

Université de Montréal

# **Facteurs de risque de sévérité de la papillomatose respiratoire juvénile**

par

Caroline Rodier

Département de médecine sociale et préventive, École de santé publique  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en santé communautaire

Février, 2013

© Caroline Rodier, 2013

## Résumé

La papillomatose respiratoire récurrente (PRR) juvénile est causée par les génotypes 6 et 11 du virus du papillome humain (VPH). Cette maladie est caractérisée par des verrues récurrentes généralement au larynx. La forme sévère peut avoir un impact dévastateur sur la santé et la qualité de vie de l'enfant atteint et de sa famille en raison des conséquences des multiples chirurgies nécessaires et du risque d'obstruction des voies respiratoires.

Objectif: Examiner les facteurs de risque associés aux manifestations sévères de la PRR.

Méthode: Étude rétrospective des 31 cas diagnostiqués entre janvier 1995 et décembre 2008. Les données démographiques, cliniques, génétiques et virologiques ont été évaluées. Des régressions logistiques furent effectuées afin d'évaluer le rôle des variables indépendantes sur la sévérité de la maladie.

Résultats: Nos données suggèrent que les facteurs de risque de sévérité de la PRR seraient associés au genre féminin (Rapport de cotes (RC)=2.60, intervalles de confiance (IC) 95% : 0.44-15.44), au fait d'être premier-né (RC=3.51, IC 95% : 0.17-72.32), à un statut économique faible (RC=5.31, IC 95% : 0.17-164.19), à un jeune âge (RC=0.83, IC 95% : 0.68-1.01), à une charge virale élevée (RC=3.81, IC 95% : 0.23-63.16) et aux condylomes chez la mère pendant la grossesse (RC=12.05, IC 95% : 0.97-149.85).

Conclusion: La sévérité de la PRR serait le résultat d'une combinaison de déterminants qui favoriseraient la croissance cellulaire particulièrement chez les jeunes enfants. Des mesures préventives et thérapeutiques visant à restreindre la contamination et la réplication du virus pourraient réduire le fardeau de la maladie.

**Mots-clés:** Papillomes, juvénile, risque, sévérité, chirurgie, récurrence, VPH.

## **Abstract**

Juvenile Recurrent Respiratory Papillomatosis is caused by Human Papillomavirus genotypes 6 or 11. It is characterised by recurring warts most commonly in the larynx. The severe form of the disease has a devastating impact on health and life quality of the child and its family because of the consequences of multiple surgical procedures and the constant risk of airway obstruction.

**Objectives:** To study the risk factors associated with severe forms of RRP.

**Method:** We conducted a retrospective case series of the 31 patients diagnosed between January 1995 and December 2008. We analyzed demographic and clinical variables, as well as viral and host factors. Logistic regressions were performed to evaluate the impact of each of independent variables on the disease severity.

**Results:** Our data suggest that risk factors for severe forms of RRP in children could be associated with female gender (OR=2.60, 95% CI: 0.44-15.44), being first-born (OR=3.51 95% CI: 0.17-72.32), lower socio-economic status (OR=5.31, 95% CI: 0.17-164.19), younger age (OR=0.83, 95% CI: 0.68-1.01), high viral load (OR=3.81, 95% CI: 0.230-63.16) and history of condylomas of the mother during pregnancy, (OR=12.05, 95% CI: 0.97-149.85).

**Conclusion:** The severity of the RRP would be the result of a combination of factors which would favor the cellular growth particularly in the young children. Therapeutics and preventive measures to restrict the contamination and the replication of the virus could reduce considerably the burden of this disease.

**Keywords:** papillomas, juvenile, risk, severity, surgery, recurrence, HPV.

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	x
<b>Chapitre 1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 2. Revue de littérature.....</b>	<b>3</b>
2.1 Introduction.....	3
2.2 État actuel des connaissances.....	4
2.2.1 Facteurs sociodémographiques.....	4
2.2.2 Facteurs cliniques.....	5
2.2.3 Facteurs génétiques de l'hôte.....	6
2.2.4 Facteurs viraux.....	7
2.3 Variation des critères de sévérité.....	8
2.4 Conclusion.....	9
<b>Chapitre 3. Méthodologie.....</b>	<b>11</b>
3.1 Objectif principal.....	11
3.2 Hypothèses.....	11
3.3 Devis.....	11
3.4 Variables dépendantes.....	11
3.5 Variables indépendantes.....	12
3.5.1 À partir des dossiers médicaux.....	12
3.5.2 À partir du questionnaire et du dossier d'accouchement de la mère.....	12
3.5.3 À partir des tests moléculaires sur les biopsies archivées et sur les échantillons de salive de l'enfant.....	13
3.6 Taille et description de l'échantillon.....	13
3.7 Méthode et collecte de données.....	13
3.7.1 À partir des dossiers médicaux.....	14
3.7.2 À partir du questionnaire et des dossiers d'accouchement de la mère.....	14
3.7.3 À partir des spécimens biologiques.....	14

3.7.4	Analyses statistiques .....	18
3.8	Contributions spécifiques de la candidate à la maîtrise au projet de recherche .....	18
<b>Chapitre 4.</b>	<b>Article – <i>Juvenile Respiratory Papillomatosis: Can we identify risk factors for severity?</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>Chapitre 5.</b>	<b>Analyse des variantes moléculaires .....</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre 6.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>55</b>
6.1	Retour sur les résultats .....	55
6.2	Analyses additionnelles en variant la définition de la variable dépendante .....	59
6.3	Limites et sources de biais .....	61
6.3.1	Précision .....	61
6.3.2	Biais de sélection .....	61
6.3.3	Biais d'information .....	62
6.3.4	Biais de confusion .....	63
<b>Chapitre 7.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>64</b>
7.1	Portée en santé publique .....	64
7.2	Implications et perspectives de recherche .....	66
	Bibliographie .....	67
	Annexe 1 – Tableau sommaire de la revue de littérature .....	xii
	Annexe 2 – Échelle de sévérité de la PRR selon Derkay, 1998 .....	xxi
	Annexe 3 – Formulaire de cas standardisé .....	xxiii
	Annexe 4 – Questionnaire à la mère .....	xxvi
	Annexe 5 – Analyses supplémentaires sur les facteurs de risque .....	xxix

## Liste des tableaux

### Dans l'article

Table 1:	Socio-demographic variables for the entire cohort of patients diagnosed with juvenile laryngeal or oropharyngeal papillomatosis between January 1995 and December 2008.....	26
Table 2:	Clinical parameters from the children's chart review.....	28
Table 3:	Clinical variables for mother's pregnancy.....	29
Table 4:	HPV genotyping and relative viral load results.....	30
Table 5:	Genetics host characteristics.....	32
Table 6a:	Odds Ratio for disease severity according to variables extracted from children's charts, mother questionnaire and viral load.....	33
Table 6b:	Odds Ratio for disease severity according to the mother history at delivery....	36
Table 6c:	Odds Ratio for severity from selected host's genetics characteristics.....	39

### Dans le corps du mémoire:

Tableau I:	Caractéristiques des variantes moléculaires des spécimens VPH 6 et 11 .....	49
------------	---	----

### À l'annexe 1

Résumé des études menées depuis 1995 mettant en lumière les paramètres sociodémographiques, les génotypes de VPH et les caractéristiques des enfants en rapport avec la papillomatose respiratoire récurrente (PRR) sévère .....	xii
--	-----

### À l'annexe 5

Tableau I:	Rapport des cotes pour la sévérité de la papillomatose respiratoire selon l'histoire de condylomes maternels (cervicaux ou vulvaires) en ajustant pour une seule variable à la fois .....	xxx
Tableau II:	Rapport des cotes pour un critère de maladie dite « agressive » (>3 chirurgies à l'intérieur de 12 mois et/ou progression de la maladie en sous-glottique) ..	xxxii
Tableau III:	Ratio des cotes pour un critère de maladie dite « agressive » selon l'histoire de la mère à l'accouchement.....	xxxiii
Tableau IV:	Ratio des cotes pour un critère de maladie dite « agressive » selon une sélection de caractéristiques génétiques .....	xxxv

## Liste des figures

Figure 1:	Mutation génomique simple pour les variantes du VPH 6 .....	50
Figure 2:	Insertions et délétions des paires de bases des variantes de MTL-LCR 06 .....	51
Figure 3:	Arbre phylogénique MTL-LCR 06.....	53
Figure 4:	Mutations génomique pour les variantes MTL-LCR 11.....	54
Figure 5a:	Charge virale VPH 6 selon la sévérité.....	58
Figure 5b:	Charge virale VPH 11 selon la sévérité.....	58
Figure 6:	Charge virale VPH 6 et 11.....	58

## Liste des abréviations

a	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
$\beta$ -globine	Bêta-globine ( <i>Beta-globin</i> )
c	Cytosine
CHU	Centre hospitalier universitaire
CI	<i>Confidence intervals</i>
CIM	Classification internationale des maladies
Ct	Cycle seuil ( <i>threshold cycle</i> )
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
CMV	Cytomégalovirus
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E2	<i>Early protein 2</i> (Protéine précoce E2)
g	Guanine
GCS	Glucocorticostéroïdes
GERD	<i>Gastroesophageal reflux disease</i>
HLA	<i>Human leucocytes antigens</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
IQR	<i>Interquartile range</i>
IC	Intervalle de confiance
ISH	<i>In situ hybridization</i> (Hybridation <i>in situ</i> )
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>
L1	<i>Late region 1</i>
LCR	<i>Long control region</i>
LA	<i>Linear array</i>
LSIL	<i>Low grade squamous intraepithelial lesion</i>
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium ( <i>magnesium chloride</i> )
mM	Millimole

NK	<i>Natural killer cells</i>
ng	Nanogrammes ( <i>Nanograms</i> )
nt	Nucléotide
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
p53	Protéine supressive anti tumorale p53
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)
pRb	Protéine rétinoblastome
PRR	Papillomatose respiratoire récurrente
PSF	<i>Peak surgical frequency</i> (Fréquence plus élevée de chirurgie)
PSS	<i>Peak severity score</i> (Grade de sévérité maximale)
RC	Rapport de cotes
RRA	Région régulatrice en amont
RRP	<i>Recurrent respiratory papillomatosis</i>
RT PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SBT	<i>Sequence based typing</i>
SD	<i>Standard deviation</i> (Écart-type)
SSP	<i>Sequence specific primer</i>
t	Thymine
TBP	Trachéale et/ou bronchique et/ou pulmonaire
Th1	<i>T helper cells type 1</i>
VHS	Virus Herpes Simplex
VPH	Virus du papillome humain
$\gamma$	Gamma

*En hommage à  
Gabriel, décédé à Montréal  
de cette terrible maladie*

## **Remerciements**

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue moralement durant ces quelques années, en particulier les membres de ma famille qui ont été patients et toujours compréhensifs.

J'aimerais offrir un merci tout particulier à mes codirectrices de maîtrise, Dre Helen Trottier et Dre Annie Lapointe, pour leur disponibilité, leur positivisme et leur passion partagée pour la papillomatose respiratoire.

Merci aux coauteurs de l'article pour leur expertise ainsi qu'à Louise, Susan et Germaine pour leur aide administrative et leur amitié.

Merci à James, Maria et Denise qui ont cru depuis le début que ce projet était possible et réalisable avec le travail exigeant que nous occupons.

Enfin, merci à Marie-Hélène et Helen pour m'avoir transmis votre passion pour la recherche et m'avoir encouragée à ne pas baisser les bras dans les moments les plus ardues.

## **Chapitre 1. Introduction**

Depuis 2006, un vaccin contre le virus du papillome humain (VPH) est disponible sur le marché canadien et en 2009, la majorité des provinces adoptait un programme de vaccination en milieu scolaire avec un objectif principal de lutter contre le cancer du col de l'utérus causé majoritairement par les types de VPH 16 et 18. Le vaccin VPH quadrivalent, présentement utilisé pour le programme de santé publique, protège non seulement contre les génotypes 16 et 18, mais également contre les génotypes 6 et 11 qui sont responsables de 90 % des condylomes anogénitaux et de la papillomatose respiratoire. Afin d'évaluer l'impact d'un programme de vaccination, il est important de connaître le fardeau des maladies évitables et l'utilisation des soins de santé qui y sont associés. La forme juvénile de la papillomatose respiratoire est une maladie relativement rare et les traitements doivent être donnés dans un centre hospitalier tertiaire pédiatrique. À cet effet, nous avons participé, au centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine, à une étude rétrospective publiée en 2010 [1] sur la papillomatose respiratoire juvénile visant à décrire l'épidémiologie de cette maladie au Canada. Pour la période entre 1994 et 2007, 243 cas ont été répertoriés et ont nécessité plus de 3021 chirurgies. Les visites en clinique externe et le suivi en thérapie vocale n'ont pas été estimés. Chaque cas répertorié a été évalué pour le nombre de chirurgies et leur fréquence en utilisant un système harmonisé de gradation des lésions déjà validé. Des cas très sévères de plus de 30 chirurgies ou de transformations malignes ont été recensés, mais certains enfants furent guéris uniquement après deux ou trois interventions. Devant cette divergence de pronostics, notre groupe s'est intéressé aux déterminants de sévérité de cette maladie qui devient l'objectif principal de ce mémoire.

Les résultats de recherche nous permettront de comprendre davantage cette maladie encore méconnue et de connaître pourquoi certains cas progressent vers des situations qui mettent la vie en danger, alors que d'autres cas demeurent bénins. Une connaissance plus approfondie des facteurs de risque de sévérité nous permettrait d'identifier une population plus à risque et aiderait possiblement dans le traitement et la prévention de cette maladie. Ce projet

pourrait générer des hypothèses qui seraient éventuellement testées avec des devis plus rigoureux à l'échelle nationale. Les résultats préliminaires de notre étude ont été présentés aux 27<sup>th</sup> *International Papillomavirus Conference and Clinical workshop*, à Berlin, en septembre 2011 [2].

Ce mémoire est composé de sept chapitres. Après le premier chapitre d'introduction, le chapitre 2 a pour objectif une révision de la littérature sur les facteurs de risque de la sévérité de la papillomatose respiratoire. Le chapitre 3 décrit la méthodologie utilisée. Nous retrouverons au chapitre 4 l'article intitulé *Juvenile Respiratory Papillomatosis, can we identify risk factor for severity?* Cet article présente les principaux résultats et est présentement en révision au journal *Journal of Medical Virology*. Le chapitre 5 traite de résultats supplémentaires sur les variantes moléculaires analysées dans notre population du CHU Sainte-Justine. Le chapitre 6 fait état d'une discussion sur les résultats principaux avec des observations additionnelles et est suivi par le chapitre 7 qui fait état de nos conclusions.

## **Chapitre 2. Revue de littérature**

### **2.1 Introduction**

Le VPH est maintenant univoquement associé à une maladie rare, mais dévastatrice appelée la papillomatose respiratoire récurrente juvénile (PRR) [3]. Cette maladie est principalement causée par les génotypes 6 ou 11 acquis généralement par transmission périnatale de la mère à l'enfant [4, 5]. Les enfants atteints de cette maladie auront une atteinte de leurs voies respiratoires et une dysphonie qui causent une souffrance émotionnelle et physique importante [6]. Ces enfants subissent de nombreuses interventions chirurgicales et des hospitalisations fréquentes. La PRR a un impact sur la qualité de vie de l'enfant atteint et de sa famille, mais elle est également responsable d'une morbidité et des frais en soins de santé importants [7]. Les enfants sont traités, pour la plupart, dans des centres de pédiatrie universitaires par des oto-rhino-laryngologistes pédiatriques. Un cas représente en moyenne 143 827 \$ en coûts directs selon un estimé fait en Colombie-Britannique en 2005 [8]. L'incidence de cette maladie est estimée à 4,3 enfants sur 100 000 aux États-Unis [9]. Au Canada, une étude récente nationale canadienne évalue plutôt l'incidence à 0.24 par 100 000 et varie sensiblement par province (0.20-0.31) [1]. La différence importante avec les États-Unis serait attribuée à une surestimation possible des données provenant d'un sondage fait auprès d'oto-rhino-laryngologistes ou à une incidence régionale effectivement plus élevée [1]. Il n'y a actuellement aucun traitement efficace pour cette maladie. Seule la chirurgie contribue à dégager les lésions obstructives des voies respiratoires et sur les cordes vocales. L'évolution de la maladie est imprévisible. Parfois, l'enfant atteint subira plus de 100 chirurgies, alors que d'autres ne subiront qu'une seule intervention [10, 11]. Des chirurgies répétées peuvent entraîner un web des cordes vocales, une excroissance tissulaire près de la commissure antérieure qui peut causer l'enrouement, l'aphonie et des dommages irréversibles aux cordes vocales [12]. Une transformation maligne peut survenir dans 1% des cas juvéniles [13]. La maladie peut donc être légère ou largement diffuse et morbide. Certains enfants connaîtront une rémission prolongée ou même permanente. Pour d'autres, la croissance des papillomes

peut s'étendre dans les voies respiratoires. Lorsqu' il y a atteinte pulmonaire, le pronostic est moins favorable et le décès survient dans 25 à 75 % des cas [14]. Quelques études se sont intéressées aux facteurs de sévérité de la maladie, mais la majorité l'ont fait en comparant la sévérité selon le génotype 6 et 11 en cause [15-21]. Certains facteurs sociodémographiques tels que l'âge et statut socioéconomique ont été identifiés, mais les résultats sont parfois contradictoires. Il y a très peu de données actuellement disponibles sur le rôle de la charge virale, des variantes moléculaires et de certains facteurs génétiques de l'hôte [22-24].

## **2.2 État actuel des connaissances**

### **2.2.1 Facteurs sociodémographiques**

La majorité des études ont identifié le jeune âge au moment du diagnostic comme déterminants de sévérité de la maladie [1, 10, 11, 19, 20, 25-28]. Les enfants diagnostiqués avant l'âge de trois ans ont en moyenne un nombre de chirurgies plus élevé par année, 1.8 fois plus de chance d'avoir plus de deux sites anatomiques affectés [25] et reçoivent plus fréquemment des traitements adjuvants [10]. Les investigateurs expliquent souvent cette relation par la petitesse des voies aériennes chez les jeunes enfants. En effet, comme les voies aériennes sont très petites avant l'âge de trois ans, des interventions plus fréquentes sont nécessaires pour maintenir les voies dégagées. À ce jour, aucune recherche n'a montré une association avec la sévérité et le sexe de l'enfant [10, 11, 17, 25, 26]. L'ethnie ne serait pas associée à la sévérité [10, 25]. Le rang de naissance de l'enfant a parfois été associé à l'acquisition de la maladie [29]. Étant donné que les enfants atteints de PRR sont plus souvent des premiers nés, les auteurs suggèrent que les mères primipares sont plus susceptibles d'avoir un long deuxième stade du travail et que l'exposition prolongée au VPH dans le canal conduirait à un risque plus élevé d'infection pour le premier-né. Le premier rang de naissance et le jeune âge de la mère (< 20 ans) n'ont pas été corrélés, à ce jour, avec une maladie plus grave [10]. Enfin, le statut économique en tant que déterminant de sévérité est encore controversé. Contrairement à une étude américaine qui montre un lien entre la couverture Medicaid et la sévérité de la maladie [10], un sondage fait à Toronto auprès de 21 familles sous traitement pour la papillomatose révèle qu'il n'y aurait pas de lien avec le statut socio-

économique [27]. Ceci serait probablement en raison de l'accès au système de santé universel canadien qui préviendrait des retards au niveau du diagnostic et du traitement.

## 2.2.2 Facteurs cliniques

### A. *Facteurs cliniques associés à l'enfant*

Le registre américain de PRR qui examine 22 centres hospitaliers tertiaires a suivi la trajectoire clinique de plus de 603 enfants entre 1997 et 2002 [11]. Il dénote que 87.4 % des cas ont leurs papillomes restreints à un seul site, habituellement le larynx (84.0 %). Parmi les 469 cas qui offraient suffisamment de données, 5.8 % des enfants ont connu une progression de leur maladie au delà du larynx. La trachéotomie était associée significativement aux cas qui montraient une progression ou impliquaient de nouveaux sites anatomiques. Parmi l'ensemble des cas, 47.6 % ont eu recours à des traitements adjuvants. L'interféron était le plus souvent utilisé. En général, les enfants sous interféron avaient des chirurgies plus fréquentes et étaient diagnostiqués à un plus jeune âge. Très peu d'études ont regardé les maladies sous-jacentes à la papillomatose chez les enfants, mais une histoire de maladie infectieuse ne fut pas corrélée avec la sévérité de la papillomatose [10]. Les enfants atteints de PRR ont souvent une histoire clinique d'asthme [30]. Une analyse américaine suggère qu'il s'agit souvent d'un diagnostic erroné avant que le diagnostic de papillomatose soit posé [30]. Aucune étude à ce jour n'a évalué le lien entre l'histoire d'asthme et la sévérité de la maladie chez l'enfant. Cependant, une étude récente chez l'adulte montre un lien significatif avec une papillomatose agressive et les patients qui souffrent d'asthme, en particulier ceux sous traitement quotidien de glucocorticostéroïdes en inhalation (GCS) [31]. Les explications possibles seraient que l'asthme, par son processus inflammatoire ou les traitements aux GCS, occasionnerait une perturbation du système immunitaire. Enfin, des séries de cas suggèrent que la papillomatose pourrait être aggravée en présence de reflux gastro-œsophagien L'inflammation induite par l'exposition chronique d'acide gastrique stimulerait le VPH dans les tissus déjà fragilisés [32, 33].

## B. Facteurs cliniques associés à la mère

Le registre de papillomatose du Danemark a permis d'évaluer longitudinalement les caractéristiques cliniques de la mère associées à l'acquisition de la maladie. Ce registre a montré un risque augmenté de 231 fois lorsque la mère avait une histoire de condylome durant la grossesse [5]. Une durée de travail de plus de dix heures était également un facteur significatif de développement de la papillomatose chez le nouveau né. Très peu d'études ont regardé les variables cliniques de la mère en regard de l'impact sur la sévérité. Wiatrak et ses collègues montrent un score ou grade de sévérité maximale (PSS) significativement augmenté lorsque la mère avait une histoire de condylomes vulvaires, mais pas une fréquence plus élevée de chirurgie (PSF) [10]. Même si les césariennes diminuent le risque, elles ne protègent pas complètement de la transmission [5]. D'ailleurs, des cas de papillomatose nés après une césarienne ont déjà été classifiés comme sévères [10]. La transmission prénatale serait possible puisque des études antérieures ont détecté jusqu'à 13.5 % de VPH dans le cordon ombilical, et entre 15 et 65 % dans le liquide amniotique des femmes enceintes [34].

### 2.2.3 Facteurs génétiques de l'hôte

Devant la variabilité et l'incidence relativement rare de la maladie comparativement à la prévalence du VPH, des facteurs génétiques de l'hôte ont également été investigués comme facteurs étiologiques. Depuis 2003, des travaux semblent montrer que certains allèles *Human Leucocytes Antigens* (HLA) du Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II seraient associés à un risque d'acquisition de la maladie et une sévérité plus importante [23]. Tout comme dans les lésions VPH à haut risque au niveau du col, certaines études décrivent aussi un lien avec les formes sévères de papillomatose et l'allèle DRB1\*0301 [23]. Les allèles DRB1\*0102, DQB1\*0201, DQB1\*0202 seraient également dominants dans des cas sévères de PRR chez des sujets caucasiens, suggérant alors que certains allèles spécifiques pourraient jouer un rôle dans l'évolution de la sévérité [23]. Ces allèles sont associés à une suppression de l'interféron gamma ( $\gamma$ ) possiblement en cause dans la progression de la maladie. Par contre, les HLA DQB1\*0602 protégeraient les caucasiens d'une forme sévère de maladie [23].

Les récepteurs des HLA de classe I, les gènes *Killer-cell Immunoglobulin-like receptors* (KIR) ont également été investigués sur l'évolution de la papillomatose. Les gènes KIR sont des récepteurs d'un type de lymphocytes soit les cellules *natural killer cells* (NK), responsables de la réponse immunitaire innée contre certaines infections. Ils seraient impliqués dans la résistance ou la susceptibilité à certaines maladies. Bonagura et ses collègues ont observé un lien entre l'absence des gènes 2DS1 et 3DS1 parmi les cas sévères de PRR comparativement à des cas contrôles [24].

#### 2.2.4 Facteurs viraux

##### A. *Génotype*

Parmi les déterminants de sévérité de la papillomatose chez l'enfant, le génotype est probablement celui le plus étudié. La grande majorité des travaux semblent montrer que le VPH 11 serait associé à une maladie plus sévère. Les résultats sont soit exprimés par un recours plus grand à une trachéotomie [10, 15], à une dissémination plus fréquente à la trachée et aux poumons [10, 17] ou à un nombre de chirurgies plus fréquentes [16, 18, 22, 35]. Le VPH 11 serait aussi plus souvent associé aux transformations malignes [17, 36]. Cependant, deux études moins récentes étaient incapables de montrer une différence entre le VPH 6 et le VPH 11 [26, 37]. Il est important de noter que ces études n'utilisent pas tous les mêmes tests et que très peu ont tenu compte de l'âge de l'enfant. L'article de Buchinsky et ses collègues mentionne qu'après avoir contrôlé pour l'âge, la relation entre l'évolution clinique et le génotype viral devient pratiquement non significative [20].

##### B. *Charge virale*

Une seule étude à ce jour a étudié la charge virale dans un objectif d'établir une association avec la sévérité de la papillomatose [22]. Contrairement aux recherches au niveau du col de l'utérus [38, 39], cette étude n'a pas montré qu'une charge virale plus élevée était associée à un pronostic moins favorable. Il est à noter que cette étude a été menée auprès de seulement 15 enfants avec un suivi médian de 5.4 mois uniquement.

### C. Variantes moléculaires

Un nouveau type taxonomique de VPH est déterminé lorsque la séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) de la région *open reading frame* (ORF) présente moins de 90 % de similitude avec un génotype connu. Un sous-type est déterminé s'il y a entre 90% et 98% de similitude. Une variante moléculaire est définie lorsqu'il y a plus de 98 % de similitude [40]. Le VPH 6 est classifié en trois sous-types 6a, 6b et 6vc [41]. Officiellement, le VPH 11 est rassemblé en un groupe, bien que des sous-types 11a et 11b soient répertoriés [41]. À ce jour, 19 variantes moléculaires de VPH 6 et 10 variantes de VPH 11 ont été identifiées dans le monde suite à des mutations de la région *Long Control Region* (LCR) [13]. Contrairement au VPH oncogène 16 qui possède des variantes africaines, européennes, américaines et asiatiques, il n'y aurait pas de division géographique parmi les variantes 6 et 11 et pas d'association ethnique [41]. Seulement deux études ont étudié le pronostic de RRP en fonction des variantes moléculaires 6 et 11; aucune n'a été en mesure d'identifier des différences qui expliqueraient une sévérité plus grande [26, 42]. Une de ces études soupçonne néanmoins une duplication d'un nucléotide chez un VPH 11 pour expliquer un cas très sévère de RRP qui a connu une transformation maligne [26].

### 2.3 Variation des critères de sévérité

Il existe une certaine inconsistance dans les résultats publiés à ce jour sur les déterminants de la sévérité de la PRR. Ceci pourrait s'expliquer dans un premier temps par les différentes populations utilisées. Certaines études considèrent un cas juvénile jusqu' à 18 ans alors que d'autres les considère jusqu'à 12 ou 14 ans [1, 35]. Cette restriction évite d'incorporer des cas de papillomatose transmis par contact sexuel plutôt que par voie verticale. Des études ont également exclu les cas qui n'ont pas une période suffisamment longue de suivi et possiblement retiré des cas non sévères des analyses [15, 20]. Les techniques d'extractions, la nature et l'âge des spécimens peuvent également varier et justifier la différence trouvée. Par ailleurs, nous remarquons une grande diversité dans les définitions du critère de sévérité qui pourrait aussi expliquer les résultats divergents. D'ailleurs, la proportion de cas sévère varie de 38 % à 81 % dans la littérature. Certaines études se limitent à un recours à la trachéotomie,

une progression pulmonaire ou aux cas qui ont connu des transformations malignes [15, 17]. La grande majorité des études offrent une définition combinée de critères au niveau du nombre de chirurgie et de fréquence qui varie entre trois ou quatre chirurgies par an [18, 20, 22, 35]. Pour corriger le fait que la fréquence des chirurgies peut être déterminée davantage par le chirurgien que par l'agressivité de la maladie, Derkay a proposé en 1998 une échelle subjective de sévérité qui inclut une évaluation de la distribution et du volume des papillomes auprès de 25 sites anatomiques lors de chaque intervention chirurgicale [43]. La somme du pointage permet de prédire l'évolution clinique de la maladie. Cette échelle a été évaluée et validée avec une concordance élevée entre oto-rhino-laryngologistes [44]. Cependant, ce système est complexe et long à calculer et est souvent mis de côté au profit des critères standards de fréquence de chirurgie. Quelques études depuis 1998 ont utilisé une échelle de mesure clinique et anatomique [10, 23, 24, 27]. L'annexe 1 « Tableau sommaire de la revue de littérature » (p. xii) résume les principales études sur la papillomatose juvénile, les paramètres étudiés et les critères de sévérité utilisés. Pour notre recherche, nous tiendrons compte des différentes définitions de sévérité lors de nos analyses.

## **2.4 Conclusion**

Selon l'état actuel des connaissances, le VPH 11 serait associé à un moins bon pronostic. Devant le risque élevé de transformation maligne consécutif à la papillomatose, une étude suggère même, après un suivi prospectif des patients sur plus de 20 ans [17], de reclasser à « risque moyen » d'oncogénicité le VPH 11 plutôt que la catégorie « faible risque » où ce génotype est présentement classé. Les autres facteurs identifiés seraient: l'âge au moment du diagnostic, l'âge de la mère et son histoire de condylomes. L'importance du niveau socio-économique est controversée [27]. Très peu de données sont actuellement disponibles sur le rôle qu'exercent la charge virale et les variantes moléculaires [22, 42] sur la sévérité de la maladie. De récentes données semblent montrer que certains allèles HLA DRB1\*0301 en particulier seraient associés à un risque et une sévérité plus élevés, alors que la présence des gènes KIR 3DS1 et KIR2DS1 occupent un rôle protecteur [45]. Les variations dans les critères de sévérité et l'âge des cas répertoriés expliquent possiblement les résultats divergents que l'on retrouve actuellement dans la littérature.

L'objectif principal de cette étude consiste à étudier les facteurs de risque associés à la sévérité de la PRR. Notre étude est la plus vaste recherche à ce jour à étudier un aussi grand ensemble de variables à la fois sociodémographiques, cliniques et virales. Nous tenterons d'identifier les déterminants de la sévérité de la PRR chez l'enfant en utilisant deux définitions distinctes de sévérité de la maladie. Une définition principale plus générale qui considère le nombre de chirurgies effectuées et une deuxième définition qui considère plutôt la progression rapide de la maladie et son agressivité.

## **Chapitre 3. Méthodologie**

### **3.1 Objectif principal**

L'objectif principal est d'examiner les facteurs de risque associés aux manifestations sévères de la papillomatose juvénile respiratoire récurrente.

### **3.2 Hypothèses**

Les hypothèses sont les suivantes: le VPH 11, l'âge de l'enfant, l'histoire de condylome de la mère pendant la grossesse, les allèles de classe II DRB1\*0301 et DQB1\*0201 seraient associés à une maladie plus sévère. Une durée de travail lors de l'accouchement plus longue et l'utilisation de forceps et de ventouses seraient également des indicateurs de frottements plus grands et de sévérité des papillomes.

### **3.3 Devis**

Étude rétrospective de l'ensemble des cas de papillomatose diagnostiqués au CHU Sainte-Justine entre 1995 et 2008. Les cas sévères seront comparés avec les cas non sévères.

### **3.4 Variables dépendantes**

La sévérité de la PRR représente notre variable dépendante. La sévérité de la maladie a été mesurée rétrospectivement en utilisant une échelle standardisée et validée [43, 44] pour chaque chirurgie (cf. annexe 2, p. xxi). Cette échelle de mesure est utilisée aux États-Unis depuis 1998 pour évaluer à la fois l'étendue ainsi que le volume des lésions. Une valeur numérique de 0 à 3 est attribuée selon la grosseur des papillomes pour le larynx, la trachée et les autres sites affectés (0=absent, 1=lésion de surface, 2=lésions surélevées, 3= lésions volumineuses). La somme est calculée pour chaque chirurgie, ce qui nous permet de voir si la

maladie progresse ou régresse. Ces valeurs objectives ont été attribuées à partir du rapport de chirurgie, puis révisées par une oto-rhino-laryngologiste, Dre Annie Lapointe. La très grande majorité des études sur les déterminants publiées utilisent un marqueur de sévérité qui considère le nombre de chirurgies ou une atteinte distale à la trachée plutôt que l'échelle de Derkay. Nous avons donc retenu une définition de sévérité composée à la fois de la valeur anatomique, du nombre de chirurgies et/ ou s'il y a atteinte à la trachée. Lorsqu'un enfant avait obtenu lors de l'une de ses chirurgies, une valeur de 10 ou plus sur l'échelle anatomique, ou subi 10 chirurgies et plus, ou une atteinte à la trachée, la maladie a alors été qualifiée de sévère.

### **3.5 Variables indépendantes**

Les variables indépendantes ont été recueillies à partir de plusieurs sources :

#### **3.5.1 À partir des dossiers médicaux**

Il s'agit des variables démographiques tels que le genre, l'ethnie ainsi que l'âge de la mère à l'accouchement, l'âge de l'enfant au diagnostic et l'ordre de naissance. Il s'agit également des variables cliniques: autres comorbidités (reflux, asthme etc.), le type de traitements, ainsi que les médicaments adjuvants requis.

#### **3.5.2 À partir du questionnaire et du dossier d'accouchement de la mère**

Il s'agit des variables relatives à l'accouchement: accouchement vaginal ou césarienne, complications, durée du travail, rupture prématurée des membranes, instruments requis (forceps ou ventouses), prématurité et l'historique de condylomes ou de cytologies anormales au col de l'utérus

### 3.5.3 À partir des tests moléculaires sur les biopsies archivées et sur les échantillons de salive de l'enfant.

Les variables suivantes ont été analysées: la charge virale, les génotypes de VPH, les variantes moléculaires, des facteurs génétiques HLA tels que les allèles de classe II DQB1 et DRB1 ainsi que les gènes KIR.

## **3.6 Taille et description de l'échantillon**

Les cas correspondent à des enfants, résidents canadiens, âgés de moins de 18 ans, traités au CHU Sainte-Justine entre 1995 et 2008. Les dossiers présentant les codes diagnostics de la Classification internationale des maladies (CIM) 9 et CIM 10, tumeur bénigne au larynx et nasopharynx, ont été réclamés aux archives. (CIM9: 210.0, 210.1-210.9, 212.0, 212.1); (CIM10-CA: D10.0, D10.1-D10.7, D10.9, D11.0, D11.7, D11.9, D14.0, D14.1). Seul les cas de papillomatose confirmés par un rapport de pathologie durant la période correspondante ont été retenus. Nous avons un total de 31 patients. Il s'agit d'une des études dont la taille d'échantillon est impressionnante compte tenu de la rareté de la maladie. Notre échantillon provient d'une étude précédente [1] à laquelle nous avons participé, dont le but était de constituer un registre national de la PRR juvénile.

## **3.7 Méthode et collecte de données**

Après avoir obtenu l'accord du comité d'éthique du CHU Sainte-Justine, le dossier médical de tous les enfants a été consulté pour obtenir les informations cliniques et démographiques relativement à ce projet. Par la suite, un formulaire de consentement a été élaboré puis acheminé aux parents des enfants mineurs ou directement au patient, s'il était âgé de plus de 18 ans au moment d'entreprendre l'étude. La mère ou le tuteur légal devait: 1) remplir et retourner le questionnaire sur l'accouchement, 2) autoriser l'accès au dossier d'accouchement et 3) accepter que les biopsies archivées et la salive de l'enfant soient testées.

### 3.7.1 À partir des dossiers médicaux

Pour cueillir les informations cliniques et démographiques, nous avons utilisé le formulaire de cas standardisé (cf. annexe 3, p. xxiii), également utilisé dans les autres centres pédiatriques tertiaires au Canada pour composer le registre canadien. Les symptômes de l'enfant au diagnostic, la distribution anatomique et les complications telles qu'une progression distale au niveau pulmonaire ou une transformation maligne ont également été investigués. Les données ont été colligées par Caroline Rodier. Un second reviseur, Dre Annie Lapointe, a validé la cueillette de données pour tous les cas exclus et répertoriés.

### 3.7.2 À partir du questionnaire et des dossiers d'accouchement de la mère

Puisque les dossiers des enfants traités sont souvent incomplets relativement à l'historique d'accouchement ou l'histoire d'infection au VPH de la mère, nous avons développé un questionnaire pour capturer toutes informations supplémentaires (cf. annexe 4, p. xxvi). C'est également à ce niveau que nous interrogeons les mères sur le niveau socioéconomique de la famille. La question du niveau socioéconomique était formulée de la façon suivante: « Comment qualifiez-vous la condition socioéconomique que vous aviez au moment de l'accouchement ? » Trois choix de réponse leurs étaient offerts : « plutôt faible », « plutôt moyen », « plutôt élevée ». Puisque l'étude remonte à 1995, il est possible que la mère ne se souvienne plus de son historique de cytologie du col de l'utérus, ce qui pourrait engendrer un biais de rappel. Nous avons par la suite demandé l'autorisation d'accès au dossier d'accouchement afin de valider les réponses du questionnaire et de compléter les informations manquantes sur les complications pendant la grossesse et les facteurs de risque potentiels, tels que les ruptures de membranes. Les hôpitaux concernés ont été contactés et ont fait parvenir le dossier d'accouchement des mères.

### 3.7.3 À partir des spécimens biologiques

Les coupes de biopsies archivées ont été préparées par la pathologiste Dre Dorothée Dal Soglio du CHU Sainte-Justine, puis acheminées à l'hôpital Notre-Dame au laboratoire de

microbiologie du Dr François Coutlée pour le génotypage d'ADN du VPH, la mesure de la charge virale et l'analyse des variantes moléculaires. L'ADN viral a été purifié avec l'ensemble "Master Pure Extraction" (Epicenter, Madison, WI) [46, 47]. Un seul spécimen est testé pour les cas plus légers en utilisant la biopsie de diagnostic. Dans les cas où plusieurs biopsies étaient disponibles, nous avons utilisé la biopsie médiane afin d'évaluer la charge virale comme facteur de risque de progression.

#### A. *Test ADN viral*

##### Résultats déjà au dossier

Durant la période étudiée (1995-2008), une procédure de routine de génotypage du VPH avait été mise en place au laboratoire de pathologie du CHU Sainte-Justine. Les biopsies de lésions papillomateuses provenant de différents sites anatomiques (col de l'utérus, vagin, vulve, région anale, larynx et oropharynx) étaient testées pour identifier l'ADN viral et les résultats inscrits aux dossiers des patients [48]. La technique d'hybridation *in situ* (ISH) a été utilisée jusqu'en 1998 pour deux de nos patients à l'aide d'une trousse de détection commerciale sur tissu ISH/ horse radish peroxidase di-amino-benzidine (Enzo, Farmingdale, NY). La technique d'hybridation a été appliquée selon les instructions du fabricant en utilisant la sonde commerciale fournie pour détecter les types regroupés de VPH 6-11, 16-18, 31-33-51. Les résultats aux dossiers de ces deux patients ne distinguent donc pas s'il s'agit du génotype 6 ou du 11. Au début de 1998, la technique ISH a été remplacée par une technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) plus sensible et moins coûteuse [48]. Les biopsies de ces patients ont été fixées dans une solution de formol entre 12 et 72 heures. L'ADN extraite de ces biopsies a par la suite été soumis à l'intérieur de quelques semaines du prélèvement à la technique de PCR précédemment décrite [48] et qui utilise des amorces générales GP5+/GP6+ pour amplifier la section correspondante d'intérêt du segment de gène L1 (*late region 1*). Le séquençage direct complémentaire a été effectué à l'aide de la trousse BigDye® (Life Technologies, Carlsbad, Ca.). En tout, les résultats de typage spécifiques d'ADN viral étaient disponibles aux dossiers de 24 patients.

### Nouveaux tests d'ADN viral

Pour confirmer et compléter les résultats disponibles au dossier des patients, les biopsies ont été analysées à nouveau dans le cadre de cette étude (pour les 14 patients ayant donné leur consentement). Les 14 biopsies archivées jusqu'alors dans les blocs de paraffine, ont été ré-analysées avec une technique contrôlée pour la qualité afin d'identifier la présence de d'autres génotypes dans les spécimens. Ces nouveaux tests sur l'ADN viral ont été faits par le biais de la technologie PCR après amplification des séquences VPH et bêta-globine ( $\beta$ -globine) à l'aide du système d'amorces PGMY09/11, dont la validité et la fidélité ont été testées dans des études précédentes [46, 49]. Cette technique est suffisamment sensible pour détecter une quantité aussi faible que 10 copies d'ADN viral. Le génotypage utilisé est en mesure d'identifier la présence de 36 génotypes différents de VPH qui affectent les muqueuses. Tous les tests ont été faits à l'hôpital Notre-Dame avec le Dr Coutlée, travaillant à l'un des laboratoires les plus expérimentés et spécialisés au monde quant à la technique du *Linear Array* (LA) utilisée dans notre étude.

#### *B. Analyses de la charge virale*

La charge virale a été mesurée par PCR en temps réel pour chaque génotype au laboratoire du Dr Coutlée. Un contrôle interne a été effectué afin d'évaluer s'il y a présence d'inhibition de l'amplification tel que décrit précédemment [50, 51]. Le contenu cellulaire des échantillons qui ne présentaient pas d'inhibition a été testé en double par la quantification de  $\beta$ -globine d'ADN en utilisant le protocole standard [52, 53]. La quantité de VPH 6 contenu dans des échantillons a été mesurée en double exemplaire selon un protocole précédemment publié [52, 53]. La quantité de VPH 11 a été aussi mesurée en double avec:

- des amorces 5'-CACTGACCACCGCAGAGATA-3' (nt de la position 211-230) et
- 5'-TGTGCCTGTTGCTTAGAACT-3' (nt de la position 291-310); ainsi que
- la sonde 5'-AAGGGAAAGTTGTCTCGCCACAC-3' (nt de la position 261-283)

avec 1.5 millimole (mM) de chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) en utilisant les mêmes cycles et durées que le test avec le VPH 6, mais avec une température d'hybridation à 56°C. Le cycle seuil (Ct) pour le VPH dans chaque échantillon a été tracé en fonction du logarithme de la concentration d'une courbe standard de VPH d'ADN plasmidique en utilisant des séries de dilutions de 10 dans un contexte de 100 nanogrammes (ng) de fibroblastes humains permettant la quantification [52, 53]. Les résultats ont été comptabilisés en nombre de copies par cellule.

### *C. Analyses des variantes moléculaires*

L'analyse des variables moléculaires a été exécutée sur les échantillons VPH 6 et à 11 positifs de la façon suivante:

- Le séquençage de la section finale 3' de la région LCR du VPH 6 a été accompli avec les amorces VPH 6-F 5'-AAAGTGGATATAGGGGACGG-3' (nucléotides (nt) de la position 7185-7204) et VPH 6-R 5'-TTTTAAGAGTTGGCTACAGTGC-3' (nt de la position 7748-7769) dans un mélange principal contenant 2.5 mM  $MgCl_2$  à 94°C pendant 4 minutes, suivie par 60 cycles à 95°C (30 secondes), 57°C (30 secondes) et 72°C (30 secondes).
- Les spécimens qui n'ont pas produit de bande visible d'une taille appropriée sur le gel d'électrophorèse ont été réévalués avec deux types d'amorces chevauchant les amplicons VPH 6 du segment LCR. Un fragment a été produit avec les amorces VPH 6-F et VPH 6-R2 (5'-GCAACAGCCACTGAGTCACA-3' (nt de la position 7434-7453) avec 2.5 mM de  $MgCl_2$  à 95°C pendant 4 minutes, suivie par 60 cycles à 95°C (30 secondes), 57°C (30 secondes) et 72°C (30 secondes). Le deuxième fragment a été produit avec des amorces VPH 6-F2 (5'-ACCTCTTGTTACACCCTGTGAC-3' (nt de la position 7418-7439) et VPH 6-R avec 2,5 mM de  $MgCl_2$  selon un équivalent de cycles, de durée et de température.

#### *D. Échantillons de salive*

Un tube d'autoprélèvement de salive destiné à l'enfant, l'Oragen-DNA OG-500 (DNA Genotek, Kanata, ON) avec les instructions, a été acheminé par la poste aux familles. Ces dernières devaient nous retourner le tout dans une enveloppe préaffranchie. Les tubes ont ensuite été acheminés au laboratoire du Dr Michel Roger à l'hôpital Notre-Dame pour les analyses des allèles HLA de classe II. L'ADN extrait de la salive et un typage à haute résolution a été performé. La technique par séquençage *Sequence Based Typing* (SBT) avec des tests commerciaux AlleSEQR DQB1 et Allele SEQR DRB1 (Abbott Molecular Diagnostic, Des Plaines, IL) qui est à ce jour la méthode la plus complète et disponible pour l'identification des nucléotides spécifiques aux allèles HLA, a été utilisée.

#### 3.7.4 Analyses statistiques

Les analyses par régression logistique non conditionnelles ont été effectuées afin d'analyser le rôle de chacune des variables indépendantes obtenues à partir des quatre sources (dossier patient, dossier accouchement, questionnaire de la mère et spécimens biologiques) sur la variable dépendante dichotomique de sévérité. Afin d'ajuster les estimés pour un potentiel effet de confusion, nous avons contrôlé *a priori* pour l'âge de l'enfant et l'âge de la mère. Le logiciel SPSS Statistics 19.0 (IBM, Somers, NY) a été utilisé pour les analyses.

### **3.8 Contributions spécifiques de la candidate à la maîtrise au projet de recherche**

La candidate à la maîtrise et auteure de ce mémoire, Caroline Rodier, a joué un rôle prépondérant dans le cadre de ce projet de recherche. Dès sa première session au département de médecine sociale et préventive, la candidate a rencontré sa directrice principale du projet de recherche, Dre Helen Trottier, pour vérifier la faisabilité du projet et définir la formulation adéquate de la question de recherche préalablement déterminée par la candidate. La candidate a ensuite rencontré le comité d'éthique du CHU Sainte-Justine pour valider les prérequis pour la soumission du projet, puis a participé activement à la rédaction du protocole avec

Dre Trottier, notamment en complétant la section de recherche de littérature et les sections des données sur les facteurs de l'hôte et des variantes moléculaires. Afin de bien définir chaque variables à l'étude, plusieurs rencontres ont été orchestrées par la candidate avec les co-chercheurs dans le but de discuter de la méthodologie utilisée et valider l'analyse des résultats. La cueillette des données a été effectuée par la candidate pour l'ensemble des dossiers patients et dossiers d'accouchement. Tout au long du projet, le traitement de ces données a été réalisé en s'assurant que des procédures soient prévues pour garantir la confidentialité des données selon les règles exigées. Il est intéressant de souligner que ce projet examine plus d'une centaine de variables bien distinctes, ce qui contribue à la grande valeur et rigueur requise pour l'analyse des données. Toutes les statistiques et tableaux ont été effectués par la candidate et des rencontres régulières avec la directrice principale de recherche initiées par l'étudiante ont permis de s'assurer de la progression adéquate du travail. Des données intérimaires ont été présentées par la candidate suite à une demande de l'Institut National de Santé Publique en mars 2010, puis sous forme d'affiche lors du 27<sup>e</sup> Congrès International Papillomavirus à Berlin, en septembre 2011. La candidate est également l'auteur principal de l'article scientifique qui a été envoyé aux co-auteurs afin de recueillir leurs commentaires et demandes d'ajouts. Plusieurs échanges et révisions ont été nécessaires avant la soumission au journal et l'étudiante a été en mesure de bien saisir les exigences et suggestions de chaque collaborateur. Enfin, la rédaction du mémoire a été entièrement réalisée par la candidate à la maîtrise avec un peu d'aide administrative pour le formatage du document final et lors de la révision de la rédaction.

## **Chapitre 4. Article – *Juvenile Respiratory Papillomatosis: Can we identify risk factors for severity?***

Running title: Risk factors for severe form of juvenile respiratory papillomatosis

C. Rodier<sup>1, 2, 7</sup>, A. Lapointe<sup>3</sup>, F. Coutlée<sup>4</sup>, M.H. Mayrand<sup>1, 5</sup>, D. Dal Soglio<sup>6</sup>, M. Roger<sup>4</sup>,  
H. Trottier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Social and Preventive Medicine, Université de Montréal (Québec), Canada; <sup>2</sup>Hôpital Sainte-Justine, Montréal (Québec), Canada; <sup>3</sup>Department of Otorhinolaryngology, Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal (Québec), Canada; <sup>4</sup>Department of Microbiology and Infectious Diseases, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada; <sup>5</sup>Department of Obstetrics and Gynecology and CRCHUM, Université de Montréal (Québec), Canada; <sup>6</sup>Department of Pathology, Sainte-Justine Hospital, Université de Montréal (Québec), Canada; <sup>7</sup>Merck Canada Inc.

Keywords: Human papillomavirus, papillomatosis, risk, severity

Word count (text): 3906

Word count (abstract): 245

Figure/table count: tables: 8

Reference count: 40

This article was submitted on October 22, 2012 to the *Journal of Medical Virology*

## **Abstract**

Juvenile Recurrent Respiratory Papillomatosis (RRP) is mostly caused by human papillomavirus genotypes 6 or 11, acquired at birth or during pregnancy from an infected mother. RRP is characterized by recurring warts growing most commonly in the larynx. Multiple surgical procedures and the constant risk of airway obstruction contribute to the devastating impact of this disease. Some children will go into remission after a few surgeries whereas others will require repeated interventions over several years. Further understanding of the risk factors associated with severity may contribute to tailored treatments. We conducted a retrospective study of RRP cases diagnosed between January 1995 and December 2008 in a tertiary care pediatric center to study determinants of severe forms of juvenile RRP. Demographic and clinical variables were abstracted from children's medical charts and mothers' delivery charts. Viral factors (HPV genotyping and viral load) were studied from archived biopsies. Specific HLA class II alleles and KIR genes were tested from saliva samples. Logistic regression was performed to identify risk factors for severity. Overall, 31 pediatric cases of RRP were identified. The only significant factor associated with severe forms of RRP was the maternal history of condylomas during pregnancy (OR: 12.05 [p=0.05]). Our analysis failed to identify risk factors that could be used clinically to identify RRP cases likely to take a severe course. Although too early to determine, vaccination against the HPV genotypes most commonly involved in RRP may provide the best hope to prevent severe forms of this disease.

## **Introduction**

Human papillomavirus is now clearly associated with the most common benign neoplasm of the larynx called juvenile recurrent respiratory papillomatosis (RRP) [1]. This disease is caused by HPV genotypes 6 or 11 [2], and is acquired via perinatal transmission from mother to child [3, 4]. Many children with these exophytic lesions undergo numerous surgeries due to respiratory distress and dysphonia [5]. RRP has a devastating impact on the quality of life of the child and the family and is also responsible for costs to the health care system [6, 7]. In Canada, a recent national, retrospective study estimated the incidence of RRP

at 0.24 per 100 000 children with substantial variation by province and from year to year [8]. The course of the disease is not always predictable. Sometimes the affected child may need more than 100 surgeries [6, 9] whereas others will undergo a limited number of interventions. Malignant transformation can occur in 1% of children with RRP [10]. In rare instances, death secondary to complete airway obstruction or cancer progression has been reported [5, 11, 12].

There is a paucity of good quality data on risk factors associated with disease severity [5, 9, 13-25]. In most of the studies, HPV11 was associated with a worse prognosis [13, 14, 16, 20, 21]. Other risk factors associated with increased severity included: young age of the children at diagnosis and maternal history of condylomas [5, 9, 17, 26]. Due to the relatively rare incidence of RRP compared to the high HPV prevalence in young women, genetic factors of the host were suspected to play a role in disease outcome. Recent data suggest that some Human Leukocyte Antigen (HLA) class II alleles such as DRB1\*0301 and DRB1\*0102 could be associated with a higher severity; while the presence of Killing Inhibitory Receptors (KIR) 3DS1 and 2DS1 could play a protective role [24, 25]. Finally, viral characteristics such as viral load may also be associated with severity, but no clear association was demonstrated to date [20].

Our objective was to study risk factors associated with severe forms of juvenile RRP, considering a wide list of potential determinants, including socio-demographic and clinical variables, maternal and birth history, as well as viral and host factors.

## **Material and Method**

We reviewed the medical charts of every patient diagnosed with laryngeal papillomatosis at Sainte-Justine Hospital, between January 1995 and December 2008. This tertiary pediatric center is one of the two reference centers for RRP in the province of Québec. We used a standardized case report form to capture birth details, socio-demographic factors and clinical course of the disease. Following approval by the Hospital Ethics Board, families were contacted to participate in the study. The mother was asked to complete a questionnaire regarding the delivery of the infected child and her Pap test history. The mother also approved

access to her obstetrical chart, enabling us to extract information on delivery history and related complications. One of the legal parents also provided consent for HPV genotyping and viral load testing on the children's biopsy samples archived at the department of pathology. Finally, with parent's guidance, each affected child participating in the study was invited to provide a self-collected specimen of saliva for deoxyribonucleic acid (DNA) extraction using Oragen-DNA OG-500 collection kit (DNA Genotek, Kanata, ON).

#### HLA and KIR testing

Human DNA was extracted from the children's saliva samples. High-resolution typing of the DQB1 and DRB1 HLA class II loci was done by sequence-based typing with Allele SEQR DQB1 and Allele SEQR DRB1 assays (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA). Locus-specific exon 2 and 3 amplicons were produced by PCR amplification and then sequenced to determine the allele-specific nucleotide sequence variants according to the manufacturer's instructions. The presence or absence of KIR genes was determined by the sequence specific primer (SSP) PCR method using the KIR Genotyping SSP Kit (Invitrogen Life Technologies, Brown Deer, WI, USA).

#### HPV DNA detection and typing

During the course of the study period, it was routine procedure at the Sainte-Justine Hospital pathology laboratory to genotype histological samples of RRP for diagnostic purposes by L1 PCR from 1998 to 2008 (n=26 patients) or hybridization *in situ* from 1995 to 1997 (n=2 patients). Results of these tests were available in patient charts. Biopsies were fixed in formalin within 12 to 72 hours. DNA was extracted and tested with a standard PCR technique as previously described [27] using general consensus primer GP5+/ GP6+ to amplify the corresponding part of the L1 gene within weeks of formalin fixation. Direct sequencing was done according to manufacturer's instruction using BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). For ISH, a commercially available HPV detection kit based on tissue ISH/horse radish peroxidase diaminobenzidine was used (Enzo, Farmingdale, NY, USA). The hybridization techniques were performed according to

the instructions of the manufacturer, using probe cocktails to detect HPV genotypes 6-11, 16-18 and 31-33-51.

In order to confirm these results and to determine with a commercial quality-controlled assay the presence of other genotypes in biopsies, we reanalyzed 14 archived formalin-fixed biopsies with Linear Array according to the following protocol. HPV DNA was purified as described previously with xylene treatment and extraction with the Master pure™ (Epicentre, Madison, WI, USA) procedure [28-30]. Extracted DNA was stored at -70° C until tested. Five hundred nanograms (ng) of DNA extracted from biopsies were tested with PCR with co-amplification of HPV and  $\beta$ -globin DNA sequences. The PCR protocol was based on amplification of a 450 base pair segment in the HPV L1 gene using PGMY primers in the Linear Array HPV genotyping assay (LA-HPV) (Roche Molecular Systems) [28, 29]. Thirty-six mucosal HPV genotypes were detected with this technique, including genotypes 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34 (formerly known as genotype 64), 35, 39, 40, 42, 44 (formerly known as genotype 55), 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, and 89. Co-amplification of a  $\beta$ -globin DNA sequence permitted determination of whether the specimens had adequate cellularity [31]. Negative, weak positive and strong positive controls were included in each amplification run. Samples that were both  $\beta$ -globin and HPV-negative were considered inadequate.

#### HPV viral load testing

HPV viral load was measured with real-time PCR assays for each genotype. Samples were tested with an internal control to assess the presence of inhibition of the amplification reaction as described previously [32, 33]. All samples were free of inhibitors and were thus tested in duplicate to measure the cellular content of samples by quantitation of  $\beta$ -globin DNA using standard protocol [34, 35]. The quantity of HPV6 contained in samples was measured in duplicate with a previously published protocol. The quantity of HPV11 was also measured in duplicate with: primers 5'-CACTGACCACCGCAGAGATA-3' (nt position 211-230) and 5'-TGTGCCTGTTGCTTAGAACT-3' (nt position 291-310); and probe 5'-AAGGGAAAGTTGTCTCGCCACAC-3' (nt position 261-283), in an amplification buffer

containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Cycling parameters for the HPV11 viral load assay were similar to that of the HPV6 assay except for the hybridization temperature set at 56°C. The threshold cycle (Ct) for HPV6 and 11 in each sample was plotted against the logarithm of the concentration of a standard curve of HPV6 or 11 DNA plasmid using 10-fold dilution series in a background of 100 ng of human fibroblasts [34, 35]. Results were recorded as copy numbers per cell. We used the median biopsy of the entire clinical episode to estimate viral load. For example, when three viral load measures were available, the results obtained from the median (middle) biopsy were used for regression analysis. When only two biopsies were available, the initial biopsy was retained for the analysis.

### Statistical analysis

Severity of the disease (dependent variable) was measured retrospectively according to a standardized staging system (Derkey scoring system) evaluated on each surgical procedure [36]. This staging system has been validated for reproducibility and is a reliable method for the assessment of anatomic involvement in patients with RRP [5, 37]. It works as follows: the chart reviewer assigns a score of 0 to 3 to anatomical sites potentially affected by papillomas (0=absent, 1=surface lesions, 2=raised lesions and 3=bulky lesions). The sum of all scores per surgery is generated to assess an objective clinical score of severity of the disease. A pediatric otolaryngologist reviewed all staging results (AL). Severe forms of RRP were defined as any of the following: Derkey anatomical score  $\geq 10$ , more than 10 surgeries overall or any tracheal involvement. We chose this definition to incorporate both the objective Derkey anatomical scale and the number of surgeries mostly used in the literature [14-17].

Unconditional logistic regression was used to estimate odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CI) for the association between the severity of RRP and (1) socio-demographic variables, (2) variables related to delivery, and (3) host factors and viral factors. Age-adjusted ORs were also estimated after control for age of the child and age of the mother. Our small sample size allows us to control for these two most important confounding variables. We used SPSS statistics software 19.0 (IBM, Somers, NY) for all analyses.

## Results

### Patient characteristics and clinical variables

Overall, 31 charts of children with juvenile RRP were identified and reviewed; 22 mothers sent back the questionnaire and 13 children provided saliva samples. Socio-demographic characteristics are summarized in Table 1:

**Table 1: Socio-demographic variables for the entire cohort of patients diagnosed with juvenile laryngeal or oropharyngeal papillomatosis between January 1995 and December 2008**

Variables	N=31	%
Gender		
Male	19	61.3
Female	12	38.7
Age at diagnostic, years <sup>a</sup>		
Mean $\pm$ SD (range)	5.5 $\pm$ (4.6) (0.6-16.4)	
Median (IQR) <sup>b</sup>	3.5 (1.9-9.8)	
Birth Rank		
First	16	51.6
Second	9	29.0
Third	4	12.9
Unknown	2	6.5
Place of Birth		
Québec Province	25	80.6
Other Provinces <sup>c</sup>	1	3.2
Other Countries <sup>d</sup>	5	16.1
Economic Status <sup>e</sup>		
Low	6	19.4
Average	9	29.0
High	1	3.2
Unknown	15	48.4

<sup>a</sup>At first surgery. <sup>b</sup>IQR: Interquartile range. <sup>c</sup>New Brunswick. <sup>d</sup>Chile, Chad, Algeria, Russia, Moldavia. <sup>e</sup>Self reported in mother's questionnaire as per the question: How do you qualify your socio-economic condition that you had at the time of the childbirth? Rather low, rather average, rather high. SD:Standard deviation

Our sample included more males than females (61.3% vs. 38.7%). The median age at diagnosis was 3.5 years, (Interquartile Range [IQR] 1.9-9.8) 51.6% of cases were first born. Five cases (16.1%) were not born in Canada. Socio-economic status as self-reported in mothers' questionnaires was low: 19.4%, average 29.0%, high: 3.2%. Up to 48.4% did not answer this question.

Table 2 shows patients' clinical data. During the study period, a total of 244 excision surgeries were performed among these 31 cases. The mean number of surgeries per child was 7.9 (SD:  $\pm 8.7$ ; range: 1-36). Twelve (38.7%) children required an urgent surgery at one point during their disease episode. The mean Derkay score was 13.8 (SD:  $\pm 8.9$ ; range: 1-33). Adjuvant therapy was administered to 7 patients (22.6%). There were 26 cases for whom the disease originated in the larynx and 5 cases for whom the papillomas were found in the oropharynx. In 23.1% of the laryngeal cases (6/26), recurrent growth extended above or below the larynx. The trachea was also affected in 11.5% of the laryngeal cases (9.7% of overall cases). In our study, 61.3% (n=19) of cases were classified as severe.

#### *Clinical parameters of the mother.*

The pregnancy and/or delivery summary charts were reviewed for 22 mothers (1 child was adopted and some mothers did not consent or could not be reached) (Table 3). The mean age of mothers at delivery was 23.9 years (SD:  $\pm 5.3$ ; range: 16-35). All mothers for whom we accessed the chart had vaginal deliveries. Cervical or vulvar condylomas during pregnancy was confirmed in the charts or mothers' questionnaires in 41.9% (n=13) of the cases, and 22.6% (n=7) had evidence of condylomas at delivery. The mother's history of condylomas during pregnancy was unknown for 32.3% (n=10) and unknown for 38.7% (n=12) at the time of delivery. We also captured other characteristics of labor and delivery such as duration of labor, premature membrane rupture (defined as at least one hour prior to the onset of labor), the use of forceps or vacuum, episiotomy, and premature birth. These variables may serve as proxy for the level of abrasion and can potentially be associated with an increased exposure to the virus.

**Table 2: Clinical parameters from the children's chart review**

Variables	Parameters	N=31	%
Number of surgeries	244	31	100
Mean (SD) (range)	7.9 ± (8.8) (1-36)		
Median (IQR) <sup>a</sup>	5.0 (2.0-10.0)		
Derkay score			
Mean± (SD) (range)	13.8 ± (8.9) (1-33)		
Median (IQR)	16.0 (5.0-19.0)		
Mean time between first and last surgery (months) ± (SD) (range)	31.6 ± (38.6) (0-169)		
Median (IQR)	20.7 (3.0-41.7)		
Comorbidities	None	14	45.2
	At least one	17	54.8
	-Asthma	8	25.8
	-GERD <sup>b</sup>	3	9.7
	-Other(s) <sup>c</sup>	6	19.3
Disease Location	Larynx	26	83.9
	Oropharynx	5	16.1
Disease Extent	Larynx	20	64.5
	Larynx and above	3	16.1
	Larynx and below	2	6.5
	Above and below larynx	1	3.2
	Tracheal involvement	3	9.7
Severe <sup>d</sup>		19	61.3
Non-severe		12	38.7
Aggressive	> 3 surgeries per year	14	45.2
Non-aggressive	≤ 3 surgeries per year	17	54.8
Virus genotype			
HPV 6	PCR <sup>e</sup>	17	54.8
HPV 11	PCR <sup>e</sup>	6	19.4
HPV 6/11	HIS <sup>f</sup>	2	6.5
HPV 30	PCR <sup>e</sup>	1	3.2
Missing	-	5	16.1
Adjuvant therapy	None	24	77.4
	Interferon	6	19.4
	Interferon and Cidofovir	1	3.2

<sup>a</sup>IQR: Interquartile Range. <sup>b</sup>GERD: gastroesophageal reflux disease. <sup>c</sup>Other comorbidities: epilepsy, hyperthyroid, functional murmur. <sup>d</sup>Severe is defined as: ≥10 Derkay score or ≥10 and more surgeries or tracheal involvement. <sup>e</sup>PCR: Polymerase Chain Reaction results by amplification of the L1 gene described in the patient's chart. <sup>f</sup>Hybridization *In situ*.

**Table 3: Clinical variables for mother's pregnancy**

<b>Variables</b>		<b>N=31</b>	<b>%</b>
Mother age (year)			
Mean $\pm$ (SD) (range)	23.9 $\pm$ (5.3) (16-35)		
Median (IQR) <sup>a</sup>	23.50 (21.3-25.0)		
Mode of delivery confirmed in charts	Vaginal	22	71.0
	Caesarean	0	0
	Unknown	9	29.0
Maternal history of condylomas <sup>b</sup> during pregnancy	No	8	25.8
	Yes	13	41.9
	Unknown	10	32.3
Condylomas at delivery <sup>c</sup>	No	12	38.7
	Yes	7	22.6
	Unknown	12	38.7
Premature birth $\leq$ 36 weeks	No	11	35.5
	Yes	3	9.7
	Unknown	17	54.8
Premature membrane rupture <sup>d</sup>	No	6	19.4
	Yes	4	12.9
	Unknown	21	67.7
Duration of labor	<10 hours	4	12.9
	$\geq$ 10 hours	4	12.9
	Unknown	23	74.2
Forceps or Vacuum	No	6	19.4
	Yes	7	22.6
	Unknown	18	58.1
Episiotomy	No	3	9.7
	Yes	9	29.0
	Unknown	19	61.3
Vaginal lacerations	No	8	25.8
	Yes	4	12.9
	Unknown	19	61.3
Combined operative delivery and/or complications <sup>e</sup>	No	1	3.2
	Yes	11	35.5
	Unknown	19	61.3

<sup>a</sup>IQR: Interquartile Range. <sup>b</sup>Cervical or vulvar condylomas. <sup>c</sup>Confirmed in the charts or in the mother's questionnaire. <sup>d</sup>Rupture of membranes at least one hour prior to the onset of labor. <sup>e</sup>Combined variable defined as usage of forceps or vacuum, had vaginal lacerations or episiotomy.

*Viral characteristics.*

Genotyping results from the children's chart are described in Table 2. HIS confirmed the presence of HPV6 or 11 in the two cases tested with this technique but could not

discriminate between these types. The Linear array did not detect any of the 34 genital HPV types other than 6 or 11 in the biopsies but did detect HPV6 in a biopsy tested negative with the routine L1 PCR assay. Combining genotyping data available from the patient charts review (n=17) and those from the Linear array, we found that HPV6 was the most prevalent genotype being detected in 58.1% (18/31) of lesions. HPV6 was more frequently detected with PCR than HPV11. One case was co-infected by HPV6 and HPV30, an oncogenic genotype of the Genus Alpha-6 papillomavirus.

Table 4 below shows linear array results and the viral load expressed in copies per cell. One sample tested negative for  $\beta$ -globin and two samples tested negative in the real-time PCR assays. The viral load levels ranged from 0.3 to 6346.6 copies per cell for 9 patients with HPV6 and from 29.9 to 812.4 copies per cell for 5 patients with HPV11. Median viral load for HPV6 and HPV11 were 348.0 (IQR: 6.9-4580.2) and 193.9 (IQR: 30.9-665.4), respectively.

**Table 4: HPV genotyping and relative viral load results**

<b>Patients #</b>	<b>PCR<sup>a</sup></b>	<b>L.A.<sup>b</sup></b>	<b>RT PCR<sup>c</sup></b>	<b>HPV viral load</b>
<b>n=14</b>				<b>(copies/cells)</b>
1 <sup>d</sup>	6	6	6	12.9
2 <sup>e</sup>	6	6	6	2120.5
3	6	-	6	0.3
4 <sup>d</sup>	11	11	11	812.4
5 <sup>e</sup>	6	6	6	2928.2
6	6	-	6	242.6
7	-	6	6	6346.6
8 <sup>d</sup>	11	11	11	32.0
9	6	-	6	6232.1
10 <sup>e</sup>	6	6	6	348.0
11	11	11	11	193.9
12	11	11	11	29.9
13	11	-	11	518.4
14	30	-	6	0.9

PCR<sup>a</sup>: Polymerase Chain Reaction results by amplification of the L1 gene described in the patient's chart. <sup>b</sup>LA: Linear Array. <sup>c</sup>Real time PCR for viral load. <sup>d</sup>Median biopsy used. <sup>e</sup>First biopsy if only two available.

### *Host characteristics.*

HLA class II alleles of the children are described in Table 5. There were 17 children who provided saliva specimen and 13 were successfully amplified (76.5%). Therefore, results were not available for 58.1% of all of our cases. Alleles DRB1\*0301, DQB1\*0201, DQB1\*0202, DRB1\*0102 associated with a more severe disease in Caucasian [25], were present in heterozygous form in 9.7%, 6.4%, 3.2% and 0% of our cases, respectively. One patient was homozygote for DRB1\*0301 and DQB1\*0201 but suffered from a mild form of oropharyngeal papilloma. The protective alleles DQB1\*0501 and DQB1\*0602 were expressed only in heterozygous form in 9.7% and 6.4% of our cases.

KIR results are also presented in table 5. We were able to fully amplify KIR genes in 14 out of 17 available saliva specimens (82.4%). Therefore, results were not available for 54.8% of all of our 31 cases. Current literature suggests that patients lacking activating genes 2DS1, 3DS1, or 2DS5 are more common in severe RRP [24]. Of the 14 cases with KIR genotype available, 64.3% (n=9) were lacking 2DS1, 3DS1 and 2DS5 simultaneously.

### Risk factors for severity related to children/mother/pregnancy characteristics

History of condylomas of the mother during pregnancy was the strongest predictor of severity, almost reaching statistical significance (adjusted OR: 12.05 [0.97-149.85]). The other convincing determinant of severity was age at diagnosis (adjusted OR: 0.83 [95% CI: 0.68-1.01]). Thus, each additional year of age at diagnosis decreased the risk of severity by 17%. Other potential determinants for disease severity were: being first born in the family (adjusted OR: 3.51 [0.17-72.32]), mother's age younger than 23 years (adjusted OR: 7.10 [0.57-88.62]), low economic status (adjusted OR: 5.31 [0.17-154.19]) and female gender (adjusted OR: 2.60 [0.44-15.44]) (table 6a).

**Table 5: Genetics host characteristics<sup>a</sup>**

<b>Selected HLA class II alleles</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Selected Activating KIR Genes</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>DRB1*0301</b>					
Absent	9	29.0	2DS1		
Heterozygote	3	9.7	Absent	9	29.0
Homozygote	1	3.2	Present	5	16.1
Unknown	18	58.1	Unknown <sup>b</sup>	17	54.8
<b>DRB1*0101</b>					
Absent	9	29.0	3DS1		
Heterozygote	4	12.9	Absent	11	35.5
Homozygote	0	-	Present	3	9.7
Unknown	18	58.1	Unknown <sup>b</sup>	17	54.8
<b>DQB1*0201</b>					
Absent	10	32.3	2DS5		
Heterozygote	2	6.4	Absent	10	32.3
Homozygote	1	3.2	Present	5	16.1
Unknown	18	58.1	Unknown <sup>c</sup>	16	51.6
<b>DQB1*0202</b>					
Absent	12	38.7	2DS1, 3DS1 and 2DS5		
Heterozygote	1	3.2	All absent	9	29.0
Homozygote	0	-	All present	3	9.7
Unknown	18	58.1	Unknown or else <sup>d</sup>	19	61.3
<b>DQB1*0501</b>					
Absent	10	32.3			
Heterozygote	3	9.7			
Homozygote	0	-			
Unknown	18	58.1			
<b>DQB1*0602</b>					
Absent	11	35.5			
Heterozygote	2	6.4			
Homozygote	0	-			
Unknown	18	58.1			

<sup>a</sup> 12 samples tested were from Caucasians, one was from North-Central Africa (Chad). <sup>b</sup> 3 genes were not amplified. <sup>c</sup> 2 genes were not amplified. <sup>d</sup> Else: at least one KIR gene is missing or is present.

**Table 6a: Odds ratio for disease severity according to variables extracted from children's charts, mother questionnaire and viral load**

Variables	N (%)	Severe/ Non severe	Crude OR	CI	p	Adjusted <sup>a</sup> OR	CI	p
Gender								
Male (ref)	19 (61.3)	11/8	1.00	-	-	1.00	-	-
Female	12 (38.7)	8/4	1.46	0.32-6.56	0.62	2.60	0.44-15.44	0.29
Age of child								
Age of child	31 (100)	-	0.88	0.74-1.04	0.13	0.83	0.68-1.01	0.06
Birth rank								
First	16 (51.6)	12/4	3.00	0.31-28.84	0.34	3.51	0.17-72.32	0.42
Second	9 (29.0)	5/4	1.25	0.12-13.24	0.85	1.19	0.05-31.55	0.92
Third (ref)	4 (12.9)	2/2	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	2 (6.5)							
Age (mother)								
< 23 years	8 (25.8)	6/2	3.00	0.36-24.92	0.31	7.10	0.57-88.62	0.13
≥ 23 years (ref)	8 (25.8)	4/4	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	15 (48.4)							
Economic Status								
Low	6 (19.3)	5/1	6.25	0.50-77.49	0.15	5.31	0.17-154.19	0.34
Average or high (ref)	10 (32.3)	5/5	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	15 (48.4)							
Comorbidities								
Asthma	8 (25.8)	6/2	1.67	0.24-11.58	0.61	0.65	0.04-10.23	0.76
GERD <sup>b</sup>	3 (9.7)	2/1	1.11	0.08-15.53	0.94	0.30	0.01-9.55	0.49
Other <sup>c</sup>	6 (19.3)	2/4	0.28	0.04-2.09	0.21	0.04	0.00-0.75	0.03
None (ref)	14 (45.2)		1.00	-	-	1.00	-	-

**Table 6a: Odds ratio for disease severity according to variables extracted from children's charts, mother questionnaire and viral load**

Variables	N (%)	Severe/ Non severe	Crude OR	CI	p	Adjusted <sup>a</sup> OR	CI	p
Maternal condylomas								
Yes	13 (41.9)	11/2	9.17	1.15-73.24	0.04	12.05	0.97-149.85	0.05
No (ref)	8 (25.8)	3/5	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	10 (32.3)							
HPV genotypes								
HPV 6 (ref)	18 (58.1)	14/4	1.00	-	-	1.00	-	-
HPV 11	6 (19.4)	4/2	0.57	0.08-4.35	0.59	0.40	0.02-8.30	0.40
Else <sup>d</sup> / unknown	7 (22.6)							
Viral Load								
< 295 copies/cell (ref)	7 (22.6)	4/3	1.00	-	-	1.00	-	-
≥ 295 copies/cell	7 (22.6)	6/1	4.50	0.34-60.15	0.30	7.40	0.35-155.25	0.20
Unknown	17 (54.8)							
Viral Load HPV 6								
< 242 copies/cell (ref)	3 (9.6)	2/1	1.00	-	-	1.00	-	-
≥ 242 copies/cell	6 (19.4)	5/1	1.67	0.13-21.20	0.69	1.88	0.043-81.83	0.74
Unknown or HPV 11	22 (71.0)							
Viral Load HPV 11								
< 194 copies/cell (ref)	3 (9.6)	2/1	1.00	-	-	1.00	-	-
≥ 194 copies/cell	2 (6.4)	1/1	0.50	0.13-19.56	0.72	0.58	0.12-27.14	0.78
Unknown or HPV 6	26 (83.8)							

<sup>a</sup>Adjusted for age of the children (continuous) and age of the mother (categorical ≤ 23 or >23 years). <sup>b</sup>GERD: gastroesophageal reflux disease. <sup>c</sup>Other comorbidities: epilepsy, hyperthyroid, functional murmur. <sup>d</sup>Else = 2 cases 6/11 detected by hybridization and one HPV 6 co-infected by genotype 6 and 30.

When we considered clinical variables related to the delivery of the affected child (table 6b), we found the following trends. Premature birth was associated with less severe disease after adjustment for age (adjusted OR: 0.46 [0.20-10.67]). The presence of vulvar condylomas at delivery or of LSIL (Low grade squamous intraepithelial lesion) on cervical cytology during pregnancy also increased the risk for severity (adjusted OR: 1.71 [0.17-17.05]). Vaginal laceration was also associated with more severe cases (adjusted OR: 4.37 [0.15-124.75]). Potential association with other markers of abrasion during the delivery such as labor duration, membrane rupture or the use of forceps or vacuum could not be calculated due to the absence of cases in some cells of the 2x2 tables.

#### Risk factors for severity related to viral characteristics

A trend was found between severity of disease and overall HPV viral load (table 6a). The age-adjusted odds ratio for HPV viral load was 7.40 [0.35-155.25]. Stratified OR according to genotype revealed different results for HPV6 and 11. We used the median HPV viral load value to set our cut-off for the association analyses. High viral load for genotype 6 remained associated with severe disease (adjusted OR 1.88 [0.043-81.83]) in opposite to high levels of HPV11 (adjusted OR 0.58 [0.12-27.14]). HPV11 viral load thus seemed to confer a protective effect for severity. These analyses were limited by the small number of non-severe cases (n=2 for each types). Nevertheless, these two non-severe cases for HPV6 had viral loads <250 copies per cell while 5 of 7 severe cases had viral loads above that level.

**Table 6b: Odds Ratio for disease severity according to the mother history at delivery**

<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>	<b>Severe/ Non severe</b>	<b>Crude OR</b>	<b>CI</b>	<b>p</b>	<b>Adjusted<sup>a</sup> OR</b>	<b>CI</b>	<b>p</b>
<b>Condylomas at delivery</b>								
Yes	7 (22.6)	5/2	1.79	0.24-13.22	0.57	1.71	0.17-17.05	0.65
No (ref)	12 (38.7)	7/5	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	12 (38.7)							
<b>Premature birth</b>								
Yes	3 (9.7)	2/1	1.14	0.77-16.95	0.92	0.46	0.20-10.67	0.63
No (ref)	11 (35.5)	7/4	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	17 (67.7)							
<b>Premature membrane rupture<sup>b</sup></b>								
Yes	4 (12.9)	2/2	n/a		n/a	n/a		n/a
No (ref)	6 (19.4)	6/0	1.00		-	-		-
Unknown	21 (67.7)							
<b>Duration of labor</b>								
≥10 hours	4 (12.9)	2/2	n/a		n/a	n/a		n/a
<10 hours (ref)	5 (16.1)	5/0	1.00		-	-		-
Unknown	22 (70.1)							
<b>Forceps or vacuum</b>								
Yes	7 (22.6)	4/3	n/a		n/a	n/a		n/a
No (ref)	6 (19.4)	6/0	1.00		-	-		-
Unknown	18 (58.0)							
<b>Episiotomy</b>								
Yes	9 (29.0)	6/3	n/a		n/a	n/a		n/a
No (ref)	3 (9.7)	3/0	1.00		-	-		-
Unknown	19 (61.3)							

**Table 6b: Odds Ratio for disease severity according to the mother history at delivery**

<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>	<b>Severe/ Non severe</b>	<b>Crude OR</b>	<b>CI</b>	<b>p</b>	<b>Adjusted<sup>a</sup> OR</b>	<b>CI</b>	<b>p</b>
Vaginal lacerations								
Yes	4 (12.9)	3/1	1.00		1.00	4.37	0.15-124-75	0.39
No (ref)	8 (25.8)	6/2	1.00	0.06-15.99	-	1.00	-	-
Unknown	19 (61.3)							
Combined complications <sup>c</sup>								
Yes	10 (32.3)	5/5	n/a		n/a	n.a		n/a
No (ref)	2 (6.4)	2/0	1.00	-	-	-	-	-
Unknown	19 (61.3)							

<sup>a</sup> Adjusted for age of the children (continuous) and age of the mother (categorical  $\leq 23$  or  $> 23$  years) . <sup>b</sup>Rupture of membranes at least one hour prior to the onset of labor.

<sup>c</sup> Combined variable define as usage of forceps or vacuum, had vaginal lacerations or episiotomy.

### Risk of severe disease related to host's genetic characteristics

Our results from selected HLA class II alleles could not demonstrate any increased risk with previously suspected DRB1\*0301 or DQB1\*0201 alleles (Adjusted OR 0.44 [0.26-7.43] and 0.25 [0.01-5.56] respectively) (Table 6c). Additionally, our single case of homozygote for alleles DRB1\*0301 was in fact a non-severe case with a history of only two surgeries. Our results, although not statistically significant, showed an association with the DRB1\*0101 alleles (Adjusted OR 1.90 [0.10-34.90]). HLA-DQB1\*0602 has been suspected of protecting children from RRP acquisition. In our study all severe cases did not have this allele, validating a potential severe disease sparing role for DQB1\*0602 as previously described [25]. We also found a decreasing risk of severity when the activating KIR gene 2DS5 was absent (adjusted OR 0.19 [0.02-2.22]).

### Additional analysis

Considering our small number of patients, we performed additional analysis by adjusting for only one variable at a time (age of the child or age of the mother). Although nearly all of the adjusted ORs remained similar to the crude OR, the precision of the estimate was improved with smaller CI. However, when we adjusted for age of the children only, the relationship between the “history of condylomas during pregnancy” and severity reached clearly statistical significance with an adjusted OR of 8.64 [CI: 1.03-72.20].

**Table 6c: Odds Ratio for severity from selected host's genetics characteristics**

Variables	N (%)	Severe/ Non severe	Crude OR	CI	p	Adjusted <sup>a</sup> OR	CI	p
<b>HLA class II</b>								
DRB1*0301								
Present	4 (12.9)	2/2	0.50	0.05-5.51	0.57	0.44	0.26-7.43	0.57
Absent (ref)	9 (29.0)	6/3	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	18 (58.1)							
DRB1*0101								
Present	4 (12.9)	3/1	2.40	0.18-32.88	0.51	1.90	0.10-34.90	0.67
Absent (ref)	9 (29.0)	5/4	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	18 (58.1)							
DQB1*0201								
Present	3 (9.7)	1/2	0.21	0.01-3.37	0.27	0.25	0.01-5.56	0.38
Absent (ref)	10 (32.3)	7/3	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	18 (58.1)							
DQB1*0202								
Present	1 (3.2)	0/1	n/a		n/a	n/a		n/a
Absent (ref)	12 (38.7)	8/4	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	18 (58.1)							
DQB1*0602								
Present (ref)	2 (6.4)	0/2	1.00		n/a	1.00		n/a
Absent	11 (35.5)	8/3	n/a	-	-	n/a	-	-
Unknown	18 (58.1)							
<b>Selected KIR genes</b>								
2DS1								
Absent	9 (29.0)	4/5	n/a		n/a	n/a		n/a
Present (ref)	5 (16.1)	5/0	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	17 (54.8)							
3DS1								
Absent	10 (32.2)	5/5	n/a		n/a	n/a		n/a
Present (ref)	4 (12.9)	4/0	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	17 (54.8)							
2DSS5								
Absent	10 (32.2)	5/5	0.60	0.12-2.98	0.53	0.19	0.02-2.22	0.19
Present (ref)	5 (16.2)	4/1	1.00	-	-	1.00	-	-
Unknown	16 (51.6)							
<b>HLA and KIR combination<sup>b</sup></b>								
2DS1								
Absent	3 (75.0)	1/2	n.a		n.a	n.a		n.a
Present (ref)	1 (25.0)	1/0	1.00	-	-	1.00	-	-
3DS1								
Absent	3 (75.0)	1/2	n.a		n.a	n.a		n.a
Present (ref)	1 (25.0)	1/0	1.00	-	-	1.00	-	-
2DSS5								
Absent	3 (75.0)	1/2	n.a		n.a	n.a		n.a
Present (ref)	1 (25.0)	1/0	1.00	-	-	1.00	-	-

<sup>a</sup> Adjusted for age of the children (continuous) and age of the mother (categorical ≤ 23 or > 23 years). <sup>b</sup> Among the DRB1\*0301 or DQB1\*0201 positive (n=4)

## **Discussion**

Our data found several trends between risk factors and severe forms of RRP in children: younger age of the child at presentation, younger age of the mother at delivery (< 23 years), being the first born in the family and having a lower socio-economic status. These results are consistent with previous studies [5, 9, 17]. Our data also suggests that female children are at increased risk for severe disease. Another study has shown that RRP may re-occur at an adult age at the time of pregnancy, pointing to a potential role of female hormones and/or down-modulation of immunity in pregnancy [38]. However, it is unclear if hormonal factors could explain gender differences in RRP severity in pre-pubertal children who all have very low levels of sex hormone. This needs to be further evaluated.

A trend was demonstrated between the HPV6 viral load measured in archived formalin-fixed biopsies and the severity of disease. It is possible that lesions exhibiting rapid proliferation leading to airway obstruction and requiring more frequent surgeries also exhibit greater viral replication and shedding, leading to higher viral loads. The correlation between loads of HPV DNA with disease duration, extent of disease and frequency of recurrences was previously demonstrated in genital condylomas [39]

In contrast to other studies [13, 14, 16, 20, 21], we did not find an association between HPV11 and increased severity, although our most severe case with 36 lifetime surgeries (up to the age of 9 years old) was HPV11 positive. Furthermore, two of the three children with diseases spreading down the trachea were also infected by HPV11. It is important to note that the severity definition varies greatly in the RRP literature. Some studies used tracheotomy cases or cases with pulmonary involvement to describe a severe disease [13, 21] . Our definition was inclusive of all cases with at least 10 surgeries or a Derkay score of at least 10. Therefore, we may have included in our severe case category some moderate cases that previous publications would have classified as non-severe. These various definitions may explain some of the discrepancies observed for the associations related to HPV genotypes. Moreover, our study included only five children infected with HPV11, reducing our ability to find differences between HPV genotypes.

As expected, a history of condylomas (cervical or vulvar) during pregnancy and at delivery, was a predictor of severe disease. The infant is probably exposed to a higher viral load in the presence of active lesions during pregnancy and at birth. It is noteworthy that all mothers in our study for whom we had the information on the mode of delivery had given birth vaginally. Although we were not able to estimate an OR between the mode of delivery and the severity of disease, vaginal delivery may play a role in the risk of developing RRP as all RRP (severe or not) in our study were born vaginally. As RRP is very rare, most experts agree that a cesarean section is not warranted in women with condylomas for the sole purpose of preventing RRP. Cesarean sections are not without risks, and exposing all women with condylomas to these surgical risks most probably outweighs the benefits of preventing RRP in the very few that would develop the disease. Moreover, RRP has been reported in children born by cesarean section [5, 26]. However, previous studies on the association between mode of delivery and RRP did not differentiate between elective versus unplanned cesarean section. It is possible that cesarean sections performed after rupture of the membranes or prolonged labor would not be as protective as an elective cesarean section.

A genetic association between the presence of specific HLA class II alleles and RRP severity was previously demonstrated [25]. Our analysis of the host genetic characteristics could not reproduce these findings except for the potential protective role of the DQB1\*0602 allele. Our results also show an association with the presence of the DRB1\*0101 alleles and severe disease. This allele was mildly protective in Caucasians with RRP compared to controls in a previous study [25]. We could also have assessed the mother's HLA class II alleles and performed the analysis of the KIR genes with their corresponding HLA class I ligands, as described in various infectious and autoimmune diseases [40].

Our study has limitations. Many associations found in this study did not reach statistical significance. The most important one was our small sample size, although we included all cases diagnosed with juvenile RRP in our center from 1995 to 2008. Extraction and amplification of some samples could not be performed, thus further limiting our sample size. We recognize that we worked with data from only one center, albeit a tertiary pediatric hospital. Finally, the ethics board at Sainte-Justine Hospital required parental consent for

testing of existing biopsy samples, as prescribed by Québec laws. Hence, older cases could not be reached since coordinates were not always up to date. Nevertheless, RRP is a rare disease with significant impact on the infected patient justifying our report despite a low power.

Our study has several strengths that deserve underlining. First, it is, to our knowledge, the most comprehensive study to date looking at a wide range of clinical, viral and host characteristics to assess determinant of disease severity. Second, we included all cases diagnosed during the study period (1995-2008), from a single institution covering 76% of the cases of the Province of Québec [8]. Thirdly, the risk of misclassification of HPV-related lesion is decreased by the fact that we documented such history from three different sources which were: the children's charts, the mothers' questionnaires and the delivery charts.

This study comprehensively looked at severity factors for juvenile RRP. Our analysis did not identify readily modifiable risk factors for disease severity. For now, health services interventions should continue to focus on support for children with RRP and their families. Young mothers and families with low socio-economic status may especially benefit from measures to facilitate compliance to scheduled surgeries and adjuvant therapies. Immunization programs including protection against HPV genotypes 6 and 11 in teenage girls may potentially reduce disease incidence and/or severity in the next generation of children, when the girls currently being vaccinated reach childbearing age.

### **Authors' Contributions**

Authors respectively contributed to the following elements of the study:

Conception and design: H. Trottier, C. Rodier.

Development of methodology: H. Trottier, C. Rodier. F. Coullée.

Acquisition of data. C. Rodier, A. Lapointe, D. Dal Soglio.

Analysis and interpretation of data: C. Rodier, H. Trottier, F. Coullée, A. Lapointe, M.H. Mayrand, M. Roger.

Writing, review, and/or revision of the manuscript: C. Rodier, H. Trottier, F. Coullée, A. Lapointe, M.H. Mayrand, D. Dal Soglio, M. Roger.

Study supervision: H. Trottier, A. Lapointe.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Louise Laporte from Sainte-Justine Hospital Research Center for her administrative support and help in contacting families and collecting samples. Mrs. Julie Guénoun and Karine Beauchemin at the Notre-Dame Hospital virology laboratory, Montreal, were instrumental in running the molecular testing of our study and Susan Hammond for her reviewing and friendship assistance.

### **Grant support**

This study was supported by an HPV infection and associated diseases team grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). H.T. and M.H.M. received a salary award from the Fonds de la recherche du Québec-Santé.

### **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

C.R. is an employee in the Medical Affairs department of Merck, Montréal, Canada.  
H.T. has served as a consultant on advisory boards and has received speaker fees and travel assistance from Merck, Whitehouse Station, NJ, USA and GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium.  
M.H.M. has received research grants from Merck, Whitehouse Station, NJ, USA and Qiagen, Valencia, CA, USA, through her institution, and honoraria from Merck, Whitehouse Station, NJ, USA and GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium for speaking engagements.  
F.C. has no conflict of interest related directly to this publication but has received research grants from Merck Whitehouse Station, NJ, USA and Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA, through his institution, and honoraria from Merck Whitehouse Station, NJ and Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA for speaking engagements.  
M.R., D.DS. AL. have no conflict of interests to declare.

## References

1. Derkay, C.S. Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 2001. 111(1): p. 57-69.
2. Abramson, A.L., Steinberg, B.M., Winkler, B. Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope*, 1987. 97(6): p. 678-85.
3. Smith, E.M., Johnson, S.R., Cripe, T.P., Pignatari, S., Turek, L. Perinatal vertical transmission of human papillomavirus and subsequent development of respiratory tract papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1991. 100(6): p. 479-83.
4. Silverberg, M.J., Thorsen, P., Lindeberg, H., Grant, L.A., Shah, K.V. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol*, 2003. 101(4): p. 645-52.
5. Wiatrak, B.J., Wiatrak, D.W., Broker, T.R., Lewis, L. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope*, 2004. 114(11 Pt 2 Suppl 104): p. 1-23.
6. Derkay, C.S. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995. 121(12): p. 1386-91.
7. Bishai, D., Kashima, H., Shah, K. The cost of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000. 126(8): p. 935-9.
8. Campisi, P., Hawkes, M., Simpson, K. The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. *Laryngoscope*, 2010. 120(6): p. 1233-45.
9. Reeves, W.C., Ruparella, S.S., Swanson, K.I., Derkay, C.S., Marcus, A., Unger, E.R. National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. 129(9): p. 976-82.
10. Donne, A.J., Hampson, L., Homer, J.J., Hampson, I.N. The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2010. 74(1): p. 7-14.
11. Saumet, L., Damay, A., Jeziorski, E., Cartier, C., Rouleau, C., Margueritte, G. et al. Bronchopulmonary squamous cell carcinoma associated with HPV 11 in a 15-year-old girl with a history of severe recurrent respiratory papillomatosis: a case report. *Arch Pediatr*, 2010. 18(7): p. 754-7.
12. Cook, J.R., Hill, D.A., Humphrey, P.A., Pfeifer, J.D., El-Mofty, S.K. Squamous cell carcinoma arising in recurrent respiratory papillomatosis with pulmonary involvement:

emerging common pattern of clinical features and human papillomavirus serotype association. *Mod Pathol*, 2000. 13(8): p. 914-8.

13. Gerein, V., Rastorguev, E., Gerein, J., Draf, W., Schirren, J. Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 years experience. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005. 132(3): p. 392-4.
14. Rabah, R., Lancaster, W.D., Thomas, R., Gregoire, L. Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatr Dev Pathol*, 2001. 4(1): p. 68-72.
15. Buchinsky, F.J., Donfack, J., Derkay, C.S., Choi, S.S., Conley, S.F., Myer, C.M. et al. Age of child, more than HPV type, is associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. *PLoS One*, 2008. 3(5): p. e2263.
16. Draganov, P., Todorov, S., Todorov, I., Karchev, T., Kalvatchev, Z. Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR Green real-time PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2006. 70(3): p. 469-73.
17. Gabbott, M., Cossart, Y.E., Kan, A., Konopka, M., Chan, R., Rose, B.R. Human papillomavirus and host variables as predictors of clinical course in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(12): p. 3098-103.
18. Carvalho, C.M., Huot, L., Charlois, A.L., Khalfallah, S.A., Chapuis, F., Froehlich, P. Prognostic factors of recurrent respiratory papillomatosis from a registry of 72 patients. *Acta Otolaryngol*, 2009.129(4): p. 462-70.
19. Leung, R., Hawkes, M., Campisi, P. Severity of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis is not associated with socioeconomic status in a setting of universal health care. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2007. 71(6): p. 965-72.
20. Maloney, E.M., Unger, E.R., Tucker, R.A., Swan, D., Karem, K., Todd, N.W. et al. Longitudinal measures of human papillomavirus 6 and 11 viral loads and antibody response in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006. 132(7): p. 711-5.
21. Rimell, F.L., Shoemaker, D.L., Pou, A.M., Jordan, J.A., Post, J.C., Ehrlich, G.D. Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope*, 1997. 107(7): p. 915-8.
22. Armstrong, L.R., Derkay, C.S., Reeves, W.C. Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. RRP Task Force. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1999. 125(7): p. 743-8.

23. Pou, A.M., Rimell, F.L., Jordan, J.A., Shoemaker, D.L., Johnson, J.T., Barua, P. et al. Adult respiratory papillomatosis: human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1995. 104(10 Pt 1): p. 758-62.
24. Bonagura, V.R., Du, Z., Ashouri, E., Luo, L., Hatam, L.J., DeVoti, J.A. et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol*, 2009. 71(2): p. 212-9.
25. Bonagura, V.R., Vambutas, A., DeVoti, J.A., Rosenthal, D.W., Steinberg, B.M., Abramson, A.L. et al. HLA alleles, IFN-gamma responses to HPV-11 E6, and disease severity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol*, 2004. 65(8): p. 773-82.
26. Silverberg, M.J., Thorsen, P., Lindeberg, H., Ahdieh-Grant, L., Shah, K.V. Clinical course of recurrent respiratory papillomatosis in Danish children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004. 130(6): p. 711-6.
27. Feoli-Fonseca, J.C., Oligny, L.L., Filion, M., Brochu, P., Simard, P., Russo, P.A. et al. A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detecting and typing human papillomaviruses in pathological specimens. *Diagn Mol Pathol*, 1998. 7(6): p. 317-23.
28. Coutlee, F., Rouleau, D., Petignat, P., Ghattas, G., Kornegay, J.R., Schlag, P. et al. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGM1 primers and the Linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(6): p. 1998-2006.
29. Koushik, A., Ghosh, A., Duarte-Franco, E., Forest, P., Voyer, H., Matlashewski, G. et al. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detect Prev*, 2005. 29(4): p. 307-16.
30. Gohy, L., Gorska, I., Rouleau, D., Ghattas, G., Pokomandy, A., Vezina, S. et al. Genotyping of human papillomavirus DNA in anal biopsies and anal swabs collected from HIV-seropositive men with anal dysplasia. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2008. 49(1): p. 32-9.
31. Aho, J., Kornegay, J.R., Healey, S., Roger, M., Dion, F., Gaudreault, D. et al. Evaluation of a convenient enzyme immunoassay to assess the quality of genital specimens submitted for the detection of human papillomavirus DNA by consensus PCR. *J Clin Virol*, 2004. 29(2): p. 127-33.
32. Lefevre, J., Hankins, C., Pourreaux, K., Voyer, H., Coutlee, F. Real-time PCR assays using internal controls for quantitation of HPV-16 and beta-globin DNA in cervicovaginal lavages. *J Virol Methods*, 2003. 114(2): p. 135-44.

33. Lefevre, J., Hankins, C., Pourreaux, K., Voyer, H., Coutlee, F. Prevalence of selective inhibition of HPV-16 DNA amplification in cervicovaginal lavages. *J Med Virol*, 2004. 72(1): p. 132-7.
34. Khoudri, S., Villa, L.L., Gagnon, S., Koushik, A., Richardson, H., Matlashewski, G. et al. Viral load of episomal and integrated forms of human papillomavirus type 33 in high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Int J Cancer*, 2007. 121(12): p. 2674-81.
35. Coutlee, F., Trottier, H., Gagnon, S., Koushik, A., Richardson, H., Roger, M. et al. Low-risk human papillomavirus type 6 DNA load and integration in cervical samples from women with squamous intraepithelial lesions. *J Clin Virol*, 2009. 45(2): p. 96-9.
36. Derkay, C.S., Malis, D.J., Zalzal, G., Wiatrak, B.J., Kashima, H.K., Coltrera, M.D. A staging system for assessing severity of disease and response to therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 1998. 108(6): p. 935-7.
37. Hester, R.P., Derkay, C.S., Burke, B.L., Lawson, M.L. Reliability of a staging assessment system for recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2003. 67(5): p. 505-9.
38. Scurry, W.C., Jr. McGinn, J.D. Recurrent respiratory papillomatosis in pregnancy: a case of emergent airway management. *Ear Nose Throat J*, 2008. 87(6): p. E8-11.
39. Che, Y.M., Wang, J.B., Liu, Y.H. Correlation between deoxyribonucleic acid loads of human papillomavirus and recurrence of condylomata acuminata. *Int J STD AIDS*, 2005. 16(9): p. 605-7.
40. Parham, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(3): p. 201-14.

## Chapitre 5. Analyse des variantes moléculaires

Le génome du VPH est relativement simple et consiste en 8000 paires de bases (pb), à double brins circulaires d'ADN [13]. Il est constitué de trois régions distinctes. La région régulatrice LCR, la région des gènes E1-E8 qui code pour les protéines précoces (ou *early*) et la région des gènes L1 et L2 qui code pour les protéines de la capsid (ou *Late*). La séquence des nucléotides localisés dans la section du LCR du génome constitue des sites de liaison des facteurs de transcription qui sont responsables de l'expression et de la réplication des gènes [54]. Des études antérieures ont montré la présence de variantes moléculaires pour les isolats d'un même VPH pour le génotype 16 et qui se distinguaient par un profil plus agressif et oncogène au niveau du col de l'utérus [55, 56]. Dans le but de découvrir si une diversité du génome pourrait être associée à une évolution plus sévère de la papillomatose, nous avons comparé les séquences de nucléotides en vérifiant leur hétérogénéité avec la séquence du clone de référence VPH 6b (numéro d'accèsion X00203) et VPH 11 (numéro d'accèsion M14119) obtenues de la GenBank (Los Alamos, National Laboratory, USA).

L'amplification et le séquençage ont été réussis pour 15 isolats de biopsies durant la période d'observation. Aucun des isolats ne correspondait à la séquence de référence LCR. Un total de sept variantes a été trouvé pour le génotype 6 et six variantes pour le génotype 11. Le tableau I (p. 49) montre les isolats identifiés et le nombre de mutations respectives pour les VPH 6 et 11. Entre deux et 39 mutations ont été observées pour les isolats VPH 6 (moyenne 21.86, écart-type (SD)  $\pm$  13.91). Entre une et neuf mutations ont été observées pour le VPH 11 (moyenne 5.0 SD  $\pm$  2.76). La fréquence des variantes était similaire entre les deux génotypes avec une fréquence de mutation de 1.14 SD  $\pm$  0.38 pour VPH 6 et 1.17 SD  $\pm$  0.41 pour le VPH 11.

**Tableau I : Caractéristiques des variantes moléculaires des spécimens VPH 6 et 11**

Isolat #	VPH 6	Variantes LCR	Nb total variations	Fréquence	Statistiques
2	1	MTL-LCR06-01	27	1	
5	1	MTL-LCR06-02	27	1	Médiane de mutations: 27
24	1	MTL-LCR06-05	39	1	Moyenne mutations: 21.86
17	1	MTL-LCR06-09	3	1	Écart type (SD): 13.91
20	1	MTL-LCR06-06	2	1	
22	1	MTL-LCR06-07	28	1	Médiane de fréquence: 1
16	1	MTL-LCR06-08	27	2	Moyenne de fréquence: 1.14
19	1	MTL-LCR06-08	27	2	Écart type (SD): 0.38

Isolat #	VPH 11	Variantes LCR	Nb total variations	Fréquence	Statistiques
13	1	MTL-LCR11-02	6	1	Médiane de mutations: 5.5
21R	1	MTL-LCR11-03	5	1	Moyenne mutations: 5
21A	1	MTL-LCR11-01	6	2	Écart type (SD): 2.76
21M	1	MTL-LCR11-04	3	1	
25	1	MTL-LCR11-05	9	1	Médiane de fréquence: 1
26	1	MTL-LCR11-01	6	2	Moyenne de fréquence: 1.17
41	1	MTL-LCR11-06	1	1	Écart type (SD): 0.41

Isolat 21 : A= ancienne biopsie, M= biopsie médiane, R= récente biopsie disponible.

Dans l'ensemble, deux patients étaient infectés par la même variante moléculaire de VPH 6 (MTL-LCR06-08) et deux patients étaient infectés par la même variante moléculaire de VPH 11 (MTL-LCR11-01). La majorité des mutations représentent une mutation d'une seule paire de base (figure 1, p. 50). Pour les isolats de VPH 6, la variante MTL-LCR06-05 possède trois insertions de plusieurs pb soient de 4pb, 5pb et 11pb situées dans le segment 5' de la séquence LCR (figure 2, p. 51).



**Figure 2: Insertions et délétions des paires de bases des variantes de MTL-LCR 06**

Segment LCR	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	Ctl	Ctl	
	17334	17335	17337	17339	D7349	D7351	17354	D7362	17363	D7366	D7367	D7371	17374	17377	17378	D7379	17384	17386	17390	17417	17419	17420	D7653	17654
(6B) X00203					G	G		G			A					T							G	
(6a) L41216*																								
(6vc) AF092932											19 pb													
mutation	5 pb	G	TG	4 pb			AC T		AT				A/ G		G		T	AT	GT	A	TA	11 pb		A
MTL-LCR06-01							AC T		AT				A	A	G		T	AT						A
MTL-LCR06-02													G				T		GT					
MTL-LCR06-05	5 pb	G	TG	4 pb																A	TA	11 pb		
MTL-LCR06-06																								
MTL-LCR06-07													G				T		GT					
MTL-LCR06-08													G				T		GT					
MTL-LCR06-09																								A

I = Insertion D = Délétion, pb: paire de bases

5 pb = TTATA 4 pb = TATA 11 pb = ATTATTGTAT Ctl: segment LCR central.

Les zones grises indiquent une mutation. Les nucléotides en rouge représentent une insertion ou délétion de multiples nucléotides

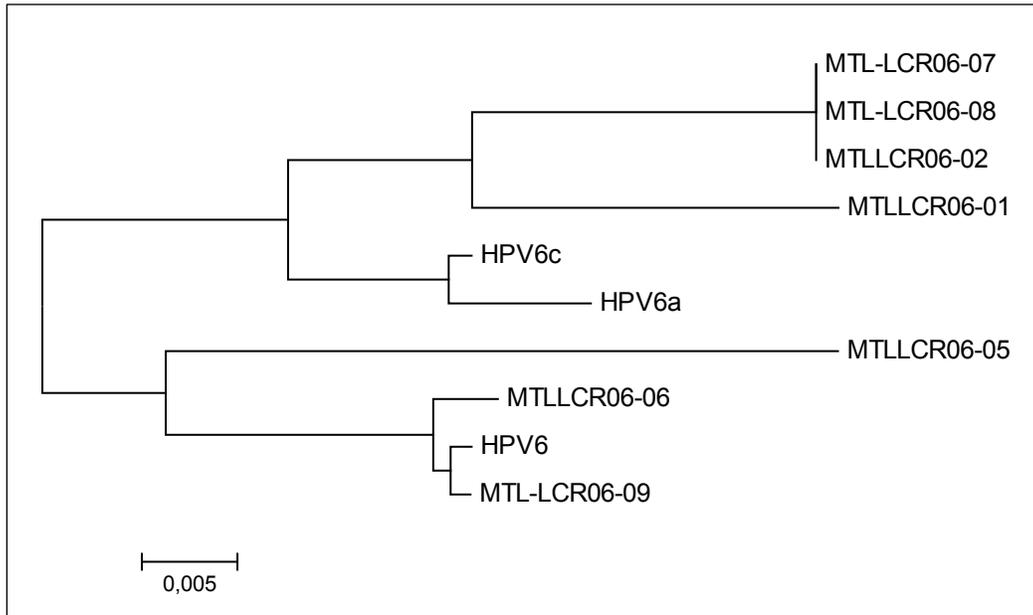
\* Contient aussi une insertion de 14 pb après n.t. 7514.

De façon intéressante, six variantes VPH 6b sur sept avaient une mutation dans la portion terminale du segment 5' (nucléotides 7524 à 7606). Aucun de ces nucléotides ne correspond à des sites de facteurs de transcription spécifique avec un rôle biologique connu [54]. Cinq isolats de biopsie avaient une mutation au premier site de liaison E2 (protéines précoces E2) de la région LCR au nucléotide (n.t.) 7654. Cette région correspond cependant à la région spécifique *epithelium-specific-enhancer* du VPH 6 [42] et serait possiblement responsable du tropisme pour un épithélium particulier, mais le mécanisme et le rôle de cette spécificité épithéliale ne sont pas encore élucidés [54]. Seulement deux patients avaient une mutation dans la région équivalente centrale pour le génotype 11. Le gène E2, quant à lui, code pour la séquence spécifique de liaison des protéines, règle l'expression des gènes viraux et est nécessaire aussi pour la réplication virale.

Il existe à ce jour deux sous-types de VPH 6, VPH 6a et VPH 6vc, en comparaison au prototype VPH6b [57]. Les séquences des sous-types 6a et 6vc sont également disponibles à la banque centralisée Genbank (numéro d'accèsion L41216 et AF 092932 respectivement). Nous avons regardé si nos variantes découvertes étaient associées davantage à une des séquences non-prototypique 6a et 6vc tel que précédemment observés [57]. Aucun de nos spécimens n'était équivalent aux séquences du LCR des isolats de référence des sous-types 6a et 6vc. Même si jusqu'à dix mutations ponctuelles correspondaient au sous-type 6vc dans nos isolats, l'analyse phylogénique construite démontre que les variantes identifiées ne se ségrégaient pas avec les sous-types 6a ou 6vc (figure 3, p. 53). Le maximum de diversité génomique observée est de 3% entre les variantes LCR06-05 et LCR06-02.

Pour le VPH 11, nous avons séquencé la même longueur de segment (nombre de nucléotides) que pour le VPH 6. L'analyse des variantes moléculaires du VPH 11 révèle aussi de l'hétérogénéité dans la séquence du génome de la section LCR, mais dans une magnitude moins grande que les patients qui sont infectés avec le génotype 6. Comparativement à la séquence de référence du génotype 11 (numéro d'accèsion M14119), six variantes ont été identifiées. Les mutations ont été reconnues à neuf positions génomiques distinctes. Les mutations ponctuelles étaient rares avec un maximum de trois. Il y a deux délétions et quatre insertions et aucune avec plusieurs pb.

**Figure 3: Arbre phylogénique MTL-LCR 06**



La figure 4 (p. 54) montre les mutations spécifiques de la région LCR chez les patients affectés avec le génotype 11. Contrairement aux variantes MTL-LCR06, les nucléotides mutés présentaient un seul remplacement d'un nucléotide par un autre. Par exemple, toutes les mutations du nucléotide 7479 consistaient en un changement de cytosine (c) pour thymine (t). La majorité des mutations (sept sur neuf) ont survécu dans la région 5' du segment LCR. Deux insertions surviennent dans la région centrale et aucune dans la région du site de liaison des protéines E2 pour le génotype 11.

**Figure 4: Mutations génomiques pour les variantes MTL-LCR 11**

LCR segment	5'	5'	5'	5'	5'	5'	5'	Ctl	Ctl
	7413	7479	7547	D7506	D7509	17575	17584	17718	17719
<b>M14119</b>	A	C	T	T	T				
<b>mutation</b>	C	T	C			C	C	G	C
<b>MTL-LCR11-01</b>	C	T	C			C		G	C
<b>MTL-LCR11-02</b>	C	T	C			C	C		
<b>MTL-LCR11-03</b>	C	T	C				C		
<b>MTL-LCR11-04</b>	C	T							
<b>MTL-LCR11-05</b>	C	T	C			C	C	G	C
<b>MTL-LCR11-06</b>	C								

I = Insertion D = Délétion

Ctl: segment LCR central. Les zones grises indiquent une mutation

Comme nous avons pu le constater dans le tableau I (p. 49), trois biopsies étaient disponibles de la part d'un même patient. Ces biopsies ont été prises en 2004, 2006 et 2007. Il a été surprenant de noter que trois variantes moléculaires ont été découvertes pour ce même patient. Ce phénomène ne correspond pas à la littérature qui montre une évolution très stable du polymorphisme de VPH 16 et 18 à travers le temps. Aucune étude à notre connaissance n'a recueilli plusieurs isolats de papillomatose respiratoire pour les VPH 6 et 11 sur une longue période de suivi. Nous croyons que le fait d'obtenir plusieurs variantes pour un même cas pourrait représenter une suite d'événements et de mutations au cours de l'évolution de la maladie caractérisée par un cycle cellulaire de réplication rapide ou par les traitements physique ou chimiques administrées [26]. Une autre explication possible serait que les isolats soient composés d'un mélange ou de variantes moléculaires dans les papillomes. Ce phénomène reste encore à être élucidé avec des études longitudinales.

## **Chapitre 6. Discussion**

### **6.1 Retour sur les résultats**

Dans notre étude, nous avons identifié que certains facteurs sociodémographiques pourraient être associés avec une manifestation plus sévère de papillomatose laryngée juvénile. Les déterminants tels que le jeune âge de l'enfant, le jeune âge de la mère (< 23 ans) et le fait d'être le premier-né, étaient associés à un pronostic de maladie moins favorable. Même si aucune de ces variables étaient significatives à cause de notre petite taille d'échantillon (n=31), ces résultats corroborent avec les observations faites dans plusieurs autres études sur la papillomatose [10, 11, 26]. Le jeune âge de l'enfant est associé à de plus petites voies respiratoires et les médecins planifient très souvent des interventions chirurgicales plus rapprochées pour garder les voies aériennes dégagées. Dans notre étude, le risque de maladie sévère était sept fois plus grand si la mère était plus jeune que 23 ans. Ce résultat s'explique par le fait que l'âge de la mère est également relié aux infections VPH. Le pic d'infection au Canada est d'ailleurs entre 20-24 ans [58]. Un premier-né est souvent un proxi d'un âge plus jeune de la mère. Après ajustement pour l'âge, le fait d'être le premier-né de la famille augmentait le risque de maladie sévère de plus de trois fois. Dans notre étude, un autre facteur sociodémographique associé avec la sévérité était le faible niveau socioéconomique. Le risque de maladie sévère est cinq fois plus élevé chez les mères qui déclaraient avoir un niveau économique plutôt faible. Quoique cette conclusion varie dans la littérature selon le pays et l'accès aux soins de santé [27], nous avons effectivement observé que certaines mères qui avaient répondu avoir « plutôt un faible revenu » dans le questionnaire avaient parfois une plus grande difficulté à gérer la maladie. Ceci pourrait s'exprimer notamment par des chirurgies manquées et une plus faible fidélité aux traitements adjuvants.

Certains paramètres cliniques de la mère se sont également avérés des facteurs de risque importants de la sévérité de la papillomatose. Une histoire de condylomes (au col ou à la vulve) chez la mère était associée à une maladie plus sévère. Après ajustement pour l'âge de

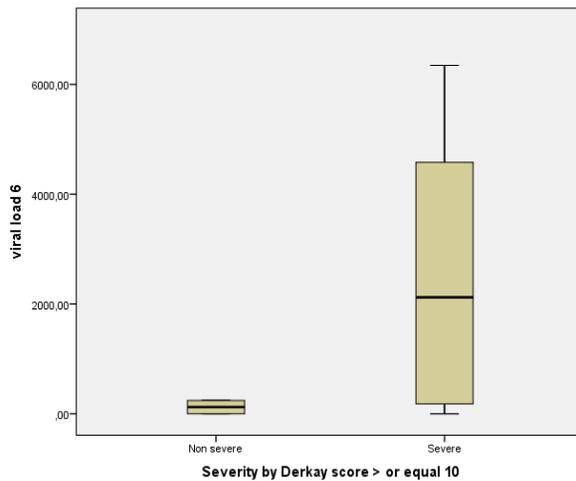
la mère et de l'enfant, ce risque était 12 fois plus élevé. Le lien entre les condylomes de la mère durant la grossesse et l'acquisition de papillomatose juvénile est bien reconnu dans la littérature, mais une seule étude à ce jour avait corroboré le lien avec une maladie plus sévère [10]. Avec les données brutes, l'histoire de condylomes de la mère est en fait le seul déterminant statistiquement significatif de notre étude. Une analyse supplémentaire montre aussi une association statistiquement significative lorsque l'on corrige pour l'âge de l'enfant seulement (cf. annexe 5, tableau I, p. xxx). Dans notre étude, si la mère avait des condylomes à l'accouchement, le risque était encore présent avec un RC ajusté de 1.71 (0.17-17.05). Malgré ce lien évident avec les condylomes maternels (durant la grossesse ou présent à l'accouchement), les césariennes électives ne sont pas préconisées comme intervention, et ce principalement parce que le nombre de césariennes à réaliser seraient trop important proportionnellement au nombre de cas de papillomatose qui pourrait être prévenus. De plus, les césariennes ne sont pas complètement protectrices [10, 59]. Malheureusement, nos résultats ne nous ont pas permis de vérifier l'hypothèse que les variables associées au frottement et à l'abrasion prononcée lors de l'accouchement seraient reliées à une maladie plus sévère. Les variables telle qu'une durée de travail de plus de dix heures, le recours aux forceps ou à la ventouse ainsi que la rupture prématurée des membranes n'ont pu être calculées suite à la présence de cellules vides. Même en attribuant une petite valeur aux cases vides, aucun risque n'a pu être calculé avec la sévérité. La seule complication qui a montré une association était la présence de déchirures vaginales ou périnéales lors de l'accouchement. Le risque de maladie sévère était alors augmenté de plus de quatre fois. À notre connaissance, c'est la première fois que cette association a été montrée avec la sévérité de la papillomatose et demeure à être validée avec un plus grand échantillon de patients.

Étant donné une incidence relativement faible de la PRR juvénile (en contraste avec la forte prévalence des VPH 6 et 11 chez les femmes en âge de procréer), les facteurs de l'hôte sont fortement soupçonnés de jouer un rôle dans l'acquisition et la sévérité de la maladie. Nos résultats n'ont pas été en mesure cependant de montrer une association avec les HLA de classe II précédemment identifiés dans la littérature et un pronostic moins favorable de RRP [23]. Dans notre étude, seulement la présence de l'allèle de classe II DRB1\*0101 augmentait le risque de sévérité de près de deux fois après ajustement pour l'âge. En effet, 37.5% des cas

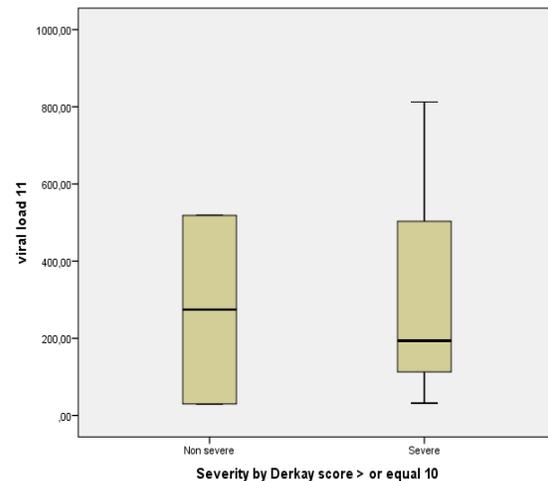
sévères (n=3) avaient cet allèle contre 12.5% (n=1) dans notre groupe non sévères (table 6c, p. 39). L'allèle DRB1\*0101 est fortement associé à une maladie auto-immune chez l'enfant et l'adulte, soit l'arthrite rhumatoïde. Un autre allèle enrichi pour l'arthrite rhumatoïde chez les caucasiens est le DRB1\*0401. Dans notre population, deux cas sévères possédaient cet allèle par opposition à aucun cas non sévère. La papillomatose tout comme l'arthrite rhumatoïde ont en commun un déficit en cytokines interleukine-2 et en interféron- $\gamma$  [60, 61]. Il est certes possible que dans notre population en grande partie caucasienne, les allèles DRB1\*0101, DRB1\*0401 jouent un rôle dans le dérèglement de ces cytokines du groupe Th1 (*T Helper cells type 1*) et qui sont responsables des réponses pro-inflammatoires et antivirales. L'analyse des autres facteurs de l'hôte, tel que les récepteurs KIR, n'a pu montrer une association avec la sévérité de la maladie, sauf un effet protecteur non significatif lorsque le gène 2DS5 était absent. Davantage d'études seraient requises pour mieux comprendre le mécanisme immunitaire impliqué dans la progression de la PRR juvénile.

Parmi les facteurs viraux, la charge virale a été très peu étudiée dans la papillomatose. Nos analyses ont montré que lorsque les valeurs de charge virale des deux types étaient combinées, le RC était sept fois plus élevé chez les patients dont la charge virale était supérieure à la valeur médiane avec un RC de 7.40 [0.35-155.25]. Cependant, étant donné le risque de sévérité distinct dans notre population pour le VPH 6 et pour le VPH 11 (figures 5a et 5b, p. 58), nous avons fait des analyses stratifiées pour les génotypes 6 et 11 séparément. Celles-ci sont d'autant plus justifiées que les valeurs de charge virale du VPH 6 sont considérablement plus élevées que les charges virales du VPH 11 (figure 6, p. 58). Les nouveaux RC obtenus révèlent bien l'interaction provoquée par le génotype. Le RC ajusté était de 1.88 pour le VPH 6 [0.043-1.88] et de 0.58 [0.12-27.14] pour le VPH 11. Seule la charge virale pour le VPH 6 conservait une tendance pour un risque pratiquement doublé.

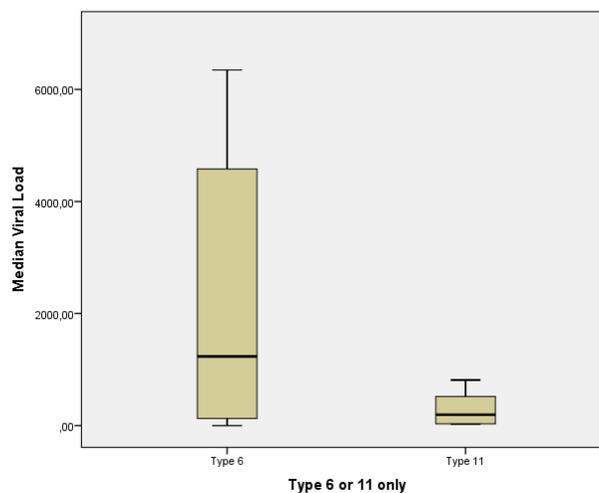
**Figure 5a : Charge virale VPH 6 selon la sévérité**



**Figure 5b : Charge virale VPH 11 selon la sévérité**



**Figure 6 : Charge virale VPH 6 et 11**



En tant que facteur viral, le génotype de VPH a été largement étudié. Même si plusieurs études montrent une maladie plus grave lorsque le VPH 11 est en cause, nos résultats n'ont pu montrer cette association. En fait, nos analyses montrent plutôt l'inverse avec un risque de sévérité diminué de 41 % lorsque le VPH 11 est détecté. Le VPH 6 est en général plus prévalent dans la papillomatose récurrente. Dans notre étude, nous avons trois fois plus de cas de VPH 6 que de 11 (n=18 vs n=6). Nous soupçonnons que nos résultats soient affectés par notre définition de sévérité qui est possiblement plus large que celle souvent utilisée. En

effet, notre recherche de littérature montre que même si l'échelle sévérité de Derkay est validée et publiée, la grande majorité des études n'utilise pas cette échelle puisque le processus d'évaluation des valeurs anatomiques pour chaque chirurgie est long et fastidieux. Dans notre population, 61.3% de nos cas se qualifient comme sévères. Ceci représente un pourcentage généralement plus élevé que ce qui est souvent rencontré dans la littérature [15, 18]. Nous avons donc entrepris de refaire quelques analyses en utilisant des critères de sévérité qui traduisent davantage une maladie agressive ou un risque de progression distale.

## **6.2 Analyses additionnelles en variant la définition de la variable dépendante**

La trachéotomie est souvent un indicateur de sévérité [15, 20]. Dans notre étude, nous n'avons aucun cas de trachéotomie, notamment parce qu'il s'agit d'une option de dernier recours, que les oto-rhino-laryngologistes du CHU Sainte-Justine souhaitent éviter à tout prix. Ce critère n'a donc pu être utilisé pour décrire nos cas plus sévères dans notre population. En utilisant la définition « agressif », telle que parfois utilisée et qui est décrite comme: trois chirurgies et plus par année et/ou une progression distale en sous-glottique [16, 26, 62], le nombre de cas sévères chuterait à 45.2%. Au moins cinq cas (16%) ne seraient donc plus considérés comme sévères par comparaison avec nos analyses initiales, bien que certains de ces enfants aient eu jusqu'à sept chirurgies en 60 mois. Avec cette définition, nos résultats sont demeurés similaires pour la presque majorité des facteurs de risque identifiés (cf. annexe 5, tableaux I, II et III, p. xxx-xxxiv). Le jeune âge de l'enfant et de la mère ainsi que le rang de naissance sont tous les trois demeurés des déterminants de sévérité. Une association moins forte, mais quand même présente, a été mesurée pour les variables suivantes: faible statut économique, condylomes durant la grossesse et condylomes à l'accouchement. Pour ce qui est des facteurs de l'hôte, le risque de maladie agressive en présence du HLA de classe II DRB1\*0101 n'était plus augmenté avec cette nouvelle définition, mais demeurait deux fois plus grand lorsqu'un des deux allèles HLA DRB1\*0101 ou DRB1\*0401 étaient présents (cf. annexe 5, tableau I p. xxx). Parmi les caractéristiques virales, la charge virale demeurait prédictive d'une maladie agressive avec un risque augmenté de plus de sept fois. Le VPH 11 et une naissance prématurée montraient aussi un effet protecteur. Il a été rassurant de voir que

ces analyses supplémentaires avec une définition différente de la sévérité confirment pratiquement les mêmes déterminants de sévérité que nous avons précédemment identifiés.

Plusieurs histoires de cas et études suggèrent que le génotype 11 est associé à l'incidence de transformation maligne [18, 63-65]. Étant donné qu'il n'y a pas eu de cas de transformation maligne dans notre échantillon durant la période 1995-2008, nous n'avons pas été en mesure de mesurer cette association. Le rôle joué par le VPH 11 dans le processus carcinogène n'est pas encore entièrement élucidé [66]. Contrairement aux génotypes oncogènes 16 et 18 associés au niveau des carcinomes cervicaux, il n'a pas été démontré que le VPH 11 inactive les protéines suppressives antitumorales p53 et pRb qui interfèrent dans la croissance cellulaire [66]. Des mutations spécifiques pouvant expliquer les propriétés carcinogènes demeurent à être démontrées pour la PRR juvénile.

Des variations intra sous-types ont été observées dans notre étude lors de l'analyse des variantes moléculaires. Ces variations sont plus nombreuses pour le VPH 6 que pour le VPH 11. Au total, nous avons identifié sept nouvelles variantes moléculaires pour le VPH 6 et six pour le VPH 11. Bien qu'une variation spécifique de la région centrale responsable du premier site de liaison de protéines E2 du segment LCR se retrouve auprès de cinq nouvelles variantes, aucune association n'a pu être montrée avec la sévérité. De plus, l'impact de cette variation simple d'un nucléotide (adénine) au site de liaison de protéine E2 sur la réplication demeure à être démontré par des expériences *in vitro*.

Nous concluons que la sévérité de la maladie serait le résultat d'une combinaison de déterminants qui favoriseraient la réplication et la croissance cellulaire. Une contamination massive durant la grossesse et ou à la naissance ainsi qu'un état immunitaire fragilisé chez un enfant très jeune qui arbore de plus petites voies respiratoires seraient annonciateurs d'un moins bon pronostic.

## 6.3 Limites et sources de biais

### 6.3.1 Précision

La petite taille d'échantillon affecte la précision des estimés. Il est impossible d'écarter le rôle de la chance dans l'interprétation des résultats. Par contre, nous avons analysés tous les cas diagnostiqués au CHU Sainte-Justine entre 1995 et 2008. Il a été jugé préférable d'analyser ces cas en connaissant la limite de puissance plutôt que de ne pas analyser cette maladie très morbide.

### 6.3.2 Biais de sélection

Un des avantages de notre étude est que l'ensemble des cas incidents durant la période 1995-2008 a été trié par au moins deux reviseurs. Les 31 cas retenus étaient tous des cas confirmés en pathologie de papillomatose sur une liste initiale de 49 cas. Les raisons principales d'exclusion étaient que les enfants souffraient d'un autre type de tumeur laryngée tel que tératome ou schwannome, ou si les enfants avaient eu un diagnostic avant 1995 ou après 2008. Par contre, nous n'avons pas obtenu le consentement de 14 familles pour l'accès au bloc de biopsies et à l'échantillon de salive. Dix cas n'ont simplement pas été rejoints. Un autre cas était en attente de tuteur légal et la protection de la jeunesse préférerait ne pas signer le consentement à l'étude. Seulement trois familles ont refusé. Parmi l'ensemble des cas qui n'ont pas signé le consentement, six cas étaient non sévères et huit cas sévères ( $p=0.679$ ). Seulement quelques cas ( $n=3$ ) avaient reçu une première chirurgie dans des centres non spécialisés, puis avaient été référés à notre centre lorsque la maladie a présenté des récurrences. Il est possible que les cas très légers, non sévères nécessitant une ou deux chirurgies soient sous représentés dans notre échantillon dans les cas où ils ne seraient pas tous référés dans un centre tertiaire. Cependant, une étude canadienne [1] confirme après avoir sondé les oto-rhino-laryngologistes, que virtuellement tous les cas juvéniles de PRR seraient suivis dans les centres tertiaires. Nous croyons donc avoir identifié l'ensemble des cas éligibles et limité les biais de sélection.

### 6.3.3 Biais d'information

#### *A. Biais de rappel*

Certaines données ont été auto rapportées en rétrospective dans le questionnaire rempli et retourné par la mère. Ainsi, un biais de rappel potentiel doit être considéré. Néanmoins, il y a peu de chance que la mère ne se souvienne pas de sa condition économique ou du type d'accouchement à la naissance de l'enfant. L'histoire de cytologie anormale au col de l'utérus et de condylomes rapportés par la mère pourrait être différentielle entre les cas sévères et non sévères, mais puisque cette information est captée aussi dans le dossier de l'enfant et dans le dossier d'accouchement, le biais de rappel est ainsi minimisé.

#### *B. Erreur de classification*

Dans notre étude, les erreurs de classification sont minimisées puisque les données proviennent de sources objectives telles que les rapports opératoires et les dossiers médicaux. L'échelle anatomique validée de Derkay a été utilisée pour évaluer les lésions et les résultats ont été révisés par une oto-rhino-laryngologiste. Il est donc peu probable que les cas aient été mal classifiés dans leur définition de sévérité. Les mêmes procédures de laboratoire ont été effectuées pour les deux groupes et les techniciens étaient aveugles au fait que les échantillons étaient des cas sévères ou non sévères.

#### *C. Données manquantes*

Des valeurs manquantes ont été identifiées pour plusieurs variables cliniques et sociodémographiques. Deux questionnaires n'ont pu être retournés par les mères, puisqu'elles n'avaient plus la garde légale et trois dossiers d'accouchement n'ont pas été récupérés puisqu'ils venaient de l'extérieur du Canada. Dans certains cas, des échantillons n'ont pu être amplifiés et les analyses moléculaires et génétiques n'ont pu être faites souvent à cause de l'âge ou de la qualité du spécimen. Ce manque d'information n'est toutefois pas différentiel à la sévérité de la maladie.

#### 6.3.4 Biais de confusion

Comme il s'agit d'une étude observationnelle, il y a un potentiel important de biais de confusion. Le premier rang de naissance par exemple est facilement expliqué par le jeune âge de la mère. Nous avons donc ajusté pour l'âge maternel nos régressions logistiques. Il est également possible que les oto-rhino-laryngologistes soient plus agressifs dans la cédula des chirurgies chez les plus jeunes enfants. Ceci pourrait avoir un effet sur l'évolution de la maladie et le nombre total de chirurgie. Nous avons donc tenu à ajuster l'ensemble des rapports de cotes pour l'âge de l'enfant dans nos analyses étant donné la forte association avec la sévérité de la maladie.

## **Chapitre 7. Conclusion**

### **7.1 Portée en santé publique**

La PRR est encore méconnue au Canada, en partie en raison de son incidence relativement faible. Pourtant, elle est pratiquement aussi fréquente que l'infection invasive à méningocoque de type C et l'hépatite A qui mobilisent la vigie et des interventions de la santé publique. Force est de constater, dans ce mémoire, la grande morbidité et le fardeau psychosocial qu'impose la PRR juvénile. Les enfants atteints des formes sévères doivent subir de nombreuses chirurgies parfois urgentes, jumelées à des thérapies vocales pour préserver une qualité de la voix. Des complications peuvent parfois se présenter. Deux décès sont survenus dans ces dernières années à l'hôpital de Montréal pour Enfants suite à des transformations malignes. Mieux connaître les déterminants d'un pronostic défavorable est donc justifié afin de proposer des interventions rapides de traitements ou de prévention.

Notre recherche montre qu'un niveau économique plutôt faible et un âge jeune (<23 ans) de la mère seraient associés à la sévérité de PRR. Les jeunes mères et les familles avec un niveau socioéconomique faible pourraient profiter particulièrement de mesures de soutien qui les aident à respecter les plans de chirurgie, de thérapies adjuvantes et de thérapie vocale. La nature et les caractéristiques des besoins restent encore à être mieux définies.

Une découverte intéressante est que la charge virale, en particulier celle du VPH 6, semble montrer un rôle important dans la progression de la maladie. Bien que nos résultats demeurent à être validés dans des études avec un plus grand nombre de patients et idéalement avec un suivi longitudinal suffisant, ceux-ci suggèrent que, en l'absence de traitement adéquat, l'approche agressive de chirurgies répétées est encore à préconiser pour réduire au maximum la réplication cellulaire des papillomes. Des résultats semblent encourageants suite à l'utilisation de médicaments antiviraux injectés localement, mais leur innocuité à long terme demeure à être démontrée [68]. Comme la charge virale pour nos cas de VPH 11 est

considérablement plus basse que celle du VPH 6, nous soupçonnons que les génotypes 6 deviennent sévères d'avantage à cause de leur grande prolifération cellulaire. Le VPH 11 tel que bien décrit dans la littérature, serait associé plus fréquemment à des transformations malignes. A cet effet, plusieurs déterminants seraient impliqués dans la PRR juvénile et joueraient possiblement différents rôles selon le génotype de VPH, l'âge de l'enfant et les facteurs immunitaires de l'hôte.

### Le rôle de la prévention

Il serait possible de réduire l'incidence de la papillomatose en considérant certaines mesures: même si la maladie est rare, une plus grande connaissance dans la communauté médicale et chez les jeunes filles que les condylomes durant la grossesse peuvent avoir de lourdes conséquences. Des mesures primaires de prévention, telles que l'éducation sur les infections transmises sexuellement et le port adéquat du condom (i.e. avant le début des contacts intimes), peuvent être supportées pour réduire la transmission du VPH. Si un diagnostic de condylomes ou de cytologie anormale est posé en grossesse, les traitements devraient être plus fréquemment envisagés. Les lignes directrices médicales proposent d'ailleurs des médicaments sécuritaires en grossesse [69]. Par contre, la césarienne n'est pas nécessairement une bonne option considérant les risques pour la mère. Afin de détecter une potentielle progression distale aux poumons et des transformations malignes, certaines études [70] et médecins spécialistes de Montréal qui ont malheureusement perdus des enfants suite à une mauvaise évolution de la PRR, recommandent de faire des radiographies pulmonaires chez tous les enfants atteints. Les recherches pour trouver un médicament efficace devraient également être encouragées. Entre-temps, une perspective de réduction considérable des nouveaux cas de maladie est envisageable au Canada. Un programme d'immunisation contre le VPH qui s'inscrit dans le programme national de santé publique, a été mis en place au Québec en septembre 2008. Les infirmières administrent gratuitement dans les écoles le vaccin VPH aux adolescentes âgées de 9 et 14 ans. Le vaccin actuel inclut la protection contre les VPH 6 et 11 responsables de la PRR. Si elle est maintenue, cette mesure préventive qui connaît une bonne couverture vaccinale à ce jour, pourrait potentiellement réduire l'incidence de maladie

et/ou, la gravité dans moins d'une décennie, lorsque les premières cohortes de jeunes filles vaccinées auraient atteint l'âge d'avoir des enfants.

## **7.2 Implications et perspectives de recherche**

Les données exposées dans ce mémoire servent à mieux définir une maladie encore méconnue. À notre connaissance, personne n'avait jusqu' à ce jour décrit de façon aussi large les cas de PRR juvéniles diagnostiquées au Canada. Ces données sont non seulement utiles pour mieux comprendre la maladie, mais également pour évaluer l'impact du programme vaccinal contre le VPH au Canada sur la sévérité et l'incidence de la papillomatose. Nos données contribuent d'ailleurs au registre canadien mis en place cette année. Peu d'interventions sont actuellement possibles pour s'attaquer aux déterminants de la sévérité identifiés, mais davantage d'information et de soutien aux jeunes mères sont à considérer. Les recherches pour trouver un traitement sécuritaire ou moins invasif qui réduirait la charge virale et la multiplication cellulaire semblent se poursuivre. Enfin seules quelques caractéristiques génétiques des enfants ont été analysées dans ce mémoire. D'autres travaux pour identifier les mécanismes immunitaires impliqués et pour valider le rôle des HLA DRB1\*0101 et DRB1\*0401 seraient souhaitables. De nouvelles variantes moléculaires ont été ici identifiées et contribuent à démontrer les variations intra typiques de cette maladie. Enfin, la papillomatose chez l'adulte est encore moins bien comprise. Une étude rétrospective chez les cas adultes serait souhaitable pour déterminer dans quelle proportion des cas chez l'adulte, représente une réactivation de leur maladie juvénile et ainsi mieux comprendre l'histoire naturelle de cette maladie virale morbide.

## Bibliographie

1. Campisi, P., M. Hawkes, and K. Simpson, The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. *Laryngoscope*, 2010. 120(6): p. 1233-45.
2. Rodier, C., et al., Juvenile Respiratory Papillomatosis: Risk factors for severity, in *27th International Papillomavirus Conference and Clinical workshop*. September 17-22, 2011: Berlin.Germany. Poster 13.03.
3. Larson, D.A. and C.S. Derkay, Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS*, 2010. 118(6-7): p. 450-4.
4. Smith, E.M., et al., Perinatal vertical transmission of human papillomavirus and subsequent development of respiratory tract papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1991. 100(6): p. 479-83.
5. Silverberg, M.J., et al., Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol*, 2003. 101(4): p. 645-52.
6. Chadha, N.K., et al., The quality of life and health utility burden of recurrent respiratory papillomatosis in children. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010. 143(5): p. 685-90.
7. Bishai, D., H. Kashima, and K. Shah, The cost of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000. 126(8): p. 935-9.
8. Agency, B.C., A population Based HPV immunization Program in British Colombia. Background Paper, 2006: p. 1-140.
9. Derkay, C.S., Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995. 121(12): p. 1386-91.
10. Wiatrak, B.J., et al., Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope*, 2004. 114(11 Pt 2 Suppl 104): p. 1-23.
11. Reeves, W.C., et al., National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. 129(9): p. 976-82.
12. Derkay, C.S., Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 2001. 111(1): p. 57-69.

13. Donne, A.J., et al., The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2010. 74(1): p. 7-14.
14. Soldatski, I.L., et al., Tracheal, bronchial, and pulmonary papillomatosis in children. *Laryngoscope*, 2005. 115(10): p. 1848-54.
15. Rimell, F.L., et al., Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope*, 1997. 107(7): p. 915-8.
16. Rabah, R., et al., Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatr Dev Pathol*, 2001. 4(1): p. 68-72.
17. Gerein, V., et al., Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 years experience. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005. 132(3): p. 392-4.
18. Draganov, P., et al., Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR Green real-time PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2006. 70(3): p. 469-73.
19. Shehata, B.M., et al., E6 and E7 oncogene expression by human papilloma virus (HPV) and the aggressive behavior of recurrent laryngeal papillomatosis (RLP). *Pediatr Dev Pathol*, 2008. 11(2): p. 118-21.
20. Buchinsky, F.J., et al., Age of child, more than HPV type, is associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. *PLoS One*, 2008. 3(5): p. e2263.
21. Carvalho, C.M., et al., Prognostic factors of recurrent respiratory papillomatosis from a registry of 72 patients. *Acta Otolaryngol*, 2009. 129(4): p. 462-70.
22. Maloney, E.M., et al., Longitudinal measures of human papillomavirus 6 and 11 viral loads and antibody response in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006. 132(7): p. 711-5.
23. Bonagura, V.R., et al., HLA alleles, IFN-gamma responses to HPV-11 E6, and disease severity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol*, 2004. 65(8): p. 773-82.
24. Bonagura, V.R., et al., Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol*, 2009. 71(2): p. 212-9.

25. Armstrong, L.R., C.S. Derkay, and W.C. Reeves, Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. RRP Task Force. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1999. 125(7): p. 743-8.
26. Gabbott, M., et al., Human papillomavirus and host variables as predictors of clinical course in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(12): p. 3098-103.
27. Leung, R., M. Hawkes, and P. Campisi, Severity of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis is not associated with socioeconomic status in a setting of universal health care. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2007. 71(6): p. 965-72.
28. Snowden, R.T., et al., The predictive value of serum interleukins in recurrent respiratory papillomatosis: a preliminary study. *Laryngoscope*, 2001. 111(3): p. 404-8.
29. Kashima, H.K., et al., A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 1992. 102(1): p. 9-13.
30. Zacharisen, M.C. and S.F. Conley, Recurrent respiratory papillomatosis in children: masquerader of common respiratory diseases. *Pediatrics*, 2006. 118(5): p. 1925-31.
31. Robb, P.K., Jr., et al., Association of asthma with clinically aggressive recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011. 137(4): p. 368-72.
32. McKenna, M. and L. Brodsky, Extraesophageal acid reflux and recurrent respiratory papilloma in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2005. 69(5): p. 597-605.
33. Borkowski, G., et al., Recurrent respiratory papillomatosis associated with gastroesophageal reflux disease in children. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1999. 256(7): p. 370-2.
34. Syrjanen, S., Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS*, 2010. 118(6-7): p. 494-509.
35. Pou, A.M., et al., Molecular characterization of mutations in patients with benign and aggressive recurrent respiratory papillomatosis: a preliminary study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2004. 113: p. 180-6.
36. Reidy, P.M., et al., Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. *Laryngoscope*, 2004. 114(11): p. 1906-9.
37. Penaloza-Plascencia, M., et al., Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000. 126(9): p. 1119-23.

38. Sun, C.A., et al., The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 2001. 83(1): p. 95-9.
39. Bigras, G. and F. de Marval, The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load: results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13,842 women. *Br J Cancer*, 2005. 93(5): p. 575-81.
40. Wheeler, C., A Closer Look at Papillomavirus Variants. *Human Papillomavirus 1995 Compendium*, 1995. III: p. 41-46.
41. Burk, R.D., et al., Classification and nomenclature system for Human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerol*, 2011. 20(3): p. 113-23.
42. Heinzl, P.A., et al., Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(7): p. 1746-54.
43. Derkay, C.S., et al., A staging system for assessing severity of disease and response to therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 1998. 108(6): p. 935-7.
44. Hester, R.P., et al., Reliability of a staging assessment system for recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2003. 67(5): p. 505-9.
45. Bonagura, V.R., et al., Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. *APMIS*, 2010. 118(6-7): p. 455-70.
46. Coutlee, F., et al., Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGM1 primers and the Linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(6): p. 1998-2006
47. Koushik, A., et al., The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detect Prev*, 2005. 29(4): p. 307-16.
48. Feoli-Fonseca, J.C., et al., A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detecting and typing human papillomaviruses in pathological specimens. *Diagn Mol Pathol*, 1998. 7(6): p. 317-23.
49. Gravitt, P.E., et al., Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(1): p. 357-61.

50. Lefevre, J., et al., Real-time PCR assays using internal controls for quantitation of HPV-16 and beta-globin DNA in cervicovaginal lavages. *J Virol Methods*, 2003. 114(2): p. 135-44.
51. Lefevre, J., et al., Prevalence of selective inhibition of HPV-16 DNA amplification in cervicovaginal lavages. *J Med Virol*, 2004. 72(1): p. 132-7.
52. Coutlee, F., et al., Low-risk human papillomavirus type 6 DNA load and integration in cervical samples from women with squamous intraepithelial lesions. *J Clin Virol*, 2009. 45(2): p. 96-9.
53. Khouadri, S., et al., Viral load of episomal and integrated forms of human papillomavirus type 33 in high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Int J Cancer*, 2007. 121(12): p. 2674-81.
54. O'Connor, M., Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. *The Human Papillomavirus Compendium*, 1996. III: p. 21-39.
55. Kammer, C., et al., Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer*, 2002. 86(2): p. 269-73.
56. Zehbe, I., et al., Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998. 58(4): p. 829-33.
57. Kocjan, B.J., et al., Pre vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). *Virology*, 2009. 391(2): p. 274-83
58. Sellors, J.W., et al., Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ*, 2000. 163(5): p. 503-8.
59. Silverberg, M.J., et al., Clinical course of recurrent respiratory papillomatosis in Danish children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004. 130(6): p. 711-6.
60. Firestein, G.S., Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 356-61.
61. Parham, P., MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(3): p. 201-14.
62. Seedat, R.Y., et al., HPV types causing juvenile recurrent laryngeal papillomatosis in South Africa. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 74(3): p. 255-9.
63. Silver, R.D., et al., Diagnosis and management of pulmonary metastasis from recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. 129(6): p. 622-9.

64. Cook, J.R., et al., Squamous cell carcinoma arising in recurrent respiratory papillomatosis with pulmonary involvement: emerging common pattern of clinical features and human papillomavirus serotype association. *Mod Pathol*, 2000. 13(8): p. 914-8.
65. Lele, S.M., et al., Molecular events in the progression of recurrent respiratory papillomatosis to carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2002. 126(10): p. 1184-8.
66. Saumet, L., et al., Bronchopulmonary squamous cell carcinoma associated with HPV 11 in a 15-year-old girl with a history of severe recurrent respiratory papillomatosis: a case report. *Arch Pediatr*, 2010. 18(7): p. 754-7.
67. Huberman, M. and B. Langholz, Application of the missing-indicator method in matched case-control studies with incomplete data. *Am J Epidemiol*, 1999. 150(12): p. 1340-5.
68. Chadha, N., Intralesional cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis: Systematic review of efficacy and safety. *J Laryngol Voice*, 2011. p. 22-26.
69. SOGC, Canadian Consensus Guidelines on Human Papillomavirus. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 2007. 29(8): p. S1-56.
70. Zawadzka-Glos, L., et al., Lower airway papillomatosis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2003. 67(10): p. 1117-21.

## **Annexe 1**

### **Tableau sommaire de la revue de littérature**

## **Annexe 1 – Tableau sommaire de la revue de littérature**

Le tableau sommaire de la revue de la littérature portant sur la PRR, intitulé *Résumé des études menées depuis 1995 mettant en lumière les paramètres sociodémographiques, les génotypes de VPH et les caractéristiques des enfants en rapport avec la papillomatose respiratoire récurrente (PRR) sévère* est présenté aux pages qui suivent.

**Résumé des études menées depuis 1995 mettant en lumière les paramètres sociodémographiques, les génotypes de VPH et les caractéristiques des enfants en rapport avec la papillomatose respiratoire récurrente (PRR) sévère**

Référence	Population	Devis et méthode	Paramètres	Facteurs déterminants de la sévérité	Définition de la sévérité	Commentaires
Rimell (1997)	24 enfants Pittsburgh, É.-U.	Étude rétrospective de cas (1984-1994) Biopsies sous forme de sections paraffinées	Génoype, CMV <sup>1</sup> , VHS <sup>2</sup>	L'infection par le VPH 11 est plus susceptible d'évoluer vers une maladie obstructive des voies respiratoires précoce. Les autres co-infection virales ne sont pas associées à la sévérité	Trachéotomie, obstruction des voies respiratoires	Tous les cas n'ayant subi qu'une chirurgie ont été exclus Le génoype a été déterminé dans 79 % des cas
Gabbott (1997)	47 enfants Sydney, Australie	Étude rétrospective de cas (1981-1996) Biopsies sous forme de sections paraffinées	Génoype, âge, sexe, variantes moléculaires	L'âge est un facteur prédictif indépendant de la sévérité Aucune différence parmi les génotypes La mutation soupçonnée dans la RRA <sup>3</sup> serait exclue	10 excisions ou plus avec une fréquence de $\geq 3$ excisions par année et/ou atteintes TBP <sup>4</sup>	Seuls 44 cas ont un génoype viral connu 21 % des patients perdus de vue pendant le suivi. Peut contribuer à une erreur de classification
Armstrong (1999)	399 enfants Registre américain contenant les données de 20 centres de soins pédiatriques tertiaires, É.-U.	Étude rétrospective de cas (1996-1998)	Âge, race, sexe	Jeune âge au moment du diagnostic Race uniquement dans les analyses univariées	Nombre moyen élevé d'interventions (> 4) Nombre des sites anatomiques touchés	Les enfants inscrits dans le registre avaient été traités dans des centres de soins tertiaires et peuvent représenter une population présentant une PRR plus grave ou une affection médicale concomitante qui nécessite une trachéotomie

<sup>1</sup> CMV: Cytomégalovirus.

<sup>2</sup> VHS: Virus *Herpes simplex*.

<sup>3</sup> RRA: Région régulatrice en amont.

<sup>4</sup> TBP: Trachéale et/ou bronchique et/ou pulmonaire.

Référence	Population	Devis et méthode	Paramètres	Facteurs déterminants de la sévérité	Définition de la sévérité	Commentaires
Penaloza-Plascencia (2000)	47 enfants Guadalajara, Mexique	Étude transversale. Papillomes extraits sous forme de sections paraffinées.	Génotype	Aucune différence parmi les génotypes	Plus de 10 résections, plus de 5 ans d'évolution et plus de 3 résections par année, ainsi qu'une papillomatose respiratoire non laryngée	23 % des cas ont été jugés comme ayant une maladie invasive Infection par le VPH 6, 11, 16, 31, 33, 35 ou 39 confirmée dans tous les cas avec différentes combinaisons
Rabah (2001)	61 enfants Michigan, É.-U.	Étude rétrospective de cas Examen de dossiers de patients traités sur une période de 20 ans	Génotype	Le VPH 11 confère une évolution plus agressive de la maladie	10 interventions ou plus avec 3 interventions ou plus en un an et/ou envahissement de la maladie à la partie distale de la région sous-glottique	23/61 (38 %) des cas sont définis comme présentant une maladie agressive.
Reeves (2003)	603 cas âgés de moins de 18 ans, dans 22 centres de soins pédiatriques tertiaires participant au registre américain É.-U.	Étude prospective de suivi (1996-2002)	Sexe, âge, couverture médicale, traitement secondaire	Les sujets dont l'âge < 4 ans au moment du diagnostic ont subi plus de chirurgies annuellement L'âge précoce est associé avec le nombre de sites touchés L'âge actuel, et non l'âge au moment du diagnostic, a été associé avec la sévérité de la maladie Aucune différence relative à l'évolution de la maladie en raison du sexe, de la race ou de la couverture médicale	Fréquence des chirurgies Besoin d'une trachéotomie Étendue anatomique de la maladie	Analyses limitées aux cas les plus sévères au moment du diagnostic

Référence	Population	Devis et méthode	Paramètres	Facteurs déterminants de la sévérité	Définition de la sévérité	Commentaires
Silverberg (2004)	57 enfants Registre du Danemark	Étude rétrospective de cas Examen des dossiers médicaux des patients hospitalisés entre (1974-1999)	Âge, antécédents maternels de condylomes, méthode d'accouchement	Taux plus élevé de chirurgie chez les enfants âgés de moins de 5 ans, dont la mère a présenté des condylomes et qui sont nés par césarienne	Taux de chirurgie par année-personne	Les patients ayant subi une première chirurgie sans autres chirurgies récurrentes ont été exclus Seuls les patients hospitalisés et présentant des condylomes ont été identifiés, ce qui pourrait entraîner une sous-estimation du nombre de cas
Wiatrak (2004)	73 enfants Alabama, É.-U.	Étude prospective de 10 ans (1993-2003)	Race, âge, assurance, ordre de naissance, condylomes maternels, méthode d'accouchement, âge maternel, exposition à la fumée de tabac, infection précoce, reflux gastrique, génotype, alimentation	Âge < 3 (PSS, PSF) VPH 11 (PSS, PSF) Premier enfant (PSS) Césarienne (PSS, PSF) Couverture médicale (PSF) Aucune prédilection de gravité de la maladie en fonction du sexe ou de la race.	PSS: (Peak Severity Score) Grade maximal de sévérité, c.-à-d. les 3 grades anatomiques moyens les plus élevés PSF: (Peak Surgery Frequency) Fréquence maximale de chirurgies, c.-à-d. le nombre le plus élevé de chirurgies en 12 mois	Utilisation constante d'un système de classification de la maladie
Pou (2004)	7 enfants, 6 adultes Texas, É.-U.	Étude rétrospective de cas Échantillons de tissu sous forme de sections paraffinées archivées et échantillons de tissu frais lorsque disponibles (1990-1992)	Génotype, polymorphismes	Les sujets infectés par le VPH 11 ont présenté une évolution plus agressive de leur maladie que les sujets infectés par le VPH 6 Tous les isolats de VPH 11 ont montré une insertion au site GC dans la région régulatrice en amont mais ceci n'avait aucun lien avec l'évolution de la maladie	10 excisions ou plus, avec une fréquence de 3 excisions ou plus par année, envahissement distal de la maladie à la région sous-glottique et à l'arbre trachéobronchique ou apparition d'un carcinome	La forme juvénile est déterminée par l'apparition de la maladie avant ou à l'âge de 12 ans Le petit nombre de patients évalués ne permet pas d'expliquer en toute confiance l'influence du polymorphisme sur l'évolution clinique de la maladie

Référence	Population	Devis et méthode	Paramètres	Facteurs déterminants de la sévérité	Définition de la sévérité	Commentaires
Bonagura (2004)	19 enfants de race blanche 10 enfants afro-américains 37 adultes de race blanche 4 adultes afro-américains. New York, É.-U.	Étude cas-témoins La gravité a été déterminée au moment de la chirurgie et lorsqu'on a isolé l'ADN des cellules mononuclées du sang périphérique	HLA-A, HLA-B, DRB1, DQB1	Les allèles DRB1*301 et DRB1*0102 étaient enrichis dans les cas sévères Les allèles DQB1*0602 étaient significativement réduits dans les cas sévères Les patients porteurs des allèles DRB1*301 et DQB1*0201 ont montré une augmentation de leur risque de PRR sévère.	Nombre de sites, obstruction luminale, surface anatomique La somme des scores combinés, divisée par le nombre de jours écoulés depuis la dernière chirurgie Sévère: $0,06 \geq$ ou atteinte trachéale Léger à modéré: $< 0,06$	Aucune association avec les gènes polymorphes HLA de classe I
Gerein (2005)	42 patients Mainz, Allemagne	Étude prospective et multicentrique d'une durée de 20 ans (1983-2003) menée auprès de patients recevant un traitement d'appoint par l'interféron <i>alpha</i>	Génotype, sexe, âge	Le VPH 11 a montré une association définitive avec l'évolution invasive de la maladie et l'incidence de la progression vers un cancer	Patient présentant une atteinte pulmonaire Patient présentant des tumeurs malignes	Observation d'un taux élevé de progressions vers un cancer (13 %) attribué au suivi à long terme
Dragonov (2006)	23 enfants, âgés de 0.5-12 ans, Sofia, Bulgarie	Étude cas-témoins Biopsies de tissus frais analysés par PCR en temps réel	Génotype, âge à l'apparition de la maladie	Le VPH 11 est significativement associé à une évolution plus agressive de la maladie	10 interventions ou plus et 3 interventions ou plus sur une période d'un an ou atteinte sous-glottique au cours des 6 premiers mois	13/23 (56 %) présentaient une forme agressive
Maloney (2006)	15 enfants sous traitement actuel Atlanta, É.-U.	Étude longitudinale de 5,4 mois (1999-2000) Échantillons prélevés par cytobrosse et échantillons de tissus prélevés par biopsie	État de l'infection par le VPH, charge virale, génotype	VPH 11 ou VPH 11 coinfecté par le VPH 6 La charge virale n'a pas été associée aux indicateurs de sévérité	Fréquence des interventions chirurgicales Interventions chirurgicales médianes par année	Les niveaux de charge virale étaient stables chez la plupart des enfants tout au long du suivi La séropositivité à l'égard des VPH était faible

Référence	Population	Devis et méthode	Paramètres	Facteurs déterminants de la sévérité	Définition de la sévérité	Commentaires
Leung (2007)	21 enfants Toronto, Canada	Étude transversale de tous les cas actifs en 2005	Statut socio-économique, âge	Le jeune âge au moment du diagnostic est un indicateur prédictif de sévérité	PSF: Fréquence maximale annuelle de chirurgie et grades anatomiques les plus élevés	Suggère que les familles à plus faibles revenus présentent un risque accru de la maladie, mais elles ne sont pas un indicateur de la sévérité de la maladie
Shehata (2008)	43 enfants 4 mois à 10 ans Atlanta, É.-U.	Examens rétrospectifs de cas (1993-2005) Tissus sous forme de sections paraffinées	Âge, génotype, expression des protéines oncogènes E6/E7	Les patients ayant reçu un diagnostic avant l'âge de 24 mois présentaient un taux plus élevé d'oncogènes E7. Le VPH 11 associé à un taux plus élevé d'expression des oncogènes E6 et E7.	Expression des oncogènes E6 et E7 Fréquence des excisions ou de débridements	Aucun tableau faisant état de l'âge, du type et de la fréquence des chirurgies n'a été fourni.
Buchinsky (2008)	118 enfants É.-U. et Canada	Étude transversale menée auprès de patients subissant un traitement chirurgical (2003-2007) Biopsies du larynx (tissu frais)	Sexe, race, génotype, revenus, niveau de scolarité, approche chirurgicale	Le VPH 11 et le jeune âge sont associés à une évolution agressive de la maladie	> 10 chirurgies à vie ou ≥ 4 chirurgies par année + atteinte distale ou une trachéotomie à vie	81% des cas étaient graves. Les patients ayant eu un suivi pendant une période de moins d'un an ont été exclus Lorsque l'âge de l'enfant est contrôlé, l'association entre les génotypes de VPH devient limite.
Carvalho (2009)	24 enfants et 48 adultes atteints de PRR Lyon, France	Étude rétrospective menée dans un hôpital de soins tertiaires (2005-2007)	Âge, génotype	Fréquence plus élevée d'endoscopies chez les porteurs de VPH 11 p/r porteurs de VPH 6 Aucune différence significative entre les groupes VPH 6 et 11 en regard à l'âge, le grade de Derkay ou la durée de rémission	Fréquence des endoscopies Nombre maximal d'endoscopies par année Grade anatomique de Derkay Durée de la rémission	Typage viral disponible dans 66 % des cas Incluait uniquement les cas actifs au cours des deux années précédentes

Référence	Population	Devis et méthode	Paramètres	Facteurs déterminants de la sévérité	Définition de la sévérité	Commentaires
Snowden (2001)	15 enfants 2 à 18 ans Memphis, É.-U.	Étude cas-témoins (1993-1999)	Interleukine-2, âge, récepteur de l'interleukine-2	L'âge était significativement plus bas dans le groupe ayant une maladie agressive. L'interleukine-2 et les récepteurs étaient significativement plus élevés en présence d'une maladie sévère	> 4 récidives traitées par chirurgie par année.	Des taux élevés d'interleukine et de récepteurs peuvent être attribuables au stress découlant d'une chirurgie récente.
Campisi (2010)	243 cas âgés de 0 à 14 ans Canada	Étude rétrospective multicentrique (1994-2007)	Âge	Le jeune âge au moment du diagnostic a été associé à un taux maximal annuel de chirurgie plus élevé.	Taux maximal annuel, grade anatomique maximal, nombre total de chirurgies	Les cas de maladie subclinique, des régions éloignées ou les n'ayant pas été dirigés dans un centre de soins tertiaires pourraient être manqués, mais leur nombre est jugé petit. Aucune donnée sur d'autres variantes observées pouvant corrélérer avec la sévérité de la maladie.
Seedat (2010)	19 patients âgés de 0 à 16 ans Bloemfontein, Afrique du Sud	Étude transversale menée auprès de patients ayant subi un traitement chirurgical entre janv. 2008 et sept. 2009	Âge, génotype	Les patients ayant un VPH 11 semblaient avoir subi plus d'interventions chirurgicales, avoir une moyenne de Derkay plus élevée au cours de la période de traitement. L'âge n'a pas été associé au caractère agressif de la maladie.	Grade anatomique de Derkay Grade moyen de Derkay Interventions totales Interventions/année	21 % des cas définis comme ayant une maladie invasive selon une autre définition <sup>5</sup> n'ont pas été utilisés dans cette étude. Le nombre d'interventions/année est calculé uniquement chez les patients ayant reçu un suivi pendant plus d'un an.

<sup>5</sup> Doyle et al. Laryngoscope.199 ; 104:523-7

Référence	Population	Devis et méthode	Paramètres	Facteurs déterminants de la sévérité	Définition de la sévérité	Commentaires
Bonagura (2011)	26 enfants et 40 adultes Long Island, É.-U.	Étude cas-témoins sur du tissu frais (biopsies de papillomes)	Combinaisons de gènes KIR et KIR-HLA	Les allèles 2DS1 étaient significativement sous-représentés dans les cas sévères 79 % des cas sévères ne présentaient pas les allèles protecteurs KIR 3DS1 et 2DS1 En l'absence des allèles HLA-DQB1*0602 la maladie a tendance à être plus sévère	Nombre de sites, obstruction luminale, surface anatomique La somme des grades combinés, divisée par le nombre de jours écoulés depuis la dernière chirurgie Sévère: $0,06 \geq$ ou atteinte trachéale léger à modéré: $< 0,06$	Séparation en deux groupes Cas sévères et légers à modérés

## **Annexe 2**

### **Échelle de sévérité de la PRR selon Derkay, 1998**

## Annexe 2 – Échelle de sévérité de la PRR selon Derkay, 1998

Surgery number: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_\_

Urgency:  urgent/emergency

scheduled/routine

Voice/cry:  hoarse/weak cry/dysphonia

normal

unknown/not reported

Stridor:  present

no stridor

unknown/not reported

Anatomic score: (1=minimal; 2=moderate; 3=severe)

Voice/cry:  hoarse/weak cry/dysphonia

normal

unknown/not reported

Stridor:  present

no stridor

unknown/not reported

Anatomic score: (1=minimal; 2=moderate; 3=severe)

### LARYNX

Epiglottis \_\_\_\_\_

Lingual Surface \_\_\_\_\_

Laryngeal Surface \_\_\_\_\_

Ary-epiglottic Folds Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_

False Vocal Cords Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_

True Vocal Cords Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_

Anterior Commissure \_\_\_\_\_

Posterior Glottis \_\_\_\_\_

Subglottis \_\_\_\_\_

Other \_\_\_\_\_

### TRACHEA

Upper 1/3 Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_

Middle 1/3 Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_

Lower 1/3 Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_

Bronchi Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_

Tracheostomy Stoma \_\_\_\_\_

### OTHER

Nose \_\_\_\_\_

Esophagus \_\_\_\_\_

Palate \_\_\_\_\_

Lungs Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_

Pharynx \_\_\_\_\_

Other \_\_\_\_\_

TOTAL SCORE: \_\_\_\_\_

## **Annexe 3**

### **Formulaire de cas standardisé**

## Annexe 3 – Formulaire de cas standardisé

### CASE REPORT FORM: Juvenile Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis

(Page 1: complete for each patient)

#### Demographics

Study number: \_\_\_\_\_

Gender:  male  
 female

Birth Date (DD/MM/YYYY): \_\_\_\_\_

Last patient encounter (date): \_\_\_\_\_

Postal code: \_\_\_\_\_

Family: \_\_\_\_\_

Number of children: \_\_\_\_\_

Patient birth order: \_\_\_\_\_

Parents:  single mother  
 single father  
 parents together

#### Birth History

Gestational age at delivery: \_\_\_\_\_

Birth weight: \_\_\_\_\_

Mode of delivery:  vaginal delivery  
 cesarian section

place of birth: \_\_\_\_\_

country: \_\_\_\_\_

province (if Canada): \_\_\_\_\_

Maternal history condylomata:  yes  
 no  
 unknown

History abnormal pap smear:  yes  
 no  
 unknown

#### Initial diagnosis

Date: \_\_\_\_\_

Presenting symptoms:  hoarseness  
 abnormal cry  
 voice change  
 diff. breathing  
 stridor  
 other: \_\_\_\_\_

Disease extent:  above larynx  
 larynx  
 below larynx

Comorbidities:  GERD  
 asthma  
 household smoker  
 immune deficiency  
 other: \_\_\_\_\_

#### Tracheostomy

no tracheostomy  
 tracheostomy

Indication: \_\_\_\_\_

Date of procedure: \_\_\_\_\_

#### Complications

Distal pulmonary spread  
 Malignant degeneration

**HPV confirmation**

Date of pathology/microbiology

report: \_\_\_\_\_

- Method:      histology:  
                    immunofluoresc. stain  
                    in situ hybridization  
                    PCR  
                    other: \_\_\_\_\_

**Adjuvant Therapy**

Medication	dose, route, frequency	start date	stop date
<input type="checkbox"/> interferon <input type="checkbox"/> cidofovir <input type="checkbox"/> indole-3-carbinol <input type="checkbox"/> other: _____			

**(Complete one box for each surgery)**

Surgery number: \_\_\_\_\_  
 Date: \_\_\_\_\_  
 Urgency:    urgent/emergency  
                    scheduled/routine  
 Voice/cry:    hoarse/weak cry/dysphonia  
                    normal  
                    unknown/not reported  
 Stridor:    present  
                    no stridor  
                    unknown/not reported  
 Anatomic score: (1=minimal; 2=moderate; 3=severe)

**LARYNX**

Epiglottis \_\_\_\_\_  
 Lingual Surface \_\_\_\_\_  
 Laryngeal Surface \_\_\_\_\_  
 Ary-epiglottic Folds   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 False Vocal Cords   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 True Vocal Cords   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 Anterior Commissure \_\_\_\_\_  
 Posterior Glottis \_\_\_\_\_  
 Subglottis \_\_\_\_\_  
 Other \_\_\_\_\_

**TRACHEA**

Upper 1/3   Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_  
 Middle 1/3   Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_  
 Lower 1/3   Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_  
 Bronchi   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 Tracheostomy Stoma \_\_\_\_\_

**OTHER**

Nose \_\_\_\_\_           Esophagus \_\_\_\_\_  
 Palate \_\_\_\_\_       Lungs Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 Pharynx \_\_\_\_\_     Other \_\_\_\_\_

TOTAL SCORE: \_\_\_\_\_

**Pt study number: \_\_\_\_\_**

Surgery number: \_\_\_\_\_  
 Date: \_\_\_\_\_  
 Urgency:    urgent/emergency  
                    scheduled/routine  
 Voice/cry:    hoarse/weak cry/dysphonia  
                    normal  
                    unknown/not reported  
 Stridor:    present  
                    no stridor  
                    unknown/not reported  
 Anatomic score: (1=minimal; 2=moderate; 3=severe)

**LARYNX**

Epiglottis \_\_\_\_\_  
 Lingual Surface \_\_\_\_\_  
 Laryngeal Surface \_\_\_\_\_  
 Ary-epiglottic Folds   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 False Vocal Cords   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 True Vocal Cords   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 Anterior Commissure \_\_\_\_\_  
 Posterior Glottis \_\_\_\_\_  
 Subglottis \_\_\_\_\_  
 Other \_\_\_\_\_

**TRACHEA**

Upper 1/3   Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_  
 Middle 1/3   Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_  
 Lower 1/3   Anterior \_\_\_\_\_ Posterior \_\_\_\_\_  
 Bronchi   Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 Tracheostomy Stoma \_\_\_\_\_

**OTHER**

Nose \_\_\_\_\_           Esophagus \_\_\_\_\_  
 Palate \_\_\_\_\_       Lungs Right \_\_\_\_\_ Left \_\_\_\_\_  
 Pharynx \_\_\_\_\_     Other \_\_\_\_\_

TOTAL SCORE: \_\_\_\_\_

## **Annexe 4**

### **Questionnaire à la mère**

## Annexe 4 – Questionnaire à la mère

ÉTUDE SUR LA PAPILLOMATOSE LARYNGÉE

Numéro de patient : \_\_\_\_\_

### QUESTIONNAIRE POUR LA MÈRE

MERCI DE REMPLIR LE FORMULAIRE CI-DESSOUS ET DE NOUS LE RETOURNER DANS L'ENVELOPPE PRÉ-AFFRANCHIE

1. Centre hospitalier où vous avez accouché de votre enfant (atteint de papillomatose laryngée) ?

Nom de l'hôpital ou centre hospitalier \_\_\_\_\_

Ville : \_\_\_\_\_ Pays : \_\_\_\_\_

2. Quel type d'accouchement avez-vous eu pour votre enfant atteint de papillomatose laryngée ?

Normal (vaginal)  Césarienne

3. Quel âge aviez-vous au moment de l'accouchement de cet enfant ? \_\_\_\_\_

4. Quel était le rang de naissance de cet enfant (est-ce que c'était votre 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, ..., enfant) ? \_\_\_\_\_

5. Comment qualifieriez-vous la condition socioéconomique que vous aviez au moment de l'accouchement:

Plutôt faible  Plutôt moyen  Plutôt élevé

6. Avant l'accouchement de cet enfant, avez-vous déjà eu un Test Pap anormal?

Oui  Non  Ne sait pas

Si oui : - Date approximative mm aaaa

--	--

--	--	--	--

- Connaissez-vous le résultat de ce test PAP anormal?

Si oui, spécifiez : \_\_\_\_\_

- Pour ce dernier, avez-vous eu une colposcopie au niveau du col de l'utérus?

Oui  Non  Ne sait pas

Si oui, connaissez-vous le résultat de la biopsie ? \_\_\_\_\_

7. Avez-vous déjà eu des condylomes (verrues) au niveau génital ?

Oui     Non     Ne sait pas

Si oui :

- Date approximative mm aaaa

--	--	--	--	--	--

- Avez-vous reçu un traitement pour éliminer ces condylomes?     Oui     Non

## **Annexe 5**

### **Analyses supplémentaires sur les facteurs de risque**

## **Annexe 5 – Analyses supplémentaires sur les facteurs de risque**

Les tableaux qui suivent, fournissent des données d'analyse supplémentaires:

- Le tableau I présente une analyse du paramètre histoire de condylome maternel en corrigeant pour une variable âge à la fois.
- Les tableaux II, III et IV font intervenir une nouvelle définition de la sévérité de la PRR: >3 chirurgies en 12 mois et/ou progression dans la région sous-glottique.

**Tableau I: Rapport des cotes pour la sévérité de la papillomatose respiratoire selon l'histoire de condylomes maternels (cervicaux et/ou vulvaires) en ajustant pour une seule variable à la fois**

<b>Variables</b>	<b>Sévère/ Non sévère</b>	<b>RC Brut (IC 95%)</b>	<b>P</b>	<b>RC ajusté pour l'âge de l'enfant (IC 95%)</b>	<b>P</b>	<b>RC ajusté pour l'âge de la mère (IC 95%)</b>	<b>P</b>
Histoire de condylomes maternels							
Oui	11/2	9.17 (1.15-73.24)	0.04	8.64 (1.03-72.20)	0.47	7.00 (0.42-117-67)	0.18
Non (réf.)	3/5	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Inconnue							

**Tableau II: Rapport des cotes pour un critère de maladie dite « agressive »  
(> 3 chirurgies à l'intérieur de 12 mois et/ou progression de la maladie en sous-glottique)**

<b>Variabiles</b>	<b>N (%)</b>	<b>Agressive/ Non agressive</b>	<b>RC Brut</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>	<b>RC ajusté*</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Genre</b>								
Garçons (réf)	19 (38.7)	8/11	1.00	-	-	1.00	-	-
Filles	12 (61.3)	6/6	1.38	0.32-5.88	0.30	3.21	0.47-22.12	0.24
<b>Âge</b>								
31 (100)	(continue)	0.80	0.65-0.98	0.04	0.742	0.58-0.95	0.02	
<b>Rang de naissance</b>								
Premier-né	16 (51.6)	9/7	3.86	0.33-45.57	0.28	3.78	0.12-123.41	0.45
Deuxième	9 (29.0)	4/5	2.40	0.18-32.88	0.28	3.58	0.76-168.51	0.52
Troisième (réf)	4 (12.9)	1/3	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	2 (6.5)	0/2						
<b>Âge de la mère</b>								
< 23 ans	8 (25.8)	5/3	2.78	0.37-21.03	0.32	10.35	0.73-146.76	0.08
≥ 23 ans (réf)	8 (25.8)	3/5	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	15 (48.4)	6/9						
<b>Statut économique</b>								
Bas	6 (19.3)	4/2	4.00	0.45-35.79	0.22	2.71	0.11-68.76	0.55
Moyen	10 (32.3)	3/6	1.00	-	-	1.00	-	-
Élevé (réf)	15 (48.4)	7/9						
Inconnu								
<b>Comorbidités</b>								
Asthme	17 (54.8)	5/3	3.00	0.49-18.17	0.23	0.94	0.6-13.86	0.97
Reflux	14 (45.2)	2/1	3.60	0.26-50.33	0.34	1.36	0.5-36.66	0.86
Aucun (réf)	8 (25.8)	5/9	1.00			1.00		
Inconnu	3 (9.7)							
<b>Condylomes maternels</b>								
Oui	13 (41.9)	7/6	1.94	0.32-11.76	0.91	1.61	0.19-13.80	0.66
Non (réf)	8 (25.8)	3/5	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	10 (32.3)	4/6						

**Tableau II: Rapport des cotes pour un critère de maladie dite « agressive »  
(> 3 chirurgies à l'intérieur de 12 mois et/ou progression de la maladie en sous-glottique)**

<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>	<b>Agressive/ Non agressive</b>	<b>RC Brut</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>	<b>RC ajusté*</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Génotypes VPH</b>								
VPH 6 (réf)	18 (58.1)	10/8	1.00	-	-	1.00	-	-
VPH 11	6 (19.4)	3/3	0.80	0.13-5.09	0.81	0.37	0.3-5.3	0.46
Autre <sup>†</sup> / inconnu	7 (22.6)	1/6						
<b>Charge virale</b>								
< 295 copies/cel.	7 (22.6)	3/4	1.00	-	-	1.00	-	-
≥ 295 copies/cel.	7 (22.6)	5/2	3.33	0.36-30.70	0.29	7.48	3.80-147.16	0.19
Inconnu	17 (54.8)	6/11						

\* Ajusté pour l'âge de l'enfant (variable continue) et l'âge de la mère (variable catégorielle ≤ 23 ou > 23 ans)

† Autres= 2 cas 6/11 détectés par hybridation *in situ*.

**Tableau III: Rapport des cotes pour un critère de maladie dite « agressive » selon l'histoire de la mère à l'accouchement**

Variables	N (%)	Agressive/Non agressive	RC Brut	IC 95%	p	RC Ajusté*	IC 95 %	p
Condylomes à l'accouchement								
Oui	7 (22.6)	4/3	1.33	0.20-8.71	0.76	1.04	0.11-10.25	0.98
Non	12 (38.7)	6/6	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	12 (38.7)							
Naissance prématurée								
Oui	3 (9.7)	1/2	0.42	0.03-6.06	0.52	0.01	0.03-3.00	0.18
Non (réf)	11 (35.5)	6/5	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	17 (67.7)							
Rupture prématurée des membranes **								
Oui	4 (12.9)	1/3	0.07	0.03-1.51	0.09	0.12	0.01-3.15	0.12
Non (réf)	6 (19.4)	5/1	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	21 (67.7)							
Durée du travail								
≥10 heures	4 (12.9)	1/3	0.08	0.04-1.95	0.12	0.07	0.02-2.00	0.12
<10 heures (réf)	5 (16.1)	4/1	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	22 (70.1)							
Forceps ou ventouse								
Oui	7 (22.6)	3/4	0.15	0.11-2.06	0.16	1.03	0.32-32.55	0.99
Non (réf)	6 (19.4)	5/1	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	18 (58.0)							
Épisiotomie								
Oui	9 (29.0)	4/5	n/a		n/a	n/a		n/a
Non (réf)	3 (9.7)	3/0	1.00	-	-	-	-	-
Inconnu	19 (61.3)							
Lacérations vaginales								
Oui	4 (12.9)	2/2	0.60	0.05-6.80	0.68	1.69	0.70-39.69	0.76
Non (réf)	8 (25.8)	5/3	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	19 (61.3)							

**Tableau III: Rapport des cotes pour un critère de maladie dite « agressive » selon l'histoire de la mère à l'accouchement**

Variables	N (%)	Agressive/Non agressive	RC Brut	IC 95%	p	RC Ajusté*	IC 95 %	p
Complications combinées ±								
Oui	10 (32.3)	7/3	n/a		-	n/a		-
Non (réf)	2 (6.4)	2/0	1.00	-	-	-	-	-
Inconnu	19 (61.3)							

\* Ajusté pour l'âge de l'enfant (variable continue) et l'âge de la mère (variable catégorielle ≤ 23 ou > 23 ans)

\*\* Définie comme rupture des membranes au moins une heure avant le début des contractions.

± Définies comme usage de forceps, ventouses, épisiotomie ou lacérations vaginales.

**Tableau IV: Rapport des cotes pour un critère de maladie dite « agressive » selon une sélection de caractéristiques génétiques**

Variables	N (%)	Agressive/ Non agressive	RC Brut	IC 95%	p	RC ajusté*	IC 95%	p
<b>HLA classe II</b>								
<b>DRB1*0301</b>								
Présent	4 (12.9)	2/2	0.80	0.76-8.45	0.85	0.690	0.35-13.53	0.81
Absent (réf)	9 (29.0)	5/4	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	18 (58.1)							
<b>DRB1*0101</b>								
Présent	4 (12.9)	2/2	1.96	0.20-45.24	0.41	0.50	0.27-9.27	0.64
Absent (réf)	9 (29.0)	5/4	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	18 (58.1)							
<b>DRB1*0101 ou DRB10401</b>								
Présent	6	4/2	2.67	0.28-25.67	0.43	2.18	0.16-28.93	0.56
Absent (réf)	7	3/4	1.00	-	-	-	-	-
Inconnu	18							
<b>DQB1*0201</b>								
Présent	3 (9.7)	1/2	0.33	0.02-5.03	0.33	0.60	0.02-17.92	0.77
Absent (réf)	10 (32.3)	6/4	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	18 (58.1)							
<b>DQB1*0202</b>								
Présent	1 (3.2)	0/1	n/a		n/a	n/a		n/a
Absent (réf)	12 (38.7)	7/5	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	18 (58.1)							
<b>DQB1*0602</b>								
Présent (réf)	2 (6.4)	0/2	1.00	-	n/a	1.00	-	n/a
Absent	11 (35.5)	7/4	n/a		-	n/a		-
Inconnu	18 (58.1)							

**Tableau IV: Rapport des cotes pour un critère de maladie dite « agressive » selon une sélection de caractéristiques génétiques**

Variables	N (%)	Agressive/ Non agressive	RC Brut	IC 95%	p	RC ajusté*	IC 95%	p
<b>Gènes KIR</b>								
2DS1								
Absent	9 (29.0)	3/6	n/a		n/a	n/a		n/a
Présent (réf)	5 (16.1)	5/0	1.00	-	-	1.00	-	
Inconnu	17 (54.8)							
3DS1								
Absent	10 (32.2)	4/6	n/a		n/a	n/a		n/a
Présent (réf)	4 (12.9)	4/0	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	17 (54.8)							
2DS5 ‡								
Absent	10 (32.2)	4/6	1.11	0.22-0.90	0.90	0.40	0.33-4.82	0.47
Présent (réf)	5 (16.2)	4/1	1.00	-	-	1.00	-	-
Inconnu	16 (51.6)							

\* Ajusté pour l'âge de l'enfant (variable continue) et l'âge de la mère (variable catégorielle ≤ 23 ou > 23 ans.

‡ Parmi les DRB1\*0301 ou DQB1\*0201 positifs (n=4)