;52(5):743-9.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Vergara A, del Moral A, Munoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, et al: Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993;2(5):423-31.
- Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group: Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1093-101.

- Murao K, Kubo Y, Fukumoto D, Matsumoto K, Arase S: Verrucous carcinoma of the scalp associated with human papillomavirus type 33. *Dermatol Surg.* 2005;31(10):1363-5.
- Myers G, Bernard H-U, Delius H, Favre M, Icenogel J, Van Ranst M, Wheeler C: Human papillomaviruses a compilation of and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. 1<sup>st</sup> ed. Los Alamos, USA: Theoretical Biology and biophysics group T-10, Los Alamos National Laboratory.
- Nagao, S., M. Yoshinouchi, Y. Miyagi, A. Hongo, J. Kodama, S. Itoh, and T. Kudo. 2002. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:863-867.
- Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, and T. R. Cech. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955–959.
- Narechania A, Terai M, Burk RD: Overlapping reading frames in closely related human papillomaviruses result in modular rates of selection within E2. *J Gen Virol.* 2005;86 (5):1307-13.
- Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I, Petry U, Baur S, Kirchmayr R et al. Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clinical & Diagnostic Virology* 1998; 10:49-56.
- O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU: represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol.* 1996;70(10):6529-39.

- Orth G, Favre M, Croissant O: Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977;24(1):108-20.
- Pan H, Griep AE: Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev.* 1995;9(17):2157-69.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ: The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 1999;18(9):2449-58.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ: Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2000;275(10):6764-9.
- Park TW, Fujiwara H, Wright TC: Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer.* 1995;76:1902-13.
- Peitsaro P, Hietanen S, Johansson B, Lakkala T, Syrjanen S: Single copy heterozygote integration of HPV 33 in chromosomal band 5p14 is found in an epithelial cell clone with selective growth advantage. *Carcinogenesis.* 2002;23(6):1057-64.
- 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):886-91.

- Penrose KJ, McBride AA: Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol.* 2000;74(13):6031-8.
- Peto, J. « The natural history of cervical HPV infection and neoplasia », *19th International Papillomavirus Conference*, Florianopolis, Brésil, septembre 2001, résumé n° O-87A.
- 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.
- Peyton, C. L., et autres. « Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population », *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 183, n° , juin 2001, p. 1554-1564.
- Phelps, W. C., C. L. Yee, K. Munger, and P. M. Howley. 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53:539–547.
- Piccini A, Storey A, Massimi P, Banks L: Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify multiple regions of the protein involved in binding to E1. *J Gen Virol.* 1995;76:2909-13.
- Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, Banks L: Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene.* 1994;9(7):1869-76.

- Rajeevan, M.S., D.C. Swan, R. Nisenbaum, D.R. Lee, S.D. Vernon, M.T. Ruffin, I.R. Horowitz, L.C. Flowers, D. Kmak, T. Tadros, G. Birdsong, M. Husain, S. Srivastava, and E.R. Unger. 2005. Epidemiologic and viral factors associated with cervical neoplasia in HPV-16-positive women. *Int J Cancer* 115:114-120.
- Rebrikov DV, Bogdanova EA, Bulina ME, Lukianov SA: A new planarian extrachromosomal chromosome virus-like element revealed by subtractive Hybridization. *Mol Biol* 2002;36:813-20.
- Reid R: Biology and colposcopic features of human papillomavirus-associated cervical disease. *Obstet Gyn Clin North Am* 1993; 20:123-149.
- Rheinwald JG, Green H: Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 1977;265(5593):421-4.
- Reshkin, S.J, Bellizzi, A., Caldeira, S., Albarani, V. et al : Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J*. 2000;14, 2185-2197.
- Roden RBS, Kirnbauer R, Jensen AB, et al.: Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* 1994;68:7260-7266.
- Romanczuk H, Howley PM: Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):3159-63.
- Romanczuk H, Villa L L, Schlegel R, Howley P M: The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant

of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol.* 1991; 65(5): 2739–2744.

Rose BR, Thompson CH, Zhang J, Stoeter M, Stephen A, Pfister H, Tattersall MH, Cossart YE: Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV 18 isolates from cervical cancers. *Gynecol Oncol.* 1997;66(2):282-9.

Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ: p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet.* 1998;352(9131):871-2.

Rousseau MC, Trevisan A, Villa L, Rohan T, Franco E: Viral load as a predictor of HPV infection persistence among women in the Ludwig-McGill cohort study in Sao Paulo, Brazil. In: *Proceedings of the 19th International Papillomavirus Conference, Florianopolis.* 2001.

Ruesch, M. N., and L. A. Laimins. 1998. Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 250:19–29.

Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, John S, Chandy G : Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia. *Mol Diagn.* 2004;8(1):57-64.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(12):958-64.

- Schlecht, N.F., A. Trevisan, E. Duarte-Franco, T.E. Rohan, A. Ferenczy, Villa, LL, and E.L. Franco. 2003. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 103:519-524.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, and P. M. Howley. 1994. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8797–8801.
- Shlegel R, Phelps WC, Zhang YL, Barbosa M: Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 1988;7 3181-3187.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985;314(6006):111-4.
- Seif I, Khoury G, Dhar R: The genome of human papovavirus BKV. *Cell*. 1979 (4):963-77.
- Sellers JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, et al: Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *Can Med Assoc J* 2000;163(5):503-8.
- Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, Schiffman M: Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 (10):1038-44.



- Shields TS, Brinton LA, Burk RD, Wang SS, Weinstein SJ, Ziegler RG, Studentsov YY, McAdams M, Schiffman M: A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(10):1574-82.
- Schmidt M, Kedzia W, Gozdzicka-Jozefiak A: Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol.* 2001;23(1-2):65-77.
- Sichero L, Franco EL, Villa LL: Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis.* 2005;191(5):739-42.
- Smotkin D, Wettstein FO: Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in cervical cancer and a cervical cancer derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4684-9.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Raaphorst PM, Meijer CJ, Walboomers JM: Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6\* transcript species which are terminated at different early region poly(A) sites. *J Virol.* 1992;66(5):3172-8.
- Song S, Liem A, Miller JA, Lambert PF: Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology.* 2000;267(2):141-50.
- Srivatsan ES, Chakrabarti R, Zainabadi K, Pack SD, Benyamini P, Mendonca MS, Yang PK, Kang K, Motamedi D, Sawicki MP, Zhuang Z, Jesudasan RA, Bengtsson U, Sun C, Roe BA, Stanbridge EJ, Wilczynski SP, Redpath JL:

Localization of deletion to a 300 Kb interval of chromosome 11q13 in cervical cancer. *Oncogene*. 2002;21(36):5631-42.

Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM: Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective.

*J Virol*. 1996;70(5):3127-36.

Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J: Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation.

*J Virol*. 1996;70(10):6987-93.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L: Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998;393(6682):229-34.

Stubenrauch, F., H. B. Lim, and L. A. Laimins. 1998. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic humanpapillomavirus type 31. *J. Virol*. 72:1071–1077.

Sun XW, Ellerbrock TV, Lung U, Chiasson MA, Bush TJ, Wright TC Jr (1995). Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol* 85(5 Pt1):680-686.

Suris, J. C., S. Dexeus, et L. Lopez-marin. « Epidemiology of preinvasive lesions », *European Journal of Gyneacologic Oncology*, vol. 20, n° 4, 1999, p. 301-305.

- Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER: Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol.* 2005;96(3):695-700.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP: Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):1030-4.
- Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM: The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6439-45.
- Terry G, Ho L, Cuzick J: Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer.* 1997;73(5):651-5.
- Thierry F, Yaniv M: The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* 1987;6(11):3391-7.
- Thomas M, Banks L: Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene.* 1998;17(23):2943-54.
- Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch, and L. A. Laimins. 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8449–8454.
- Thompson, D. A., G. Belinsky, T. H. Chang, D. L. Jones, R. Schlegel, and K. Munger. 1997. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* 15:3025–3035.

- Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Greggi S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buonaguro FM: Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol.* 2004;74(1):117-26.
- Turek LP: The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res* 1994;44:305–56.
- Van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM: Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol.* 2000;81:317-25.
- Van Duin M, Snijders PJF, Schrijnemakers HFJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MAE et al. Human Papillomavirus 16 Load in Normal and Abnormal Cervical Scrapes: An Indicator of CIN II/III and Viral Clearance. *International Journal of Cancer* 98(4), 590-595. 2002.
- Van Duin, M., P.J.F. Snidjers, H.F.J. Schrijnemakers, F.J. Voorhorst, L. Rozendaal, M.A.E. Nobbenhuis, A.J.C. van den Brule, R.H.M. Verheijen, T.J. Helmerhorst, and C.J.L.M. Meijer. 2002. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 98:590-595.
- Van eenwyk, J., F. G. DAVIS, et N. COLMAN. « Folate, vitamin C, and cervical intraepithelial neoplasia », *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, vol. 1, n° 2, janvier-février 1992, p.119-124.

- Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhasz A, Konya J, Gergely L: Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer*. 2001;37(15):1946-52.
- Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H: Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*. 1999;80:1035-43.
- Villa LL, Schlegel R: Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology* 1991;181:374-7.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL: Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000;81:2959-68.
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R: Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*. 2001;75(9):4467-72.
- Veldman, T., X. Liu, H. Yuan, and R. Schlegel. 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8211-8216.
- Vousden KH, Jat PS: Functional similarity between HPV16E7, SV40 large T and adenovirus E1a proteins. *Oncogene*. 1989;4(2):153-8.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N: Human papillomavirus is a

necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.

Wank R, Thomssen C: High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature.* 1991;352(6337):723-5.

Wang, S.S. and A. Hildesheim. 2003. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl.Cancer Inst.Monogr.* 35-40.

Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR: Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):2009-14.

Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR: Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. *Int J Cancer.* 2002 20;97(6):868-74.

White A, Livanos EM, Tlsty TD: Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994; 8:666-667.

Wen, L. M., et autres. « Risk factors for the acquisition of genital warts : Are condoms protective? », *Sexually Transmitted Infections*, vol. 75, n° 5, octobre 1999, p. 312-316.

Wheeler C. and Icenogle J. A Closer Look at Papillomavirus Variants. *Papillomavirus variants* :45-46. 1995.

- Whiley, D.M. and T.P. Sloots. 2005. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J Clin Virol* 34:104-107.
- Woodman, C. B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., et al: Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271):1831-6.
- Wu X, Levine AJ: p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(9):3602-6.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB: Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1997 4;89(11):796-802.
- Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Yamada M, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Shiromizu K, Fujii T, Taketani Y: Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett*. 2001;170(1):19-24.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM: Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997;71(3):2463-72.
- Yaniv M, Cereghini S: Structure of transcriptionally active chromatin. *CRC Crit Rev Biochem*. 1986;21(1):1-26.
- Yap EH, Ho TH, Chan YC, Thong TW, Ng GC, Ho LC, Singh M: Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patients. *Genitourin Med*. 1995;71(6):402-4.

- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, Adami HO, Gyllensten UB, Melbye M: Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2194–8.
- Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI: The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;158(1):27-34.
- Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K: Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer.* 2000;7(1):33-6.
- Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M: p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res.* 2001 15;61(2):608-11.
- Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M: Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 1998;58(4):829-33.
- Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, B. Mannhardt, R. Tindle, J. W. Botz, and P. Jansen-Durr. 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13:2323–2330.
- Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM: Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 1999;263:388-94.



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

Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard, and M. J. O'Connor. 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* 73:6209–6219.

zur Hausen H: Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. 1991;184(1):9-13.

Zur Hausen H: Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996;122(1):3-13.

Zur Hausen H: Human papilloma viruses (author's transl) *Arzneimittelforschung*. 1977;27(1):212-5.

**Manuel de référence**

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Virology, Fifth Edition*. Philadelphie: Lippincott-Raven, 2007.

**Sites Internet:**

Agence de Santé Publique du Canada

<http://www.inspq.qc.ca>

Biology of HPV in HIV Infection

<http://adr.sagepub.com/cgi/content/abstract/19/1/99>

Département de Biologie de l'École Normale Supérieure de Lyon

<http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/papillomaviridae>

Medscape

[http://www.medscape.com/viewarticle/553264\\_4](http://www.medscape.com/viewarticle/553264_4)

Organisation Mondiale de la Santé

[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/hpv/en/](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/)