

Université de Montréal

**Détection moléculaire des métastases des ganglions lymphatique
dans le Cancer du Col de l'Utérus**

par

Nawel Mechtouf

Département de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences biomédicales
Option générale

Avril, 2014

© Nawel Mechtouf, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Détection moléculaire des métastases des ganglions lymphatique
dans le Cancer du Col de l'Utérus**

Présenté par:

Nawel Mechtouf

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jacques Archambault, président-rapporteur

Dr Francis Rodier, directeur de recherche

Dre Vanessa Samouëlian, codirectrice de recherche

Dr Kris Jardin, membre du jury

Résumé

Le Cancer du Col Utérin (CCU) chez la femme est provoqué par le virus oncogénique VPH [1]. La métastase lymphatique ganglionnaire est un facteur pronostique majeur pour l'évolution de ce cancer et sa présence influence la décision thérapeutique. En général, l'envahissement ganglionnaire est diagnostiqué par histologie, mais cette méthode est laborieuse et parfois prise en défaut pour détecter les micrométastases et les cellules cancéreuses isolées et pour donner des résultats rapides en per opératoire. L'outil moléculaire que nous désirons développer pour combler cette lacune est basé sur une analyse d'ARN des gènes du VPH exprimés par les cellules du CCU. Ceci sera fait par transcription réverse de l'ARN cellulaire couplé à une réaction quantitative en chaîne par polymérase en temps réel (RT-qPCR). Cette technique devrait nous permettre une détection et une évaluation rapide des micrométastases pour aider à déterminer immédiatement un pronostic fiable et la thérapie associée. C'est un test précis, sensible et rapide pour détecter un envahissement ganglionnaire dans le CCU visant à améliorer la gestion thérapeutique. Le projet est basé sur trois objectifs. En premier lieu, valider les marqueurs moléculaires E6 et E7 de VPH16 et 18 à partir des échantillons frais et des échantillons fixés dans des blocs de paraffine. En deuxième lieu, déterminer la fiabilité et la sensibilité des marqueurs pour la détection des macrométastases, des micrométastases et les cellules tumorales isolées en utilisant la technique de RT-qPCR. En troisième lieu et parallèlement au travail présenté dans ce mémoire, il est nécessaire de constituer une base de données des patientes qui ont le virus VPH16 et 18 intégré dans leur génome, qui ont été traitées et dont nous connaissons déjà le diagnostic final afin de valider la méthode (biobanque). Nous avons réussi à extraire de l'ARNm de haute qualité à partir d'échantillons complexes, à détecter les gènes E6 et E7 de VPH16 et 18 en RT-qPCR, et à déterminer précisément la limite de détection de E6 et E7 dans les échantillons frais qui est une proportion de 0,008% de cellules cancéreuses. Dans les échantillons fixés dans la paraffine, cette limite est de 0,02% et 0,05% pour E6-E7-VPH16 et E6-E7-VPH18 respectivement. Ceci comparativement à une limite de détection histologique de 1% qui est déterminée par immunohistochimie de CK19. Enfin, notre protocole est validé pour VPH18 dans les ganglions lymphatiques du CCU.

Mots-clés : Cancer du Col Utérin, envahissement ganglionnaire, RT-qPCR, oncogènes viraux (E6 et E7), diagnostic, détection moléculaire, évaluation pré-thérapeutique

Abstract

The presence of lymph nodes metastasis in uterine cervical carcinoma influences therapeutic management and patient survival. The gold standard for metastasis detection is histology. However, histology lacks sensitivity to detect micrometastasis or isolated cancer cells and is not an efficient method for immediate diagnosis during surgery. The molecular tool that we want to develop to fill this gap is based on an analysis of expressed RNA transcripts derived from the HPV genome in cells of uterine cervical carcinoma (UCC). This will be done by reverse transcription of cellular RNA coupled to a quantitative polymerase chain reaction in real-time (RT-qPCR). This technique could allow detection and rapid assessment of micrometastasis to help determine prognosis and an immediate reliable combination therapy. The proposed technique would be a specific test, sensitive and rapid to detect lymph node involvement in the UCC to improve therapy management. Our objective is to constitute a patient bank containing genetic and clinical information. This genetic information will be used to test and improve new molecular markers for UCC metastasis. These markers will be validated using comparisons to traditional histological results and evaluated for their capacity to detect lymph nodes micrometastasis. Ultimately, we wish to develop a reliable molecular diagnosis method useful during surgery and improve our knowledge about the clinical evolution of metastatic UCC. Currently, we are able to extract high quality mRNA from formalin-fixed cells mounted in paraffin blocks and to detect E6 and E7 from HPV16 and HPV18 using RT-qPCR. We have specifically determined the detection limit of E6 and E7, which is 0.008% in the fresh samples and 0.02% and 0.05% for HPV16-E6-E7 and HPV18-E6-E7 respectively in the samples fixed in paraffin blocks. Comparatively, the histological detection limit was determined to be around 1% using immunohistochemistry for CK19 expression. Finally, our protocol has been validated for HPV18 in UCC patient lymph nodes.

Keywords: Diagnostic, lymph node metastasis, cervical cancer, uterine cervical carcinoma, pretherapeutic evaluation, RT-qPCR, viral oncogenes (E6 and E7), molecular detection.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et des abréviations	x
Remerciements	xv
CHAPITRE I: Introduction	1
I. Le virus du papillome humain	2
1. Historique	2
2. Taxonomie des papillomavirus	2
3. Biologie virale.....	5
II. Le VPH et le cancer du col de l'utérus	14
1. Épidémiologie du Cancer du Col de l'Utérus.....	14
2. Pathogenèse	15
3. Mécanisme moléculaire de l'oncogenèse	16
4. Progression des lésions et du cancer invasif	20
5. Méthodes de dépistage et de diagnostic.....	22
6. Facteurs pronostiques.....	23
7. Diagnostic de l'envahissement ganglionnaire.....	24
III. La Détection moléculaire des cellules tumorales	25
1. Détection des métastases ganglionnaire du carcinome mammaire	26
2. Détection des métastases ganglionnaire dans le cancer colorectal (CRC) et gastrique.....	28
3. Détection des métastases dans le cancer de la prostate.....	29
4. Détection des métastases dans les mélanomes malins	30
5. Détection des métastases dans le neuroblastome.....	30
6. Détection des métastases ganglionnaires dans le cancer du col de l'utérus.....	31

Problématique et objectifs du projet.....	33
CHAPITRE II: Matériel & Méthode.....	35
1. Lignées cellulaires et conditions de culture	35
2. Analyse biomoléculaire	35
2.1 Extraction de l'ARN à partir du matériel frais	35
2.2 Extraction d'ARN à partir des blocs de paraffine.....	36
3. Préparation des populations artificielles mixtes de cellules cancéreuses en échantillons frais ou en blocs de paraffine.....	37
3.1 Populations complexes artificielles par mélange de cellules vivantes :.....	37
3.2 Populations complexes artificielles par mélange d'ARN provenant de différentes populations :	39
4. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) quantitative en temps réel	39
4.1 La réverse transcriptase	39
4.2 La qPCR (Quantitative Réaction en Chaîne Polymérase)	40
4.3 Quantification de l'expression relative du gène cible	40
5. Immunohistochimie (IHC)	45
6. Tumeurs primaires et ganglions lymphatiques	45
CHAPITRE III: Résultats	46
1. Modèle de calcul des proportions tridimensionnelles des macro/micrométastases et des cellules tumorales isolées d'un ganglion.....	46
2. Détermination de la limite de détection des marqueurs moléculaires E6 et E7 de VPH16 et 18 dans du matériel frais pour le diagnostic de métastases ganglionnaires dans le CCU	48
3. Comparaison entre l'extraction d'ARN à partir de tissu frais et d'échantillons fixés dans la paraffine (échantillons complexes).	53
4. Détermination de la limite de détection des marqueurs moléculaires E6 et E7 de VPH16 et 18 dans des échantillons fixés dans la paraffine pour le diagnostic de métastases ganglionnaires dans le cancer du col de l'utérus.	55
4.1 Modèle de blocs de paraffine	55
4.2 Immunohistochimie.....	57

4.3 Détermination de la limite de détection des marqueurs moléculaires E6 et E7 de VPH16 et 18.....	61
5. Intégration de notre méthode de détection moléculaire à une étude en cours	66
6. Données préliminaires ganglions/tumeurs primaires.....	67
CHAPITRE IV: Discussion.....	75
1. Qualité d'ARN extrait.....	76
2. Validation des biomarqueurs E6 et E7 de VPH16 et 18 dans du matériel frais.....	77
4. Quantification par immunohistochimie de la Cytokératine 19	78
5. Validation de la technique de RT-qPCR sur des tissus de patientes avec CCU	80
Conclusions	81
Perspectives.....	82
CHAPITRE VI: Bibliographie.....	i
Annexe A	xviii

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I. Classification FIGO du cancer du col de l'utérus.....	23
--	----

Chapitre II

Tableau II. Séquences des amorces et des sondes <i>Taqman</i> utilisées.....	42, 43
--	--------

Tableau III. Critères de choix d'amorces et de sondes.....	44
--	----

Chapitre III

Tableau IV. Pourcentage de cellules diluées dans des blocs de paraffine vs pourcentage réel de cellules quantifiées en immunohistochimie	60
--	----

Tableau V. Résultats du génotypage des tissus en paraffine.....	69
---	----

Chapitre IV

Tableau VI. Banque d'échantillon proposé.....	83
---	----

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1. Arbre phylogénétique de la famille des <i>Papillomaviridae</i>	4
Figure 2. Région régulatrice (LCR) du VPH18	8
Figure 3. Carcinogenèse et formation du cancer	9
Figure 4. Représentation schématique de la coopération des oncoprotéines E6, E7, et E5 dans la persistance virale et l'oncogenèse	19
Figure 5. Photos histologiques des dépôts métastatiques d'un carcinome épidermoïde du CCU dans les ganglions lymphatiques pelviens	21

Chapitre II

Figure 6. Schéma représentant le protocole de préparation de culots cellulaires dans des blocs de paraffine.....	38
Figure 7. Schéma montrant les différents ARN E6/E7 et les positions des amorces et des sondes utilisées.....	41

Chapitre III

Figure 8. Illustration du calcul du volume occupé par une macro/micrométasase et par des cellules tumorales isolées dans un ganglion de 1 cm de diamètre.....	47
Figure 9. Détection de l'expression du VPH16-E6-E7 dans des populations mixtes de cellules VPH16 positives (CaSki) et de fibroblastes humaines (HCA2-hTERT) VPH16 négatives par RT-qPCR	49
Figure 10. Détection de l'expression du VPH18-E6-E7 dans des populations mixtes de cellules VPH18 positives (HeLa) et VPH18 négatives (CaSki) par RT-qPCR.....	51

Figure 11. Détection de l'expression de 18S, TBP, β -Actine et VPH16-E6 dans des cellules CaSki fraîches ou fixée dans la paraffine par RT-qPCR.....	54
Figure 12. Détection de l'expression du VPH16-E6-E7 à partir de blocs de paraffine contenant des dilutions de populations mixtes de cellules VPH16 positives (CaSki) et de fibroblastes humaines (HCA2-hTERT) VPH16 négatives par RT-qPCR	56
Figure 13. Caractérisation de l'expression de CK19 dans des populations mixtes de CaSki et HCA2-hTERT.....	58
Figure 14. Quantification du nombre de cellules dans chaque dilution par immunohistochimie pour CK19.....	59
Figure 15. Détection de l'expression du VPH16-E6-E7 à partir de dilutions d'ARN extrait de blocs de paraffine contenant des cellules VPH16 positives (CaSki) et des fibroblastes humains (HCA2-hTERT) VPH16 négatives par RT-qPCR.....	62
Figure 16. Détection de l'expression du VPH18-E6-E7 à partir de dilutions d'ARN extrait de blocs de paraffine contenant des cellules VPH16 positives (CaSki) et des fibroblastes humains (HCA2-hTERT) VPH16 négatives par RT-qPCR.....	64
Figure 17. Concentration d'ARN extrait à partir du matériel frais et tissu en paraffine.....	70
Figure 18. Expression de 18S, E6 et E7 de VPH16 dans des tumeurs primaires du col de l'utérus par RT-qPCR.....	71
Figure 19. Expression de 18S, E6 et E7 de VPH16 dans des tumeurs primaires du col de l'utérus par RT-qPCR.....	72
Figure 20. Détection de l'expression des biomarqueurs E6 et E7 de VPH18 dans les ganglions lymphatiques.....	73

Chapitre IV

Figure 21. Schéma représentant la stratégie pour générer le matériel moléculaire (ADNc/ARN) et histologique à partir d'un ganglion lymphatique de patiente.....	83
--	----

Liste des sigles et des abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

AP-1: Activator Protein 1

ARN: Acide ribonucléique

ASCUS: Atypical Squamous Cells of Undertermined Significance

ATP: Adénosine triphosphate

B

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BPV: Bovine Papillomavirus

C

CBP: CREB-binding protein

CCU: Cancer du Col Utérin

CEA: antigène carcino-embryonnaire

CHUM: Centre Hospitalier Universitaire de Montréal

CK19: Cytokératine 19

CK20: Cytokératine 20

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

CMH I: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CRC: Cancer colorectal

CRCHUM: Centre de Recherche du CHUM

CT: Cycle Threshold

CTC: Cellules tumorales circulantes

CRPV: Cottontail rabbit papillomavirus

D

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

E

E1BS: E1 binding site

E2BS: E2 binding site

E6AP: E6-associated protein

EGF-R: Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

F

FBS: Fetal bovine serum

FIGO: Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique

H

H&E: hématoxyline& Eosine

HMB-45: Human Melanoma Black

HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion

HSPG: Heparan sulfate proteoglycan

hTERT: Human telomerase reverse transcriptase

I

IAP: inhibitor of apoptosis protein

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IRM: Imagerie par résonance magnétique

IHC: Immunohistochimie

IDT: Integrated DNA Technologies

K

kDa: kilodaltons

L

LCR: Long control region

LNCap : Human prostate epithelial carcinoma cell line

M

MMP: métalloprotéase de la matrice

MUC13: Mucine 13

N

NF1: Nuclear Factor 1

O

Oct-1: Octamère-1

ORF: Open reading frame

ori: Origine de réplication virale

OSNA: One Step Nucleic Acid Amplification

P

Pap: Papanicolaou

pb: Paire de bases

PBS: Buffer phosphate salin

PCR: Polymerase chain reaction

PDZ: PSD-95, DLG, et ZO1

PEF-1: Penta-EF-hand domain containing 1

PEFF: Paraffin-embedded formalin fixed

PLM: Promyelocytic Leukemia

PMSA: Prostate-specific membrane antigen

pRb: Protéine du rétinoblastome

PTI-1: Prostate tumor inducing gene-1

PV: Papillomavirus

R

RPA: Replicative Protein A

RT-qPCR: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

RT-LAMP: Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification

RPM: Rotation par minute

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

S

Sp1: Specificity protein 1

SLN: Sentinel lymph node

T

TAP1: Antigen Peptide Transporter 1

TBP: TATA box binding protein

TDM: Tomodensitométrie

TEP: Tomoscintigraphie par émission de positons

TFIID: Transcription Factor II D

V

VEGF: Vacular endothelium growth factor

VLP: Virus-like particles

VPH: Virus du Papillome Humain

*À mes parents, Saliha et Hocine,
À mon mari Hichem,
À ma sœur Sarra,
À mon frère Chemseddine,
À ma fille Sofia*

Remerciements

Bien entendu, ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention de plusieurs personnes. Je tiens à remercier chaleureusement Dr Francis Rodier (directeur de recherche) qui a dirigé et suivi de près mon travail et ce jusqu'à sa fin. Merci pour l'encadrement, les conseils et les rétroactions qui ont toujours été très pertinentes et constructives, pour m'avoir encadré tout au long de mon projet, pour sa patience et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions. En outre, je voudrais lui exprimer ma gratitude pour sa générosité et sa compréhension surtout lors des moments difficiles que j'ai vécus après la période d'accouchement.

J'aimerais souligner le soutien de Dre Vanessa Samouëlian qui m'a aussi tenu compagnie lors du congrès de Gynécologie-oncologie qui a eu lieu à Calgary. Sans oublier sa disponibilité de façon constante pour répondre à mes questions cliniques.

Je voudrais aussi remercier ma famille du Laboratoire pour tout le soutien et l'aide qu'ils ont pu m'apporter durant ma maîtrise. Merci vivement à Guillaume Cardin (Assistant de recherche) pour les conseils qu'il m'a prodigués et pour sa bonne humeur au travail. Merci à Amel Dourdour (étudiante en maîtrise) pour tous les bons moments passés en sa compagnie. J'ai eu beaucoup de plaisirs à travailler avec eux.

Je remercie également Nicolas, Andréa, Audrey, Sabrina, Stéphanie, Fiona, Guila et Véronique Barrès qui ont fait preuve d'esprit d'équipe par leur aide et leur disponibilité.

Je profite également de l'occasion pour exprimer toute ma gratitude envers ma famille. Je remercie fortement les deux êtres qui m'ont donné la vie et qui m'ont transmis tout leur savoir, les deux que je ne pourrais jamais assez remercier: À ma mère Saliha et à mon père Hocine. Sans eux, tout cela n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir guidé tout au long de mon parcours académique. Merci énormément pour votre affection et votre soutien. Vous avez été pour moi des modèles de réussite et d'amour. J'espère que vous êtes fiers de votre fille !

Je n'oublierai pas non plus ceux qui ont partagé mes joies et mes peines, qui m'ont tant aidée et soutenue tout au long de mon projet: À ma sœur Sarra et à mon frère Chemseddine.

Un grand merci très particulier à mon cher mari Hichem pour sa gentillesse, sa patience, sa compréhension et ses encouragements. Merci pour le soutien dans les bons mais aussi dans les mauvais moments. Franchement, quel bonheur de t'avoir à mes côtés!

Pendant tout mon parcours de maîtrise, j'ai eu des hauts et des bas, mais l'arrivée de ma petite perle Sofia m'a apporté beaucoup de bonheur et m'a donné du courage et de la motivation. Merci mon petit trésor d'avoir existé!

Mes remerciements s'adressent aussi à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce projet de recherche.

Merci à tous ceux que j'oublie !

À tout ce monde un grand MERCI

CHAPITRE I: Introduction

Le cancer du col de l'utérus (CCU) demeure un problème majeur de santé publique. C'est le deuxième cancer le plus fréquent chez la femme au monde après le cancer du sein. Ce cancer est dans plus de 99% des cas dû au virus du papillome humain (VPH) [3]. L'infection au VPH est reconnue comme une des plus fréquentes infections transmissibles sexuellement. L'association du VPH avec le cancer du col est aussi reconnue depuis plusieurs années. La majorité des CCU sont associés au VPH 16 et 18, qui causent approximativement 70% des cas de CCU dans le monde entier [4]. Le potentiel oncogénique du VPH réside dans les oncoprotéines virales E6 et E7 [5].

Même si la plupart des femmes sont infectées par le VPH, seulement une minorité développera une infection persistante qui progressera vers une néoplasie cervicale de haut grade (HSIL) puis à un cancer invasif. L'intégration du VPH16 et 18 dans le génome de la cellule hôte est considérée comme un événement-clé dans la progression de l'infection vers un cancer envahissant [6] [7].

Au cours de la dernière décennie, les connaissances et les recherches sur le CCU se sont accélérées. De nouvelles technologies de détection moléculaire des petites cellules cancéreuses se développent de plus en plus et de nouveaux traitements deviennent disponibles. Selon *Fader et al, 2008*, dans le CCU, la RT-qPCR est très sensible pour détecter les cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques, mais elle n'est pas assez précise [8] [9] [10].

Dans l'étude présentée ici, nous évaluerons l'envahissement ganglionnaire dans le CCU par quantification de l'expression des oncogènes VPH 16 et 18 E6/E7 par RT-qPCR car plusieurs études préalables suggèrent que les micrométastases et les cellules tumorales isolées sont un facteur de risque important de récurrence tumorale dans le cancer du col utérin [11] [12] [13].

I. Le virus du papillome humain

1. Historique

Le virus du Papillome Humain est un grand problème de santé publique. L'étiologie infectieuse des verrues cutanées est établie en 1907 lorsque *Cuiffo* et son équipe ont induit cette infection à des volontaires, en inoculant un extrait de verrues communes filtré de ses cellules [14]. En 1933, *Shop* et son équipe ont réussi à isoler le premier virus du papillome, le *cottontail rabbit papillomavirus* (CRPV) ou *Shope papilloma virus*. Aussi, ils ont décrit la papillomatose cutanée du lapin sauvage causée par ce virus [15]. Ensuite, *Rous et Beard* ont démontré le potentiel oncogénique de ces virus suite à un transfert dans un lapin sain générant l'apparition de papillomes suivi d'une transformation en carcinome cutané [16] [17].

En 1954, *Barret et al*, ont démontré que la transmission du virus du Papillome Humain se fait par voie sexuelle [18]. Le virus du papillome humain (VPH) est reconnu comme étant la cause principale des CCU et l'infection la plus fréquente au monde [19] [3]. En 1976, *Harald zur Hausen* et son équipe ont démontré qu'il existe plusieurs sous-types de VPH [20] [21]. Depuis là, plusieurs études épidémiologiques sont réalisées pour mettre en évidence la relation entre l'infection avec un VPH à haut-risque et l'apparition de lésions malignes au niveau du col de l'utérus [22].

2. Taxonomie des papillomavirus

À l'origine, les papillomavirus (PV) sont regroupés avec les polyomavirus dans la même famille des *Papovaviridae*. Cette classification est basée sur des similarités entre ces virus qui sont des virus non-enveloppés, à ADN double-brin circulaire, entouré d'une capsidie icosaédrique. Plus tard, des différences notables entre ces virus sont découvertes, dont la taille de la capsidie, l'organisation génomique et aucune similarité majeure dans leur séquence nucléotidique ou protéique. Ils sont maintenant officiellement reconnus par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) comme deux familles distinctes, les *Papillomaviridae* et les *Polyomaviridae* [23].

La classification des PVs est basée sur leur séquence génomique. La séquence du gène L1 est la plus conservée dans le génome des VPH et est utilisée pour l'identification de nouveaux types de PV au cours des 15 dernières années. On définit un nouveau type de PV si leur

génomome complet est séquencé et si la séquence d'ADN du gène L1 diffère de plus de 10% des autres types de VP déjà identifiés. Si la variation est entre 2% et 10% d'homologie dans la séquence du gène L1, c'est un sous-type, et une variante intra-typique en présence de moins de 2% de variation dans les régions codantes ou moins de 5% de variation dans les régions non-codantes [24] [25] [23]. Cette définition est convenue entre tous les scientifiques travaillant sur la taxonomie et le diagnostic des Papillomavirus à l'Atelier International sur le Papillomavirus qui s'est tenu à Québec en 1995.

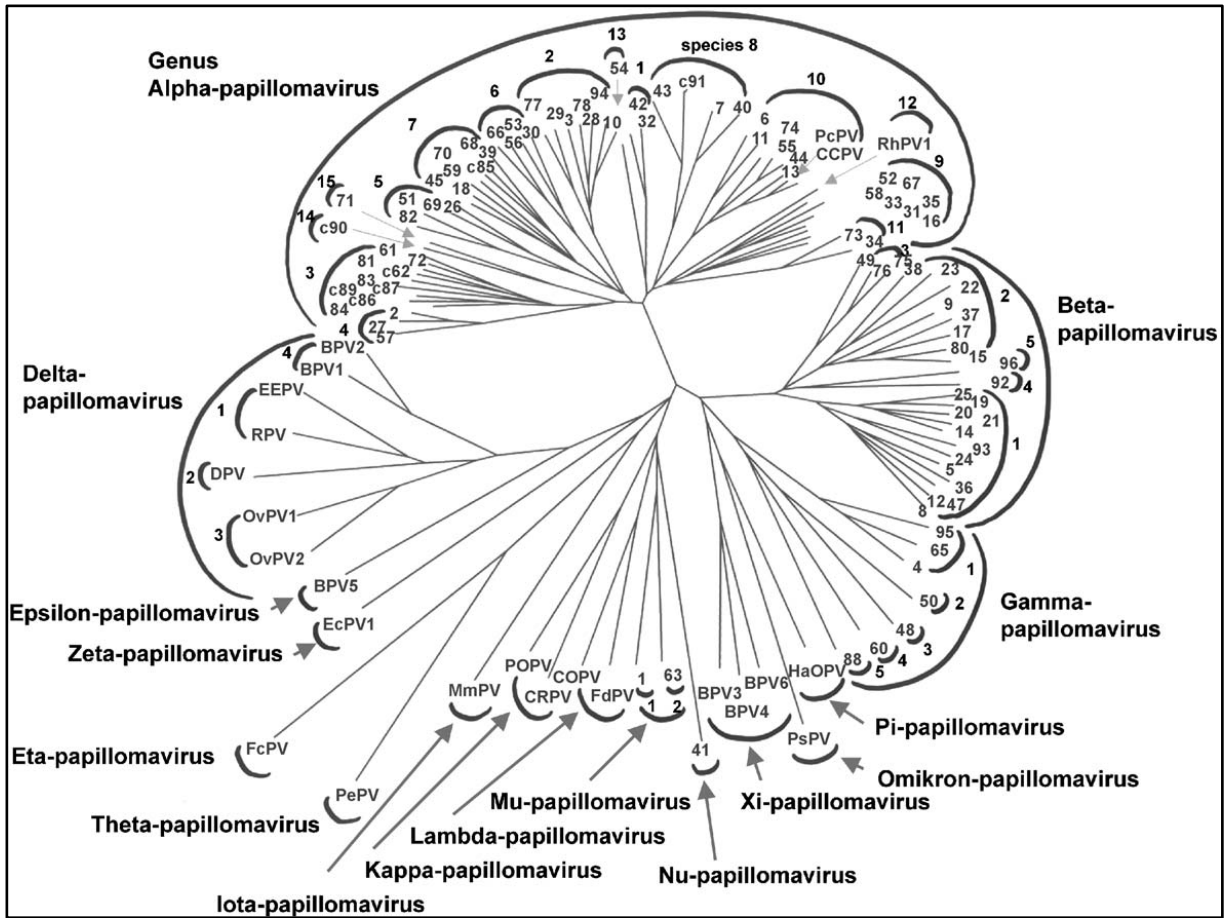


Figure 1: Arbre phylogénétique de la famille des Papillomaviridae.

L'arbre contient les séquences de 118 types de papillomavirus. Il est construit en utilisant le programme d'arborescence de l'Université de Glasgow. La famille Papillomaviridae est subdivisée en seize genres qui sont indiqués par des symboles semi-circulaires ultrapériphériques, par exemple le genre d'alpha-virus du papillome. Chaque genre est divisé en espèces, le nombre sur le symbole semi-circulaire interne se réfère à des espèces de papillomavirus. Enfin, au sein d'une espèce, les virus sont classés en types (VPH16, VPH18, etc). Par exemple, le Papillomavirus humain du type VPH16 appartient à l'espèce 9 et au genre α [23].

Permission obtenue par l'auteur pour reproduction de la figure (*de Villiers et al, 2004*)

3. Biologie virale

3.1 Organisation du génome viral

Le génome des VPH est constitué d'un ADN circulaire double brin d'environ 8000 paires de base. L'ensemble des gènes est transcrit à partir d'un seul brin. Le génome comporte trois régions dont deux sont codantes. La région précoce code pour des protéines impliquées dans la réplication virale, l'oncogenèse et le relâchement des virions, etc. La région tardive code pour les protéines qui vont permettre la formation des virions. La région non codante (LCR), très variable et contient des séquences de régulation de la réplication et de la transcription [26].

3.2 Les protéines précoces

La protéine E1 est une protéine nucléaire de 600 à 650 acides aminés, et de poids moléculaire variant entre 68 et 85 kDa. Elle est essentielle à la réplication de l'ADN viral. Elle initie la réplication en se liant à la protéine E2. L'hétérodimère E1-E2 se lie à la séquence *ori* (origine de réplication) localisée dans la région LCR. Cette séquence possède une région de liaison pour la protéine E1 (E1BS: E1 *binding site*) flanqué lui-même de plusieurs sites de liaison pour la protéine E2 (E2BS). La protéine E1 possède une activité hélicase ATP-dépendante qui permet de séparer les deux brins d'ADN avant leur réplication [27].

La protéine E2 est une protéine nucléaire d'environ 45 kDa et 360 acides aminés organisée en trois domaines fonctionnellement distincts. La protéine E2 est essentielle pour le cycle de vie viral et est impliquée dans diverses fonctions. E2 participe à l'initiation de la réplication de l'ADN viral en s'associant à l'hélicase virale E1, cette interaction est primordiale afin de permettre de E1 de lier spécifiquement l'ADN au niveau de l'origine de réplication. Elle joue aussi un rôle important dans la répression de la transcription virale, en particulier les oncogènes E6 et E7, en se liant aux sites E2BS situés à proximité de la TATA box des promoteurs P97 pour VPH16 et P105 pour VPH18 entre autre en provoquant un encombrement stérique au site d'initiation de la transcription et interférant avec la liaison des facteurs de transcription de type TFIID et du facteur SP1. Et d'ailleurs, il est connu que dans la majorité des CCU, l'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire mène à la destruction du cadre de lecture de E2, ce qui induit une surexpression des oncoprotéines. E2 est aussi impliqué dans la ségrégation du génome viral pendant la mitose par sa capacité à se lier à

l'ADN viral et les chromosomes cellulaires via des sites spécifiques retrouvés dans la région LCR [27].

La protéine E4, bien que codée par un gène précoce, est considérée comme une protéine tardive exprimée le plus souvent en parallèle avec les protéines de structure L1 et L2. Elle permet la production des particules virales, en facilitant l'encapsidation du génome et en favorisant la diffusion et la libération des virions par destruction du réseau de filaments de cytokératine. Cette destruction perturbe le cytosquelette de la cellule-hôte ce qui facilite le relâchement des virions à la surface de l'épithélium. Une autre fonction de cette protéine décrite par *Doorbar et al, 1991*, est son interaction avec les ARN hélicases impliquées dans la stabilité des ARN et le contrôle de la traduction [27] [28].

Les protéines E5, E6 et E7 sont impliquées dans l'oncogénicité du virus VPH et seront décrites en détail dans la partie **pathogénèse**.

La protéine E8 ou E8^{EC2} contient 12 acides aminés de l'ORF de E8, ces derniers sont fusionnés à la région charnière et au domaine de liaison-dimérisation en C-terminal de la protéine E2. C'est une protéine résultant de l'épissage alternatif des transcrits de E2, elle contribue à la répression de l'activité transcriptionnelle de la protéine E2 par compétition pour les sites de liaisons de E2 et certains facteurs de transcription cellulaire, de plus, elle régule entre autre le nombre de copies de l'épisome viral [181].

L'équipe de *O'Brien et al, 1998* a montré que la protéine E8 du papillomavirus Bovin de type 4 est capable de transformer des lignées de cellules immortalisées NIH3T3 dont la croissance devient indépendante de l'ancrage [29].

3.3 Les protéines structurales

La protéine L1 est la protéine majeure de la capsid virale. Cette protéine glycosylée est hautement conservée entre les papillomavirus. Elle porte les antigènes spécifiques de genre et de type. La portion C-terminale de la protéine L1 du VPH16 comporte deux signaux de localisation nucléaire qui permettent son transport dans le noyau où a lieu l'assemblage des particules virales. La portion N-terminale contient une séquence YXPPXXP indispensable à la formation de VLP (Virus-Like particule). En effet, ces protéines ont la capacité de s'auto-assembler en l'absence d'autres protéines virales pour former des particules virales vides

ressemblant à des capsides qui sont hautement immunogéniques. Elles sont une source d'antigènes pour le développement de tests sérologiques ELISA et pour la production des vaccins qui sont actuellement sur le marché [30].

La protéine L2 est une protéine mineure de la capside virale. Elle est moins conservée que la protéine L1. Cette protéine permet, en association avec la protéine L1, l'assemblage du virus et la stabilisation de la capside. Aussi, elle assure le transport du génome viral au noyau de la cellule-hôte pour initier le cycle de réplication et la transcription virale [15]. Lors de l'établissement de l'infection, L2 est impliquée dans l'échappement des particules virales aux endosomes [16].

3.4 La région régulatrice (LCR)

La région régulatrice (LCR) est localisée entre les ORFs de L1 et de E6. Elle est globalement caractérisée par une faible conservation de séquence et une variation de taille, allant de 680 à 950 pb. C'est une région impliquée dans l'initiation de la réplication et la régulation de la transcription des gènes viraux. Plusieurs facteurs de transcription cellulaires se lient au LCR et agissent soit comme activateurs (AP-1, NF1, Sp1, PEF-1, etc.) ou comme répresseurs (Oct-1, YY1, etc.) de la transcription des gènes viraux [31].

Particulièrement intéressant pour le travail présenté dans ce mémoire, l'expression des oncogènes E6 et E7 est régulée au niveau transcriptionnel par des sites de liaison de protéines contenues dans la région LCR. Il est démontré que l'expression des oncogènes E6 et E7 est dépendante du complexe activateur AP-1 (Fos/Jun) et que les changements de séquence dans la région LCR peuvent avoir un impact sur la transcription des oncogènes viraux [32] [33]. Donc, il existe un lien entre la régulation de la transcription des oncogènes E6 et E7 par le LCR et la différenciation cellulaire [33]. Selon *Tan al, 1994*, la protéine virale E2 se lie à ses sites E2BS au niveau de la LCR et réprime la transcription des gènes précoces. Cette répression empêche la liaison des facteurs d'initiation de la transcription [34].

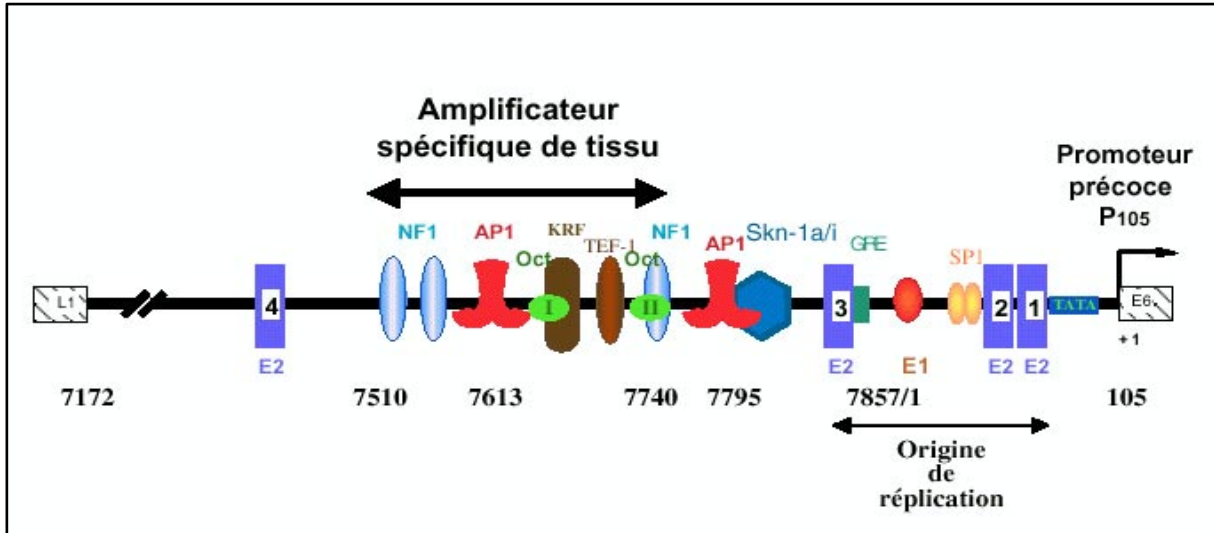


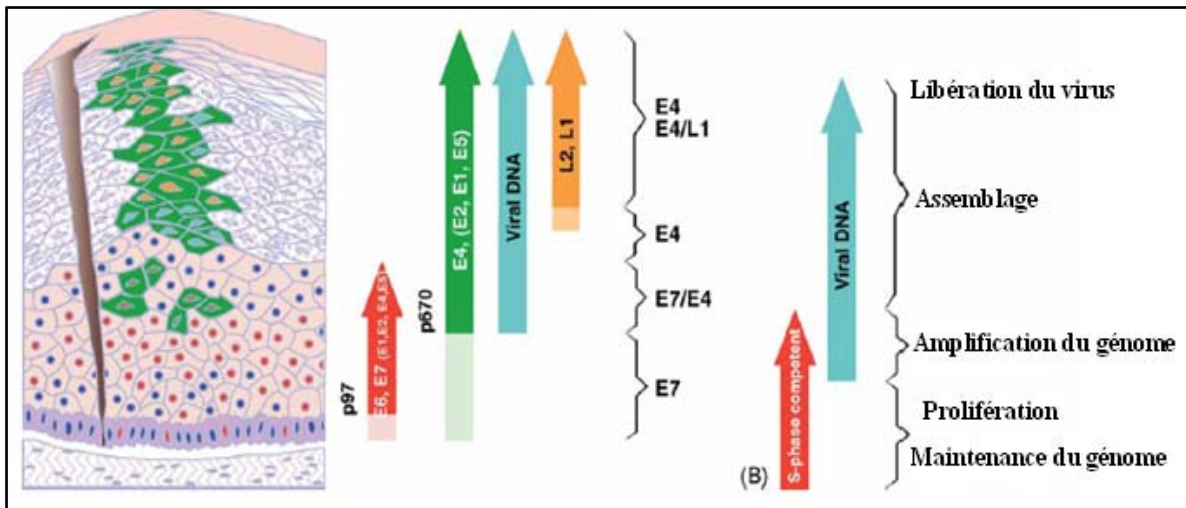
Figure 2 : Région régulatrice (LCR) du VPH18. La région régulatrice est divisée en trois parties: Le promoteur précoce, l'amplificateur (enhancer) et une autre partie moins connue. Plusieurs facteurs interagissent avec la LCR, tels que les protéines virales E1 et E2, les facteurs de transcription cellulaire YY1, Oct-1 et AP-1, etc. De plus, il y a d'autres facteurs de spécificité tissulaire comme KRF, Skn-1a/i et TEF. On note la présence de deux sites AP1 dans cette région [35].

Permission obtenue par l'auteur pour reproduction de la figure (*Bouallaga et al, 2005*)

4. Cycle viral

Les papillomavirus infectent de façon spécifique les cellules des épithéliums stratifiés squameux, qui sont en différenciation constante.

A)



B)

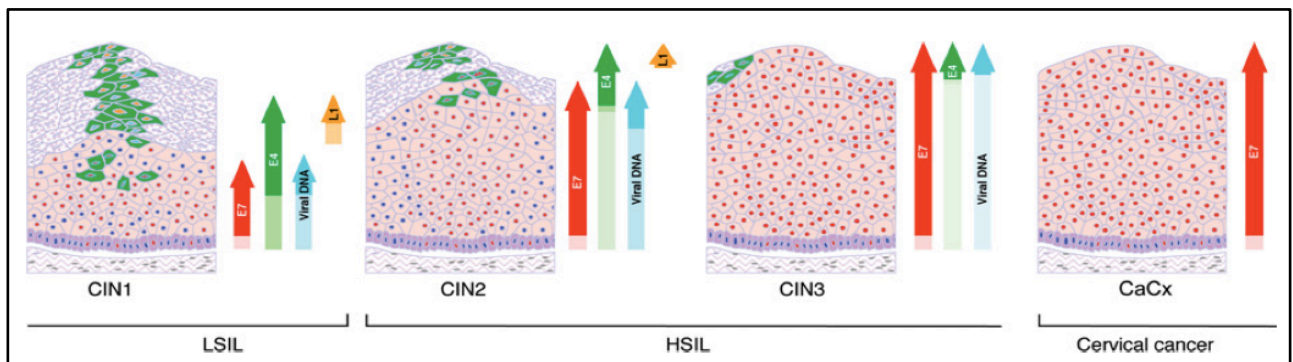


Figure 3 : Carcinogénèse et formation du cancer.

Représentation schématique de l'évolution de l'infection au VPH et l'expression des protéines virales durant le processus de différenciation des cellules épithéliales (A). Expression des protéines virales suivant l'évolution de la lésion (B) [36].

Permission obtenue par l'auteur pour reproduction de la figure (Doorba et al, 2005)

4.1 Pénétration du virus dans la cellule hôte

Suite à une microlésion tissulaire, les VPH peuvent atteindre les cellules de la couche basale de l'épithélium. En effet, leur multiplication est corrélée à la différenciation épithéliale entraînant une production effective de virions seulement au niveau des kératinocytes différenciés des cellules superficielles [26]. En fait, la réplication du virus n'aura lieu que dans les cellules épithéliales très différenciées et non dans la couche basale ou dans les fibroblastes du derme sous-jacent.

Actuellement, certains mécanismes impliqués dans l'entrée du virus sont connus. La liaison du VPH avec la cellule hôte se fait via la protéine majeure de la capsid L1 et les héparanes sulfate protéoglycane (HSPG). Ce sont des récepteurs à la surface cellulaire. Il y existe deux familles d'HSPG, les syndécane et les glypicanes [37]. De plus, il a montré que la liaison entre l'HSPG et la protéine majeure de la capsid L1 entraîne un changement de conformation au niveau des protéines de la capsid, ce qui permettrait l'apparition d'un domaine de liaison pour un second récepteur plus spécifique que l'HSPG qui peut être l'intégrine $\alpha 6$ [38].

Des travaux récents ont suggéré que l'internalisation des virions est un processus lent, avec une demi-vie de quelques heures plutôt que quelques minutes, et qu'il se produit à travers l'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine [36]. Le transfert de l'ADN viral au noyau est facilité par la protéine mineur de la capsid L2 et par le démantèlement des ponts disulfure intra-capsomérique dans l'environnement réducteur de la cellule [39].

4.2 Phase de maintenance du génome

Suite à l'infection et à la décapsidation, le génome viral est maintenu sous forme épisomique dans les cellules basales de l'épithélium. Les protéines précoces virales E1 et E2 jouent un rôle très important dans le maintien de l'ADN viral comme épisome et dans la ségrégation des génomes viraux au cours de la division cellulaire [40].

La protéine E1 est essentielle à la réplication du génome viral mais l'affinité d'E1 pour son site est faible. La fixation de E1 sur l'origine de réplication dépend de son interaction avec la protéine E2 [41]. E1 et E2 se fixent ensemble pour permettre la formation d'un complexe hexamérique d'E1, capable, après le départ d'E2, de déformer l'ADN pour l'initiation de la réplication. Cette dernière nécessite aussi la présence de la protéine RPA, qui se fixe sur

l'ADN simple brin et le stabilise [42]. À cette étape du cycle viral, l'expression des oncoprotéines E6 et E7 n'est pas encore établie mais elle suivra sous peu. Suite à l'expression de E6/E7, une phase proliférative aura lieu durant laquelle le nombre de cellules basales portant le virus augmente [43].

4.3 Phase de prolifération

Dans un épithélium sain, les cellules basales quittent le cycle cellulaire, migrent vers les couches suprabasales et débutent un processus de différenciation afin de produire une barrière de protection. Cependant, lors d'une infection par le VPH, le processus de différenciation n'aura pas lieu et le cycle cellulaire est maintenu [36]. Brièvement, l'oncoprotéine E7 s'associe avec la protéine pRb pour inhiber la formation du complexe pRb/E2F et permettre le recrutement de la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication de l'ADN viral comme cellulaire [44]. pRb est un régulateur négatif du cycle cellulaire qui empêche normalement l'entrée à la phase S, en associant à la famille E2F des facteurs de transcription. Malgré la capacité d'E7 à stimuler la prolifération cellulaire, au cours de l'infection productive seulement un sous-ensemble de cellules des couches parabasales est en mitose active. L'oncoprotéine E6 vient compléter le rôle d'E7. E6 s'associe avec p53 pour inactiver la suppression de la croissance et/ou la stimulation apoptotique médiée par p53, E6 peut aussi s'associer avec d'autres protéines pro-apoptotiques pour bloquer cette mort cellulaire [36]. La présence d'E6 est considérée comme un facteur prédisposant au développement de cancers associés au VPH en permettant l'accumulation d'erreurs dues au hasard dans l'ADN de la cellule hôte. Aussi, selon *Doorbar et al, 2005*, les protéines virales E1, E2, E4 et E5 sont exprimées avant le début de l'amplification du génome afin d'assurer le maintien de l'épisome virale à faible nombre de copies [36].

Les mécanismes d'action d'E6 et E7 dans le contexte du cancer seront décrits en détails dans la partie pathogénèse.

4.4 Phase d'amplification

Cette phase est nécessaire à la formation des particules virales infectieuses. Elle se produit dans les couches moyennes ou supérieures de l'épithélium suite à une augmentation de l'activité du promoteur tardif du VPH. L'activation de ce dernier entraîne une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral (E1, E2, E4 et E5), sans affecter directement l'expression des protéines E6 et E7 qui sont nécessaires pour l'entrée en phase S [45]. L'amplification du génome viral nécessite l'expression de tous les gènes viraux précoces [46]. Tout au long du cycle de vie du virus, les niveaux des protéines virales sont contrôlés par le promoteur et dépend de l'épissage alternatif des transcrits. En plus, l'augmentation de l'expression de E1 et E2 permet une augmentation du nombre de copies virales dans les couches épithéliales supérieures [47]. Les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'activation du promoteur tardif et la régulation d'expression de E1/E2 ne sont pas encore bien compris, et il est possible que ce promoteur est constitutivement actif à tous les stades du cycle de production [45].

4.5 Phase d'assemblage et de libération des particules virales

Les protéines de structure L1 et L2 permettent l'assemblage des particules infectieuses dans les couches supérieures de l'épithélium [48]. Le génome est encapsidé dans un assemblage icosaédrique. Il a été suggéré que les corps PML (*ProMyelocytic Leukemia*) peuvent être les sites de réplication de l'ADN viral [49] [50], et que la protéine L2 s'accumule avec E2 sur ces sites pour faciliter l'emballage. L'assemblage des particules virales aura lieu lorsque les capsomères de L1 vont pénétrer dans le noyau et recrutés par L2 au niveau des PML. L'encapsidation peut se faire en absence de L2, par contre, elle sera moins efficace [51] [52]. Les papillomavirus sont non-lytiques et le délai entre l'infection et la libération du virus est d'environ trois semaines [53].

4.6 Intégration et carcinogenèse

Le délai entre l'infection et l'apparition de lésions peut s'étendre de quelques semaines à quelques mois. Le développement tumoral résulte de l'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule hôte. En fait, dans une cellule infectée, le génome viral peut être retrouvé soit sous forme épisomique, soit sous forme intégrée, ou les deux [54]. Une caractéristique commune des virus associés aux cancers est leur capacité à provoquer des sites de tumeurs où leur cycle viral productif est inachevé. Cette caractéristique générale semble être vraie pour les VPHs [55]. Par rapport à la prévalence des infections VPH dans la population, en général, le nombre de lésions qui évoluent vers un cancer est très faible (1%). Chez les femmes, qui n'ont pas réussi à se débarrasser de l'infection, ces lésions peuvent évoluer à des néoplasies intraépithéliales cervicales (*CIN*), et peuvent encore progresser vers des lésions de type *CIN2*, ensuite *CIN3* [56] [57]. Les lésions *CIN3* sont fréquemment adjacentes aux zones de cancer invasif caractérisées par une effraction de la membrane basale.

L'évènement clé dans la progression des lésions productives à néoplasies de haut grade est la dérégulation de l'expression des oncoprotéines E6 et E7, ce qui entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire dans les couches épithéliales inférieures et une incapacité à réparer les mutations dans l'ADN de la cellule hôte [58]. Plusieurs groupes de recherche pensent que la zone de transformation est un site particulièrement sensible pour le développement du cancer du col [54]. De plus, Il semble que les types de VPH à risque élevé tels que VPH16 ne peuvent pas compléter de manière fiable leur cycle de vie à ce site, entraînant parfois une infection abortive. La progression de *CIN3* au cancer survient généralement dans les lésions qui contiennent des copies intégrées du génome viral dans lequel E7 est surexprimé. Par la suite, la rétention de E6 et E7 et la perte des gènes E2 et E4, qui peuvent exercer un effet positif permanent sur la croissance cellulaire, accompagné généralement par le développement éventuel du cancer invasif du col utérin [54].

II. Le VPH et le cancer du col de l'utérus

Le Virus du Papillome Humain est responsable de plus de 99% des cas de cancer du col de l'utérus [59]. Il est aussi impliqué dans d'autres cancers ano-génitaux et de l'oropharynx incluant 85% des cancers de l'anus, 50% des cancers du pénis, de la vulve et du vagin, et environ 20% des cancers de la tête et du cou [60]. L'importance de ces cancers varie selon différentes variables par exemple, selon les régions dans le monde, le sexe, l'âge, le comportement sexuel, etc.

Le lien entre le VPH et le CCU est bien démontré. Dans une analyse qui porte sur 1918 patientes avec un cancer du col utérin, l'ADN du VPH est détecté dans 96,6% des cas par comparaison avec 15,6 % des témoins. Les types les plus fréquemment détectés en ordre décroissant de fréquence sont les suivants: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 et 35. Selon la classification épidémiologique, les types de VPH entraînant un risque élevé sont 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82, ceux qui sont peut-être à risque élevé 26, 53 et 66, et ceux entraînant un faible risque sont 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 et CP6108 [53].

1. Épidémiologie du Cancer du Col de l'Utérus

Le CCU est le deuxième cancer le plus fréquent chez la femme dans monde, et surtout dans les pays en voie de développement puisque 85% des cas de CCU sont retrouvés dans ces pays. Il représente environ 13% des cancers chez la femme [61]. Selon les dernières estimations, Les taux de mortalité dus au CCU ont diminué mais la maladie a tué encore 200 000 femmes en 2010, dont 46 000 étaient âgées de 15-49 ans dans les pays en développement [62].

En Amérique du Nord, le taux de mortalité est relativement faible et celui du Canada est le plus bas. Au Canada, le CCU se classe au 10ième rang parmi les cancers diagnostiqués chez l'ensemble des femmes mais il se retrouve au 3ième rang chez les femmes de 20 à 49 ans [63]. Selon les statistiques canadiennes 2013, 1450 Canadiennes recevront un diagnostic de cancer du col de l'utérus et 380 femmes mourront d'un cancer du col de l'utérus au Canada (*Société canadienne du cancer, 2013*).

Une femme sur 150 devrait souffrir d'un cancer du col de l'utérus pendant sa vie et une sur 423 en mourra (*Agence de la santé publique au Canada*). Au cours des derniers 30 ans, on observe

une diminution constante de l'incidence du cancer du col utérin et des taux de mortalité suivant l'introduction du test de *Papanicolaou* ou (test Pap) au Canada en 1949 (*Organisation mondiale de la santé, 2004*).

L'âge moyen de diagnostic du cancer est de 50 ans, alors que l'âge moyen d'apparition des lésions CIN2 et CIN 3 est de 28 ans, ce qui suggère qu'il y a un temps de latence entre l'infection et l'évolution d'une lésion dysplasique ou d'un cancer. [64] .

Le CCU est une menace pour la santé publique. L'histoire de la maladie est bien connue et passe par plusieurs phases précancéreuses dépistables. En fait, il existe des tests de dépistage de diagnostic ainsi que différentes stratégies de traitement disponibles. Et, d'ailleurs depuis l'introduction du test PAP, il y a plus de 25 ans, le taux de décès dû au cancer du col de l'utérus a diminué de près de 50% et le taux de survie de cinq ans est de 74% (*Santé Canada, 2012*).

2. Pathogenèse

Jusqu'à maintenant, plus de 200 types de VPH ont été caractérisés [65] [66]. Il existe environ 40 génotypes infectant la région ano-génitale [67]. Les VPH sont divisés en deux catégories selon le risque d'oncogenèse associé. Les deux catégories se différencient par la capacité du virus à intégrer le génome de la cellule hôte, c'est à dire leur capacité à transformer les cellules infectées pour leur conférer le phénotype cancéreux [68]. Les VPHs à haut risque sont responsables de lésions précancéreuses et cancéreuses au niveau du col utérin et de diverses localisations ano-génitales, tels que l'anus, la vulve, le vagin et le pénis. D'autres part, les VPHs à bas risque ou sans risque oncogéniques sont à l'origine des lésions bénignes de la sphère ano-génitale: condylomes, verrues et des dysplasies cervicales de bas grade [23].

Le rôle carcinogène des VPHs à haut risque est bien démontré dans le cancer du col de l'utérus. Après l'intégration du génome viral, les protéines virales E6 et E7 sont produites et favorisent la dégradation des protéines suppresseurs de tumeurs p53 et pRb [19]. Il est très bien connu que le VPH de type 16 est le virus oncogène le plus fréquemment trouvé dans les cancers du col de l'utérus, à environ 53% des cas, suivi par le VPH de type 18, à environ 17% des cas. Ce qui représente environ 70% des cancers du col utérin [4]. Le col de l'utérus possède une surface particulière qui n'existe pas ailleurs dans l'utérus. Il se développe d'une

zone appelée zone de transformation ou zone de jonction. Cette zone joint l'épithélium squameux exocervical et l'épithélium pavimenteux glandulaire endocervical. Lors d'une infection, les cellules épithéliales du tractus ano-génitale acquièrent une morphologie particulière incluant des altérations cytologiques et histologiques tel que des irrégularités nucléaires. La phase productive du cycle viral est associée à un néoplasie intraépithélial cervical de bas grade (CIN1). Elle se manifeste par une augmentation de l'activité mitogène et la présence des grandes cellules vacuolaires productrices de particules virales. Selon *Richart et al*, les lésions de bas grade (CIN 1) sont causées par des infections au VPH productives, 20 % par des VPH à faible risque et 80 % par des VPH à haut risque [1]

Lorsqu'on parle de lésions précancéreuses (CIN2 et 3), celles-ci peuvent avoir des évolutions différentes: la progression, la régression ou la persistance. Elles sont caractérisées par la présence de plusieurs anomalies nucléaires, d'un haut taux de mitose et par une désorganisation de l'architecture cellulaire [56]. Toutefois, la majorité des lésions ont une évolution bénigne, avec des taux de régression allant de 32 à 57 % en fonction de la gravité de la lésion [69].

Lorsqu'une lésion précancéreuse persiste (CIN3) et qu'elle n'est pas dépistée, elle va progresser graduellement pendant des années, et atteindre le stade du cancer invasif. Une fois que ce stade est atteint, il y aura une effraction de la membrane basale et une prolifération anarchique des cellules à travers celle-ci. La propagation du cancer peut se faire à proximité pour aller toucher les organes tels que la vessie et le rectum ou bien à distance par métastases via le système lymphatique et/ou sanguin [69]. On distingue deux types de cancer, le carcinome épidermoïde, qui représente 90% des cas, et l'adénocarcinome, qui est moins fréquent [59].

3. Mécanisme moléculaire de l'oncogénèse

L'infection au virus du papillome humain est la principale cause du CCU humain. L'oncogénèse est due à l'expression des oncoprotéines E6 et E7 (Figure 4).

3.1 Rôle oncogénique de la protéine E5

La protéine E5 est une protéine hydrophobe composée de 83 résidus d'acides aminés, elle est détectée dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la membrane nucléaire des

cellules infectées [70]. Le rôle de la protéine E5 n'a pas été entièrement élucidé. Cependant des études ont démontré son implication dans la perturbation de la voie de dégradation des EGF-R et donc elle retarde leur endocytose, ce qui augmente leur concentration et leur activité à la surface cellulaire apportant une stimulation de la prolifération cellulaire [71] [72] [27] [73]. Les cellules qui expriment la protéine E5 présentent aussi une forte expression des gènes c-Fos, c-Jun de la famille AP-1, un facteur activateur de la transcription des gènes viraux, cela pourrait induire une augmentation de la transcription des oncogènes viraux E6 et E7 [74].

Enfin, la protéine E5 est impliquée dans la diminution de l'expression de la calnexine qui a un rôle dans la formation du complexe CMH-I. Elle semble aussi diminuer l'expression de TAP1, qui est essentiel au transport des peptides antigéniques [27]. De plus, elle entraîne la rétention du complexe CMH-I dans l'appareil de Golgi et inhibe sa localisation à la membrane plasmique. Tout cela, contribue à l'échappement au système immunitaire des cellules infectées [75].

E6 et E7 sont les protéines multifonctionnelles majeures des VPH de haut risque. Elles sont capables d'immortaliser et de transformer les cellules humaines.

3.2 Rôle oncogénique de la protéine E6

Les protéines E6 sont de petites protéines d'environ 150 acides aminés et d'une masse moléculaire d'environ 19 KDa, elles comportent quatre motifs Cys-x-x-Cys capable de former deux doigts de zinc. Ces motifs sont impliqués dans un rôle transactivateur de E6 [76] [77]. Le rôle principal de E6 est sa capacité à induire la dégradation de la protéine suppresseur de tumeur p53 via la voie de l'ubiquitine et le protéasome. p53 est essentielle au maintien de l'intégrité du génome, elle régule l'expression des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, y compris l'inhibiteur de la cycline kinase (cdks) p21 [78] [79]. Lorsqu'elle est inactive, cela favorise la formation de tumeurs [80]. Elle est présente en faibles concentrations dans les conditions normales. Cependant, lors d'un stress physiologique ou un dommage à l'ADN qui peuvent conduire à une prolifération anarchique des cellules et à l'accumulation d'erreurs génomiques et donc à la formation de tumeurs, p53 est activée et induit la surexpression de p21 résultant en un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 pour réparer les dommages ou déclencher l'apoptose des cellules altérées. Les VPHs à haut risque

permettent la progression du cycle cellulaire en liant l'oncoprotéine E6 à E6AP, une protéine de la famille des E3 ligases, pour former un complexe ternaire avec p53. Cette liaison aboutit à l'ubiquitination de p53, et donc à sa dégradation par le protéasome 26S [81]. La dégradation de p53 empêche la cellule d'entrer en apoptose et favorise l'immortalisation cellulaire, ce qui mène à la tumorigénèse [82].

De plus, E6 régule indirectement p53 en se liant à son co-activateur CBP/p300, cette liaison a pour effet de diminuer l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 [82]. Une autre fonction importante de E6 est de promouvoir la survie des cellules infectées en augmentant l'expression d'inhibiteurs d'apoptose tels que c-IAP2. De même, elle active la transcription de hTERT, gène codant pour la sous-unité catalytique du complexe télomérase, par l'action combinée de Myc et Sp-1, ce qui permet une prolifération illimitée des cellules infectées [83] [84]. L'une de ces interactions importantes semble être celle avec les protéines possédant un domaine PDZ, elle médie leur dégradation par le protéasome, ce qui a pour effet de perturber l'adhésion cellulaire et joue un rôle important dans la formation des métastases [85].

Enfin, bien que la protéine E6 soit capable d'immortaliser les cellules, la transformation des kératinocytes par les papillomavirus nécessite l'activité d'une seconde protéine, la protéine E7 [86] [5].

3.3 Rôle oncogénique de la protéine E7

La protéine E7 est une protéine de 98 acides aminés, elle comporte deux motifs Cys-x-x-Cys qui sont impliqués dans sa dimérisation et son activité transformante [87]. L'oncoprotéine E7 est impliquée dans la dégradation de la protéine suppresseur de tumeur rétinoblastome pRb. Cette dernière participe à la régulation du cycle cellulaire en séquestrant, sous une forme hypophosphorylée, le facteur de transcription E2F qui est essentiel à l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la stimulation de la prolifération cellulaire [88]. Dans une cellule saine, E2F est complexé avec pRb non phosphorylée, cette liaison empêche la transcription des gènes cellulaires contrôlés par E2F nécessaires à l'entrée de la cellule en phase S. Cependant, en présence du VPH, E7 se fixe spécifiquement à la forme non phosphorylée de pRb, cette liaison entraîne le relâchement du facteur E2F, ce qui permet l'entrée de la cellule en phase S et donc autorise la réplication du génome viral. Cela contribue aussi à dérégler la multiplication cellulaire et à permettre le développement du cancer.

L'affinité pour pRb des protéines E7 des virus à haut risque est 10 fois plus forte que celle des virus à bas risque [89]. Dans le cas où pRb n'est plus fonctionnelle, la cellule privilégie l'apoptose. Dans ce cas, le VPH permet d'exprimer l'oncoprotéine E6 pour contrer la voie apoptotique [90].

De plus, E7 peut s'associer avec p21 et p27 en neutralisant leur effet inhibiteur sur le cycle cellulaire. E7 module aussi l'expression d'autres protéines cellulaires, elle active l'expression de molécules d'adhésion tels que: E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1 [91]. Cependant, elle inhibe l'expression de la fibronectine [92], et des gènes impliqués dans des voies de présentation des antigènes, comme le CMH-I, ce qui permet au virus d'échapper au système immunitaire [93]. Enfin, il est important de souligner que E7 joue un rôle important dans l'instabilité génomique, l'anormalité centrosomique, et spécifiquement dans l'infection au VPH [94].

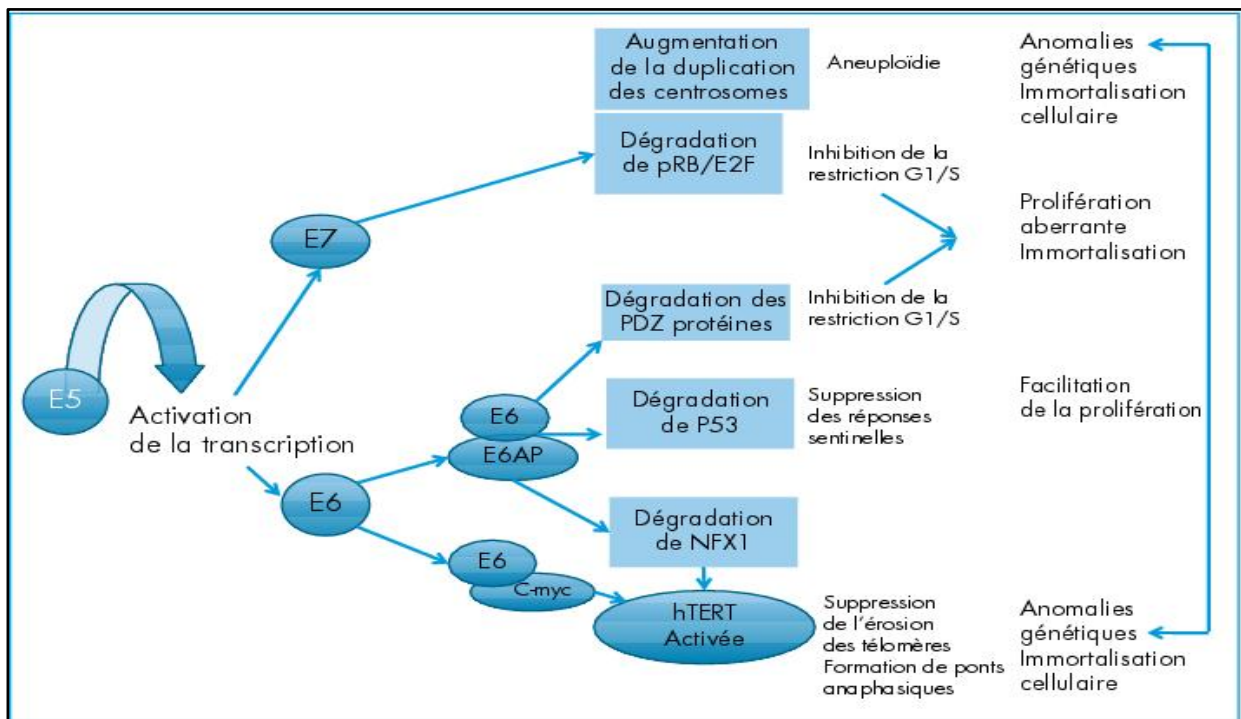


Figure 4 : Représentation schématique de la coopération des oncoprotéines E6, E7, et E5 dans la persistance virale et l'oncogénèse

Les trois oncoprotéines coopèrent non seulement pour favoriser l'échappement du virus à la réponse immune mais aussi pour transformer les cellules basales et suprabasales. Cette coopération favorise l'activation de la prolifération cellulaire par inactivation des répresseurs de l'entrée en phase S, la dérégulation de la ségrégation des chromosomes et l'augmentation de l'activité télomérase. Cela contribue à l'augmentation de la fréquence des mutations dans les cellules en phase de croissance. De plus, l'inhibition des facteurs cellulaires suppresseur de tumeur p53 et pRB empêche la mort des cellules transformées [95].

Permission obtenue par l'auteur pour reproduction de la figure (*Alain et al, 2010*)

4. Progression des lésions et du cancer invasif

Le CCU est une maladie des cellules de la muqueuse du col de l'utérus. Il s'agit d'un carcinome épidermoïde dans 90% des cas [59]. Rarement, il apparaît dans les cellules glandulaires du canal cervical pour devenir un adénocarcinome. Les épithéliomas du col utérin ont une évolution d'abord locorégionale, se poursuivant plus ou moins rapidement par une propagation lymphoganglionnaire puis, en général plus tardivement, veineuse et métastatique [96].

À un stade initial, lorsque seule la couche supérieure de la muqueuse est touchée, il n'y a pas encore de cancer et on diagnostique une lésion précancéreuse ou l'occurrence d'une néoplasie cervicale intraépithéliale. Cependant, il arrive que les cellules d'une lésion précancéreuse poursuivent leur progression dans la muqueuse, franchissent la membrane basale et envahissent le stroma du col de l'utérus puis les organes voisins, vers les ganglions lymphatiques. Ces tumeurs peuvent métastaser vers les ganglions ou d'autres organes à distance à travers les vaisseaux lymphatiques ou sanguins. Les sites préférentiellement atteints sont le foie, les poumons, les chaînes scaléniques et médiastinales et les os. C'est un cancer invasif qui met au moins 15 ans à se développer après une infection à VPH à haut risque oncogénique [97]. La voie lymphatique représente le principal mode de dissémination à distance des cancers du col.

En cancérologie, les métastases sont des tumeurs secondaires. C'est la croissance d'une cellule tumorale à distance du site original et atteint par voie sanguine ou lymphatique [98]. La formation d'une métastase est le résultat de plusieurs étapes: dans la tumeur primaire, prolifération et angiogenèse, perte de l'adhésion cellulaire, acquisition de la capacité de mobilité et de diffusion. Ensuite, dans la circulation : entrée, survie et transport et enfin, dans les organes à distance: arrêt dans le tissu, extravasation, angiogenèse et prolifération qui signent l'installation de la métastase [99].

Il est possible de caractériser les métastases selon leur taille physique. Plusieurs études récentes suggèrent qu'une « macrométastase » atteint une taille de 2 mm et plus dans un ganglion lymphatique et qu'elle est liée à un mauvais pronostic. Une « micrométastase » mesure plutôt entre 0,2 mm et 2 mm, et si la taille est inférieure à 0,2 mm nous parlons de cellules tumorales isolées (Figure 5). L'un des grand problèmes actuels que rencontre les cancérologues est le dépistage des micrométastases et des cellules tumorales isolées car elles constituent un facteur de risque important dans la récurrence du cancer du col précoce [11] [12] [13].

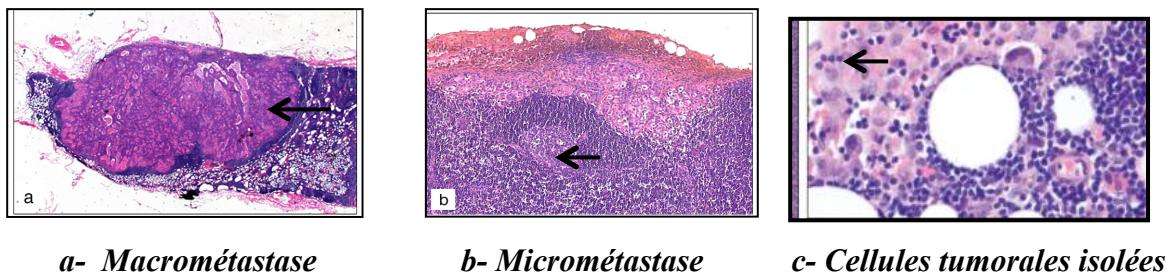


Figure 5 : Photos histologiques des dépôts métastatiques d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus dans les ganglions lymphatiques pelviens. a) Macrométastase, coloration H&E- 75X et en b) micrométastase, coloration H&E- 215X , c) cellules tumorales isolées [100].

Permission obtenue par l'auteur pour reproduction de la figure (*Horn et al, 2008*)

5. Méthodes de dépistage et de diagnostic

Le CCU l'utérus est facilement dépistable, raison pour laquelle il est important que les femmes se rendent chez le médecin pour se faire dépister dans le but de réduire la mortalité et la morbidité, ce qu'a permis le dépistage des lésions précancéreuses et des cancers précoces. Le test de dépistage de référence des lésions cancéreuses et précancéreuses du col utérin repose sur un examen cytologique, le test **Pap**. C'est un examen fondamental qui consiste à prélever des cellules du col de l'utérus et ensuite étudier la présence ou l'absence de lésions. Son utilisation a permis de réduire considérablement l'incidence du cancer du col dans les pays développés [101]. En présence de cellules anormales, dysplasiques, ou tumorales, le médecin effectue des examens complémentaires. La **colposcopie** permet de visualiser le col utérin au fort grossissement à l'aide d'une loupe binoculaire [102]. C'est un examen qui se fait sur les femmes présentant déjà une cytologie anormale du col, soit un test **Pap** anormal. La colposcopie permet d'évaluer la jonction squamo-cylindrique, ainsi que la zone de transformation [103]. Lorsque des lésions suspectes sont visualisées en colposcopie, on réalise **des biopsies cervicales**. Elles sont faites sur la partie la plus suspecte de la lésion et la plus proche de la jonction pavimento-cylindrique. C'est un examen histologique qui permet de porter le diagnostic d'une lésion intra-épithéliale (pré-cancéreuse) ou d'une lésion cancéreuse (envahissant le stroma sous-jacent) [102].

Considérant que le VPH est responsables de plus de 99% des lésions cancéreuses au niveau du col utérin, un autre examen disponible est **le test VPH**. Cet examen est réalisé en cas de lésion ASCUS à la cytologie. C'est un test basé sur des techniques de biologie moléculaire, il consiste à rechercher l'ADN viral en utilisant des techniques d'hybridation ou d'amplification à l'aide de sondes et d'amorces spécifiques. La biologie moléculaire permet la détection de l'ADN viral oncogène avec une sensibilité proche de 100% dans les lésions de haut grade [104]. Actuellement, cette détection moléculaire se fait selon trois méthodes: l'hybridation en milieu liquide (Test Hybrid Capture II®), l'hybridation *in situ* (Inform-HPV®) et la PCR, Polymerase Chain Reaction (Amplicor HPV Test®) [105].

6. Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques jouent un rôle très important dans le choix du plan de traitement. Dans le cancer du col de l'utérus, trois facteurs pronostiques importants sont reconnus. Le stade FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique) est le facteur pronostique indépendant le plus important (Tableau I).

Le deuxième facteur est l'envahissement ganglionnaire et troisièmement le volume de la tumeur.

Tableau I: Classification FIGO du cancer du col de l'utérus [103]

Stade FIGO	Tumeur
Stade 0	Tumeur intraépithéliale
Stade I	Tumeur limitée au col
Ia1	Invasion < 3mm en profondeur et < 7 mm en surface
Ia2	Invasion entre 3 et 5 mm en profondeur et < 7 mm en surface
Ib1	Lésion invasive du col > au stade Ia2 et < à 4 cm
Ib2	Lésion invasive du col > 4 cm
Stade II	Tumeur dépassant le col sans atteinte de la paroi pelvienne ou du 1/3 inférieur du vagin
IIa	Avec atteinte du vagin proximal
IIb	Avec atteinte du paramètre
Stade III	Tumeur étendue à la paroi pelvienne, au 1/3 inférieur du vagin ou comprimant l'uretère
IIIa	Extension au 1/3 inférieur du vagin sans atteinte de la paroi pelvienne
IIIb	Extension à la paroi pelvienne et/ou retentissement rénal
Stade IV	Tumeur étendue aux organes de voisinage
IVa	Extension au rectum ou à la vessie
IVb	Métastases à distance au-delà du pelvis

L'envahissement ganglionnaire est un facteur pronostique majeur [106], il n'est pas pris en compte dans la classification FIGO mais il est primordial dans la prise en charge des femmes atteintes. Dans une étude qui est publiée par la fédération nationale des centres de lutte contre le cancer en 1991, une première étude sur 441 patientes de stade I et II traitées par association radio-chirurgicale montre un envahissement pelvien dans 12,6% des cas. La survie à cinq ans était de 89% en absence d'envahissement ganglionnaire, et 55% en cas d'envahissement ganglionnaire. Dans une deuxième série de 401 patientes de stade IB traités par chirurgie première, 12% présentaient un envahissement ganglionnaire pelvien et 1% lombo-aortique, la survie à cinq ans était de 90% en absence d'envahissement ganglionnaire et moins de 70% en cas d'envahissement ganglionnaire. Une troisième étude sur 97 patientes de stade IB à IIB avec un envahissement ganglionnaire montre un taux de 35% de récurrences chez les patientes ayant un ganglion envahi, de 59% chez les patientes ayant deux ou trois ganglions envahis et de 69% chez les patientes qui plus de trois ganglions envahis. Après une curiethérapie, le taux de survie à cinq ans était moins de 30% quand plus de trois ganglions sont métastatiques [107]. En effet, le taux de survie décroît avec le nombre de ganglions ou de sites ganglionnaires atteints [108] [109] [110]. La valeur pronostique de la détection des micrométastases n'est pas encore établie dans le cancer du col de l'utérus, mais plusieurs groupes de recherche ont observé que la présence des micrométastases ganglionnaires a une valeur pronostique dans le cancer du col de l'utérus, ainsi qu'un risque de récurrence [13] [10]. Ainsi, il est important de faire une évaluation fiable de l'atteinte ganglionnaire (macro, micro et cellules tumorales isolantes).

7. Diagnostic de l'envahissement ganglionnaire

L'évaluation de l'envahissement ganglionnaire se fait de façon extrêmement variable en fonction des équipes et des décisions thérapeutiques, par chirurgie ou des examens paracliniques (TEP scanner, tomodensitométrie ou imagerie par résonance magnétique (IRM)) [107].

Les techniques d'imageries ne sont pas assez sensibles et donc elles ne permettent pas de détecter les métastases ganglionnaires de petite taille (< 5mm pour TEP scanner). L'IRM a une précision de 90%, contre 65% pour la TDM (P < 005) [111]. La TDM a une sensibilité

d'environ 86% et une spécificité de 94% [112]. Pour analyser l'atteinte ganglionnaire de façon définitive, il est nécessaire de réaliser une chirurgie dans le but de prélever les ganglions potentiellement atteints et de les tester en utilisant l'immunohistochimie. Le choix des ganglions à analyser est déterminé selon le stade de la maladie et la taille de la tumeur. Malheureusement, l'immunohistochimie (examen histologique) qui est la référence actuelle, ne détecte pas toutes les petites métastases à moins de tester le ganglion au complet ce qui n'est pas standard (elle n'est pas exhaustive) et ne peut pas être utilisée en temps réel en salle d'opération (examen extemporané sur tissu frais). Effectivement, pour pouvoir détecter les micrométastases dans un ganglion de 1,5 cm, il faut réaliser 75 coupes, ce qui n'est pas réalisable pour tous les ganglions en routine. Plusieurs laboratoires de biologie moléculaire s'intéressent à la RT-qPCR pour diagnostiquer l'envahissement ganglionnaire. *Van Trappen et al, 2001*, ont utilisé le marqueur de cellules épithéliales CK19 au niveau des ganglions pelviens dans les cancers précoces du col de l'utérus pour diagnostiquer l'envahissement ganglionnaire. Ils ont trouvé une présence de 50% des cellules tumorales dans les ganglions étudiés alors que seuls 12,5% étaient atteints lors de l'examen histologique [10]. L'une de ces trois patientes avait un envahissement ganglionnaire au niveau de l'examen histologique et la RT-qPCR et les deux autres avaient des ganglions positifs en RT-qPCR et négatifs pour l'examen histologique, nous laissant supposer que les ganglions pourraient contenir des micrométastases et des cellules tumorales qui ne sont pas détectables par l'examen histologique classique. Il est important de valider une technique de biologie moléculaire sensible et spécifique pour diagnostiquer l'envahissement ganglionnaire et améliorer la spécificité.

III. La Détection moléculaire des cellules tumorales

Au cours des dernières années, les techniques de biologie moléculaire, qui reposent essentiellement sur la RT-qPCR, ont grandement facilité la détection de cellules tumorales occultes dans de nombreuses formes de cancer. La sensibilité de la RT-qPCR est montrée supérieure aux techniques conventionnelles pour détecter les micrométastases et les cellules tumorales circulantes (CTC) dans les cancers hémato-lymphoïdes et épithéliaux. La présence de CTC ou des micrométastases ne conduit pas nécessairement à l'apparition de la maladie

métastatique cliniquement significative. Cependant, selon *Weiss*, les métastases sont la principale cause de décès chez les patients atteints de cancer [113].

Les marqueurs moléculaires utilisés pour la recherche des cellules tumorales à distance du site primitif doivent répondre à plusieurs critères, tels que la spécificité et la sensibilité, ainsi que la limite de détection des petites cellules tumorales. Cette dernière doit être très largement inférieure à celle des techniques conventionnelles. L'autre critère est relatif à la capacité de ce marqueur d'apprécier de façon quantitative le degré d'envahissement du tissu considéré. Plusieurs recherches ont rapporté que la RT-qPCR présente des sensibilités très élevées par rapport aux techniques conventionnelles et permettent, en règle générale, la détection d'une cellule tumorale par 10^6 , voire 10^7 cellules non tumorales [114].

1. Détection des métastases ganglionnaire du carcinome mammaire

La majorité des patientes atteintes du carcinome mammaire (~ 90%) présentent des tumeurs qui sont cliniquement confinées dans le sein et les ganglions lymphatiques. Essentiellement, après la chirurgie primaire ces patientes sont exemptes de la maladie. Malgré cette thérapie locorégionale très efficace, 30 à 40% de ces patientes développeront des métastases dans les 10 ans, si aucun autre traitement n'est institué [115]. Dans le cancer du sein, il est important d'évaluer avec précision les métastases des ganglions lymphatiques sentinelles (SLN). Comme dans le cas du cancer du col de l'utérus, cela implique une lourde charge de travail pour le pathologiste. Pour contourner ce problème un essai clinique multicentrique au Japon a évalué un nouveau système automatisé d'analyse de l'ARNm de la cytokératine19 (CK19). La CK19 est un marqueur épithélial largement exprimé dans les cancers humains, il est considéré comme un marqueur prometteur avec une grande sensibilité pour la détection des métastases ganglionnaires de divers cancers. CK19 est exprimé dans les cellules épithéliales normales et tumorales du col de l'utérus. CK19 n'est pas présent dans les ganglions ni dans la circulation sanguine chez le sujet sain [116]. Sa présence à distance de la tumeur indique une dissémination [117] [118]. L'analyse est basée sur l'amplification de l'ARNm en une seule étape pour détecter les métastases ganglionnaires du cancer du sein [119].

La technique s'appelle OSNA "*One Step Nucleic Acid Amplification*", elle est développée par *Notomi et al*, [120]. C'est une technique de biologie moléculaire innovante pour la détection

peropératoire des métastases ganglionnaires et qui permet de prendre une décision immédiate en évitant ainsi à la patiente une seconde intervention.

Cette méthode permet d'amplifier les ARNm du gène CK19 par une procédure isothermique spécifique et sensible appelée RT-LAMP (*Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification*). La surexpression de CK19 est directement corrélée à la présence d'un foyer métastatique et le nombre de copies à la taille de ce foyer.

Suite à son évaluation, la technique OSNA démontre une spécificité de 93,9% et un taux de concordance de 93,9%. Son utilisation est équivalente à la technique histologique de référence. Cependant, cette technique peut être réalisée en 30 à 40 minutes ce qui rend ce test adapté à la détection peropératoire des métastases du ganglion sentinelle du cancer du sein [121]. Le test est facile et s'effectue au bloc opératoire car l'homogénéisation d'un ganglion lymphatique dans le tampon de lyse ne prend que 90 secondes et la centrifugation de l'échantillon 1 minute. Alors que le placement du surnageant et les réactifs dans le détecteur ne nécessitent pas l'extraction et la purification de l'ARNm pour synthétiser l'ADNc, qui sont tous les deux nécessaires à la RT-PCR. L'ARNm est automatiquement amplifié dans un détecteur d'amplification génique RD-100i (*Sysmex*) en 16 minutes, et des résultats stables sont fournis sans être affecté par la taille de l'échantillon (maximum de 600 mg pour un essai) [119].

Depuis le mois de mai 2008, le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques en France utilise cette technique innovante. À titre d'exemple de mai 2008 à octobre 2009, 24 patientes ont pu éviter un rappel pour curage axillaire à distance garantissant ainsi une meilleure prise en charge [122].

Le test *OSNA* a montré une grande spécificité, l'exactitude et la valeur prédictive négative comparée à l'examen histopathologique conventionnel pour la détection des métastases ganglionnaires de cancer du sein. Cette technique fournit des résultats satisfaisants dans un court temps avec une procédure facile.

De plus, cette étude est confirmée par *Le Frère Belda et al, 2012*, qui ont testé 503 ganglions sentinelles provenant de 233 patientes. Le temps moyen d'évaluation pour deux ganglions sentinelles était de 40 min, la sensibilité par patient était de 91,4% (IC 95%, de 76,9 à 98,2%) et la spécificité était de 93,3% (IC 95%, de 88,6 à 96,6%), comparé à une sensibilité de 63,6% pour les coupes congelées et 47,1% pour empreinte cytologique [123].

En conclusion, Ces résultats montrent que le test *OSNA* peut permettre une détection peropératoire des ganglions sentinelles métastatiques chez les patientes atteintes de cancer du sein avec une bonne sensibilité, réduisant ainsi le besoin d'une deuxième chirurgie pour la détection du ganglion axillaire [121].

2. Détection des métastases ganglionnaire dans le cancer colorectal (CRC) et gastrique

La détection des métastases du ganglion lymphatique chez les patients avec un cancer colorectal de phase IIIa (CRC) est classiquement réalisée par une observation microscopique des surfaces de tissus découpés, suivie d'une coloration H&E. Cette méthode n'est pas capable de détecter des micrométastases en raison de la localisation du foyer métastatique. *Noura et Monden*, ont indiqué que le taux de détection des micrométastases en utilisant 1, 2 et 5 coupes dans un ganglion lymphatique était de 3,8, 6,3 et 11,8%, respectivement. Cela n'est pas une solution réaliste pour l'utilisation clinique de routine [124].

Plusieurs marqueurs testés dont cinq (CEA, CK19, FXYD3, CK20 et MUC13) ont montré relativement une bonne séparation dans l'expression entre ganglions positifs et négatifs. La performance de FXYD3 et MUC13 pour la détection des ganglions métastatiques chez les patients CRC n'est pas bien connu. Cependant, les analyses ont montré que l'ARNm de CK19 et CEA a eu un meilleur rendement que l'ARNm CK20. Ensuite, des analyses plus poussées ont indiqué qu'en utilisant OSNA et CK19, il serait plus facile de détecter un foyer métastatique dans un ganglion lymphatique que d'utiliser l'ARNm CEA car OSNA pouvait détecter l'ARNm CK19 (100 copies/ml) de façon plus reproductible que l'ARNm CEA (1 copie/ml). Ainsi, CK19 a un grand avantage par rapport à CEA et CK20 pour son utilisation dans OSNA [124].

Les résultats obtenus dans cette étude multicentrique au Japon et en Europe sont prometteurs. La détection de l'ARNm CK19 montre une sensibilité de 94,9 à 95,2% et une spécificité de 97,7 à 97,9%. Finalement, cette technique peut être utilisée au bloc opératoire pour le diagnostic des ganglions lymphatiques métastatiques du cancer colorectal [26] [60].

La méthode OSNA est donc utilisable pour la détection des métastases du ganglion lymphatique chez les patients atteints de cancer gastrique. Cela devrait être appliqué pour le diagnostic peropératoire dans *la chirurgie navigation des ganglions sentinelles* dans le cancer

gastrique. La méthode est validée par *Yaguchi et al, 2011*, la sensibilité était de 88,9% et la spécificité était de 96,6%. L'expression OSNA était significativement corrélée avec les volumes tumoraux estimés dans les ganglions métastatiques [26].

3. Détection des métastases dans le cancer de la prostate

Ce cancer constitue un bon modèle pour l'étude de la micrométastase car son pronostic est conditionné par le risque de métastases à la moelle osseuse et aux ganglions qui constituent des sites métastatiques importants accessibles aux prélèvements [125]. Dans le cancer de la prostate, la RT-PCR a permis de valider deux marqueurs prostatiques, PSMA et PTI-1 [126]. PSMA est une protéine de surface cellulaire avec une homologie de séquence à la transferrine, qui se trouve être exprimée dans des cellules peu différenciées du carcinome prostatique, les cellules réfractaires d'hormones, et les métastases osseuses [127]. En plus, les transcrits PSMA ont été détectés dans le sang périphérique des patients atteints du carcinome prostatique localisé et métastatique par RT-PCR. PTI-1 est un nouvel oncogène qui est détecté par *Sun et al*, chez des patients atteints du carcinome prostatique métastatique [128].

Des expériences de dilution de cellules prostatiques LNCaP dans du sang ont montré que la sensibilité de la détection des cellules prostatiques par RT-qPCR se situe le plus souvent à un niveau inférieur ou égal à celui d'une cellule prostatique pour 10^6 cellules normales [129].

Plusieurs recherches apprécient l'intérêt de la RT-qPCR en pratique clinique et sa capacité à confirmer une maladie métastatique connue. Cette capacité varie beaucoup lorsque l'analyse concerne le sang (30 à 90 %) [125]. Par contre, elle est moins variable lorsque l'analyse porte sur la moelle osseuse ou sur les ganglions puisque des cellules tumorales sont détectées dans la moelle osseuse chez plus de 75 % des patients métastatiques et 100 % des ganglions positifs en histologie sont aussi positifs en RT-PCR.

Le cancer de la prostate est un excellent modèle pour l'évaluation de la dissémination micrométastatique, mais malgré plusieurs recherches la biologie moléculaire n'est pas encore capable de donner une évaluation précise de la pathologie.

4. Détection des métastases dans les mélanomes malins

La présence ou l'absence de métastases ganglionnaires est un puissant facteur prédictif de la survie chez les patients atteints de mélanome malin. L'évaluation de la métastase ganglionnaire se fait par une immunohistochimie en utilisant des anticorps contre la protéine S-100 ou l'antigène mélanome HMB-45. Toutefois, en raison de l'étape de limitation de vitesse par rapport au nombre de sections qui doivent être examinés, ces techniques n'ont pas été largement utilisées. Pour contourner ces problèmes, *Wang et al*, ont tenté la détection des micrométastases ganglionnaires par RT-PCR en utilisant l'ARNm de la tyrosinase et ont montré que cette technique est supérieure à l'immunohistochimie. La tyrosinase est le marqueur le plus utilisé pour la recherche de cellules occultes par RT-qPCR. Le laboratoire de *Wang et al*, a réussi à détecter l'ARNm de la tyrosinase par RT-qPCR dans 73% des ganglions sentinelles chez des patients à risque de métastases régionales nodales, y compris tous ceux qui ont des ganglions lymphatiques sentinelles histologiquement positifs et 65% des échantillons histologiquement négatifs. Deux des 18 ganglions de contrôle sans mélanome ont révélé une PCR positive à la tyrosinase, cela suggère que la RT-qPCR est plus sensible que l'immunohistochimie pour la détection des métastases [130].

Étant donné que ce cancer est caractérisé par une dissémination hémotogène, plusieurs études s'intéressent à la détection des cellules tumorales circulantes (CTC) par RT-qPCR au moment du diagnostic. Les conclusions de ces études sont très variables, puisque la fréquence de détection de CTC oscille entre 20 % et 94 % dans les formes métastatiques et entre 0 et 40 % dans les formes localisées [131] [132].

Enfin, l'utilisation de la tyrosinase comme marqueur moléculaire semble constituer une méthode prometteuse pour mieux évaluer le risque et améliorer la stratification des malades pour les approches thérapeutiques.

5. Détection des métastases dans le neuroblastome

L'évaluation des métastases de la moelle osseuse est une composante importante chez les patients atteints d'un neuroblastome. Par conséquent, la disponibilité d'un test sensible pour détecter les cellules de neuroblastome occultes dans les spécimens de la moelle osseuse serait hautement souhaitable. *Miyajama et al*, ont réussi par RT-qPCR pour l'ARNm de la tyrosine hydroxylase (une enzyme impliquée dans la biosynthèse des catécholamines) à détecter des

cellules de neuroblastome dans le sang périphérique et la moelle osseuse des patients avec des métastases ganglionnaires. La tyrosine hydroxylase est positive dans toutes les moelles osseuses montrant un envahissement cytologique et aussi un quart de celles de patients atteints de formes localisées. Une autre application intéressante de la RT-qPCR pour les cellules de neuroblastome occultes réside dans la détection de la tumeur résiduelle dans les greffes de cellules souches [133]. *Lode et al*, ont été en mesure de détecter les cellules de neuroblastome dans les greffes de cellules souches en utilisant une combinaison de RT-PCR tyrosine hydroxylase et l'immunocytochimie des anti-gangliosides [134].

6. Détection des métastases ganglionnaires dans le cancer du col de l'utérus

Dans le cancer du col de l'utérus, les données cliniques suggèrent que les techniques histologiques classiques pour détecter les métastases du ganglion sentinelle ne sont pas sensibles chez les patientes atteintes de cancer du col utérin à un stade précoce, puisque les patientes de stade IB avaient un taux de récurrence de 10-15% malgré que les ganglions sont histologiquement négatifs. La dissection des ganglions lymphatiques pelviens et para-aortiques reste le moyen le plus fiable pour évaluer l'état des ganglions lymphatiques dans ce genre de cancer, mais elle est associée à une morbidité importante [7]. Des progrès récents de l'immunohistochimie (IHC) et de la biologie moléculaire ont permis d'identifier les cellules tumorales occultes dans des ganglions lymphatiques histologiquement négatifs, qui n'ont pas été détectées par la coloration hématoxyline/éosine (HE) [135].

Van Trappen et al, ont évalué les micrométastases du cancer du col de l'utérus par RT-PCR. Cette étude a révélé la présence de 50% de micrométastases dans des ganglions histologiquement négatifs. Cependant, l'immunohistochimie a montré seulement 8-15% de micrométastases dans ces ganglions histologiquement négatifs suggérant que le PCR est plus sensible [10].

Wang et al, ont conclu que la RT-PCR est la méthode la plus sensible pour détecter les micrométastases. Ils ont trouvé des micrométastases dans 15 des 35 (42,86%) ganglions sentinelles histologiquement négatifs dans leur cohorte [136]. Ce résultat est semblable à d'autres études, par exemple *Van Trappen et al*, ont démontré que 44% des ganglions

histologiquement négatifs avaient une expression de CK19 par RT-qPCR dans 16 de leur 32 patientes [10] .

Bien que la plupart des auteurs suggèrent que les micrométastases ganglionnaires sont corrélées avec un mauvais pronostic, aucune preuve définitive ne confirme la valeur de ces micrométastases dans le CCU. De plus, l'activité biologique des cellules tumorales isolées dans les ganglions lymphatiques régionaux n'est pas claire dans le carcinome cervical. Une analyse plus approfondie sera nécessaire pour clarifier la signification clinique des micrométastases [136].

Certaines études ont mis l'accent sur les oncoprotéines E6 et E7 du VPH 16 et 18 en utilisant la technique de RT-qPCR, mais jusqu'à ce jour, aucun rapport n'est publié pour démontrer leur validité pour prédire le statut métastatique des ganglions lymphatiques du cancer du col par RT-qPCR [137] [138].

Coutant et al, ont détecté par PCR l'ADN du VPH 16, 18 et 31 dans 50% et 5,6% de ganglion sentinelle positif et négatif, respectivement. La fréquence de positivité du ganglion sentinelle VPH ne différait pas selon l'existence de macrométastases, micrométastases ou cellules tumorales isolées. Ceci suggère que les ganglions lymphatiques ne doivent pas seulement être examinés pour l'ADN du VPH, mais aussi pour l'ARNm du VPH et CK19, ou être quantifiés par PCR en temps réel [139].

Problématique et objectifs du projet

Le facteur pronostique majeur dans le CCU est la métastase ganglionnaire (envahissement ganglionnaire). En effet, la survie à 5 ans est réduite de 30 à 70% chez les patientes qui présentent des ganglions métastatiques [140]. L'envahissement ganglionnaire est évalué par la chirurgie ou l'imagerie. Selon le statut ganglionnaire, les femmes seront admissibles à des traitements différents, à savoir la chirurgie ou la chimio-radiothérapie. Jusqu'à présent, seules les macrométastases (>2 mm) sont prises en compte lors de la décision du traitement. Cependant, les micrométastases (>0.2mm, <2 mm) et les cellules tumorales isolées (<0.2 mm) semblent également avoir un impact négatif sur le pronostic, avec un risque élevé de récurrence [23] [141]. Les recherches de *Van Trappen et al*, suggèrent que dans près de la moitié des cas de cancers du col à des stades précoces, des cellules tumorales sont retrouvées au niveau des ganglions pelviens et que les techniques moléculaires seraient plus sensibles pour donner un diagnostic précis [10]. Ceci suggère que les micrométastases et les cellules tumorales isolées devraient être considérées lors du choix de traitement. Par conséquent, l'évaluation fiable de métastases ganglionnaires en utilisant une technique de biologie moléculaire comme la qPCR en temps réel devient cruciale.

Jusqu'à présent le *Gold Standard* final pour l'évaluation des ganglions lymphatiques est l'examen histologique des échantillons préservés dans la paraffine par immunohistochimie [142]. Afin de détecter toute implication micrométastatique dans un ganglion lymphatique de 1,5 cm, l'évaluation histologique exigerait l'examen d'au moins 75 sections. En temps et en ressources, cette méthode n'est pas applicable à l'évaluation de chaque ganglion et n'est pas capable de donner des résultats rapides dans les délais requis au bloc opératoire. Généralement, les ganglions lymphatiques sont évalués en peropératoire par empreinte cytologique et/ou coupe congelée. Ces techniques ont une sensibilité plus faible que l'examen histologique standard et n'ont pas une sensibilité suffisante pour détecter les micrométastases. Des taux élevés de faux négatifs allant jusqu'à 19% sont rapportés [106].

Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes pour évaluer avec précision l'envahissement ganglionnaire dans le cancer du col de l'utérus, pour ainsi mieux adapter le traitement et évaluer le pronostic (éviter les 10 à 15% de récurrences causées par une mauvaise détection des métastases) [143]. Plusieurs études ont montré que la biologie

moléculaire utilisant la réaction en chaîne de la polymérase de la transcriptase inverse (RT-PCR) est très efficace pour le diagnostic de métastases ganglionnaires pour le cancer du sein et le cancer colorectal [144] [145]. En plus, des tests moléculaires rapides sont maintenant disponibles pour évaluer les ganglions lymphatiques péropératoire dans le cancer du sein (*GeneSearch* Breast Lymph Node (BLN) Assay-Veridex, Johnson & Johnson; Osna*-Sysmex*). Ces tests diagnostiquent l'envahissement ganglionnaire en utilisant l'expression de cytokératine 19 et sont plus sensibles que les techniques peropératoires traditionnelles tout en conservant une haute spécificité [146].

Dans le cas du cancer du col de l'utérus, causé dans plus de 99% des cas par des infections au VPH, l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 qui est constitutive dans ces cellules tumorales nous donne une cible moléculaire unique. Pour mon projet, nous avons pour objectif global d'adapter des stratégies de détection moléculaire des métastases aux patientes CCU [3].

Notre hypothèse est que nous pouvons détecter les macro/micrométastases et les cellules tumorales isolées en utilisant un outil moléculaire de façon rapide, précise et efficace dans des tissus frais ce qui pourrait aider à améliorer le traitement et dans des tissus archivés ce qui pourrait aider à mieux comprendre l'impact des micrométastases et des cellules tumorales isolées du CCU chez la femme.

Nous avons construit notre projet autour de 3 axes.

Objectif 1 : Extraire l'ARN de bonne qualité à partir des échantillons frais et préservés dans la paraffine et valider les marqueurs moléculaires CCU VPH16-E6-E7 et VPH18-E6-E7.

Objectif 2 : Tester la sensibilité et la fiabilité de notre méthode moléculaire pour détecter les métastases CCU sur une cohorte restreinte de patientes.

Objectif 3 : Constituer une base de données clinique, histologique et moléculaire des patientes traitées pour le CCU au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

CHAPITRE II: Matériel & Méthode

1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées cellulaires choisies pour l'étude sont les lignées humaines cancéreuses HeLa et CaSki ainsi que les cellules normales HCA2-hTERT. Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire humaine du Cancer du Col de l'Utérus VPH18 positives. Ces cellules proviennent d'un prélèvement de métastase effectué sur une patiente atteinte d'un CCU, *Henrietta Lacks*. C'est la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine [147]. Ces cellules sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) qui est supplémenté avec 8% de sérum de veau fœtal (FBS), 100 IU pénicilline et 100 µg/ml streptomycine. Les cellules CaSki sont une lignée cellulaire de cancer du col utérin humain dérivée d'une métastase dans le mésentère. Les CaSki sont VPH16 positives et sont cultivées dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté avec 8% de sérum de veau fœtal (FBS), 100 IU pénicilline et 100 µg/ml streptomycine. Les cellules HCA2-hTERT sont des fibroblastes humains primaires normaux issus de peau d'enfant et immortalisées par l'expression de la télomérase [148]. Elles sont utilisées comme contrôle VPH négatif. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM qui est supplémenté avec 8% de sérum de veau fœtal (FBS), 100 IU pénicilline et 100 µg/ml streptomycine. Toutes ces cellules sont amplifiées dans un incubateur humide conservé à 37°C ayant une atmosphère enrichie avec 5% de CO₂. Lorsqu'elles atteignent 80% de confluence, ces 3 lignées cellulaires sont sous-cultivées. Pour cela les cellules en flasque de 175 cm² sont lavées avec 10 ml de PBS (Buffer phosphate salin) et ensuite décollées avec 5 ml de trypsine (0,05% trypsine + 0,53 mM EDTA). Après 5 minutes d'incubation à 37°C, la trypsine est neutralisée par 5 ml de milieu de culture et les cellules sont repassées en flasque à une densité de un million de cellules par flasque de 175 cm².

2. Analyse biomoléculaire

2.1 Extraction de l'ARN à partir du matériel frais

Pour isoler l'ARN issus des cellules cultivées, nous avons réalisé une extraction d'ARN en utilisant le Trizol. Le milieu est aspiré et deux lavages avec le PBS sont effectués. Ensuite,

1 ml de Trizol est ajouté à chaque boîte de Pétri. Le mélange est transféré dans un eppendorf à température ambiante pendant 10 minutes. Ensuite, 200 µl de chloroforme sont ajoutés, suivi d'un mélange par inversion pendant 15 secondes et d'une incubation de 2 à 3 minutes à température pièce. L'échantillon est centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 12000 RPM (dans la chambre froide). Ensuite, la phase supérieure aqueuse qui contient l'ARN est transférée dans un nouvel eppendorf sur glace. 500 µl d'alcool Isopropyl sont ajoutés et l'échantillon est incubé à température pièce pendant 10 minutes et centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 12000 RPM. L'ARN précipite et devient visible, le surnageant est aspiré et 1 ml d'éthanol 75% glacial à -20°C est rajouté, puis mélangé par inversion et centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 7500 RPM, ensuite, le surnageant est aspiré. Après 2 lavages, le culot est séché à l'air libre, suspendu dans 50 µl d'eau « RNase Free » et incubé environ 10 minutes dans un bain sec de 55 à 60°C pour que l'ARN se solubilise. L'ARN extrait est quantifié en mesurant l'absorbance à 260 nm, ainsi que sa pureté, en calculant le rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm permettant d'estimer la contamination protéique. L'ARN est conservé à -80°C pour éviter la dégradation.

2.2 Extraction d'ARN à partir des blocs de paraffine

(Population mixte de cellules enrobées dans la paraffine), trousse *Ambion # AM1975*

Pour extraire de l'ARN à partir des blocs de paraffine, nous avons utilisé 15 coupes de 10 µm générées avec un microtome (l'excès de paraffine autour de l'échantillon est retiré avec un scalpel). Pour les étapes subséquentes les coupes sont sous-divisées dans 3 eppendorfs (5 coupes par tube).

Déparaffinisation: 1,4 ml de xylène est ajouté à chaque eppendorf ensuite, l'échantillon est incubé à 37°C pendant 20 minutes, puis centrifugé pendant 2 min à 13000 RPM, cette étape est répétée deux fois. Un autre lavage est fait avec 1,4 ml d'éthanol à 37°C pendant 30 minutes, puis centrifugé pendant 2 min à 13000 RPM, cette étape est répétée deux fois avant de sécher les culots à température pièce.

Digestion avec la protéase: cette étape durant laquelle l'ARN est dégradé est critique, et doit être effectuée rapidement. Le mélange de digestion contenant 200 µl de tampon de digestion et 4 µl de protéase est ajouté à chaque échantillon et est incubé à 50°C pendant 1 heure pour les

blocs fraîchement préparés, ou pendant toute la nuit pour les tissus de patientes préservés dans des blocs de paraffine. Ensuite, l'échantillon est incubé 15 minutes à 80°C pour désactiver la protéase, puis la réaction est stoppée sur glace.

Isolation des acides nucléiques: 700 µl de mélange d'isolation (550 µl d'éthanol et 240 µl de la solution isolation additive) est ajouté à chaque échantillon. Le mélange est transféré dans une colonne et cette dernière est centrifugée à 10000 RPM pendant 30 secondes. La colonne est rincée deux fois avec 2 solutions différentes « wash 1 et 2 », 700 µl et 500 µl respectivement. Après, la colonne est centrifugée pour sécher le liquide résiduel.

Digestion des nucléases et purification d'ARN: Le mélange de DNase est préparé avec 50 µl d'eau RNase free, 6 µl de DNase buffer et 4 µl de DNase. Chaque colonne est traitée avec 60 µl de mix et incubée 30 minutes à température pièce, ensuite l'enzyme est éliminée par 2 lavages, « wash 1 et 2 ». La colonne est centrifugée pour sécher le liquide résiduel. Enfin, nous avons rajouté 100 µl de la solution d'éluion pour chaque colonne, incubé pour une minute et centrifugé 1 minute à 13000 RPM pour récupérer l'ARN. Finalement, l'ARN est purifié une fois de plus en utilisant la trousse **RNeasy MinElute Cleanup** de Qiagen. L'ARN est conservé à -80°C.

3. Préparation des populations artificielles mixtes de cellules cancéreuses en échantillons frais ou en blocs de paraffine

3.1 Populations complexes artificielles par mélange de cellules vivantes :

Dans l'optique de mimer l'environnement complexe d'un vrai ganglion lymphatique ne contenant pas seulement des cellules VPH positives, nous effectuons des mélanges de cellules VPH positives et négatives. Après avoir récoltées des cellules VPH positives ⁽⁺⁾, VPH négatives ⁽⁻⁾ et des fibroblastes, deux séries de blocs de dilutions sont préparées. La première série est préparée pour tester le VPH18, pour ce faire, nous avons dilué des cellules VPH18⁺ (HeLa) dans des cellules VPH18⁻ (CaSki) à des proportions de 1/2, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/10000 et 1/50000. Un autre bloc contenant 100% de cellules VPH18⁻ est préparé comme contrôle positif pour la réaction. La deuxième série est préparée pour tester le VPH16, nous avons dilué des cellules VPH16⁺ (CaSki) dans des fibroblastes VPH⁻ (HCA2-hTERT) à

des proportions de 1/2, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/10000 et 1/50000. Le contrôle négatif pour cette série contient 100% de fibroblastes. Cette expérience fût répétée deux fois, la première fois en utilisant 40×10^6 cellules, ce qui n'est pas suffisant pour avoir une bonne concentration d'ARN suite à l'extraction. Dans la deuxième expérience, pour chaque bloc de cellules, nous avons préparé 100×10^6 cellules. Suite à la quantification des concentrations cellulaires et au mélange en utilisant les proportions ciblées, les cellules sont centrifugées à 1500 RPM pendant 10 minutes, et le culot cellulaire est resuspendu dans 500 μ l de formaline. Les cellules suspendues dans la formaline sont mises dans l'histogel et centrifugées 15 minutes à 2500 RPM. Après 15 minutes d'incubation, le surnageant est remplacé par 2 à 5 ml d'histogel pour couvrir le culot. Après avoir laissé l'histogel polymériser pendant 20 minutes, nous avons rajouté 1 à 2 ml de formaline. L'échantillon est incubé toute la nuit à 4°C et le lendemain, il est envoyé au département de pathologie pour l'enrober en paraffine dans des cassettes (Figure 6).

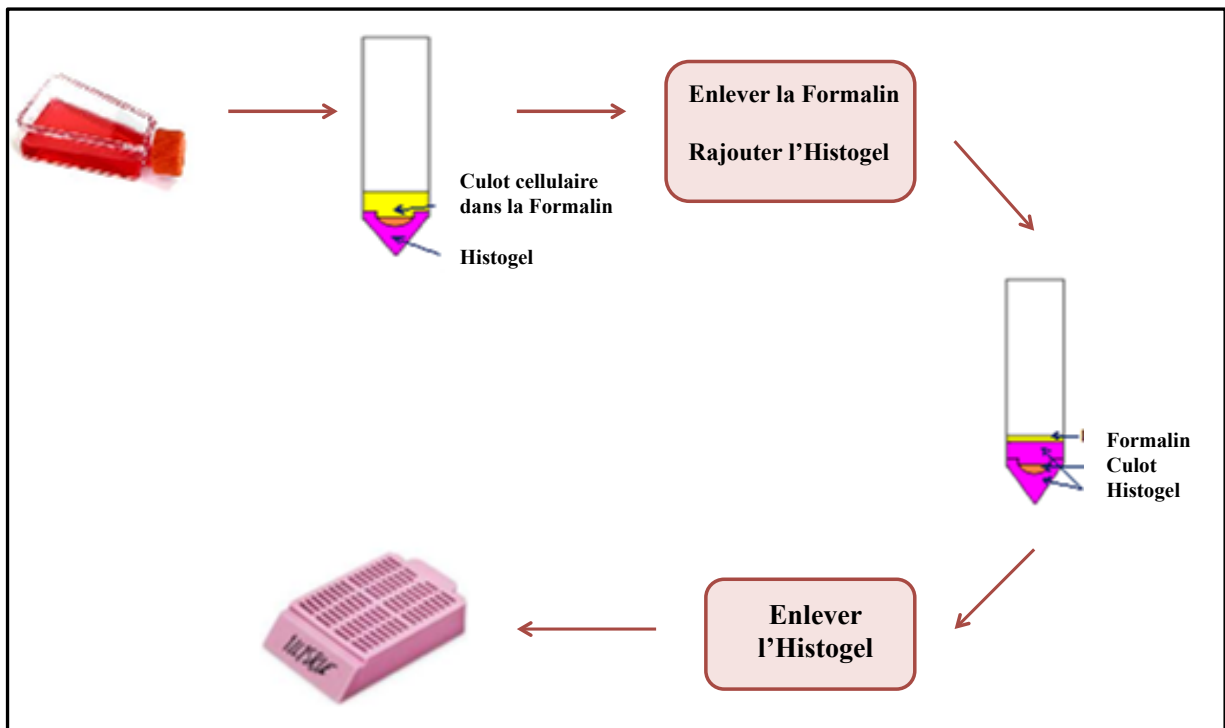


Figure 6: Schéma représentant le protocole de préparation de culots cellulaires dans des blocs de paraffine.

3.2 Populations complexes artificielles par mélange d'ARN provenant de différentes populations:

Suite à la variabilité d'expression des oncogènes E6 et E7 obtenue avec l'ARN extrait des blocs de paraffine de cellules diluées reflétant des problèmes techniques de dilution lorsque nous utilisons de grandes quantités de cellules (voir résultats), nous avons utilisé une deuxième stratégie de dilution limite basée sur l'ARN plutôt que les cellules. Deux séries de dilutions sont préparées directement à partir de l'ARN extrait de blocs de paraffine validés par histochimie pour contenir une proportion de 50% de cellules cibles VPH positives (Figure 13). Pour le test VPH16, la série contient les dilutions finales d'ARN suivantes: 25%, 5%, 1%, 0,2%, 0,04%, 0,008% et 0,0016% de cellules VPH16⁺ (CaSki) mélangées avec des cellules VPH16⁻ (HCA2-hTERT). Pour le test VPH18, la série contient les dilutions suivantes: 25%, 5%, 1%, 0,2%, 0,04% et 0,008% de cellules VPH18⁺ (HeLa) mélangées dans des cellules VPH18⁻ (CaSki).

4. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) quantitative en temps réel

La méthode de la RT-qPCR en temps réel permet la détection et la quantification de produits de PCR au fur et à mesure de leur apparition dans le milieu réactionnel.

4.1 La réverse transcriptase

Pour rétro-transcrire l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), nous avons utilisé la trousse « Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix For qRT-PCR ». La réaction est fait dans un volume de 20 µl et un maximum de 1 µg d'ARN. Tout d'abord, nous avons préparé le mélange pour la reverse transcriptase avec 10 µl de 2x RT réaction mix, 2 µl d'enzyme, 1 µg d'ARN (volume maximal de 8 µl) et compléter avec l'eau « RNase Free » pour avoir un volume final de 20 µl. Ensuite, le mélange est incubé 10 minutes à température pièce pour que les hexamères du mix se lient à l'ARN. Puis, incubé 30 minutes à 50°C pour la réaction de la réverse transcriptase. L'enzyme est inactivée à 85°C pendant 5 minutes et incubée immédiatement sur glace pour ne pas inactiver l'enzyme suivante (la RNase). Finalement, 1 µl de RNase H est ajouté suivi d'une incubation de 20 min à 37°C. L'ADNc est conservé à -20°C.

4.2 La qPCR (Quantitative Réaction en Chaîne Polymérase)

Nous avons utilisé une méthode de quantification relative qui mesure la quantité du gène cible relativement à un gène contrôle. Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé l'ARN 18S ribosomal comme gène contrôle, ce qui nous permet de normaliser les différences liées à la qualité et à la quantité d'ARN extrait.

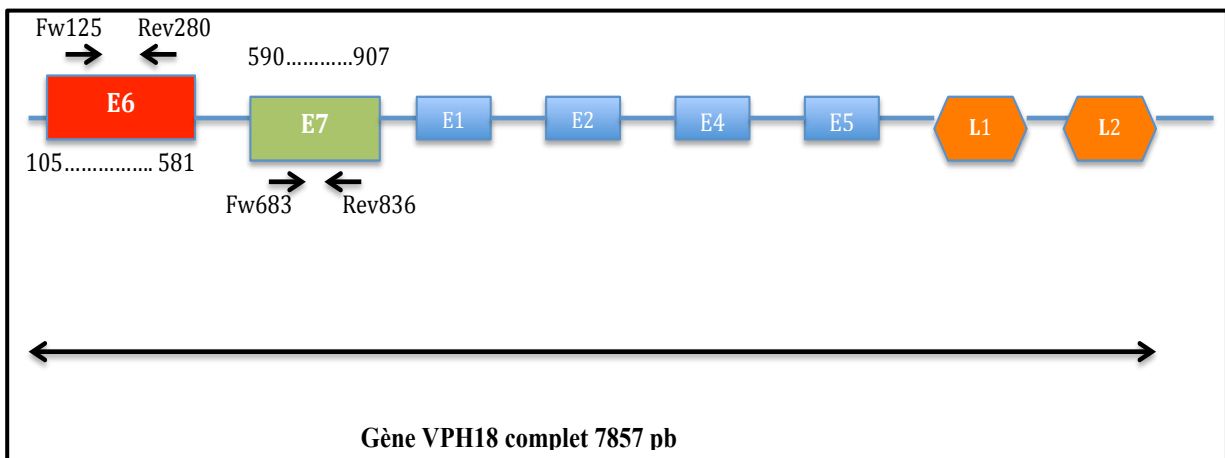
Nous avons utilisé le système TaqMan qui repose sur l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase (Taq polymérase) pour mesurer l'expression des gènes VPH16-E6-E7, VPH18-E6-E7 et CK19 dans des lignées cellulaires CCU, des tumeurs primaires du col de l'utérus et des ganglions lymphatiques. Les séquences des amorces et des sondes sont présentées dans le **Tableau II et la figure 7**. Afin de vérifier la spécificité des séquences des amorces et des sondes, nous avons utilisé les logiciels Oligo Analyzer 3.1 et BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Les amorces et les sondes sont achetées chez la compagnie IDT (*Integrated DNA Technologies*).

Nous avons réalisé la RT-qPCR en temps réel en utilisant l'appareil *Applied Biosystems StepOne™*. La réaction de qPCR est effectuée à partir de 50 ng d'ARN (3 µl) dans un volume de 15 µl, le mélange réactionnel contient 7,5 µl de 'master mix', 0,6 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,3 µl de sonde (10 µM), 0,3 µl de chaque amorce (10 µM) et complété avec de l'eau 'RNase free' pour un volume total de 12 µl. L'amplification PCR se fait en 2 étapes, dénaturation 15 sec à 95°C, hybridation et élongation 60 secondes à 60°C pendant 40 cycles. Le test est fait en duplicata pour le matériel frais et en triplicata pour les échantillons fixés dans la paraffine. Nous avons récupéré nos données de CT (*Threshold Cycle*) qui est le cycle seuil où le signal de TaqMan devient détectable, à l'intérieur de la phase exponentielle d'amplification.

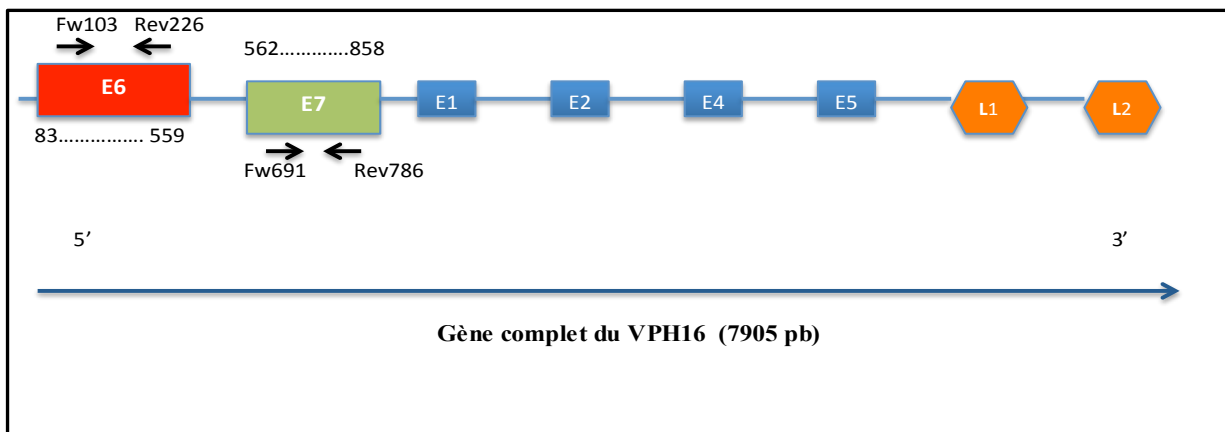
4.3 Quantification de l'expression relative du gène cible

La quantification relative de l'expression du gène cible est réalisée en utilisant la méthode du seuil de comparaison de cycle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) où le paramètre CT est défini comme le nombre de cycles auquel le signal fluorescent généré par clivage de la sonde marquée est d'abord détectable. Notre méthode de calcul est basée sur la normalisation de tous les CT par rapport au gène ribosomique 18S pour contrôler la quantité et la qualité d'ARN dans chaque test.

L'expression relative du gène cible est donnée par la formule suivante: $2^{-(\text{gène cible})} / 2^{-(\text{gène 18S})}$



Souche VPH18: X05015



Souche VPH16: K02718

Figure 7 : Schéma montrant les différents ARN E6/E7 et les positions des amorces et des sondes utilisés.

Les positions des amorces et des sondes sont indiquées aussi dans le tableau II. Les amorces reconnaissent quelques variantes VPH16 et 18 seulement pour E6-VPH16 et E7-VPH18, un nucléotide variant sur E7-VPH18 et 5 nucléotides variant sur E6-VPH16, ces derniers sont localisés au milieu de la sonde, alors la probabilité d'amplifier un produit non spécifique est presque impossible.

Fw; amorce sens, Rev : amorce anti-sens

Tableau II: Séquences des amorces et des sondes Taqman utilisées.

Les séquences des amorces et des sondes TaqMan sont présentées dans le Tableau II. Afin de confirmer la spécificité des séquences choisies pour les amorces et les sondes, nous avons effectué des vérifications sur le logiciel BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Les amorces et les sondes sont achetées chez la compagnie IDT (*Integrated DNA Technologies*).

Gènes	Séquence (5' - 3')	Position des amorces	Taille de l'amplicon
18S		450-646	196pb
Amorce sens	CGGCTACCACATCCAAGGAA		
Amorce anti-sens	CGCTATTGGAGCTGGAATTA		
Sonde	(HEX) TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC (TAMRA)		
VPH16-E6		103-226	123pb
Amorce sens	AATGTTTCAGGACCCACAGG		
Amorce anti-sens	CTCACGTCGCAGTAACTGTTG		
Sonde	(FAM) AGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATG (TAMRA)		
VPH16-E7		691-786	95pb
Amorce sens	CAAGCAGAACCGGACAGA		
Amorce anti-sens	GTCTACGTGTGTGCTTTGTA		
Sonde	(ROX) CAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTG (TAMRA)		
VPH18-E6		125-280	155pb
Amorce sens	AACACGGCGACCCTACAA		
Amorce anti-sens	CTGTCTCTATACACCACAAATAAA		
Sonde	(FAM) CGGAACTGAACACTTCACTGCAAGACATA (TAMRA)		

VPH18-E7

683-836

153pb

Amorce sens

AGCGACTCAGAGGAAGAAA

Amorce anti-sens

GGTCTGCTGAGCTTTCTACTAC

Sonde

(ROX) TCAATTCTGGCTTCACACTTACAACACA (TAMRA)

Tableau III : critères de choix d'amorces et de sondes

	Critères	VPH16						VPH18					
		E6			E7			E6			E7		
		Fw	Rev	sonde	Fw	Rev	sonde	Fw	Rev	sonde	Fw	Rev	s
Générale	nombre de nucléotides, (18-30)	20	21	28	18	20	27	18	24	29	19	22	29
	% CG content (30-80%)	50	52	46	55	45	52	55	37.5	45	47	50	41
	Nucléotides identiques (éviter 3 G ≥)	3C	ok	3A	ok	3TG 3T	ok	3C	ok	ok	3A	3T	ok
Amorces	éviter G/C au 3' terminal (5 dernières nt)	2G 1C	2G	-	1C 1G	1G	-	1C	1C	-	1G	2C	-
	Température d'élongation(T _m)	60	60	-	60	60	-	60	60	-	60	60	-
Sondes	Nombre de G (rendement diminue)	-	-	6	-	-	8	-	-	5	-	-	2
	Pas de G au 5' de la sonde (5 lières nt)	-	-	2 G	-	-	1G	-	-	2G	-	-	ok
	Proportion de C et G (C>G)	-	-	7C 6G	-	-	6C 8G	-	-	8C 5G	-	-	10C 2G
	Près de l'amorce (oui/Non)	-	-	Oui	-	-	Non	-	-	Non	-	-	Non
	Amplicon (bp)	123			95			155			153		

Fw: sens, Rev: anti-sens, nt: nucléotide

5. Immunohistochimie (IHC)

Nous avons effectué une analyse par immunohistochimie sur les blocs de paraffine VPH16⁺ pour vérifier la proportion de cellules contenues dans chaque bloc. Les blocs de paraffine VPH16⁺ ont été coupés en fines tranches de 4 µm et déposées sur une lame. Les protocoles de récupération des antigènes et de coloration immuno-histologique automatisée utilisés est le suivant: *antigen retrieval buffer CCI* (Ventana Medical System Inc., #950-124) pour 60 minutes suivi de l'anticorps CK19 1:2000 (neomarkers ms-198 (Ab-1)) pour 40 minutes dans une solution de Ventana (Antibody dilution buffer, #ADB250) à 37°C. La trousse de détection est l'UltraView universal DAB detection kit (Ventana Medical System Inc., #760-500). Le contraste est fait avec un marquage à l'hématoxylin et au « bluing reagent » (Ventana Medical System Inc., #760-2021 et #760-2037).

6. Tumeurs primaires et ganglions lymphatiques

En collaboration avec le service de gynécologie-oncologique du centre hospitalier de l'université de Montréal (CHUM), nous avons pu obtenir quelques tumeurs primaires et des ganglions lymphatiques du col de l'utérus et d'ovaire. Nous avons analysé des échantillons issus de 9 tumeurs primaires du cancer du col de l'utérus, de 8 ganglions lymphatiques dont 3 sont des ganglions de patientes avec des CCU et 5 des ganglions de patientes avec des cancers de l'ovaire.

CHAPITRE III: Résultats

1. Modèle de calcul des proportions tridimensionnelles des macro/micrométastases et des cellules tumorales isolées d'un ganglion.

Les informations existantes sur la fréquence des micrométastases, leur répartition topographique et l'impact pronostique chez les patientes atteintes de CCU sont limitées. Un foyer métastatique de plus de 2 mm est défini comme une macrométastase, un foyer métastatique qui varie entre 0,2 mm et 2 mm est une micrométastase tandis qu'un foyer indistinct de moins de 0.2mm constitue des cellules tumorales isolées [100].

Selon *Horn et al, 2008*, plus de la moitié des ganglions envahis ont un diamètre de moins de 1 cm et 29% des ganglions indemnes ont une taille supérieure à 1 cm [149]. En assumant de façon raisonnable qu'un ganglion lymphatique avec des micrométastases fait autour de 1cm de taille nous suggérons le modèle de calcul tridimensionnel suivant:

Calcul de taille des macro/micro métastases

R= rayon

Le volume d'une sphère est: $4\pi R^3 / 3$

Le volume d'un ganglion de 1cm = $(4*3,14*(0,5 \text{ cm})^3)/4 = 0,3925 \text{ cm}^3 = 392,5 \text{ mm}^3$

Le volume maximal d'une macrométastase d'un diamètre de 2mm = $(4*3,14*(1 \text{ mm})^3)/4$
= 3.14 mm^3

Le volume maximal d'une micrométastase d'un diamètre de 0,2mm = $(4*3,14*(0.1 \text{ mm})^3)/4$
= 0.00314 mm^3

Proportion volumique pour une macrométastase dans un ganglion de 1 cm = 3.14 mm^3
 $/392,5\text{mm}^3*100= \mathbf{0,8\%}$

Proportion volumique pour une micrométastase dans un ganglion de 1 cm = 0.00314mm^3
 $/392,5\text{mm}^3*100= \mathbf{0,0008\%}$

Cette formulation nous donne des seuils de détection basés sur un occupation du volume total d'un ganglion de plus de 0.8% pour une macrométastase, d'environ 0.0008% à 0.8% pour une micrométastase, et de moins de 0.0008% pour des cellules cancéreuses isolées. Ceci nous permet aussi d'évaluer la proportion de cellules cancéreuses dans ces structures (figure 8).

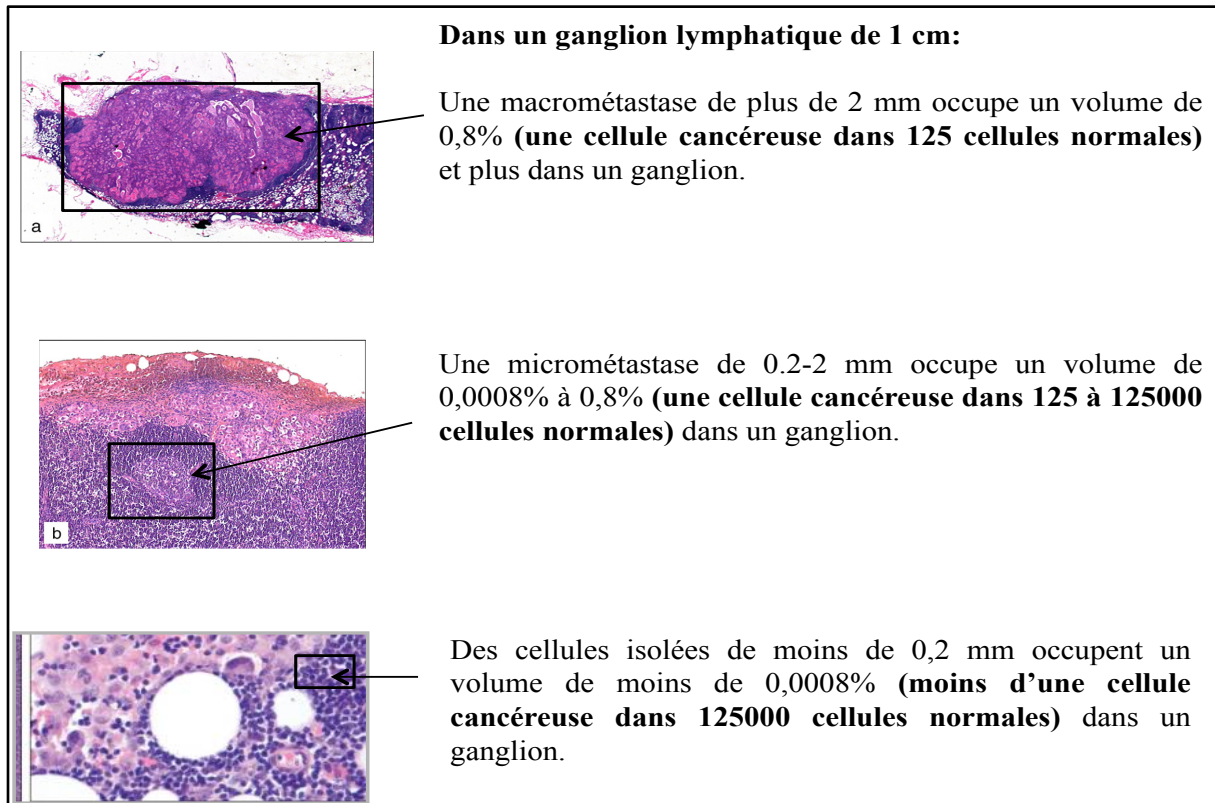


Figure 8: Illustration du calcul du volume occupé par une macro/micrométastase et par des cellules tumorales isolées dans un ganglion de 1 cm de diamètre [100].

2. Détermination de la limite de détection des marqueurs moléculaires E6 et E7 de VPH16 et 18 dans du matériel frais pour le diagnostic de métastases ganglionnaires dans le CCU

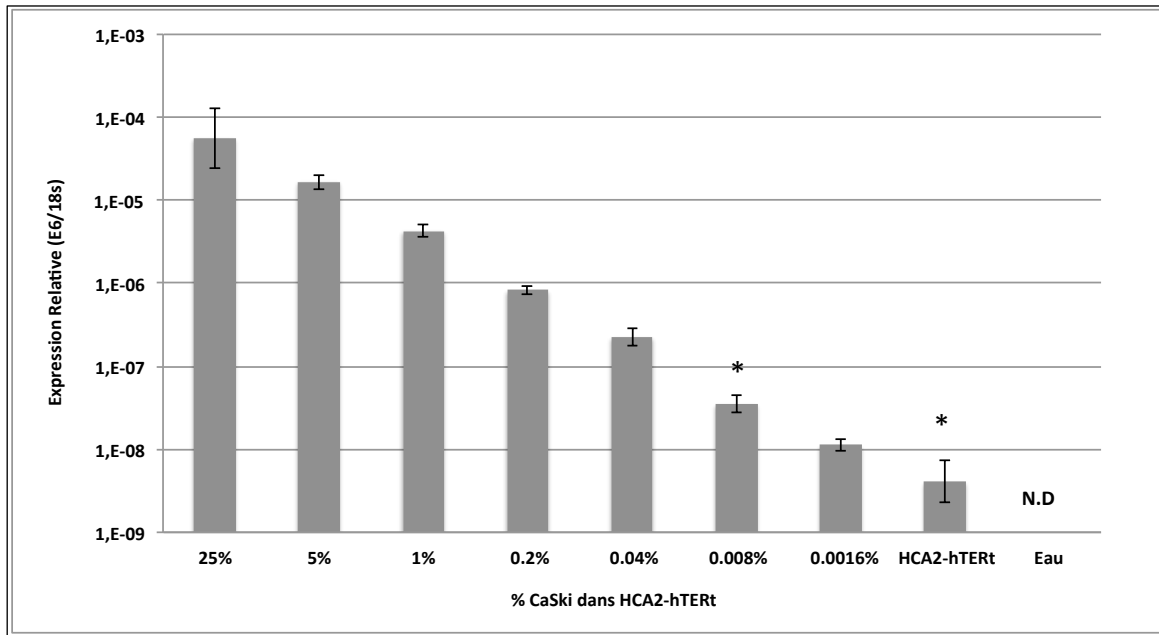
Le but de ce travail est d'élaborer une stratégie de détection moléculaire de l'envahissement ganglionnaire dans le CCU. Selon plusieurs études, la technique de RT-qPCR s'est révélée être plus performante que l'histologie pour diagnostiquer l'envahissement ganglionnaire [150] [151]. Dans cette première étape, nous avons commencé par la validation de la fonctionnalité des biomarqueurs moléculaire E6 et E7 dans des lignées cellulaires.

Afin de valider notre technique de RT- qPCR à partir du matériel frais, nous avons mesuré l'expression des oncoprotéines E6 et E7 par RT- qPCR dans plusieurs dilutions. Des cellules CaSki (VPH16+) ont été diluées dans des fibroblastes HCA2-hTERT (VPH⁻) pour valider les marqueurs E6-E7 de VPH16 (Figure 9-A et B). Alternativement, pour valider les marqueurs E6-E7 VPH18, nous avons dilué des cellules HeLa (VPH18+) dans des cellules CaSki (VPH16+) (Figure 10-A et B). Les fibroblastes HCA2-hTERT étaient notre contrôle négatif pour VPH16 et les cellules CaSki étaient notre contrôle négatif pour VPH18. Toutes les valeurs d'E6 et E7 sont normalisées par rapport à l'expression de l'ARN ribosomal 18S. Nous observons une diminution du niveau de l'expression de E6 et E7 qui correspond au niveaux de dilution des échantillons. Autrement dit, plus les cellules VPH positives sont diluées, plus l'expression des biomarqueurs diminue. Par ailleurs, nous observons aussi une faible expression d'E6 et E7 dans les fibroblastes HCA2-hTERT qui sont VPH négatives, ceci représente donc le niveau basal de détection non-spécifique (limite de la méthode) (Figure 13). Nous n'avons rien détecté au niveau de l'eau, cela nous confirme donc l'absence de contamination de notre ARN avec d'autre protéines ou de l'ADN génomique et suggère que les amorces utilisées provoquent une amplification non-spécifique de faible niveau. Cette stratégie nous a permis de détecter un petit nombre de cellules tumorales dans un mélange cellulaire correspondant à une limite de détection de 0,008% pour les deux marqueurs.

Sachant que nous prévoyons assembler un petit nombre de tissus frais (directement du bloc opératoire) pour valider l'exactitude des biomarqueurs E6 et E7, cette expérience nous donne une idée de la quantité minimale de cellules cancéreuses que nous pouvons détecter et

correspondant à des micrométastases. Par contre, la technique ne serait pas assez sensible pour détecter des cellules cancéreuses isolées.

A



B

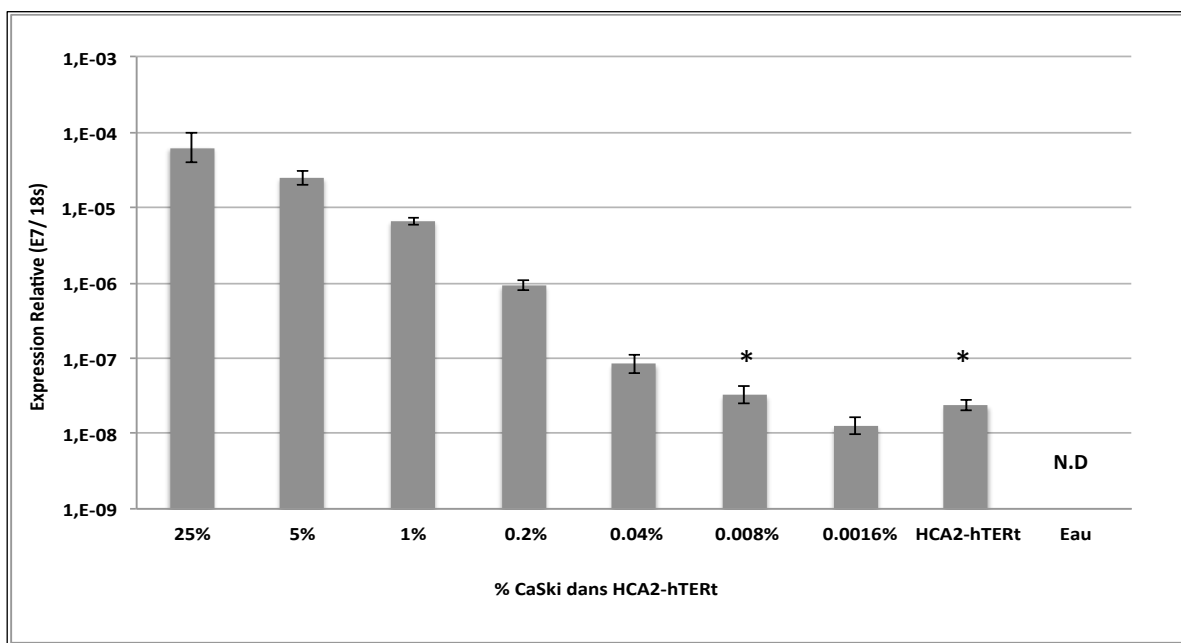
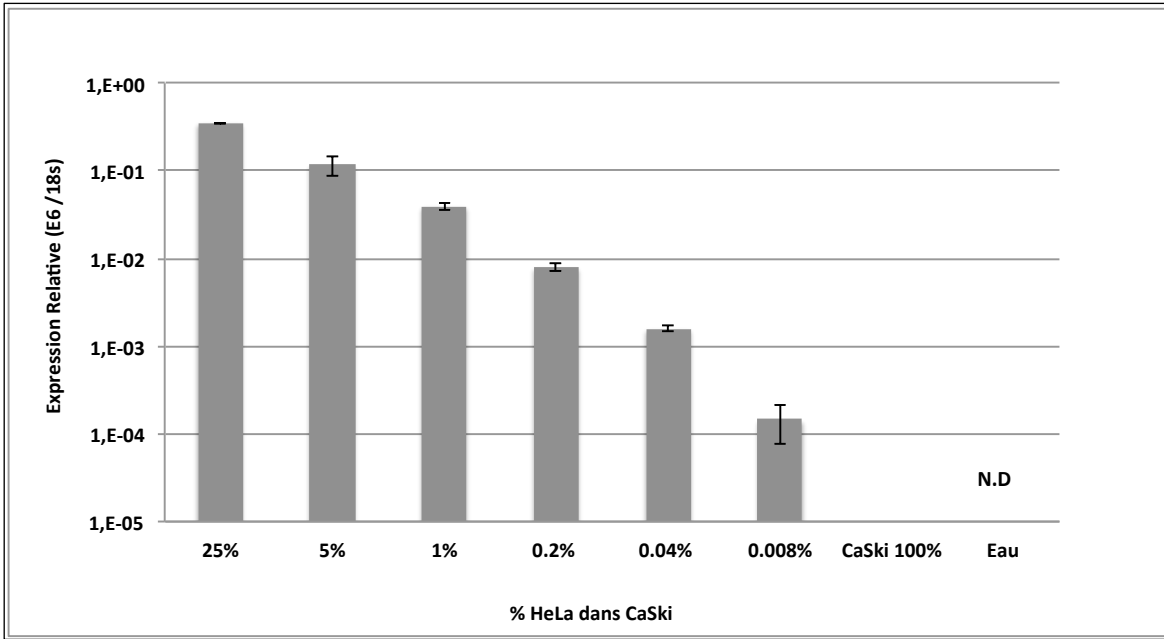


Figure 9: Détection de l'expression de VPH16-E6-E7 dans des populations mixtes de cellules VPH16 positives (CaSki) et VPH16 négatives (HCA2-hTERT) par RT-qPCR.

L'ARN est fraîchement extrait à partir de populations de cellules mixtes de CaSki et HCA2-hTERT. Les pourcentages indiqués sur l'axe X représentent le mélange cellulaire. L'expression de E6 (A) et E7 (B) est normalisée pour l'expression du gène ribosomique 18S et est affichée sur l'axe Y. Les fibroblastes HCA2-hTERT ont servi de contrôle négatif. Notez que les niveaux d'expression de E6 et E7 diminuent à chaque fois que les cellules cancéreuses sont diluées. La limite de détection de l'expression de E6 et E7 est de 0,008% (significativement différente du contrôle négatif HCA2-hTERT ne contenant pas de cellules cancéreuses, $p < 0,01$ pour E6 et $p < 0,05$ pour E7). Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 2 réplicats expérimentaux.

Le symbole * indique qu'il n'y a pas de différence significative entre le contrôle négatif et la dilution 0,008%

A



B

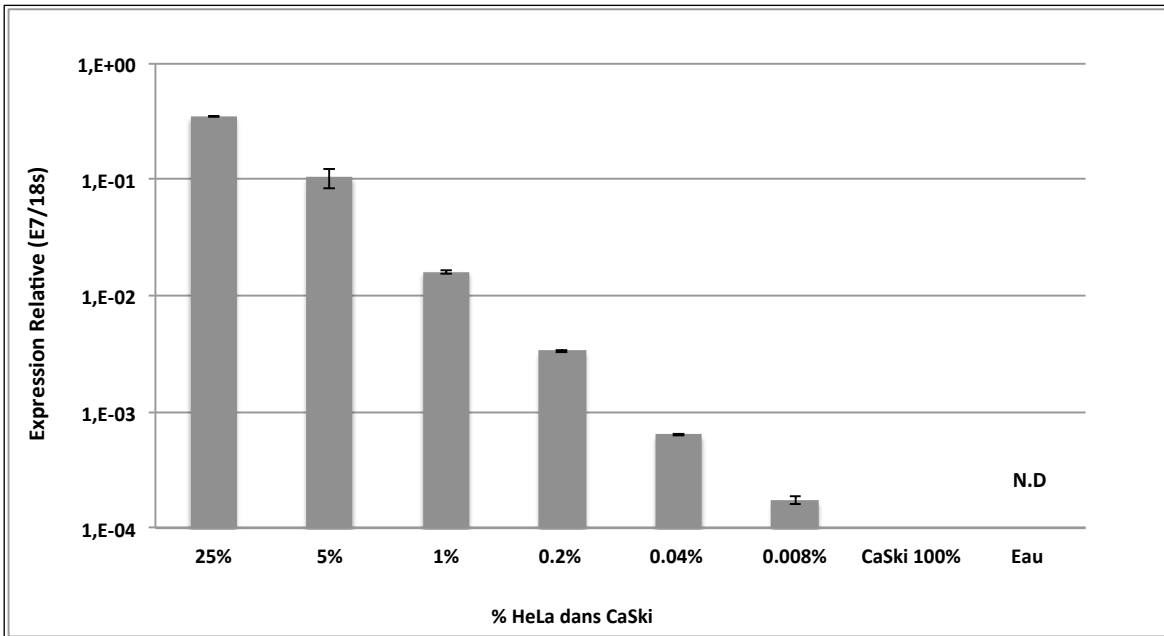


Figure 10: Détection de l'expression de VPH18-E6-E7 dans des populations mixtes de VPH18 positives (HeLa) et de VPH18 négatives (CaSki) par RT-qPCR

L'ARN est fraîchement extrait à partir de populations de cellules mixtes de HeLa et CaSki. Les pourcentages indiqués sur l'axe X représentent le mélange cellulaire. L'expression de E6 (A) et E7 (B) est normalisée par rapport à l'expression du gène ribosomique 18S et est affichée sur l'axe Y. Notez que les niveaux d'expression de E6 et E7 diminuent à chaque fois que les cellules cancéreuses sont diluées. La limite de détection de l'expression de E6 et E7 est de 0,008% (significativement différente du contrôle négatif CaSki (VPH18 négatif), $p < 0,05$). Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 2 réplicats expérimentaux.

3. Comparaison entre l'extraction d'ARN à partir de tissu frais et d'échantillons fixés dans la paraffine (échantillons complexes).

Avant d'entamer l'analyse sur les populations de cellules cancéreuses mixtes fixées dans la paraffine, nous avons effectué cette expérience dans le but de comprendre quelle est la différence de qualité d'ARN extrait à partir du matériel frais (cellules en culture) et d'un ARN extrait d'un échantillon fixé dans la paraffine.

L'identification et la validation de marqueurs moléculaires tissulaires sur des échantillons fixés en paraffine est un domaine d'activité de recherche intense particulièrement en cancérologie étant donnée la quantité d'échantillons tumoraux préservés de cette façon. L'ARNm extrait de tissu en paraffine reste difficile à analyser parce que le processus de fixation introduit des liaisons croisées entre protéines et acides nucléiques et aussi la dégradation d'ARN.

Au cours de cette expérience nous avons comparé les niveaux d'expression d'ARN extraits à partir de matériel frais avec celui extrait à partir de blocs de paraffine (pour les mêmes types de cellules). Nous avons mesuré par RT-qPCR l'expression de quelques gènes de références tels que le 18S, la TBP « TATA Box Binding Protéine » et la β -actine, ainsi que le biomarqueur E6 sur des cellules CaSki VPH16 positives. Nous observons que l'expression des gènes est plus élevée dans le matériel frais par rapport aux échantillons fixés dans la paraffine. Cette différence est d'environ 8 à 10 cycles de PCR qui est l'équivalent à environ 1000 fois moins de molécules d'ARN disponibles pour l'amplification dans les échantillons provenant de la paraffine (Figure 11).

Les résultats de cette expérience suggèrent que la détection de l'expression de l'ARN a une meilleure sensibilité dans le matériel frais par rapport à l'échantillon fixé dans la paraffine.

Dans cette expérience, nous observons clairement que l'expression de TBP et β -actine est plus faiblement détectable et se rapproche de la limite de détection dans les échantillons fixés dans la paraffine. Par contre l'expression de 18S est plus élevée et plus fiable. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser le gène 18S comme contrôle de qualité et de quantité dans toutes nos expériences. Nous avons effectué plusieurs expériences sur d'autres ARN pour confirmer notre choix de gène de contrôle (données non présentées).

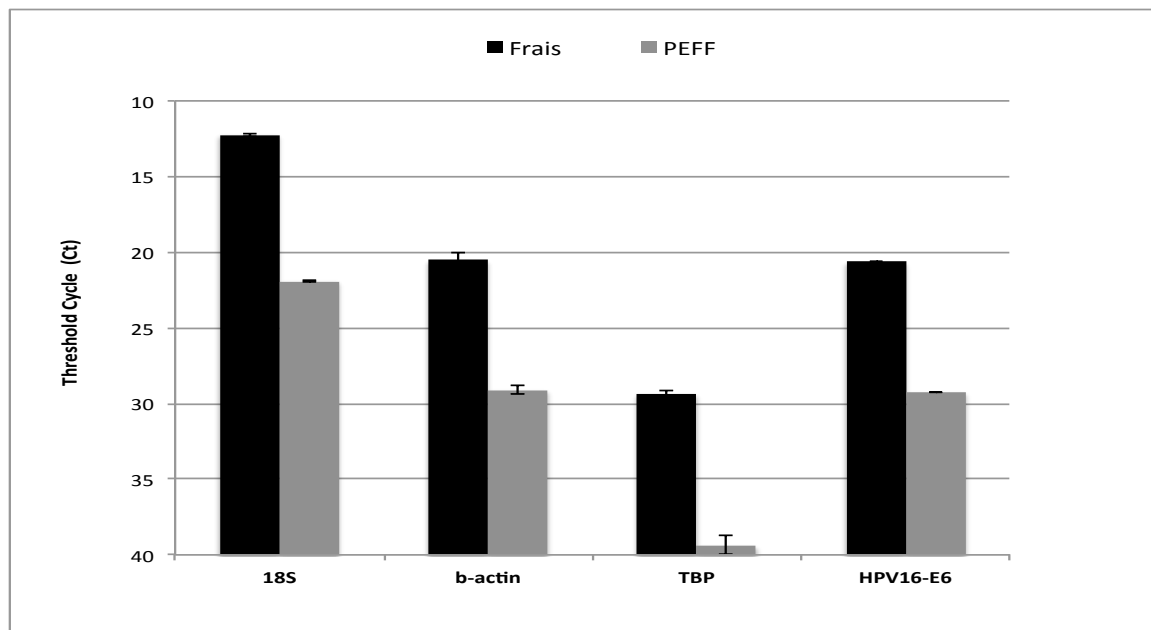


Figure 11: Détection de l'expression de 18S, TBP, β -actine et VPH16-E6 dans des cellules CaSki fraîches ou fixées dans la paraffine par RT-qPCR.

Nous avons testé deux qualités d'ARN. Un ARN fraîchement extrait à partir des cellules CaSki en culture, et un ARN extrait d'un bloc de paraffine construit à partir des mêmes cellules. Le nombre de cycle d'amplification d'ARN est indiqués sur l'axe Y (Expression de 18S, TBP, β -actine et VPH16-E6). Les barres noires représentent les résultats obtenus du matériel frais et les barres grises représentent l'échantillon fixé dans la paraffine. Notez que la détection de l'expression des gènes est plus sensible dans le matériel frais. Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 2 réplicats expérimentaux.

PEFF: paraffin-embedded formalin fixed

4. Détermination de la limite de détection des marqueurs moléculaires E6 et E7 de VPH16 et 18 dans des échantillons fixés dans la paraffine pour le diagnostic de métastases ganglionnaires dans le cancer du col de l'utérus.

4.1 Modèle de blocs de paraffine

Pour valider la sensibilité de notre technique de détection des cellules positives pour l'expression de E6 et de E7 sur des échantillons préservés en paraffine, nous avons mis au point une alternative qui nous a permis de tester l'aptitude de notre technique (RT-qPCR) sur des échantillons complexes. Pour cela nous avons mélangé des cellules VPH+ et des cellules VPH- et les avons incorporées dans des blocs de paraffine. L'objectif de cette expérience est de mimer un vrai ganglion lymphatique, sur lequel nous désirons éventuellement mesurer l'expression des biomarqueurs VPH16-E6-E7 et VPH18-E6-E7 et détecter de petites quantités de cellules CCU. Pour ce faire, nous avons préparé 2 séries de 8 blocs de paraffine avec les dilutions suivantes: (1/2, 1/20, 1/200, 1/2000, 1/10000, 1/20000, 1/50000, 100% CaSki et 100% HCA2-hTERT). L'ARN est extrait à partir de ces blocs de paraffine contenant des populations mixtes de cellules positives et négatives au VPH.

Des cellules CaSki sont diluées dans des fibroblastes HCA2-hTERT pour valider les marqueurs E6-E7 VPH16 (Figure 12). Les fibroblastes HCA2-hTERT étaient notre contrôle négatif pour VPH16. Toutes les valeurs d'E6 et E7 sont normalisées par rapport au 18S (ARN ribosomal).

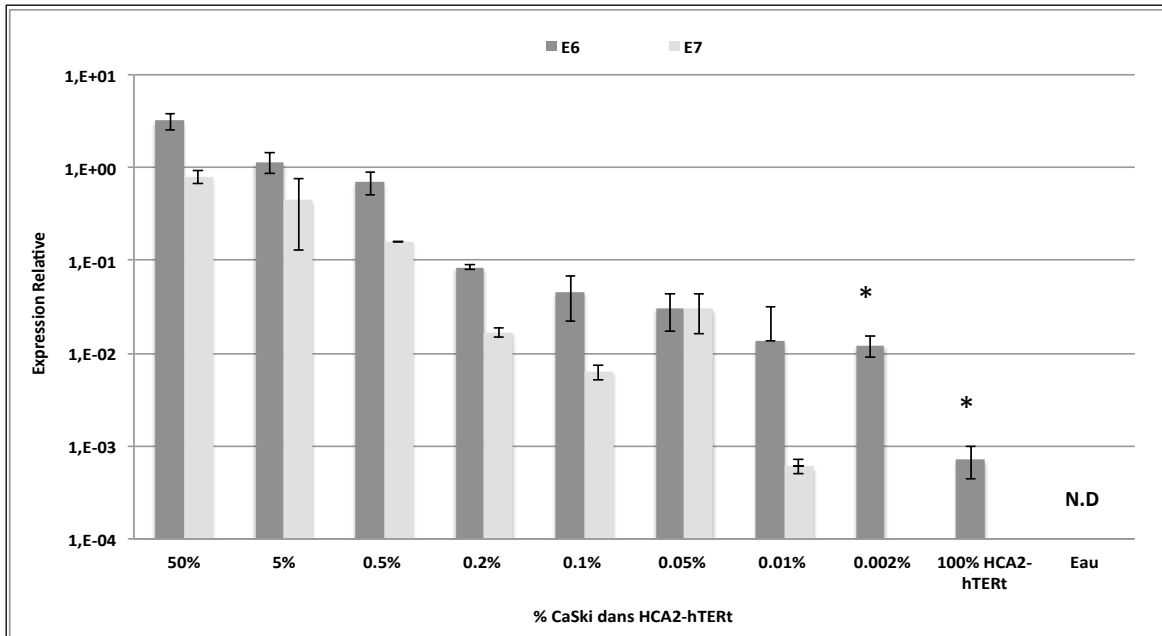


Figure 12: Détection de l'expression du VPH16-E6-E7 par RT-qPCR à partir de blocs de paraffine contenant des dilutions de populations mixtes de cellules VPH16 positives (CaSki) et de fibroblastes humaines (HCA2-hTERT) VPH16 négatives

L'ARN est extrait de chaque bloc de paraffine contenant une dilution de cellules cancéreuses indiquées sur l'axe X. L'expression de E6 et E7 est normalisée pour 18S ribosomique et est affichée sur l'axe Y. Notez que les niveaux d'expression de E6 et E7 diminuent à chaque fois que les cellules cancéreuses sont diluées. Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 3 réplicats expérimentaux.

Le symbole * indique que la dilution 0,002% est significativement différente du contrôle négatif HCA2-hTERT

4.2 Immunohistochimie

Les résultats de RT-qPCR obtenus à la figure 12 montrent beaucoup de variabilité d'expression et ne correspondent pas aux dilutions théoriques qui avaient été appliqués. Par exemple, nous avons noté que la dilution entre 50% et 5% dans la figure 10 devrait donner lieu à une diminution de 10x de l'expression, alors que notre PCR quantitative ne détecte qu'une diminution de 2-3x. Ceci de façon reproductible et cette discordance fut observée dans plusieurs dilutions. Nous avons donc évalué la quantité de cellules cancéreuses présentes dans chaque bloc de dilution pour vérifier si la mesure de l'expression de E6 et E7 correspondait bien à la quantité de cellules positives présentes plutôt qu'à la dilution théorique préparée. Nous avons choisi la méthode d'immunohistochimie pour caractériser les niveaux d'expression du marqueur CK19 dans les cellules cancéreuse (absent dans les fibroblastes) dans les populations de cellules mixtes des coupes de paraffine de chaque dilution (figure 12). La proportion de cellules positives histochimiquement pour CK19 (cellules cancéreuse) fut donc déterminée (figure 14) et est représenté dans le tableau IV. Notez que la limite de détection par histochimie se situe autour de 1% ce qui représente le niveau basal de signal CK19.

Ces résultats nous révèlent que les pourcentages qui représentent le nombre de cellules cancéreuses dans chaque bloc ne correspondent pas aux pourcentages attendus selon les dilutions qui ont été utilisées. La problématique se situe au niveau de la manipulation, les dilutions de cellules n'ont pas été réalisées simultanément à cause du nombre important de cellules utilisées (1000 000 000 de cellules par bloc), ceci pourrait expliquer pourquoi le pourcentage de cellules dans chaque bloc ne correspond pas nécessairement à la bonne dilution.

D'autres erreurs expérimentales reliées à la manipulation de très grands nombres de cellules pourraient aussi expliquer ce problème. Cette expérience de validation est effectuée seulement sur les blocs du modèle VPH16.

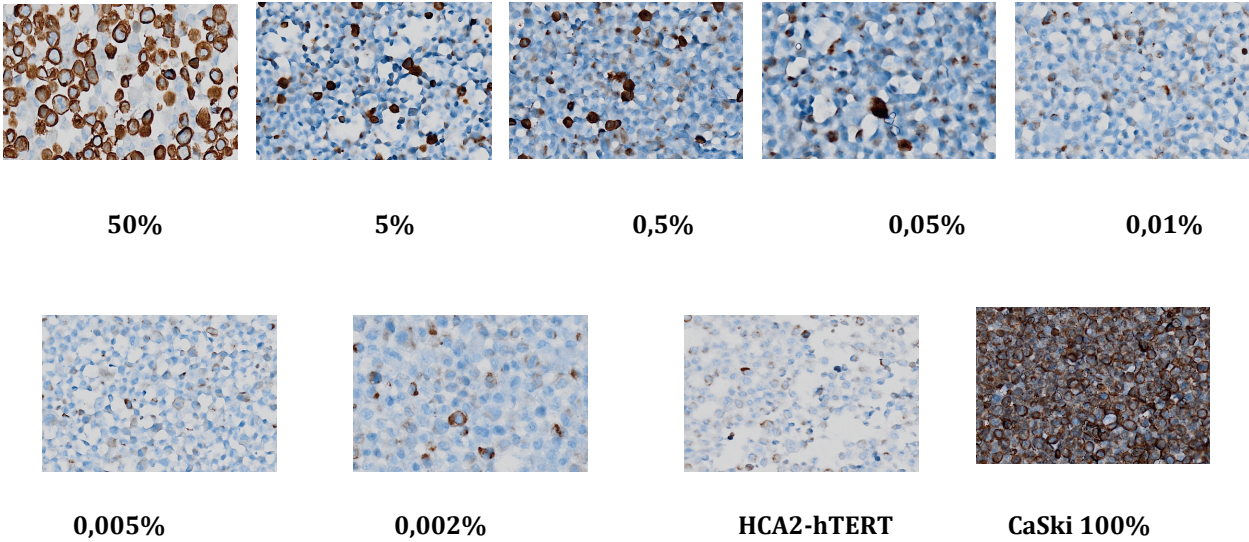


Figure 13: Caractérisation de l'expression de CK19 dans des populations mixtes de CaSki et HCA2-hTERT. Chaque coupe représente une dilution, toutes les coupes sont marquées, par immunohistochimie, pour CK19 (signal brun foncé). Les noyaux sont contre-colorés en bleu par l'hématoxyline suivie du « bluing reagent » respectivement. Les coupes sont observées à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement de 20X.

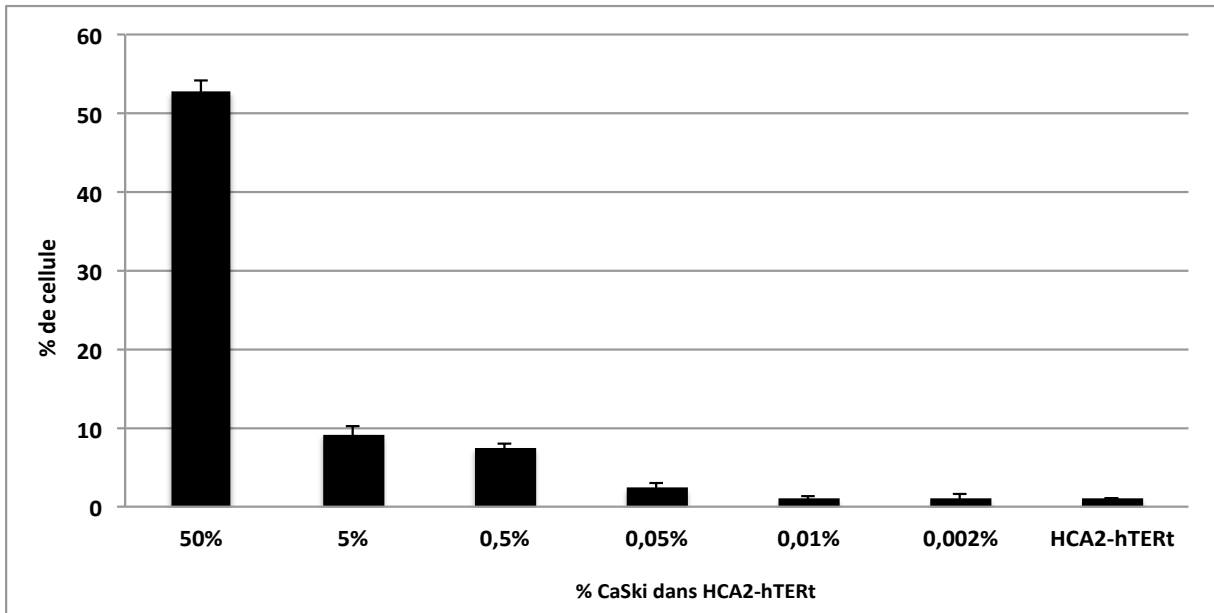


Figure 14: Quantification du nombre de cellules dans chaque dilution par immunohistochimie pour CK19.

Le graphique représente le pourcentage du compte des cellules exprimant CK19 par immunohistochimie (axe de Y) en fonction des dilutions de cellules incorporées dans les blocs de paraffine (indiqué sur l'axe des X). Notez que le pourcentage mesuré en histochimie diffère du % des dilutions théoriques. Le contrôle négatif est les fibroblastes HCA2-hTERT. La limite histologique est de détection est de 1%.

Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 3 comptes de cellules colorées pour CK19.

Tableau IV: Pourcentage de cellules théoriquement diluées dans des blocs de paraffine vs pourcentage réel de cellules quantifiées en immunohistochimie.

Représentation des dilutions de population de cellules mixtes cancéreuses-normales incorporées dans les blocs de paraffine (colonne de gauche) et la proportion réelle de cellules cancéreuses CaSki obtenus dans ces blocs par coloration CK19 (colonne de droite).

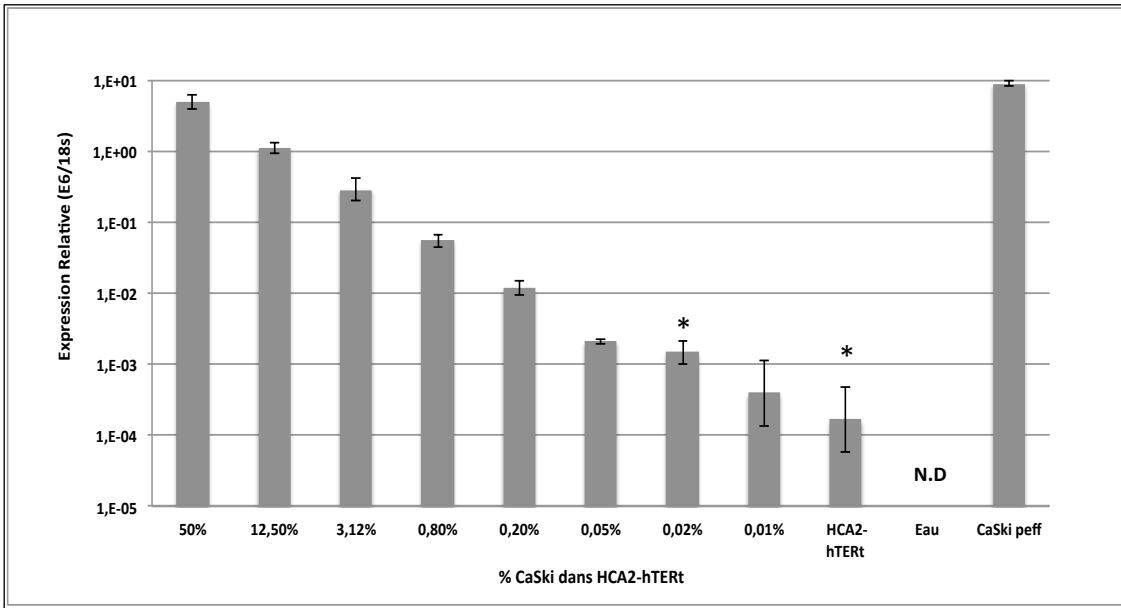
Blocs théoriquement préparés (% de cellules cancéreuses prévu)	Niveau basal de cellules cancéreuses basé sur CK19
50	52
5	9,2
0,5	7,5
0,05	2,33
0,01	1
0,002	1
0 (HCA2-hTERT)	1

4.3 Détermination de la limite de détection des marqueurs moléculaires E6 et E7 de VPH16 et 18

Due à l'impossibilité de déterminer la limite de détection de E6 et E7 sur les blocs modèles de paraffine préparés avec des populations mixtes de cellules VPH+ et VPH-, nous avons effectués des dilutions séquentielles de 1:4 directement à partir de l'ARN extrait du bloc validé de 50% de CaSki dans HCA2-hTERT pour VPH16+ (Figure 15-A et B) et d'un bloc de HeLa (50%) dans CaSki (50%) pour VPH18+ (Figure 16-A et B). Cette alternative semble être plus fiable pour détecter de façon reproductible des petites quantités de cellules cancéreuses dans un mélange de cellules négatives au VPH ce qui maintient une population d'ARN complexe mimant un tissu.

Nous observons une diminution au niveau de l'expression de E6 et E7, autrement dit, plus les cellules VPH positif sont diluées, plus l'expression des biomarqueurs est en diminution jusqu'à une limite de détection de 0,02% pour E6/E7 VPH16, et 0,05% pour E6/E7 VPH18.

A



B

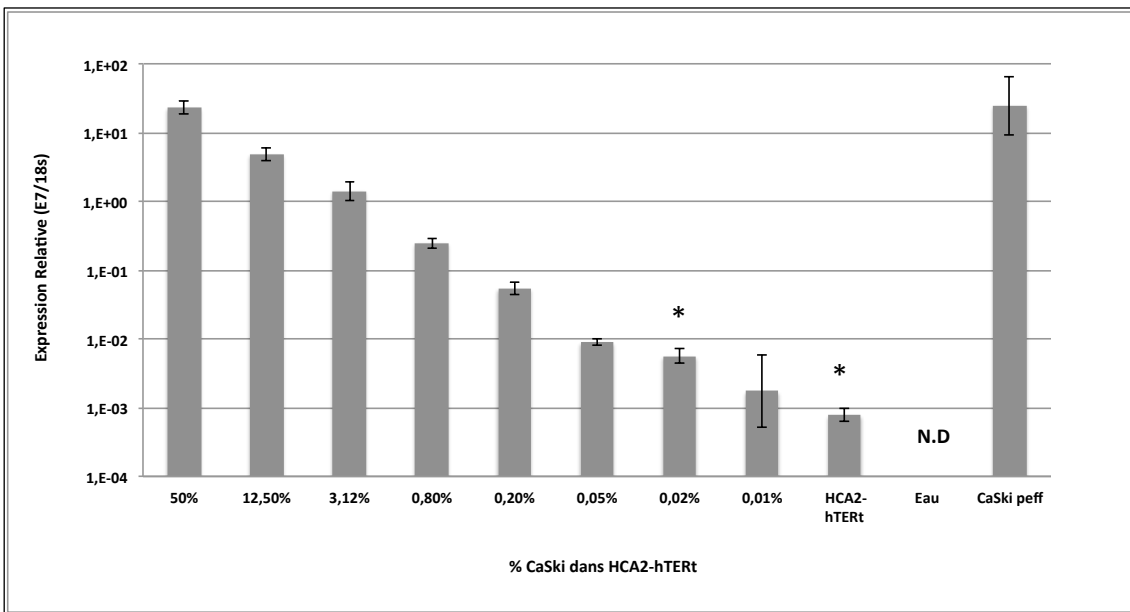
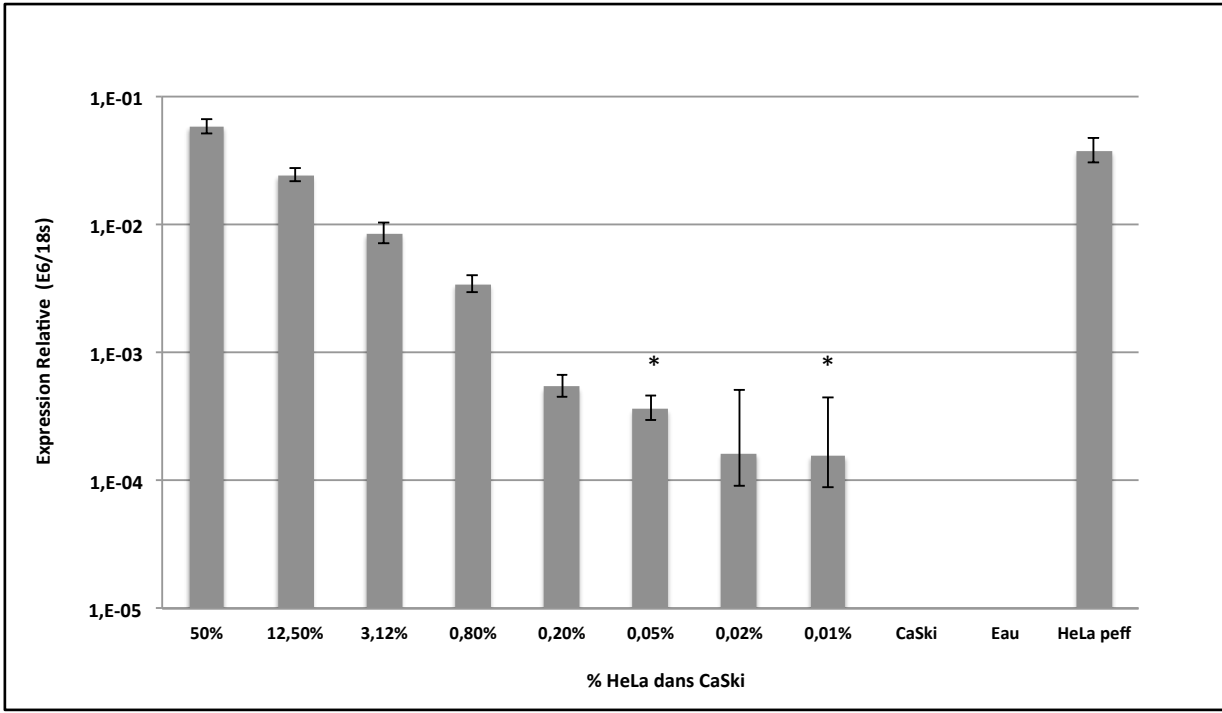


Figure 15: Détection de l'expression du VPH16-E6-E7 à partir de dilutions d'ARN extraits de blocs de paraffine contenant des cellules VPH16 positives (CaSki) et des fibroblastes humaines (HCA2-hTERT) VPH16 négatives par RT-qPCR. Les ARN VPH positifs et VPH négatifs provenant d'extraction de bloc de paraffine sont mélangés à des dilutions de cellules cancéreuses indiquées sur l'axe X. L'expression de E6 (A) et E7 (B) dans la figure 14 est normalisée pour l'expression du gène ribosomique 18S et est affichée sur l'axe Y. Notez que les niveaux d'expression de E6 et E7 diminuent à chaque fois que les cellules cancéreuses sont diluées. La limite de détection de l'expression de E6 et E7 est de 0,02% (significativement différente du contrôle négatif HCA2-hTERT contenant pas de cellules cancéreuses, $p < 0,05$). Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 3 réplicats expérimentaux. Le symbole * indique que la dilution 0,02% est significativement différente du contrôle négatif HCA2-hTERT

A



B

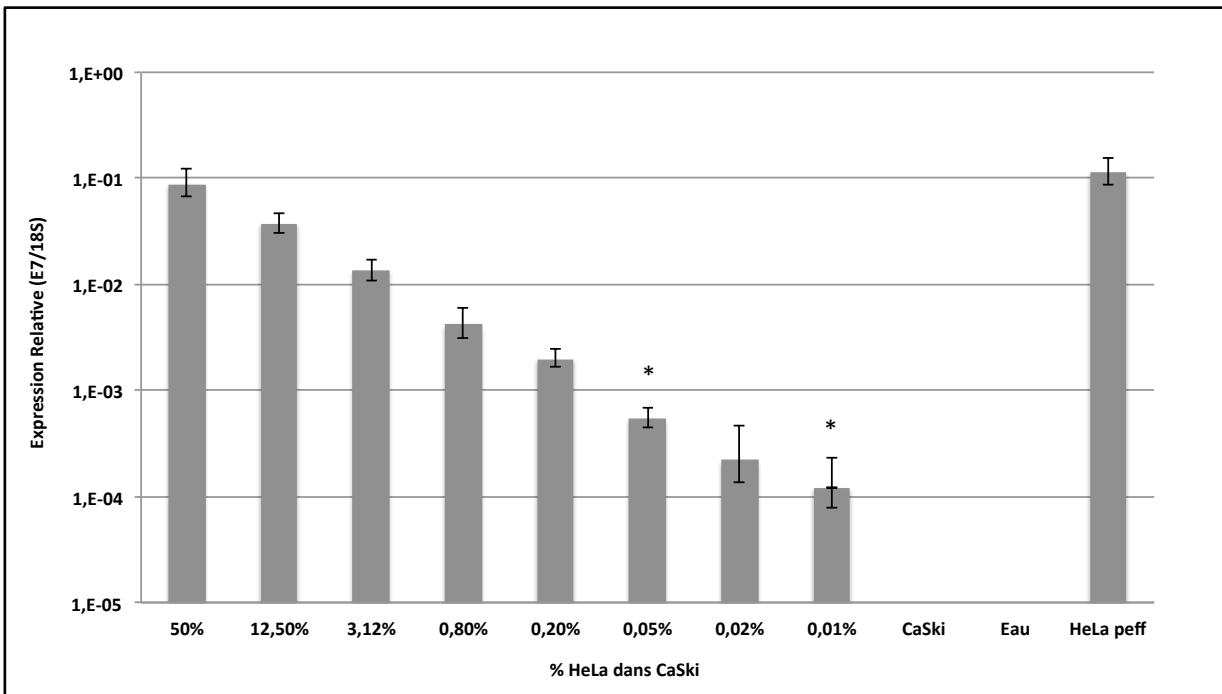


Figure 16: Détection de l'expression du VPH18-E6-E7 à partir de dilutions d'ARN extraits de blocs de paraffine contenant des cellules VPH18 positives (HeLa) et des cellules VPH18 négatives (CaSki) par RT-qPCR

Les ARN VPH positifs et VPH négatifs provenant d'extraction de bloc de paraffine sont mélangés à des dilutions de cellules cancéreuses indiquées sur l'axe X. L'expression de E6 (A) et E7 (B) est normalisée pour l'expression du gène ribosomique 18S et est affichée sur l'axe Y. Notez que les niveaux d'expression de E6 et E7 diminuent à chaque fois que les cellules cancéreuses sont diluées. La limite de détection de l'expression de E6 et E7 est de 0,05% (significativement différente de la dilution 0,01%, $p < 0,05$). Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 3 réplicats expérimentaux.

Le symbole * indique que la dilution 0,05% est significativement différente de la dilution minimale 0,01%

5. Intégration de notre méthode de détection moléculaire à une étude en cours

La méthodologie et les résultats décrits dans les section précédente pour déterminer la limite de détection de E6 et E7 dérivés du VPH16 dans les échantillons frais et dans la paraffine ont été intégré à une étude sur le point d'être soumise (voir manuscrit en préparation, annexe A). Cette étude est débutée en France par Dre Vanessa Samouëlian à l'université Droit et Santé – Lille II, école Doctorale Biologie Santé de Lille (EDBSL), et elle se poursuit dans notre laboratoire avec la collaboration du Dre Samouëlian qui possède une vaste expérience dans le développement d'outils de diagnostic moléculaire pour le CCU

Traduction française du résumé du manuscrit: *Molecular detection of nodal involvement in uterine cervical cancer*

V Samouëlian, F Revillon, E Leblanc, M-C Baranzelli, V Lhotellier, D Querleu, N Mechtouf, G Cardin, JP Peyrat and F Rodier

L'envahissement ganglionnaire métastatique joue un rôle pronostique majeur dans le cancer du col de l'utérus. Malgré l'importance cruciale de l'envahissement ganglionnaire, l'impact de micrométastases ou de cellules tumorales isolées (CTI) sur la progression de la maladie reste incertain. La biologie moléculaire utilise la réaction de PCR quantitative couplée à la transcription inverse (RT-qPCR) pour diagnostiquer efficacement l'envahissement ganglionnaire dans d'autres tumeurs malignes, mais pour les CCU, la détection par RT-qPCR de métastases ganglionnaires manque de spécificité. Afin de faciliter et d'améliorer la détection des métastases ganglionnaires chez des patientes présentant des CCU, nous avons testé plusieurs biomarqueurs en utilisant le TaqMan RT-qPCR. Certains étant caractéristique des cellules épithéliales (CK19, Mucine 1, HER1-4), d'autres des tumeurs CCU (VPH16/18-E6/E7), ainsi que certains impliqués dans l'invasion tumorale (VEGF, le VEGF-C, l'uPA et MMP9). En étudiant des échantillons de tissus frais de ganglions lymphatiques histologiquement positifs et négatifs, nous avons constaté une expression significativement élevée de trois biomarqueurs dans les ganglions histologiquement positifs avec une sensibilité et une spécificité respectivement de 82% et 99% pour CK19, de 76% et 94% pour VPH16-E6,

et de 76% et 68% pour MUC1. L'analyse combinée de la CK19 et VPH16-E6 a permis une sensibilité de 100% et une spécificité de 94%. En outre, en utilisant un modèle de culture cellulaire et de l'expression spécifique aux biomarqueurs VPH16-E6 ou VPH16-E7, nous avons facilement détecté une proportion de 0,008 % de cellules CCU VPH16 positives au sein d'une population de cellules VPH16 négatives. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'utilisation combinée des biomarqueurs CK19 et VPH16-E6 pourrait sous-tendre une stratégie de RT-qPCR pour la détection de l'envahissement ganglionnaire dans les tissus de CCU frais, et que les biomarqueurs VPH-E6/E7 pourraient de même être utilisés pour des études prospectives et rétrospectives sur des échantillons fixés en paraffine pour détecter l'envahissement ganglionnaire de petite taille comme des micrométastases ou des cellules tumorales isolées.

6. Données préliminaires ganglions/tumeurs primaires

Suite à nos résultats positifs obtenus dans la section *-Détermination de la limite de détection des marqueurs moléculaires E6-E7 de VPH16 et 18-* nous avons procédé à la validation de notre technique sur des ganglions lymphatiques et des tumeurs primaires de patientes préservées en paraffine. En collaboration avec le service de gynécologie-oncologique du CHUM, nous avons obtenus des échantillons issus de 9 tumeurs primaires de CCU et 8 ganglions lymphatiques dont 5 sont des ganglions prélevés chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire.

Nous avons extrait l'ARN des tumeurs primaires et des ganglions lymphatiques préservés dans la paraffine et comparé la concentration d'ARN obtenue par rapport à celle du matériel frais et aussi à celle des blocs modèles (populations mixtes de cellules cancéreuses).

Nos résultats confirment que l'ARN extrait du matériel frais est de meilleure concentration par rapport à l'ARN extrait du matériel fixé dans la paraffine (figure 17). Malgré cette différence, nos concentrations d'ARN obtenues à partir de tumeurs primaires et de ganglions lymphatiques sont satisfaisantes, ce qui nous a permis de tester l'expression des biomarqueurs E6 et E7 par RT-qPCR. (Figures 18, 19). Nos résultats de RT-qPCR confirment que l'ARN extrait est de bonne qualité (voir expression 18S) et que les tumeurs primaires 503A7, 377A5, 12A1, 50A1, 97A1 et 90A1 sont VPH16 positives tandis que les tumeurs 03A1, 75A1 et 44A1

sont VPH16 négatives. Nous avons similairement mesuré l'expression de E6-E7 VPH18 dans la même série de tumeur, les résultats se révèlent positifs pour les tumeurs 503A7, 377A5, 12A1, 44A1 et négatif pour 03A1, 50A1, 97A1, 70A1, 75A1.

Les tumeurs primaires du col sont théoriquement positives à plus de 70% pour la présence de VPH16-VPH18 ce qui concorde avec nos résultats et ces tumeurs primaires validées ont donc servi de contrôle positif ou négatif selon les résultats obtenus pour les expériences subséquentes avec les tissus ganglionnaires. Les ganglions d'ovaire sont reconnus pour être généralement VPH négatif et sont donc utilisés comme contrôle négatif. Pour débiter l'évaluation des ganglions lymphatiques, nous avons effectués les mesures de l'expression des biomarqueurs E6-E7 pour VPH16 et VPH18, mais pour l'instant nous avons compilé de façon claire seulement les résultats pour le VPH18. En effet, dans le cas de VPH16, nous avons 3 ganglions CCU dont les trois sont invalides en génotypage (Le génotypage est effectué dans le laboratoire de Dr François Coutlée (Tableau V).

Nous aurions donc besoin de plus d'échantillons de ganglions lymphatiques de patientes avec CCU VPH16 positif pour compléter cette partie de l'étude.

Dans le cas des mesures d'expression de E6-E7 pour le VPH18, nos résultats concordent avec les analyses de génotypage et l'historique pathologique. Les 2 tumeurs primaires (503A7 et 377A5) qui se sont révélées VPH18 positives lors du génotypage, sont aussi positives en RT-qPCR. Similairement, les ganglions lymphatiques négatifs lors du génotypage sont aussi négatifs en RT-qPCR (Figure 20).

Tableau V: Résultats du génotypage des tissus en paraffine

15 échantillons sont séquencés dont 13 ganglions lymphatiques et 2 tumeurs primaires du col de l'utérus. Seulement le spécimen #8 a donné un résultat au séquençage avec les amorces GP5+/GP6+. Ensuite, une PCR β -globine avec un amplicon de 167pb qui est près du 150pb amplifié par GP5+/GP6+. Dans la colonne invalide, on peut conclure que les numéros 1, 2, 4, 5 et 10 ne sont pas analysables (tissu dégradé). Les numéros 3, 6, 9,12 et 13 sont VPH négatif.

# séquentiel	# Dossier	16	18	B-globine		inadéquat LA	Séquençage GP5+/GP6+	B-globine 167pb	invalide
				b	B				
1	133B1					1			1
2	133C1					1			1
3	160A7					1		positif	
4	160B2					1			1
5	224D3					1			1
6	224E5				B	1		positif	
7	377A5		18	b	B	0			
8	503A7			b	B	0	18		
9	643H1			b	B	0			
10	643A5					1			1
11	643I1	16		b	B	0			
12	739D12			b	B	0			
13	739F4			b	B	0			
14	739G2	16		b	B	0			
15	962A8				B	1		positif	

6.1 Concentrations d'extraction d'ARN des échantillons en paraffine

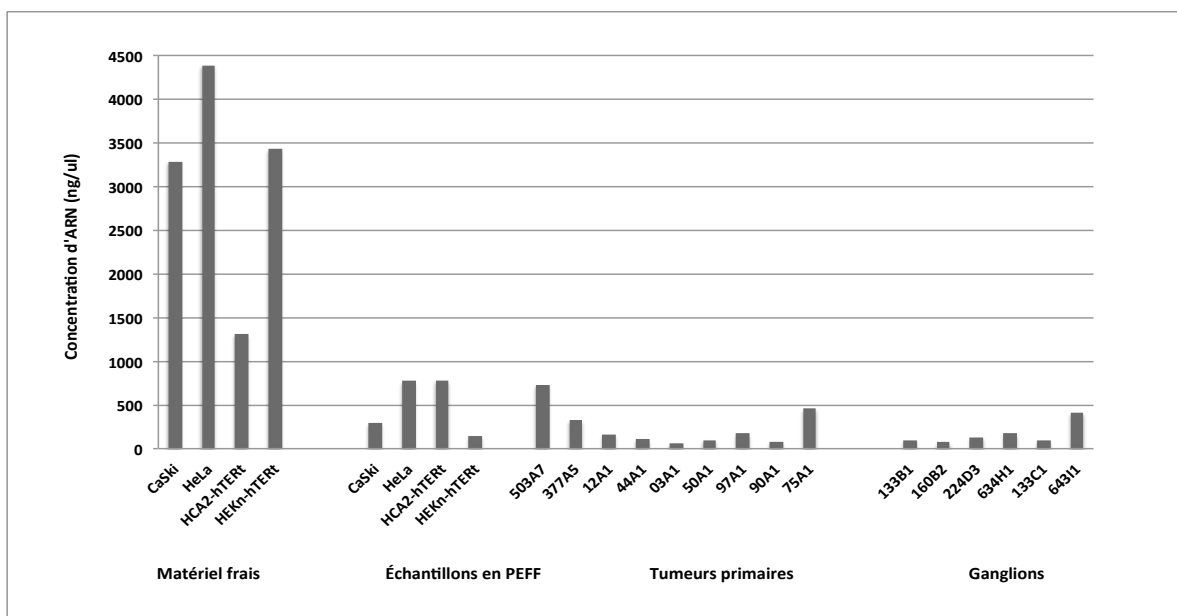


Figure 17: Concentration d'ARN extrait à partir du matériel frais et tissu en paraffine (échantillons en paraffine, tumeurs primaires et ganglions lymphatiques)

Représentation de la concentration d'ARN obtenue après extraction. L'ARN des cellules suivantes est extrait à partir du matériel frais et des blocs de paraffine: cellules CaSki, HeLa, HCA2-hTERT et HEKn-hTERT. La figure représente aussi la concentration d'ARN extrait à partir de tumeurs primaires et de ganglions lymphatiques.

6.2 Détection de l'expression de E6 et E7 de VPH16 et 18 dans les tumeurs primaires

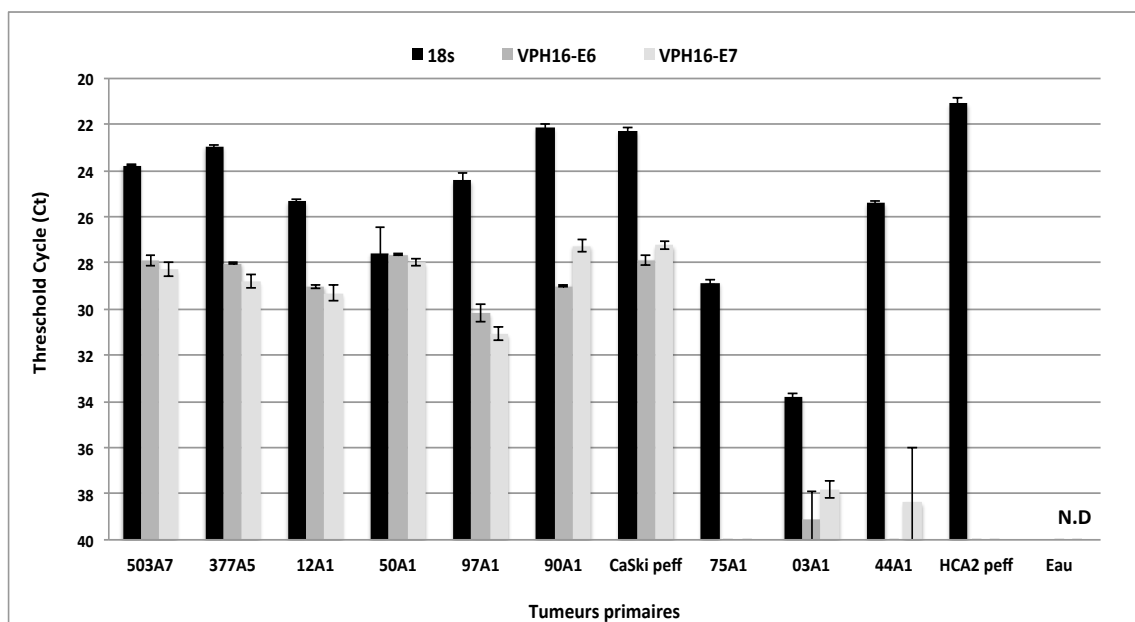


Figure 18: Expression de 18S, E6 et E7 de VPH16 dans des tumeurs primaires du col de l'utérus par RT-qPCR

L'ARN est extrait à partir de tumeurs préservées dans des blocs de paraffine. Les cellules CaSki fixées dans la paraffine sont utilisées comme contrôle positif et les fibroblastes HCA2-hTERT sont utilisés comme contrôle négatif. Le 18S ribosomal représente la qualité d'ARN extrait pour chaque tumeur. Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 2 réplicats expérimentaux.

ND : Non détecté

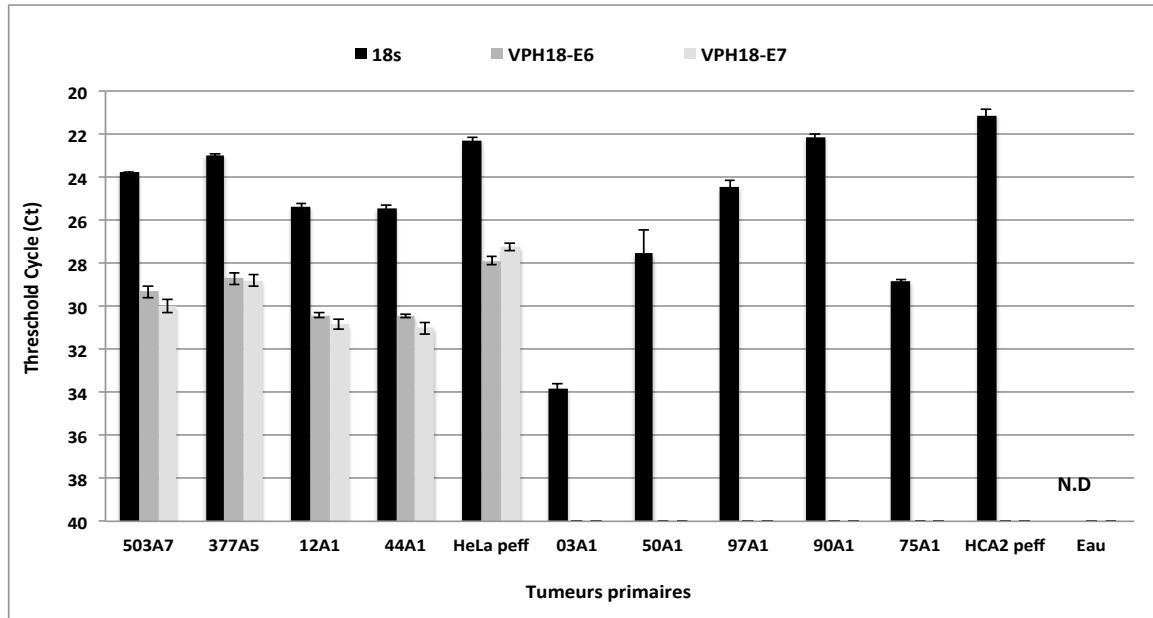


Figure 19: Expression de 18S, E6 et E7 de VPH18 dans des tumeurs primaires du col de l'utérus par RT-qPCR

L'ARN est extrait à partir de tumeurs fixées dans des blocs de paraffine. Les cellules HeLa fixées dans la paraffine sont utilisées comme contrôle positif et les fibroblastes HCA2-hTERT sont utilisés comme contrôle négatif. L'ARN ribosomal 18S représente la qualité d'ARN extrait pour chaque tumeur. Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 2 réplicats expérimentaux.

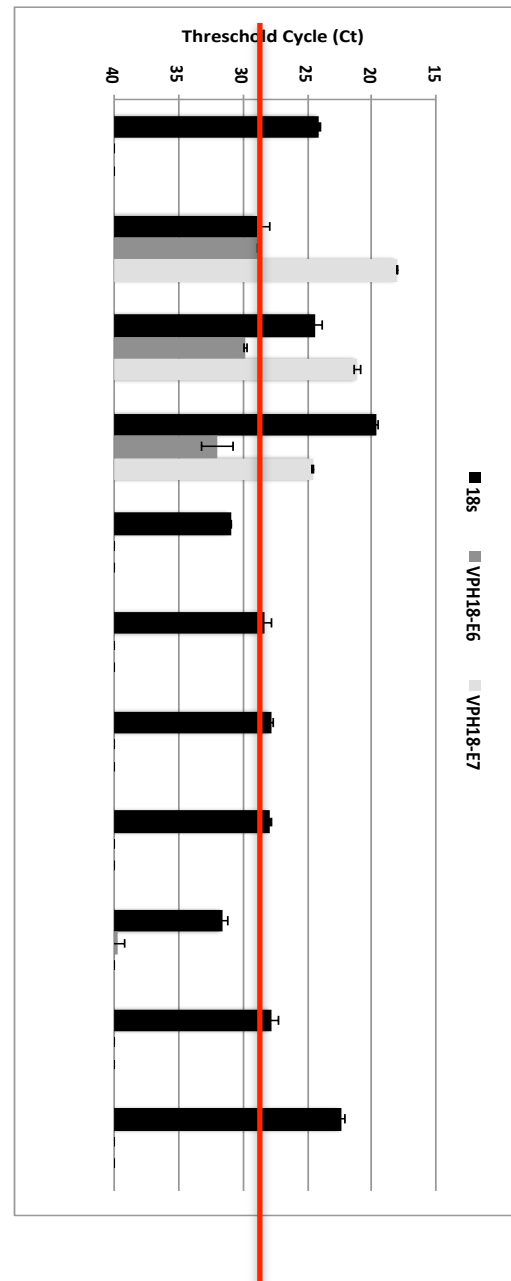
ND : Non détecté

6.3 Détection de l'expression des biomarqueurs E6 et E7 de VPH18 dans les ganglions lymphatiques et tumeurs primaires

A

Tissus	Analyse de qPCR	Génotypage	Historique de la pathologie
HEK _{hTERT}	Négatif	VPH-	Contrôle
HeLa	Positif	VPH 18+	Contrôle
503A7	Positif	VPH 18+	Tumeur primaire UC
377A5	Positif	VPH 18+	Tumeur primaire UC
224D3	Négatif	Invalide	Ganglion d'ovaire positif
643H1	Négatif	VPH négatif	Ganglion d'ovaire positif
224E5	Négatif	VPH négatif	Ganglion d'ovaire négatif
133B1	Négatif	Invalide	Ganglion du col positif
160B2	Négatif	Invalide	Ganglion du col positif
133C1	Négatif	Invalide	Ganglion du col négatif
739G2	Invalide	VPH 16+	Ganglion d'ovaire négatif

B



Niveau d'expression de 18S dans les cellules HeLa en paraffine

Figure 20: Comparaison entre l'expression de E6/E7 VPH18 par RT-qPCR, le génotypage et l'examen histologique dans les ganglions lymphatiques ou tumeurs primaires

(A) Le tableau représente les ganglions lymphatiques qui sont évalués pour le VPH18-E6-E7. Les deux tumeurs primaires (503A7 et 377A5) sont des contrôles positifs. Le tableau nous indique trois informations: analyse des ganglions lymphatiques par RT-qPCR, génotypage et historique pathologique.

(B) L'ARN est extrait à partir des tissus de ganglions lymphatiques fixées dans la paraffine. Le 18S représente la qualité d'ARN obtenue. Des tumeurs primaires (507A5 et 377A5) et des cellules HeLa fixées dans la paraffine sont utilisées comme contrôle positif. Le contrôle négatif est des fibroblastes HEKn-hTERT et des ganglions d'ovaire. Le 18S ribosomal représente la qualité d'ARN extrait pour chaque ganglion. La ligne rouge représente le niveau d'expression de 18S dans les HeLa paraffine. Cela reflète une bonne qualité de l'ARN, peu dégradée lors des manipulations. L'expérience est représentative, elle est répétée plusieurs fois. Les valeurs représentent la moyenne et les barres d'erreur la déviation standard pour un minimum de 2 réplicats expérimentaux.

CHAPITRE IV: Discussion

Le but principal de ce projet est d'élaborer une stratégie de détection moléculaire de l'envahissement ganglionnaire dans le cancer du col de l'utérus. Sur des tissus frais, cette technologie permettrait potentiellement d'adapter la pratique clinique en extemporané puisque l'envahissement ganglionnaire métastatique a un rôle pronostic dans le CCU [13]. Sur des tissus archivés en paraffine, cette technologie permettrait l'analyse rétrospective définitive de l'impact des macro, micrométastases et des cellules tumorales isolées sur l'évolution de la maladie. Parmi les techniques de biologie moléculaire, la RT-qPCR se révèle être plus performantes que l'histologie pour faire le diagnostic des micrométastases et des cellules tumorales isolées ganglionnaires dans d'autres cancers [150] [151]. Dans cette étude nous avons évalué les biomarqueurs E6 et E7 des sous-types viraux VPH16 et 18 par RT-qPCR pour étudier l'envahissement ganglionnaire dans le CCU. Le choix des VPH16 et 18 est discutable. En effet, ces derniers ne sont pas à l'origine de tous les cancers du col de l'utérus, mais ils sont impliqués dans 70% des cas, un pourcentage très intéressant pour pouvoir établir le diagnostic moléculaire d'envahissement ganglionnaire avec une sensibilité et une spécificité importantes. Éventuellement, notre technique pourrait être élargie à d'autres sous-types de VPH.

Nous avons validé des sondes TaqMan E6/E7 qui sont spécifiques au VPH16 et 18 en utilisant des modèles de culture cellulaire. L'utilisation de ces modèles de culture nous a permis d'identifier des cellules CCU dans un échantillon frais ou fixé contenant un mélange complexe de cellules et de déterminer la limite de détection de E6/E7. Nous avons déterminés la sensibilité de détection de l'expression des biomarqueurs E6 et E7 des VPH16 et 18. Ces derniers ne sont pas détectés dans les tissus cervicaux normaux, ce qui est consistant avec l'idée que ce sont des oncogènes impliqués dans la carcinogénèse.

Ces résultats supportent notre hypothèse à savoir que les oncoprotéines E6 et E7 du VPH pourraient être utilisés comme biomarqueurs moléculaires en RT-qPCR pour évaluer l'envahissement ganglionnaire et comprendre la valeur pronostique des micrométastases et des

cellules tumorales isolées qui est jusqu'à maintenant mal connue, car souvent non diagnostiquées et donc difficile à évaluer.

1. Qualité d'ARN extrait

Dans un premier temps, pour l'approche expérimentale que nous avons utilisée, il est important d'évaluer la qualité d'ARN extrait car ceci représente une première étape cruciale pour l'obtention de données valides sur l'expression des biomarqueurs E6 et E7. La pureté fut vérifiée en calculant le rapport des absorbances à 260 nm et à 280 nm. Celui-ci estime la contamination protéique et doit être supérieure à 1,6. Nos ARN montrent un rapport 260/280 nm qui varie entre 1,9 et 2 pour les ARN fraîchement extraits et les ARN extraits d'échantillons complexes. Ce résultat démontre que notre ARN est de très bonne qualité. De plus, nous avons vérifié la dégradation d'ARN dans quelques échantillons par l'appareil Agilent 2100 BioAnalyzer '« BioAnalyzer Nano chi » et par électrophorèse sur un gel d'agarose. Nous avons aussi évalué la contamination par ADN génomique qui était nulle.

Par la suite, nous avons comparé l'ARN extrait directement des cellules cancéreuses fraîches en faisant une extraction traditionnelle directe avec du Trizol à de l'ARN extrait à partir des échantillons fixés dans la paraffine. D'après nos résultats, nous avons observé une différence de 8 à 10 cycles de RT-qPCR, l'équivalent de 1000 fois moins d'ARN dans la paraffine et conséquemment une expression significativement plus élevée de 18S, β -actine, TBP et VPH6-E6 dans l'échantillon frais par rapport à l'échantillon fixé dans la paraffine (Figure 11). Ces résultats suggèrent que cette différence au niveau de l'expression est due à la fragmentation de l'ARN durant le processus de fixation.

Nous avons conclu que l'expression de l'ARN du matériel frais avait un meilleur potentiel de sensibilité par rapport à l'ARN d'échantillons fixés dans la paraffine.

En effet, l'extraction des échantillons fixés dans la paraffine est une étape délicate et souvent limitante pour l'obtention d'ARNm purifié, non dégradé et des produits de PCR de taille normale.

2. Validation des biomarqueurs E6 et E7 de VPH16 et 18 dans du matériel frais

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré l'expression des biomarqueurs E6 et E7 des VPH16 et 18 dans du matériel frais car la méthode de détection sera potentiellement appliquée au bloc opératoire sur des tissus frais (ganglions lymphatiques). À la lumière de nos résultats, la limite de détection de E6 et E7 VPH16 est de 0,008%. Cette dilution est statistiquement significative par rapport à notre contrôle négatif HCA2-hTERT et à la dilution 0,0016% ($p < 0,05$). La limite de détection de E6 et E7 VPH18 est aussi de 0,008%. Nous n'avons pas pu considérer la dilution 0,0016% comme limite de détection car en mesurant l'expression de E6 et E7 en triplicata, nous n'avons pas d'expression détectable dans certains réplicats ce qui faussait le test statistique en augmentant la déviation standard.

En résumé, ces résultats suggèrent que nous sommes capable de détecter une cellule cancéreuse parmi 12500 cellules normales. Ainsi, nous avons la sensibilité nécessaire pour détecter les macrométastases et les micrométastases dans un tissu frais (Voir Modèle de calcul de dimensions de macro/micrométastase et cellules tumorales isolées dans un ganglion).

Nous avons testé des dilutions plus petites pour évaluer les micrométastases qui font moins de 0,008% et les cellules tumorales isolées mais nous avons rencontré des problèmes de mesure de copies d'ARN. Par exemple, dans un triplicata, il est possible qu'à de très faibles niveaux de présence de la cible, le premier réplica contienne une ou 2 copies d'ARN, tandis le deuxième réplica n'en contienne aucune, et que le troisième réplica contient une seule copie, ce qui nous a empêché d'atteindre la significativité statistique. Une solution à ce problème serait d'utiliser un appareil de *Digital PCR*. Cette technologie est un PCR numérique qui fonctionne en divisant un échantillon dans de nombreuses réactions individuelles de PCR en temps réel; une partie de ces réactions contiennent la molécule cible (positif) tandis que d'autres ne la contiennent pas (négatif). Après analyse par PCR, la fraction de réactions négatives est utilisée pour générer une valeur absolue du nombre de molécules cibles dans l'échantillon, sans référence à des normes ou des contrôles endogènes (Life technologies). Nous pensons qu'avec cette technique, il est potentiellement possible de diagnostiquer les cellules tumorales isolées en augmentant la sensibilité de notre technique.

En résumé, nous pensons que notre méthode de détection de l'envahissement ganglionnaire sera plus sensible sur les échantillons frais de patientes que sur les échantillons archivés en paraffine.

3. Validation des biomarqueurs E6 et E7 dans des échantillons fixés dans la paraffine (échantillons complexes)

Il est difficile de valider la technique de détection de l'envahissement ganglionnaire de façon extensive directement sur la banque de tissu du CRCHUM car nous ne voulons pas gaspiller le matériel biologique précieux provenant des patientes et qui peut être utilisé dans d'autres projets de recherche. Pour contourner cette limitation, nous avons créé un modèle de culture avec des dilutions de populations mixtes de cellules cancéreuses pour identifier avec précision les cellules CCU positives au VPH16 et 18 dans un échantillon complexe, jusqu'à une petite proportion de cellules (micrométastase et cellules tumorales isolées). Malheureusement, avec notre premier modèle de dilutions directes de cellules vivantes nous avons constaté beaucoup de variabilité d'une dilution à l'autre (Figure 12). Ceci était probablement causé par une limitation technique faisant que les dilutions ne sont pas séquentielles, autrement dit, les dilutions ont été préparées dans des moments différents à cause du grand nombre de cellules amplifiées. Pour expliquer cette discordance, Nous avons utilisé une coloration à la CK19 pour valider la proportion de cellules cancéreuses par bloc de paraffine.

4. Quantification par immunohistochimie de la Cytokératine 19

Nous avons utilisé l'anticorps anti-Cytokératine pour vérifier les pourcentages qui représentent le nombre de cellules cancéreuses dans chaque dilution de population de cellules cancéreuses mixtes VPH16. Les résultats obtenus avec la coloration CK19 confirment nos données de RT-qPCR. L'immunohistochimie avec CK19 nous démontre que la dilution théorique 0,5% de CaSki dans des HCA2-hTERT s'est révélée être une proportion de 7,5% de CaSki. Cela explique pourquoi l'expression de E6 dans cet échantillon est plus élevée qu'attendue. Cette expérience nous révèle aussi que notre limite de détection en immunohistochimie est de 1%, puisque toutes les dilutions très faibles et le contrôle négatif nous montre malgré tout 1% de

cellules positives (Figure 14). Nous confirmons donc qu'il est difficile de détecter les micrométastases et les cellules tumorales isolées en immunohistochimie en utilisant une limite de détection de 1%, expliquant pourquoi le diagnostic des micrométastases en histologie est moins fiable. Alternativement, en RT-qPCR, nous observons facilement l'expression de E6 et E7 à des niveaux très faible. Nos résultats concordent avec la littérature qui a rapporté que la technique de RT-qPCR est plus performante que l'étude histologique.

Dans une étude sur la détection de l'envahissement ganglionnaire dans le cancer du col utérin sur des tissus frais (Manuscrit attaché en annexe A), CK19 est testé en combinaison avec VPH16-E6, ces deux paramètres avaient la meilleure concordance avec l'examen histologique. Ainsi, les résultats suggèrent que l'utilisation combinée de CK19 et VPH16-E6 peut être exploitée dans une stratégie de RT-qPCR quantitative pour la détection de l'atteinte ganglionnaire avec à la fois une grande sensibilité et spécificité.

Suite à ces résultats et pour contourner le problème des dilutions de cellules vivantes, nous avons décidé d'effectuer des dilutions séquentielles à partir de l'ARN extrait d'un seul bloc de paraffine sélectionné et validé pour sa concentration de cellules cancéreuses. Notre choix fut la dilution 50% de cellules CaSki et 50% de fibroblastes HCA2-hTERT pour VPH16 et la dilution 50% de cellules HeLa et 50% de CaSki pour VPH18. Le bloc contenant la dilution de 50% est valide selon l'immunohistochimie car nous avons détecté 52% de cellules cancéreuses (Figure 14 et tableau IV). En utilisant cette stratégie de dilution d'ARN combinée au RT-qPCR nous avons pu détecter de faible proportions de cellules cancéreuses jusqu'à 0,02% pour VPH16-E6-E7 et 0,05% pour VPH18-E6-E7 (Figures 15 et 16). Les marqueurs E6 et E7 sont plus difficiles à détecter dans la paraffine, c'est à dire, que nous avons perdu de la sensibilité si comparée avec le matériel frais.

Néanmoins, nous avons validé un protocole qui nous permet d'aller chercher les macrométastases et les micrométastases dans les échantillons de paraffine. Comme mentionné précédemment, nous pourrions potentiellement améliorer nos limites de détection en utilisant l'appareil de *Digital PCR*.

5. Validation de la technique de RT-qPCR sur des tissus de patientes avec CCU

Selon nos données préliminaires pour les tissus de patientes, nous n'avons pas pu conclure pour l'instant à propos de la détection des oncogènes provenant du VPH16. Nous avons eu accès à seulement trois ganglions CCU et malheureusement les trois ganglions sont VPH16 inconnus (invalides au génotypage). Nous avons conscience que la cohorte de tissus que nous avons analysé est présentement très limitée et nous n'avons donc pas encore de contrôle positif réel d'envahissement tumoral ganglionnaire VPH16+. Il nous faudrait donc des ganglions additionnels de CCU positifs au VPH16 au génotypage pour pouvoir valider nos marqueurs moléculaires de façon définitive dans le contexte ganglionnaire archivé.

De plus, nous avons analysé des ganglions prélevés chez des patientes atteintes de cancer d'ovaire pour les utiliser comme contrôle négatif. Les deux ganglions d'ovaire positifs pour l'envahissement tumoral selon l'historique pathologique se sont révélés aussi positif au VPH16 en génotypage. Nous avons été surpris par la détection du VPH16 dans le ganglion d'ovaire car selon *Trottier et al, 1995*, les séquences du VPH sont absentes dans les pathologies d'ovaire [77]. Plusieurs recherches montrent que le rôle du VPH dans la pathogenèse du cancer de l'ovaire est controversé, et des résultats contradictoires sont publiés [152]. Alors, il pourrait être intéressant de changer notre contrôle négatif pour un autre cancer qui n'exprime pas le VPH de façon plus certaine. En conséquence, nous n'avons pas pu considérer ces échantillons comme étant des contrôles négatifs pour le VPH.

Concernant l'analyse de VPH18 dans les ganglions lymphatiques, nos résultats concordent avec les résultats du génotypage et l'historique de la pathologie. En comparant le niveau d'expression du 18S dans cellules HeLa fixées dans la paraffine et dans nos ganglions lymphatiques, nous constatons que nous avons eu une bonne qualité d'ARN dans presque tous les ganglions, plus ou moins pour les ganglions 224D3 et 160B2. En travaillant sur une large cohorte de ganglions, cela nous permet d'élaborer notre stratégie moléculaire de diagnostic de l'envahissement ganglionnaire dans le CCU incluant le biomarqueur VPH18.

Conclusions

L'envahissement ganglionnaire est un facteur pronostic majeur dans les cancers du col utérin. L'objectif de mon projet de maîtrise est d'améliorer le diagnostic de l'atteinte ganglionnaire et par la suite comprendre le rôle des micrométastases dans le CCU. La mise au point d'une méthode de détection des micrométastases ganglionnaires et des cellules tumorales isolées pourrait permettre de réduire des récidives en augmentant la sensibilité de détection des métastases ganglionnaires ce qui donne la possibilité de mieux adapter les traitements, d'éviter de sous-traiter les patientes et de diminuer la morbidité en empêchant certaines patientes de recevoir des traitements non-essentiels.

Nous avons réussi à mettre au point un protocole pour extraire l'ARNm de bonne qualité à partir du matériel frais et des échantillons en paraffine. Les paramètres d'extraction de l'ARN pour détecter les biomarqueurs E6 et E7 des VPH16 et 18 à partir d'échantillons de paraffine sont bien définis. Donc, nous avons atteint notre premier objectif.

Nous avons aussi pu déterminer une limite de détection des petites quantités de cellules tumorales dans un environnement complexe similaire aux micrométastases lymphatiques. Dans un tissu frais, nous pouvons détecter une cellule cancéreuse dans 12500 cellules non-cancéreuses. Dans un échantillon de paraffine, nous pouvons détecter une cellule cancéreuse dans 5000 cellules non-cancéreuses. Ceci suggère que notre méthode de détection sera plus sensible sur les tissus frais qui seront analysés directement au bloc opératoire.

La précision de la méthode moléculaire et sa capacité à détecter des micrométastases sur des échantillons de paraffine est validée de façon préliminaire en utilisant un petit nombre d'échantillons de patientes de notre base de données. Nos résultats confirment aussi que la détection par RT-qPCR a une sensibilité plus élevée que l'histologie. Donc, notre deuxième objectif est presque atteint. Parallèlement, nous travaillons sur la constitution de la banque d'échantillons de patientes CCU. Nous collaborons avec plusieurs cliniciens du service de gynécologie-oncologie du CHUM pour avoir le maximum d'échantillons de patientes CCU.

Perspectives

Pour la suite du projet, d'autres recherches devront être effectuées sur la banque de tissus des patientes pour déterminer le potentiel pronostique de la détection de micrométastases. En collaboration avec des cliniciens de plusieurs centres, nous visons à rassembler une base de données cliniques et une banque d'ADNc de patientes traitées pour le cancer du col de l'utérus. La banque de données cliniques est constituée de 740 patientes traitées pour le CCU au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), dont la moitié d'entre eux ont eu une évaluation histologique ganglionnaire pré thérapeutique (Tableau VI). Ces échantillons serviront à :

1. Valider les marqueurs qui ont été déjà testés sur des échantillons fixés dans la paraffine.
2. Comparer les analyses moléculaires et histologiques des ganglions lymphatiques histologiquement positifs et négatifs des patientes de CCU et en corrélation avec les résultats cliniques.
3. Évaluer la valeur pronostique des micrométastases et par conséquent, améliorer la compréhension de leur rôle dans l'évolution du cancer du col de l'utérus.

Pour ce faire :

Nous utiliserons des tissus VPH16/18 positifs de la banque d'échantillons, ainsi que des tissus de cancer VPH négatif pour le contrôle négatif. Les ganglions lymphatiques négatifs seront analysés en entier en utilisant un protocole qui permettra de préserver suffisamment de matériel du tissu original pour analyse subséquente si nécessaire. Essentiellement nous allons faire des coupes séquentielles de 10 μM pour l'analyse moléculaire et préserver des coupes de 5 μM pour l'analyse histologique traditionnelle (Figure 21).

4. À long terme, cette étude contribuera à l'élaboration d'un protocole de RT-qPCR péroopératoire précis. Un outil moléculaire rapide et précis pour diagnostiquer les métastases ganglionnaires en extemporané.

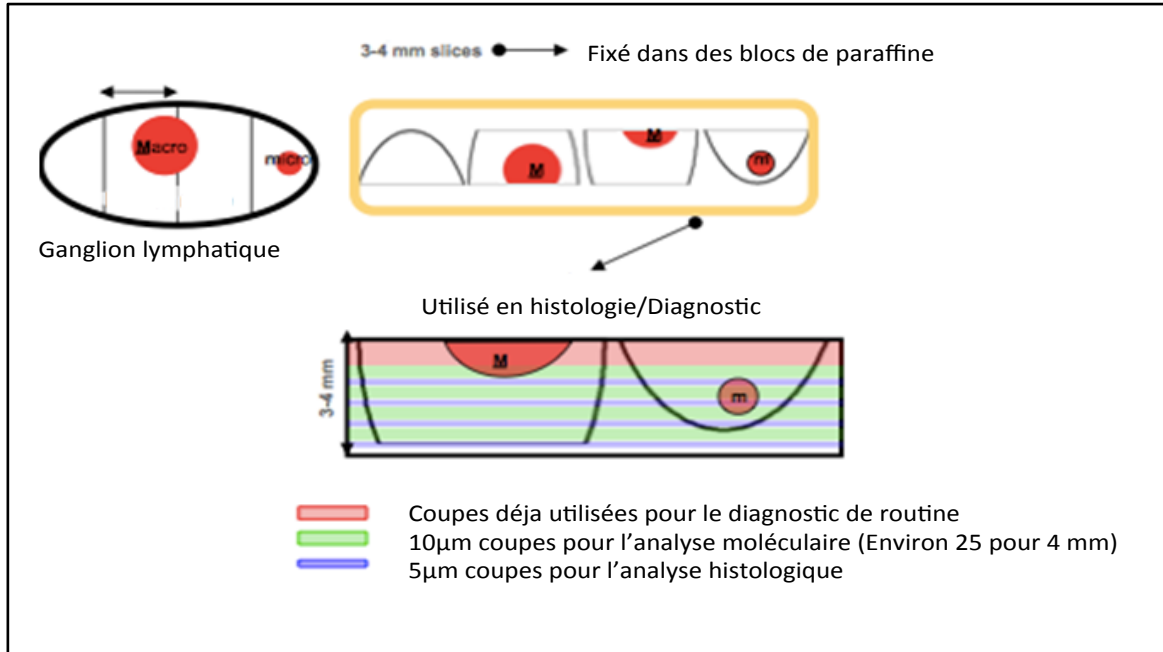


Figure 21: Schéma représentant la stratégie pour générer le matériel moléculaire (ADNc/ARN) et histologique à partir d'un ganglion lymphatique de patiente.

Cette stratégie sera appliquée sur les ganglions lymphatiques négatifs. Des coupes de 10µm seront réalisées pour l'analyse moléculaire en alternance avec des coupes de 5µm qui seront réalisées pour l'analyse histologique. Des ganglions histologiquement positifs seront utilisés pour confirmer les résultats. Tous les ganglions lymphatiques négatifs seront complètement analysés de cette façon en utilisant un protocole qui permettra de préserver le matériel tissulaire original et enfin d'évaluer les micrométastases et les cellules tumorales isolées avec précision.

Tableau VI: Banque d'échantillon à proposer.

Nombre détaillé des patientes atteintes de cancer du col utérin [2] traitées dans le service de gynécologie-oncologie du CHUM-Notre-Dame. Ces ganglions seront disponibles pour constituer une base de données avec des informations histologiques, cliniques et moléculaires.

Années	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total
Nombre de patientes	104	94	82	74	80	81	77	61	92	745

CHAPITRE VI: Bibliographie

(Bibliographie commune; Mémoire et manuscrit)

1. Akom, E. L'infection au virus du papillome humain (VPH) recension des écrits et consultation d'experts dans une perspective de santé publique : ampleur et nature du problème, exploration des avenues de prévention de ces infections et de leur complications. (Institut national de santé publique du Québec, Montréal; 2003).
2. Querleu, D., Dargent, D., Ansquer, Y., Leblanc, E. & Narducci, F. Extraperitoneal endosurgical aortic and common iliac dissection in the staging of bulky or advanced cervical carcinomas. *Cancer* 88, 1883-1891 (2000).
3. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. & Munoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189, 12-19 (1999).
4. Munoz, N., Bosch, F.X., Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K.V. & Meijer, C.J. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 111, 278-285 (2004).
5. Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M. & Schlegel, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of virology* 63, 4417-4421 (1989).
6. Hopman, A.H., Smedts, F., Dignef, W., Ummelen, M., Sonke, G., Mravunac, M., Vooijs, G.P., Speel, E.J. & Ramaekers, F.C. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *The Journal of pathology* 202, 23-33 (2004).
7. Kalantari, M., Karlsen, F., Kristensen, G., Holm, R., Hagmar, B. & Johansson, B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 17, 146-153 (1998).
8. Fader, A.N., Edwards, R.P., Cost, M., Kanbour-Shakir, A., Kelley, J.L., Schwartz, B., Sukumvanich, P., Comerci, J., Sumkin, J., Elishaev, E. & Rohan, L.C. Sentinel lymph

node biopsy in early-stage cervical cancer: utility of intraoperative versus postoperative assessment. *Gynecologic oncology* 111, 13-17 (2008).

9. Hafner, N., Gajda, M., Altgassen, C., Hertel, H., Greinke, C., Hillemanns, P., Schneider, A. & Durst, M. HPV16-E6 mRNA is superior to cytokeratin 19 mRNA as a molecular marker for the detection of disseminated tumour cells in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer by quantitative reverse-transcription PCR. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 120, 1842-1846 (2007).
10. Van Trappen, P.O., Gyselman, V.G., Lowe, D.G., Ryan, A., Oram, D.H., Bosze, P., Weekes, A.R., Shepherd, J.H., Dorudi, S., Bustin, S.A. & Jacobs, I.J. Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. *Lancet* 357, 15-20 (2001).
11. Cibula, D., Abu-Rustum, N.R., Dusek, L., Zikan, M., Zaal, A., Sevcik, L., Kenter, G.G., Querleu, D., Jach, R., Bats, A.S., Dyduch, G., Graf, P., Klat, J., Lacheta, J., Meijer, C.J., Mery, E., Verheijen, R. & Zweemer, R.P. Prognostic significance of low volume sentinel lymph node disease in early-stage cervical cancer. *Gynecologic oncology* 124, 496-501 (2012).
12. Darai, E., Rouzier, R., Ballester, M., Barranger, E. & Coutant, C. Sentinel lymph node biopsy in gynaecological cancers: the importance of micrometastases in cervical cancer. *Surgical oncology* 17, 227-235 (2008).
13. Marchiole, P., Buenerd, A., Benchaib, M., Nezhat, K., Dargent, D. & Mathevet, P. Clinical significance of lympho vascular space involvement and lymph node micrometastases in early-stage cervical cancer: a retrospective case-control surgical-pathological study. *Gynecologic oncology* 97, 727-732 (2005).
14. Douvier, S. & Dalac, S. Infections à papillomavirus, in EMC-Maladies Infectieuses Article 8-054-A010 (2004).
15. White, E. Tumour biology. p53, guardian of Rb. *Nature* 371, 21-22 (1994).
16. Rous, P. & Beard, J.W. The Progression to Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope). *The Journal of experimental medicine* 62, 523-548 (1935).
17. Shope, R.E. & Hurst, E.W. Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *The Journal of experimental medicine* 58, 607-624 (1933).
18. Barrett, T.J., Silbar, J.D. & Mc, G.J. Genital warts-a venereal disease. *Journal of the American Medical Association* 154, 333-334 (1954).
19. Duensing, S. & Munger, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research* 62, 7075-7082 (2002).

20. Gissmann, L. & zur Hausen, H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1310-1313 (1976).
21. Orth, G., Favre, M. & Croissant, O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *Journal of virology* 24, 108-120 (1977).
22. Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Tafur, L., Izarzugaza, I., Gili, M., Viladiu, P., Navarro, C., Martos, C., Ascunce, N. & et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 52, 743-749 (1992).
23. de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U. & zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27 (2004).
24. Bernard, H.U., Calleja-Macias, I.E. & Dunn, S.T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 118, 1071-1076 (2006).
25. Burk, R.D., Chen, Z. & Van Doorslaer, K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public health genomics* 12, 281-290 (2009).
26. Yaguchi, Y., Sugawara, H., Tsujimoto, H., Takata, H., Nakabayashi, K., Ichikura, T., Ono, S., Hiraki, S., Sakamoto, N., Horio, T., Kumano, I., Otomo, Y., Mochizuki, H., Yamamoto, J. & Hase, K. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Annals of surgical oncology* 18, 2289-2296 (2011).
27. Mougin, C., Bernard, B. & Lab, M. [Biology of papillomavirus infections. I. General characteristics]. *Annales de biologie clinique* 55, 555-563 (1997).
28. Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827 (1991).
29. O'Brien, V. & Campo, M.S. BPV-4 E8 transforms NIH3T3 cells, up-regulates cyclin A and cyclin A-associated kinase activity and de-regulates expression of the cdk inhibitor p27Kip1. *Oncogene* 17, 293-301 (1998).
30. Kirnbauer, R., Chandrachud, L.M., O'Neil, B.W., Wagner, E.R., Grindlay, G.J., Armstrong, A., McGarvie, G.M., Schiller, J.T., Lowy, D.R. & Campo, M.S. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219, 37-44 (1996).

31. Favre, M., Ramoz, N. & Orth, G. Human papillomaviruses: general features. *Clinics in dermatology* 15, 181-198 (1997).
32. Kurvinen, K., Yliskoski, M., Saarikoski, S., Syrjanen, K. & Syrjanen, S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *European journal of cancer* 36, 1402-1410 (2000).
33. Kyo, S., Klumpp, D.J., Inoue, M., Kanaya, T. & Laimins, L.A. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *The Journal of general virology* 78 (Pt 2), 401-411 (1997).
34. Tan, S.H., Leong, L.E., Walker, P.A. & Bernard, H.U. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *Journal of virology* 68, 6411-6420 (1994).
35. Bouallaga, I. Les papillomavirus et la régulation de la transcription, chapitre IV (Paris, France, Institut Pasteur - Unité "Expression génétique et Maladies", Département de Biologie du Développement; 2005). Disponible à: <http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/14.html>; page consultée le 01 mai 2014.
36. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 32 Suppl 1, S7-15 (2005).
37. Johnson, K.M., Kines, R.C., Roberts, J.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T. & Day, P.M. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *Journal of virology* 83, 2067-2074 (2009).
38. Horvath, C.A., Boulet, G.A., Renoux, V.M., Delvenne, P.O. & Bogers, J.P. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal* 7, 11 (2010).
39. Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K. & Garcea, R.L. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of virology* 72, 2160-2167 (1998).
40. You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K. & Howley, P.M. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117, 349-360 (2004).
41. Desaintes, C. & Demeret, C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Seminars in cancer biology* 7, 339-347 (1996).
42. Sedman, J. & Stenlund, A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *Journal of virology* 72, 6893-6897 (1998).

43. Crum, C.P., Nuovo, G., Friedman, D. & Silverstein, S.J. Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *Journal of virology* 62, 84-90 (1988).
44. McLaughlin-Drubin, M.E. & Munger, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384, 335-344 (2009).
45. Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., Nakahara, T., El-Sherif, A., Morris, L., Seth, R., Hibma, M., Jenkins, D., Lambert, P., Coleman, N. & Doorbar, J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of virology* 77, 10186-10201 (2003).
46. Genther, S.M., Sterling, S., Duensing, S., Munger, K., Sattler, C. & Lambert, P.F. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *Journal of virology* 77, 2832-2842 (2003).
47. Ozbun, M.A. & Meyers, C. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* 248, 218-230 (1998).
48. Florin, L., Sapp, C., Streeck, R.E. & Sapp, M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *Journal of virology* 76, 10009-10014 (2002).
49. Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R. & Schiller, J.T. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *Journal of virology* 72, 142-150 (1998).
50. Swindle, C.S., Zou, N., Van Tine, B.A., Shaw, G.M., Engler, J.A. & Chow, L.T. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *Journal of virology* 73, 1001-1009 (1999).
51. Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. & Beard, P. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *Journal of molecular biology* 283, 529-536 (1998).
52. Zhou, J., Stenzel, D.J., Sun, X.Y. & Frazer, I.H. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *The Journal of general virology* 74 (Pt 4), 763-768 (1993).
53. Money, D.M. & Provencher, D. Épidémiologie et histoire naturelle de l'infection au VPH. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* Vol 29(8), S7, Chapitre 1 (2007).
54. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science* 110, 525-541 (2006).

55. Campo, M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus research* 89, 249-261 (2002).
56. Steenbergen, R.D., de Wilde, J., Wilting, S.M., Brink, A.A., Snijders, P.J. & Meijer, C.J. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 32 Suppl 1, S25-33 (2005).
57. Peto, J., Gilham, C., Fletcher, O. & Matthews, F.E. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 364, 249-256 (2004).
58. von Knebel Doeberitz, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European journal of cancer* 38, 2229-2242 (2002).
59. Liu, S., Semenciw, R. & Mao, Y. Cervical cancer: the increasing incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women. *CMAJ : Canadian Medical Association journal*, 1151-1152 (2001).
60. Croner, R.S., Schellerer, V., Demund, H., Schildberg, C., Papadopulos, T., Naschberger, E., Sturzl, M., Matzel, K.E., Hohenberger, W. & Schlabrakowski, A. One step nucleic acid amplification (OSNA) - a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *Journal of translational medicine* 8, 83 (2010).
61. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 2893-2917 (2010).
62. Forouzanfar, M.H., Foreman, K.J., Delossantos, A.M., Lozano, R., Lopez, A.D., Murray, C.J. & Naghavi, M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 378, 1461-1484 (2011).
63. Santé Canada Dépistage du cancer du col de l'utérus 2005). Disponible à; page consultée le page consultée en septembre 2013
64. Dalstein, V., Riethmuller, D., Pretet, J.L., Le Bail Carval, K., Sautiere, J.L., Carbillet, J.P., Kantelip, B., Schaal, J.P. & Mouglin, C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 106, 396-403 (2003).
65. Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. & de Villiers, E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79 (2010).

66. Schiller, J.T. & Lowy, D.R. Virus infection and human cancer: an overview. Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer 193, 1-10 (2014).
67. zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 92, 690-698 (2000).
68. Ferenczy, A. & Franco, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. The lancet oncology 3, 11-16 (2002).
69. Ostor, A.G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists 12, 186-192 (1993).
70. Oh, J.M., Kim, S.H., Lee, Y.I., Seo, M., Kim, S.Y., Song, Y.S., Kim, W.H. & Juhn, Y.S. Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. Carcinogenesis 30, 141-149 (2009).
71. Zhang, B., Srirangam, A., Potter, D.A. & Roman, A. HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. Oncogene 24, 2585-2588 (2005).
72. Kim, M.K., Kim, H.S., Kim, S.H., Oh, J.M., Han, J.Y., Lim, J.M., Juhn, Y.S. & Song, Y.S. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. Biochemical pharmacology 80, 1930-1935 (2010).
73. Straight, S.W., Hinkle, P.M., Jewers, R.J. & McCance, D.J. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. Journal of virology 67, 4521-4532 (1993).
74. Mahata, S., Bharti, A.C., Shukla, S., Tyagi, A., Husain, S.A. & Das, B.C. Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. Molecular cancer 10, 39 (2011).
75. Ashrafi, G.H., Brown, D.R., Fife, K.H. & Campo, M.S. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. Virus research 120, 208-211 (2006).
76. Desaintes, C., Hallez, S., Van Alphen, P. & Burny, A. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. Journal of virology 66, 325-333 (1992).

77. Trottier, A.M., Provencher, D., Mes-Masson, A.M., Vauclair, R. & Coutlee, F. Absence of human papillomavirus sequences in ovarian pathologies. *Journal of clinical microbiology* 33, 1011-1013 (1995).
78. Ko, L.J. & Prives, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes & development* 10, 1054-1072 (1996).
79. Longworth, M.S. & Laimins, L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68, 362-372 (2004).
80. Donehower, L.A. & Bradley, A. The tumor suppressor p53. *Biochimica et biophysica acta* 1155, 181-205 (1993).
81. Huijbregtse, J.M., Scheffner, M. & Howley, P.M. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Molecular and cellular biology* 13, 775-784 (1993).
82. Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U. & O'Connor, M.J. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *Journal of virology* 73, 6209-6219 (1999).
83. Wang, Y.W., Chang, H.S., Lin, C.H. & Yu, W.C. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 402-412 (2007).
84. Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J.C. & Schlegel, R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Journal of virology* 75, 4467-4472 (2001).
85. Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M. & Banks, L. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 23, 8033-8039 (2004).
86. Barbosa, M.S. & Schlegel, R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene* 4, 1529-1532 (1989).
87. Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L. & Storey, A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes & development* 14, 3065-3073 (2000).
88. Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J. & Livingston, D.M. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-497 (1993).

89. Heck, D.V., Yee, C.L., Howley, P.M. & Munger, K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4442-4446 (1992).
90. May, P.a.M.E. Protéine p53 : de l'interaction avec les protéines virales à la pathogénie des cancers humains. (1998).
91. D'Anna, R., Le Buanec, H., Bizzini, B., Burny, A., Giannouli, C., Zagury, J.F., Gallo, R.C., Zagury, D. & D'Alessio, P. Human papillomavirus-16-E7 oncoprotein enhances the expression of adhesion molecules in cervical endothelial cells but not in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of human virology* 4, 85-95 (2001).
92. Rey, O., Lee, S. & Park, N.H. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein represses transcription of human fibronectin. *Journal of virology* 74, 4912-4918 (2000).
93. Georgopoulos, N.T., Proffitt, J.L. & Blair, G.E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* 19, 4930-4935 (2000).
94. Duensing, S., Duensing, A., Crum, C.P. & Munger, K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer research* 61, 2356-2360 (2001).
95. Alain, S., Hantz, S. & Denis, F. Papillomavirus : les virus et la physiopathologie de l'infection. *mtPédiatrie* 13 (2010).
96. Bernard, P. Cancers invasifs du col utérin (Grenoble, 2002). Disponible à : <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/gyneco/gyneco/147c/lecon147c.htm>; page consultée le septembre 2013
97. Duport, N. (Institut de veille sanitaire, France; 2008).
98. Hoerni, Y.B.e.B. Cancérologie et Hématologie. (Paris; 2001).
99. Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* 3, 453-458 (2003).
100. Horn, L.C., Hentschel, B., Fischer, U., Peter, D. & Bilek, K. Detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients with carcinoma of the cervix uteri using step sectioning: Frequency, topographic distribution and prognostic impact. *Gynecologic oncology* 111, 276-281 (2008).
101. Nonnenmacher, M., Salmon, J., Jacob, Y., Orth, G. & Breitburd, F. Cottontail rabbit papillomavirus E8 protein is essential for wart formation and provides new insights into viral pathogenesis. *Journal of virology* 80, 4890-4900 (2006).

102. Rouquille, N. Papillomavirus et cancers associés: Données actualisées sur le dépistage, les recommandations et la prophylaxie vaccinale. (Université Joseph Fourier, Faculté de pharmacie de Grenoble, Grenoble, France; 2009).
103. Aubin, F., Prêtet, J.L. & Mouglin, C. Papillomavirus humains – Biologie et pathologie tumorale. (France; 2003).
104. Blanc, B. Le dépistage du cancer du col de l'utérus. (2005).
105. Leveque, J., Classe, J.M., Marret, H. & Audrain, O. [Contribution of viral typing in cytological anomalies of the cervix]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction* 34, 427-439 (2005).
106. Fyles, A.W., Pintilie, M., Kirkbride, P., Levin, W., Manchul, L.A. & Rawlings, G.A. Prognostic factors in patients with cervix cancer treated by radiation therapy: results of a multiple regression analysis. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 35, 107-117 (1995).
107. Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer, Fervers, B., Resbeut, M. & Société française d'oncologie gynécologique Cancers invasifs du col utérin: stades non métastatiques. (J. Libbey Eurotext, Montrouge; 1999).
108. Stehman, F.B., Bundy, B.N., DiSaia, P.J., Keys, H.M., Larson, J.E. & Fowler, W.C. Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy. I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 67, 2776-2785 (1991).
109. Morice, P., Castaigne, D., Pautier, P., Rey, A., Haie-Meder, C., Leblanc, M. & Duvillard, P. Interest of pelvic and paraaortic lymphadenectomy in patients with stage IB and II cervical carcinoma. *Gynecologic oncology* 73, 106-110 (1999).
110. Kamura, T., Shigematsu, T., Kaku, T., Shimamoto, T., Saito, T., Sakai, K., Mitsumoto, M. & Nakano, H. Histopathological factors influencing pelvic lymph node metastases in two or more sites in patients with cervical carcinoma undergoing radical hysterectomy. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 78, 452-457 (1999).
111. Subak, L.L., Hricak, H., Powell, C.B., Azizi, L. & Stern, J.L. Cervical carcinoma: computed tomography and magnetic resonance imaging for preoperative staging. *Obstetrics and gynecology* 86, 43-50 (1995).
112. Lin, W.C., Hung, Y.C., Yeh, L.S., Kao, C.H., Yen, R.F. & Shen, Y.Y. Usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography to detect para-aortic lymph nodal metastasis in advanced cervical cancer with negative computed tomography findings. *Gynecologic oncology* 89, 73-76 (2003).
113. Weiss, L. Metastatic inefficiency. *Advances in cancer research* 54, 159-211 (1990).

114. Ghossein, R.A. & Bhattacharya, S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *European journal of cancer* 36, 1681-1694 (2000).
115. Seiden, M. & Sklar, J.L. PCR- and RT-PCR-based methods of tumor detection: potential applications and clinical implications. *Important advances in oncology*, 191-204 (1996).
116. Saintigny, P., Coulon, S., Kambouchner, M., Ricci, S., Martinot, E., Danel, C., Breau, J.L. & Bernaudin, J.F. Real-time RT-PCR detection of CK19, CK7 and MUC1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 115, 777-782 (2005).
117. Scheungraber, C., Muller, B., Kohler, C., Possover, M., Leistriz, S., Schneider, A. & Durst, M. Detection of disseminated tumor cells in patients with cervical cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 128, 329-335 (2002).
118. Yuan, C.C., Wang, P.H., Ng, H.T., Li, Y.F., Huang, T.S., Chen, C.Y., Tsai, L.C. & Shyong, W.Y. Detecting cytokeratin 19 mRNA in the peripheral blood cells of cervical cancer patients and its clinical-pathological correlation. *Gynecologic oncology* 85, 148-153 (2002).
119. Tamaki, Y., Akiyama, F., Iwase, T., Kaneko, T., Tsuda, H., Sato, K., Ueda, S., Mano, M., Masuda, N., Takeda, M., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Inaji, H., Nakajima, H., Komoike, Y., Kataoka, T.R., Nakamura, S., Suzuki, K., Tsugawa, K., Wakasa, K., Okino, T., Kato, Y., Noguchi, S. & Matsuura, N. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 2879-2884 (2009).
120. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* 28, E63 (2000).
121. Bats, A.S., Bouteille, C., Charron-Barra, C., Clough, K.B., Crouet, H., Le Frère-Belda, M.A., Houvenaeghel, G., Khaddage, A., Leroux, A., Lucas, N., Nos, C., Penault-Llorca, F. & Lecuru, F. (HEGP, Paris-France; 2008).
122. CHU Saint-Étienne Une petite révolution dans la détection des métastases ganglionnaires du carcinome mammaire (France, CHU Saint-Étienne; 2010). Disponible à: http://www.chu-st-etienne.fr/ProfessionnelSante/newsletter/newsletter1_5.asp; page consultée le Août 2013
123. Le Frere-Belda, M.A., Bats, A.S., Gillaizeau, F., Poulet, B., Clough, K.B., Nos, C., Peoc'h, M., Seffert, P., Bouteille, C., Leroux, A., Guillemin, F., Blanc-Fournier, C.,

- Crouet, H., Arnould, L., Cuisenier, J., Penault-Llorca, F., Gimbergues, P., Jacquemier, J., Houvenaeghel, G., Chatellier, G. & Lecuru, F. Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intraoperative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 130, 2377-2386 (2012).
124. Yamamoto, N., Daito, M., Hiyama, K., Ding, J., Nakabayashi, K., Otomo, Y., Tsujimoto, M., Matsuura, N. & Kato, Y. An optimal mRNA marker for OSNA (One-step nucleic acid amplification) based lymph node metastasis detection in colorectal cancer patients. *Japanese journal of clinical oncology* 43, 264-270 (2013).
 125. Corey, E. & Corey, M.J. Detection of disseminated prostate cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): technical and clinical aspects. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 77, 655-673 (1998).
 126. Mellado, B., Gutierrez, L., Castel, T., Colomer, D., Fontanillas, M., Castro, J. & Estape, J. Prognostic significance of the detection of circulating malignant cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in long-term clinically disease-free melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 5, 1843-1848 (1999).
 127. Gudrun, S., . & Olivier, D. Détection des micrométastases et des cellules tumorales circulantes par les techniques de biologie moléculaire dans les tumeurs solides. *Pathologie moléculaire des cancers* 88 (2001).
 128. Sun, Y., Lin, J., Katz, A.E. & Fisher, P.B. Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. *Cancer research* 57, 18-23 (1997).
 129. Henke, W., Jung, M., Jung, K., Lein, M., Schlechte, H., Berndt, C., Rudolph, B., Schnorr, D. & Loening, S.A. Increased analytical sensitivity of RT-PCR of PSA mRNA decreases diagnostic specificity of detection of prostatic cells in blood. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 70, 52-56 (1997).
 130. Wang, X., Heller, R., VanVoorhis, N., Cruse, C.W., Glass, F., Fenske, N., Berman, C., Leo-Messina, J., Rappaport, D., Wells, K. & et al. Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Annals of surgery* 220, 768-774 (1994).
 131. Kunter, U., Buer, J., Probst, M., Duensing, S., Dallmann, I., Grosse, J., Kirchner, H., Schluepen, E.M., Volkenandt, M., Ganser, A. & Atzpodien, J. Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma. *Journal of the National Cancer Institute* 88, 590-594 (1996).
 132. Glaser, R., Rass, K., Seiter, S., Hauschild, A., Christophers, E. & Tilgen, W. Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two-center study.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 15, 2818-2825 (1997).

133. Miyajima, Y., Kato, K., Numata, S., Kudo, K. & Horibe, K. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA. *Cancer* 75, 2757-2761 (1995).
134. Lode, H.N., Handgretinger, R., Schuermann, U., Seitz, G., Klingebiel, T., Niethammer, D. & Beck, J. Detection of neuroblastoma cells in CD34+ selected peripheral stem cells using a combination of tyrosine hydroxylase nested RT-PCR and anti-ganglioside GD2 immunocytochemistry. *European journal of cancer* 33, 2024-2030 (1997).
135. Matsuda, J., Kitagawa, Y., Fujii, H., Mukai, M., Dan, K., Kubota, T., Watanabe, M., Ozawa, S., Otani, Y., Hasegawa, H., Shimizu, Y., Kumai, K., Kubo, A. & Kitajima, M. Significance of metastasis detected by molecular techniques in sentinel nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Annals of surgical oncology* 11, 250S-254S (2004).
136. Wang, H.Y., Sun, J.M., Lu, H.F., Shi, D.R., Ou, Z.L., Ren, Y.L. & Fu, S.Q. Micrometastases detected by cytokeratin 19 expression in sentinel lymph nodes of patients with early-stage cervical cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 16, 643-648 (2006).
137. Baay, M.F., Koudstaal, J., Hollema, H., Duk, J.M., Burger, M.P., Quint, W.G., Stolz, E. & Herbrink, P. Detection of HPV-16 DNA by PCR in histologically cancer free lymph nodes from patients with cervical cancer. *Journal of clinical pathology* 50, 960-961 (1997).
138. Poka, R. & Czegledy, J. HPV- and node status in cervical cancer long-term results. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 71, 169-172 (1997).
139. Coutant, C., Barranger, E., Cortez, A., Dabit, D., Uzan, S., Bernaudin, J.F. & Darai, E. Frequency and prognostic significance of HPV DNA in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18, 1513-1517 (2007).
140. Burd, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16, 1-17 (2003).
141. Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J. & International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 348, 518-527 (2003).

142. Pretet, J.L., Jacquard, A.C., Carcopino, X., Charlot, J.F., Bouhour, D., Kantelip, B., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mouglin, C., Riethmuller, D. & group, E.s. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 122, 428-432 (2008).
143. Lentz, S.E., Muderspach, L.I., Felix, J.C., Ye, W., Groshen, S. & Amezcua, C.A. Identification of micrometastases in histologically negative lymph nodes of early-stage cervical cancer patients. *Obstetrics and gynecology* 103, 1204-1210 (2004).
144. Nagai, Y., Maehama, T., Asato, T. & Kanazawa, K. Detection of human papillomavirus DNA in primary and metastatic lesions of carcinoma of the cervix in women from Okinawa, Japan. *American journal of clinical oncology* 24, 160-166 (2001).
145. Duensing, S. & Munger, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 109, 157-162 (2004).
146. Tinga, D.J., Timmer, P.R., Bouma, J. & Aalders, J.G. Prognostic significance of single versus multiple lymph node metastases in cervical carcinoma stage IB. *Gynecologic oncology* 39, 175-180 (1990).
147. Rahbari, R., Sheahan, T., Modes, V., Collier, P., Macfarlane, C. & Badge, R.M. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *BioTechniques* 46, 277-284 (2009).
148. Rodier, F., Coppe, J.P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A., Munoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R. & Campisi, J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* 11, 973-979 (2009).
149. Follen, M., Levenback, C.F., Iyer, R.B., Grigsby, P.W., Boss, E.A., Delpassand, E.S., Fornage, B.D. & Fishman, E.K. Imaging in cervical cancer. *Cancer* 98, 2028-2038 (2003).
150. Mikhitarian, K., Martin, R.H., Mitas, M., Mauldin, P.D., Palesch, Y., Metcalf, J.S., Cole, D.J., Gillanders, W.E. & Mims Study, G. Molecular analysis improves sensitivity of breast sentinel lymph node biopsy: results of a multi-institutional prospective cohort study. *Surgery* 138, 474-481 (2005).
151. Braun, S., Schindlbeck, C., Hepp, F., Janni, W., Kentenich, C., Riethmuller, G. & Pantel, K. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 368-375 (2001).

152. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108 (2005).
153. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. & Muñoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189, 12-19 (1999).
154. Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M. & Group, I.A.f.R.o.C.M.C.C.S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 348, 518-527 (2003).
155. Muñoz, N., Bosch, F.X., Castellsagué, X., Díaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K.V. & Meijer, C.J.L.M. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International journal of cancer Journal international du cancer* 111, 278-285 (2004).
156. Münger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M. & Schlegel, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of virology* 63, 4417-4421 (1989).
157. Duensing, S. & Münger, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research* 62, 7075-7082 (2002).
158. Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. & Howley, P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505 (1993).
159. Gloyeske, N.C., Goreal, W., O'Neil, M., Connor, C., Tawfik, O.W. & Fan, F. Outcomes of breast cancer patients with micrometastases and isolated tumor cells in sentinel lymph nodes. *In Vivo* 25, 997-1001 (2011).
160. Balic, M., Williams, A., Dandachi, N. & Cote, R.J. Micrometastasis: detection methods and clinical importance. *Cancer Biomark* 9, 397-419 (2011).
161. Giuliano, A.E., Dale, P.S., Turner, R.R., Morton, D.L., Evans, S.W. & Krasne, D.L. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Annals of surgery* 222, 394-399; discussion 399-401 (1995).
162. Diaz, J.P., Gemignani, M.L., Pandit-Taskar, N., Park, K.J., Murray, M.P., Chi, D.S., Sonoda, Y., Barakat, R.R. & Abu-Rustum, N.R. Sentinel lymph node biopsy in the management of early-stage cervical carcinoma. *Gynecologic oncology* 120, 347-352 (2011).

163. Bats, A.S., Buenerd, A., Querleu, D., Leblanc, E., Darai, E., Morice, P., Marret, H., Gillaizeau, F., Mathevet, P. & Lecuru, F. Diagnostic value of intraoperative examination of sentinel lymph node in early cervical cancer: a prospective, multicenter study. *Gynecologic oncology* 123, 230-235 (2011).
164. Schoenfeld, A., Luqmani, Y., Sinnott, H.D., Shousha, S. & Coombes, R.C. Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastases in lymph nodes in breast cancer patients. *British journal of cancer* 74, 1639-1642 (1996).
165. Liefers, G.J., Cleton-Jansen, A.M., van de Velde, C.J., Hermans, J., van Krieken, J.H., Cornelisse, C.J. & Tollenaar, R.A. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 339, 223-228 (1998).
166. Cserni, G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *Journal of clinical pathology* (2011).
167. Samouelian, V., Revillion, F., Alloy, N., Lhotellier, V., Leblanc, E. & Peyrat, J.P. Measurement of mRNA of 11 biomarkers by RT-PCR to detect lymph node involvement in cervical cancer. *The International journal of biological markers* 23, 74-82 (2008).
168. Pawlowski, V., Revillion, F., Hebbar, M., Hornez, L. & Peyrat, J.P. Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 4217-4225 (2000).
169. Nagai, Y., Maehama, T., Asato, T. & Kanazawa, K. Detection of human papillomavirus DNA in primary and metastatic lesions of carcinoma of the cervix in women from Okinawa, Japan. *Am J Clin Oncol* 24, 160-166 (2001).
170. Skrzydlewska, E., Sulkowska, M., Koda, M. & Sulkowski, S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 11, 1251-1266 (2005).
171. Moll, R., Levy, R., Czernobilsky, B., Hohlweg-Majert, P., Dallenbach-Hellweg, G. & Franke, W.W. Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract. *Lab Invest* 49, 599-610 (1983).
172. Rose, M.C. Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases. *Am J Physiol* 263, L413-429 (1992).
173. Lee, C.M., Shrieve, D.C., Zempolich, K.A., Lee, R.J., Hammond, E., Handrahan, D.L. & Gaffney, D.K. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecologic oncology* 99, 415-421 (2005).

174. Fuchs, I., Vorsteher, N., Buhler, H., Evers, K., Sehouli, J., Schaller, G. & Kummel, S. The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma. *Anticancer Res* 27, 959-963 (2007).
175. Feng, S.M., Sartor, C.I., Hunter, D., Zhou, H., Yang, X., Caskey, L.S., Dy, R., Muraoka-Cook, R.S. & Earp, H.S., 3rd The HER4 cytoplasmic domain, but not its C terminus, inhibits mammary cell proliferation. *Mol Endocrinol* 21, 1861-1876 (2007).
176. Sartor, C.I., Zhou, H., Kozłowska, E., Guttridge, K., Kawata, E., Caskey, L., Harrelson, J., Hynes, N., Ethier, S., Calvo, B. & Earp, H.S., 3rd Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. *Molecular and cellular biology* 21, 4265-4275 (2001).
177. Naresh, A., Long, W., Vidal, G.A., Wimley, W.C., Marrero, L., Sartor, C.I., Tovey, S., Cooke, T.G., Bartlett, J.M. & Jones, F.E. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer research* 66, 6412-6420 (2006).
178. Lee, C.M., Lee, R.J., Hammond, E., Tsodikov, A., Dodson, M., Zempolich, K. & Gaffney, D.K. Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecologic oncology* 93, 209-214 (2004).
179. Kobayashi, H., Fujishiro, S. & Terao, T. Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer research* 54, 6539-6548 (1994).
180. Van Trappen, P.O., Ryan, A., Carroll, M., Lecoeur, C., Goff, L., Gyselman, V.G., Young, B.D., Lowe, D.G., Pepper, M.S., Shepherd, J.H. & Jacobs, I.J. A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer. *British journal of cancer* 87, 537-544 (2002).

Annexe A

Manuscrit en préparation

Molecular detection of nodal involvement in uterine cervical cancer

V Samouëlian^{1,2,3,4*}, F Revillon³, E Leblanc⁴, M-C Baranzelli⁵, V Lhotellier³, D Querleu⁶, N Mechtouf¹, G Cardin¹, JP Peyrat^{3#*} and F Rodier^{1,7#*}

¹ CRCHUM et Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Université de Montréal, Département d'Obstétrique Gynécologie, Montreal, QC, Canada

³ Department of human molecular oncology - Centre Oscar Lambret, France

⁴ Department of surgery - Centre Oscar Lambret, France

⁵ Department of Anatomopathology - Centre Oscar Lambret, France.

⁶ Department of Surgery - Institut Claudius Regaud, Toulouse, France.

⁷ Université de Montréal, Département de Radiologie, Radio-Oncologie et Médecine Nucléaire, Montreal, QC, Canada

These authors contributed equally

ABSTRACT

Uterine cervical cancer [2] is the second most common cancer among women and metastatic nodal involvement plays a major prognostic role in this disease. Despite the critical importance of nodal involvement, the impact of small micrometastasis or isolated tumor cells (ITC) on disease progression remains uncertain. Molecular biology using reverse-transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) efficiently diagnose nodal involvement in other malignancies, but in UCC, RT-qPCR detection of lymph node metastasis lacks specificity. To facilitate and improve the detection of UCC metastases, we tested several biomarkers using Taqman RT-qPCR; some being characteristic of epithelial cells (CK19, MUC1, HER 1-4), UCC tumor (HPV16/18-E6/E7), or implicated in tumor invasion (VEGF, VEGF-C, uPA, and MMP9). In fresh normal and UCC tissues, including histologically positive and negative lymph nodes, three biomarkers were significantly increased in histologically positive nodes with respective sensitivity and specificity of 82% and 99% for CK19, 76% and 94% for HPV16-E6, or 76% and 68% for MUC1. Each individual biomarker failed to detect 1.7% to 2.2% of the histologically positive nodes, but combining CK19 and HPV16-E6 allowed a sensitivity of 100% and a specificity of 94%. Additionally, using a cell culture model and the UCC-specific expression biomarkers HPV16-E6 or HPV16-E7, we easily detected a proportion of 0.04% HPV16 positive UCC cells within an otherwise HPV16 negative cell population (robust 1:2500 cell sensitivity). Thus, our results suggest that the combined use of the biomarkers CK19 and HPV-E6 could underlie a RT-qPCR strategy for the detection of nodal involvement in fresh UCC tissues, and that the biomarkers HPV-E6/E7 could similarly be used for prospective or retrospective studies on paraffin embedded samples to efficiently detect small nodal involvements like micrometastases or ITCs.

Key words: diagnostic of lymph node metastasis, cervix cancer, uterine cervical carcinoma, pretherapeutic evaluation, intraoperative PCR, viral oncogenes

INTRODUCTION

Uterine cervical cancer [2] is the second most common cancer among women in the world [152]. It is induced by Human papillomaviruses (HPV) infections and among more than 120 characterized HPV subtypes, at least 15 high risk HPVs are responsible for malignant progression [140 , 153 , 154]. The majority of cervical carcinomas are associated with HPV subtypes 16 and 18, which account for approximately 70% of UCCs worldwide [155]. The oncogenic potential of HPV lies in the oncoproteins E6 and E7 [156]. These proteins bind to and modulate a number of different gene products, in particular, the tumor suppressors p53 and pRb, inducing genomic instability and an increased risk of malignant transformation in host cells [157] [158].

Lymph node metastases (≥ 2 mm) are a major prognostic factor in cervical carcinomas. Multiple recent studies suggest that micrometastasis (0.2 mm to 2 mm) are also an important risk factor of tumor recurrence in early cervical carcinoma [11 , 12 , 13]. Whether the presence of even smaller groups (< 0.2 mm) of isolated tumor cells (ITC) is a risk factor remain controversial [11 , 159 , 160]. Hence, reliable assessment of lymph nodes metastasis and micrometastasis including ITCs becomes essential. The “gold standard” for nodal evaluation remains histological examination of 4-6 permanent sections assisted by immunohistochemistry [161 , 162]. However, in order to detect any micrometastatic involvement in a 1.5 cm lymph node, histological assessment would demand 75 sections. Time-consuming and expensive, this methodology is not applicable for the assessment of each node in every day clinical practice. Therefore, a growing interest rose for new methods to evaluate nodal involvement [8 , 12 , 163]. Several studies have shown that molecular biology using reverse-transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) is very efficient for the diagnosis of lymph node metastasis in other malignancies [164 , 165 , 166]. In cervical cancer, RT-qPCR is very sensitive to detect tumor cells in lymph nodes but not specific enough [8 , 9 , 10] .

In an attempt to improve the molecular detection of nodal involvement, we further tested several biomarkers characteristic of the epithelial cells such as cytokeratin 19 (CK19), Mucin 1 (MUC1), and Human Epidermal growth factor Receptors (HER 1-4) [167]. Since cervical carcinomas are mainly induced by Human papillomavirus (HPV) oncogenes E6 and E7, we also studied the expression of HVP-E6/E7 as specific markers of the cervical uterine tumor cells. In addition, we used biomarkers involved in angiogenesis (Vascular endothelial

growth factor / VEGF, Vascular endothelial growth factor C VEGF-C) and in tumor invasion (Urokinase-type Plasminogen Activator / uPA, Matrix Metalloproteinase 9 / MMP9).

MATERIAL AND METHODS

Patients: Cervical tumor and lymph node samples were collected from 21 patients with cervical carcinoma (stages IB2-IVA) at the Centre Oscar Lambret (Lille). Patients with locally advanced cervical cancer, no enlarged aortic nodes on magnetic resonance imaging (MRI), systematically undergo a surgical pre therapeutic nodal assessment. The surgical staging in this group of patients includes a diagnostic transperitoneal laparoscopic abdominopelvic exploration to preclude patients with obvious peritoneal carcinomatosis and/or fixed pelvic or paraaortic lymph nodes. If negative, a retroperitoneal laparoscopic infrarenal paraaortic lymph node dissection is performed as described [2]. A biopsy of the cervical tumor was performed at the time of surgery. The tumor biopsies were cut in half for histological evaluation and molecular assessment. The lymph nodes greater than 0.5mm were cut in half. One half was analyzed using conventional histological examination. The second half was snap frozen and stored in liquid nitrogen until RNA extraction. The lymph nodes smaller than 0.5mm were examined in anatomopathology only (thus not included in this study). Among the 179 lymph nodes assessed by histology and RT-qPCR, 17 were histologically positive. Normal cervical tissue was collected from patients with normal Pap tests who had a vaginal hysterectomy for benign uterine pathology.

The median age of the 21 surgically staged patients was 43 years (26 to 56 years). All the patients had a primary uterine cervical carcinoma. Nine were stage IB2, 9 were IIB and 3 were IIIA. Eight-ten women had histologically confirmed cervical uterine squamous cell carcinomas (SCC), two had adenocarcinomas and one had an adenosquamous carcinoma. The average number of paraaortic nodes was 31 per patient (range: 17 - 43). Six patients had histologically confirmed paraaortic nodal involvement. The 6 patients had at least one macrometastases (≥ 2 mm) and four of them had macro and micrometastases (≥ 0.2 mm and < 2 mm).

The median follow-up was 36 months (27 to 40 months). Seven patients developed a recurrence after a median of 12 months (3 to 35 months). Three of these patients had positive paraaortic lymph nodes. Recurrence was locoregional in 5 cases. One patient had locoregional and distant recurrence.

Histological examination: Histological examination of the tumor biopsies was done using the standard hematoxylin/eosin (H&E) stain. Lymph nodes were cut in 2 to 3 mm slices and then

fixed in formaldehyde and embedded in paraffin blocks. Three 5 µm thick sections were collected at three levels 300 µm apart. Lymph nodes were examined on one slide with standard H&E stain. Immunohistochemistry (IHC) was performed using anti-keratin antibodies AE1/AE on request of the pathologist. Our positive control for IHC was an epithelial tissue, included in each run of AE1/AE3 staining. Some histologically negative lymph nodes detected as positive by RT-qPCR were also reexamined using IHC.

RNA extraction: The tumor and lymph node samples were frozen and stored in liquid nitrogen until RNA extraction. The total RNA was isolated using the MagNa Pure Compact system (Roche Applied Science) with RNA Isolation from human tissue Kit (Roche Applied Science). The disruption and the homogenization of the tissue samples were performed using a Rotor-Stator Homogenizer (Ribolyzer, Hybaid). The purity of the RNA was checked by the ratio between the absorbance values at 260 nm and 280 nm and ranged between 1.49 and 2.09 demonstrating high quality. This was confirmed by the presence of the 18S and 28S ribosomal bands by electrophoresis on 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. Total RNA from CASKI and HELA cells was isolated using TRIzol® (Invitrogen) following the manufacturers instructions and RNA quality was assessed as above.

RT-qPCR: We studied the expression of CK19, HPV16-E6, MUC1, uPA, HER1 (EGFR), HER2, HER3, HER4, MMP9, VEGF and VEGF-C in normal uterine tissues, cervical uterine tumors and in paraaortic lymph nodes using a TaqMan RT-qPCR quantification method. We used the housekeeping gene TBP (Tata Box Binding Protein) as reference gene [168]. Additionally, ribosomal 18s (r18s) and HPV16-E7 were studied in samples from UCC cell lines (HELA and CASKI). A negative and a positive control were included in each experiment. We used cell lines known to express each gene as positive controls. The non-template controls and the samples were assayed in duplicate. The expression level of each gene was analyzed on the mean of its duplicate.

Cell lines: The cell lines were purchased from the American Type Culture Collection. MCF7, T47D and MDA-MB-231 cells were cultured in MEM, HELA in DMEM and CASKI in RPMI. All culture media were supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and collected at sub-confluence.

PCR Primers and TaqMan Fluorogenic Probe: The sequences of the primers and the TaqMan fluorogenic probes are presented in table 1. In order to confirm the total gene specificity of the sequences chosen for the primers and probes, we performed BLASTn searches against dbEST and nr (the non redundant set of GenBank, EMBL, and DDBJ database sequences). Primers and probes were purchased from Applied Biosystems (Courtabœuf, France) or Proligo (Saint Quentin Fallavier, France).

RT-qPCR conditions. The reverse transcription and the PCR were performed in a one-step methodology on 50 ng of total RNA using a 7700 ABI PRISM sequence detector system (Applied Biosystems). The reaction mixture (20 µl final volume) contained 2X Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgique) including HotGold Star DNA polymerase, dNTP and MgCl₂, 5units RNase inhibitor, 2 units Euroscript Reverse transcriptase, primers and probe (Proligo, France) at the concentration indicated in table 2. Reverse transcription was performed at 48°C for 30 min. The activation 10 min at 95°C, of the DNA polymerase, was followed by PCR (15 sec at 95°C and 1 min at 60°C for 40 cycles for TBP and each target gene but CK19: 15 sec at 95°C and 1 min at 62°C for 40 cycles).

Relative quantification of target gene expression. The relative quantification of the target gene expression was performed using the comparative cycle threshold (C_T) method where the C_T parameter is defined as the cycle number at which the fluorescent signal generated by cleavage of the dual labeled probe is first detectable. This method is based upon the use of a calibrator sample (i.e. 1x sample) that permits the quantification in the unknown samples. We used pooled uterine cervix cancer tumors as calibrator (i.e. target expression = 1). The relative target expression was given by the formula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ patient sample} - \Delta C_T \text{ calibrator sample}$; with $\Delta C_T = C_{T \text{ TARGET}} - C_{T \text{ TBP}}$.

Statistical analyses: Correlations between the biomarkers were assessed according to the Spearman test. All the statistical analyses were done using the SPSS software (Version 13.0.1). Nonparametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare expressions of the target genes in tumors and lymph nodes.

RESULTS

Expression levels in cervical normal tissues, cervical tumors and lymph nodes

We first studied the expression levels of the 11 biomarkers in normal uterine cervical tissues and in cervical carcinomas. Four biomarkers had significantly higher expression levels in uterine tumors when compared to normal cervical tissues: HPV16-E6 ($p < 0.001$), CK19, uPA and MMP9 ($p < 0.05$) (Figure 1). HPV16-E6 was not expressed in cervical normal tissues, in 6 of the tested tumors and in their matched lymph nodes (Table 3). Among the 6 tumors that did not express HPV16-E6, two were adenocarcinomas and 4 were SCC. We then analyzed the expression of the biomarkers in 179 lymph nodes. We observed a very significantly higher expression of CK19, HPV16-E6 and MUC1 in the histologically positive nodes than in the negative nodes ($p < 0.001$) (Figure 2). HER4 was neither expressed in the uterine cervical tissues nor in the lymph nodes.

Correlations between biomarkers expressions

The expression levels of several biomarkers were correlated in the cervical tumors and in the histologically positive nodes (HPN). Several positive correlations were found in both tumors and HPN: HER3 with MUC1, HER2 and uPA, HER1 with HER2, VEGF-C with MMP9 (Table 4). In tumors, we observed also a significant positive correlation between the expression levels of the HER family members HER1 and HER3 ($p < 0.001$) as well as between the invasion markers uPA and MMP9 ($p < 0.01$). Furthermore, in the histologically involved lymph nodes the epithelial cells markers, CK19 was positively correlated to the other epithelial cell markers MUC1 and HER3 (Table 4).

RT-qPCR nodal evaluation

In an attempt to determine nodal involvement by RT-qPCR, we fixed a cut off value for the expression level of each biomarker. The positive threshold of overexpression was chosen as the 75th percentile of the expression in the histologically negative nodes (HNN). RT-qPCR positive lymph nodes according to each biomarker are listed in Table 3. Considering the 11 biomarkers separately, 13 to 53 lymph nodes were positive. The sensitivity and the specificity of the markers with a significant higher expression level in the HPN than in the HNN are reported in table 5. Moreover, we observed that HPV16-E6 was never expressed in lymph nodes from patients with HPV16-E6 negative tumors.

Relations is between RT-qPCR and histological results

CK19 and HPV16-E6 detected a number of RT-qPCR positive nodes in the same range than the histological evaluation, respectively 16 and 21 (Table 3). The agreement with the

histological results was 97% for CK19, 92% for HPV16-E6 and 75% for MUC1 (table 5a). The sensitivity and the specificity for the detection of histological nodal involvement were, respectively, 82% and 99% for CK19, 76% and 94% for HPV16-E6 and 76% and 68% for MUC1. Each biomarker failed to detect 2% (1.7 to 2.2%) of the HPN (table 5a). Using CK19 and HPV16-E6 together, we observed a sensitivity of 100% and a specificity of 94%. Ten histologically non-involved nodes were detected as positive by the combined use of CK19 and HPV16-E6. Retrospective complementary histological examination confirmed the presence of a micrometastasis in one node and of tumor cells in two others nodes. Agreement between combined CK19 and HPV16-E6 RT-qPCR assessment with overall histological result (OHR) was 97% (table 5b).

UCC cells detection limits in complex samples using HPV16-E6/E7 RT-qPCR

To test the ability of RT-qPCR HPV16-E6 and HPV16-E7 biomarkers to detect small amounts of UCC cells in complex cellular samples reminiscent of tissues or lymph nodes, RNA was extracted from mixed HPV positive/negative UCC cell populations (HPV16(+)/HPV18(-) CaSki and HPV16(-)/HPV18(+) HeLa cells). The presence of HPV16 positive CaSki cells within otherwise HPV16 negative cellular samples was easily detected down to one CaSki cell in 2500 cells (Figure 3). Ribosomal RNA (rRNA) 18S was used to demonstrate that mixed cell population samples harbored similar levels of total RNA. Importantly, the slope of the diminishing HPV-E6/E7 signal (Ct) was consistent with a diminishment of 2.3 Ct per CaSki 1:5 dilutions ($2^{2.3} = 4.92$), suggesting that at least one more 1:5 dilution, down to 0.008% CaSki cells, could have been used.

DISCUSSION

The aim of our study was to evaluate RT-qPCR biomarkers for the detection of lymph node involvement in cervical cancer. We investigated the expression of 11 genes identified as biomarkers of epithelial cells (CK19, MUC1, HER family), of cervical uterine tumors cells (HPV16-E6) or involved in tumor progression (uPA, MMP9, VEGF and VEGF-C). We report their expression in normal uterine cervical tissues, in primary uterine cervical tumor and in histologically non-metastatic and metastatic paraaortic lymph nodes. We then tested the detection limits of the HPV-E6/E7 UCC biomarkers and propose an RT-qPCR strategy for the detection of nodal involvement.

HPV16-E6 was not detected in normal cervical tissues and 29% of the cervical tumors studied. HPV16-E6 is an oncogene involved in cervical cells carcinogenesis induced by HPV infection [3, 5]. Thus, it is not present in normal uterine cervical cells. Furthermore, HPV16 is the causal agent of about 50% but not all of the cervical carcinomas worldwide [4]. We can imagine that in the six tumors where HPV16-E6 was not expressed, cervical carcinoma was induced by a different high-risk HPV subtype. Moreover, it has been reported that HPV16 is more frequently related to SCC and HPV18 in adenocarcinomas [169]. This could explain the absence of HPV16-E6 expression in at least two adenocarcinomas from our series.

Comparing the normal to the tumoral uterine cervical tissues we also observed a significantly higher expression CK19, uPA and MMP9 ($p < 0.05$) in the tumors. This results was not surprising, especially for uPA and MMP9 which are both implicated in the neoplastic process [170].

Among the lymph nodes, CK19, HPV16-E6 and MUC1 had significantly higher expression in HPN when compared to HNN ($p < 0.001$). CK19 and MUC1 are biomarkers of epithelial cells [171, 172]. HPV16-E6 is characteristic of cervical tumor cells [156]. Thus, the overexpression of these biomarkers in HPN appears to be related to the presence of nodal involvement by the epithelial cervical tumor cells. Therefore, CK19, HPV16-E6 and MUC1 could be valuable candidates for nodal involvement detection in cervical carcinoma. Because we noticed that HPV16-E6 was not expressed in HPN from patients with HPV16 negative tumors, the detection of other E6/E7 from other high-risk HPV could be of interest to identify nodal involvement. Although not presented here, we have begun to validate other E6/E7 Taqman probes that are specific for other high-risk HPV subtypes using cell culture models.

Using these culture models, we also demonstrate that HPV16-E6 or HPV16-E7 can indeed be used to accurately identify HPV16 positive UCC cells in a complex sample, down to a proportion of cells that are close to 0.008% of total cells. This supports the idea that HPV-E6 or HPV-E7 could be used as RT-qPCR molecular biomarkers to assess small nodal involvements such as micrometastasis, and perhaps ITCs.

Of interest, among all the tested biomarkers, only one was not expressed in tumors or in lymph nodes: HER4. Only a few articles link HER4 to uterine cervical cancer [173 , 174]. Lee et al observed a significantly increased expression of HER4 in patient with improved disease free survival [173] and HER4 can suppress tumor cell proliferation [175 , 176]. In breast cancer, the loss of HER4 expression during carcinogenesis contributes to the ability of breast tumors to avoid apoptotic cell death [177]. Thus, HER4 loss of expression in tumors with aggressive phenotype could be one explanation of our findings. According to our data, since it was neither expressed in tumors nor in HPN, HER4 does not appear to be an appropriate marker for the diagnosis of nodal involvement.

Looking at correlation between biomarkers expression, we observed positive correlation between several markers of epithelial cells. Expression levels of MUC1 and HER3 were correlated to each other in both tumors and HPN. MUC1 was also correlated to CK19 in HPN. Thus, MUC1 and CK19 could be redundant biomarkers, if both tested in lymph nodes, of nodal involvement. Conversely, we did not observe any relation between CK19 and HPV16-E6 in HPN. The independence between these two parameters suggests that it could be of interest to detect both in HPN.

Furthermore, we observed a strong positive correlation among the HER family members in the tumors as well as in HPN. Indeed, HER2 expression was associated with HER1 and with HER3. In the tumors, HER1 and HER3 were also positively correlated to each other. The literature reports conflicting data concerning these biomarkers in cervical uterine cancer. There are only few reports of correlations. Lee et al. reported a negative correlation of HER2 and HER1 membranous staining [178] and positive correlation of HER4 expression with HER2 and HER3 expressions [173].

In our study, uPA was positively correlated with HER1 in tumors, with HER2 in HPN and with HER3 in both sites. It was also correlated to MMP9 and to VEGF-C in the tumors and in HPN respectively. uPA is known as an important actor in tumor invasion, since the

proteolytic cascade of the extracellular matrices (ECM) is triggered by the uPA mediated conversion of plasminogen in plasmin and the subsequent activation of procollagenases [170]. Our results suggest that uPA may play a key role in the invasion process in cervical cancer. This hypothesis is emphasized by literature data reporting an association between uPA elevated levels and increasing risk of lymph node metastasis as well as poorer prognosis in cervical cancer [179].

We also observed correlations between VEGF-C and MMP9 both in tumors and in HPN. A co-expression of these biomarkers in cervical cancer but not in normal cervical tissue has already been reported [180]. Thus, VEGF-C and MMP9 are related to invasive phenotype of uterine cervical tumor cells. They might act together in promoting cervical carcinoma lymphatic spread.

We then studied the correlation between histological assessment results and RT-qPCR assay results for CK19, HPV16-E6 and MUC1, the three biomarkers overexpressed in HPN. Their agreement with the histological results was respectively 97.2%, 92.8% and 75.5%. Thus, CK19 and HPV16-E6 emerged as the biomarkers with the best concordance with “gold standard” histological evaluation. However, all three biomarkers failed to detect about 2% of the HPN. So, we tested the concordance of the histological and RT-qPCR results using two RT-qPCR biomarkers. We choose CK19 and HPV16-E6 for several reasons. First, among the significantly overexpressed biomarkers in HPN, they had the best concordance with the histological results. Second, they had better sensitivity and specificity than MUC1. Third, their expressions were not correlated in HPN, indicating that they could provide complementary information. Thus, using these two biomarkers, all HPN were detected by RT-qPCR assessment. Moreover, 10 HNN were positive by RT-qPCR for CK19 and/or HPV16-E6. Further histological reassessment using immunohistology showed an involvement in 3 of the 10 cases (one micrometastasis in one case and isolated tumor cells in 2 cases). Hence, as already reported in the literature, and supporting our sensitivity assessments for the HPV-E6/E7 biomarkers, RT-qPCR had a greater sensitivity to detect nodal involvement than routine histology. Among the 7 other nodes, it is not possible to conclude to either RT-qPCR false positive nodes or histological false negative nodes since the nodal involvement might have been present only in the portion of the node used for mRNA preparation and assessed by RT-qPCR. Thus, our results suggest that the combined use of CK19 and HPV-E6 could be

exploited in a RT-qPCR strategy for the detection of nodal involvement with both high sensitivity and specificity.

FIGURE AND TABLE LEGENDS:

Table 1: Sequences of primers and TaqMan fluorogenic probes.

Table 2: Primers and probes concentrations.

Table 3: Histological and RT-qPCR nodal examination of each patient

* Patients with HPV16-E6 negative tumors.

Table 4: Correlations between biomarkers expression levels in uterine cervical tumors and histologically positive lymph nodes (Spearman test).

* Shared correlations between cervical tumors and histologically positive lymph nodes.

Table 5: RT-qPCR assay results and histological examination results agreement.

5a: Agreement between RT-qPCR assay results and histological examination results (H).

5b: Agreement between RT-PCR assay results and overall histological results (OHR).

H: Histological examination according to the standard procedures.

OHR: Overall histological result: Histological examination according to the standard procedures and retrospective IHC.

Figure 1 : Expression of CK19, HPV16-E6, MUC1, uPA, HER1, HER2, HER3, VEGF, VEGF-C and MMP9 in uterine normal cervix and in uterine cervical tumors.

AU: Arbitrary unit; NS: Not significant.

Figure 2: Expression of CK19, HPV16-E6, MUC1, uPA, HER1, HER2, HER3, VEGF, VEGF-C and MMP9 in histologically negative (HNN) and positive nodes (HPN).

AU: Arbitrary unit; NS: Not significant.

Figure 3: Expression of HPV16-E6, HPV16-E7 and 18s rRNA in mixed populations of HPV16 positive (CaSki) and HPV18 positive (HeLa) UCC cells.

Table 1 :

Gene	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
r18s		
Forward Primer	cggctaccacatccaaggaa	197
Reverse Primer	cgctattggagctggaatta	
Probe	(HEX) – tgctggcaccagactgcccctc– (BHQ-1)	
CK19		
Forward Primer	tcgacaacgcccgtctg	75
Reverse Primer	ccacgctcatgcgag	
Probe	(6FAM) – cctgtccgtctcaactggttcgg – (TAMRA)	
HER1		
Forward Primer	tccccgtaattatgtggtgacagatc	250
Reverse Primer	accctaaatgccaccggc	
Probe	(6FAM) – cagctatgagatggaggaagacggcgt – (TAMRA)	
HER2		
Forward Primer	caaccaagtgaggcaggctc	101
Reverse Primer	ggtctccattgtctagcacgg	
Probe	(6FAM) – agaggctgcgattgtgcga – (TAMRA)	
HER3		
Forward Primer	gggagccgcttcagact	98
Reverse Primer	ttgaggccggtgatcagaaa	
Probe	(6FAM) – tggactcgagcaacattgatggattgt – (TAMRA)	

Samouelian et al.

Table 1 (suite1)

TBP

Forward Primer	cacgaaccacggcactgatt	89
Reverse Primer	ttttcttgctgccagtctggac	
Probe	(VIC) – tctcactcttggctcctgtgcaca – (TAMRA)	

uPA

Forward Primer	actgcaggaaccagacaacc	70
Reverse Primer	tggacaagcggcttaggc	
Probe	(6FAM) – ctgcacatagcaccagggtgcct – (TAMRA)	

VEGF-C

Forward Primer	tcaaggacagaagagactataaaattgc	137
Reverse Primer	actccaaactcctccccacat	
Probe	(6FAM) – atacacacctcccgtggcatgcattg – (TAMRA)	

VEGF

Forward Primer	gcacccatggcagaagg	90
Reverse Primer	ctcgattggatggcagtagct	
Probe	(6FAM) – ctgatagacatccatgaactcaccacttctgt – (TAMRA)	

Table 1 (suite2)

TBP

Forward Primer	cacgaaccacggcactgatt	89
Reverse Primer	tttcttgctgccagtctggac	
Probe	(VIC) – tctcactctggctcctgtgcaca – (TAMRA)	

uPA

Forward Primer	actgcaggaaccagacaacc	70
Reverse Primer	tggacaagcggctttaggc	
Probe	(6FAM) – ctgcacatagcaccagggtcgct – (TAMRA)	

VEGF-C

Forward Primer	tcaaggacagaagagactataaaattgc	137
Reverse Primer	actcctcctctcccccacat	
Probe	(6FAM) – atacacacctcccgtggcatgcattg – (TAMRA)	

VEGF

Forward Primer	gcacccatggcagaagg	90
Reverse Primer	ctcgattggatggcagtagct	
Probe	(6FAM) – ctgatagacatccatgaactcaccactcgt – (TAMRA)	

Table 2 :

Gene	Primers (nM)	Probe (nM)
CK19	400	200
HPV16-E6, HPV-E7	200	200
MUC1	200	300
HER1-4, TBP, r18s	200	200
uPA	300	300
VEGF, VEGF-C	400	200
MMP9	400	400

Table 3 :

Number of nodes	Histology	CK19	HPV16	MUC1	HER1	HER2	HER3	VEGF	VEGF-C	uPA	MMP9
3	3	3	1	2	1	1	1	2	2	0	1
7	2	3	2	5	0	1	2	1	3	2	1
16	1	1	0*	2	4	0	4	4	4	2	1
15	7	6	9	9	3	5	4	6	5	3	6
9	0	0	0	4	5	6	4	5	3	1	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0*	1	0	1	1	0	4	4	1
11	2	1	4	4	11	7	5	8	9	8	2
4	2	2	2	2	2	1	2	1	0	0	0
7	0	0	0*	4	4	4	3	4	2	3	5
6	0	0	0	2	2	4	3	1	1	3	0
6	0	0	0	5	5	4	3	2	1	1	1
7	0	0	1	1	1	2	1	0	0	1	0
8	0	0	0	2	4	4	3	5	5	3	3
12	0	0	2	6	1	2	2	1	1	1	0
13	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	1	3	1	1	1	0
11	0	0	0	0	2	1	2	1	1	1	2
10	0	0	0*	0	0	0	1	1	2	1	10
7	0	0	0	3	1	1	2	1	1	4	4
6	0	0	0*	1	0	0	0	2	0	2	5

Samouelian et al.

Table 4 :

Correlation in tumors			Correlation in histologically positive lymph nodes		
Genes	r	p	Genes	r	p
MUC1 – HER3*	0.577	0.01	MUC1 – HER3*	0.679	0.003
HER1 – HER2*	0.752	<0.001	HER1 – HER2*	0.608	0.01
HER2 – HER3*	0.649	0.003	HER2 – HER3*	0.679	0.003
HER3 – uPA*	0.540	0.02	HER3 – uPA*	0.613	0.009
VEGF-C – MMP9*	0.525	0.02	VEGF-C – MMP9*	0.667	0.003
CK19 – HPV16-E6	0.498	0.03	CK19 – MUC1	0.828	0.001
HER1 – HER3	0.824	<0.001	CK19 – HER3	0.610	0.009
HER1 – uPA	0.473	0.04	HER1 – VEGF	0.586	0.013
MMP9 – uPA	0.639	0.003	HER2 – uPA	0.672	0.003
			uPA – VEGF-C	0.505	0.039

Samouelian et al.

Table 5 :**5a**

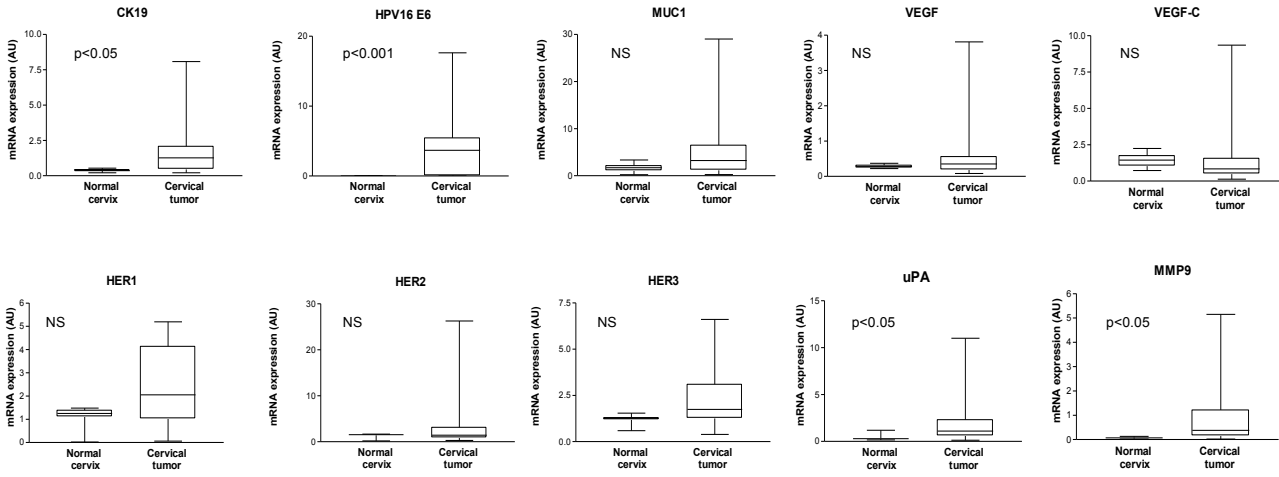
N	Biomarker	RT-PCR- / H-	RT-PCR+ / H+	RT-PCR+ / H-	RT-PCR- / H+	% Agreement
179	CK19	160 (89%)	14 (8%)	2 (1%)	3 (2%)	97%
179	HPV16	153 (85%)	13 (7%)	9 (5%)	4 (2%)	92%
179	MUC1	122 (68%)	13 (7%)	40 (22%)	4 (2%)	75%
179	CK19 and HPV16	152 (85%)	10 (6%)	1 (1%)	0	95%
	CK19 or HPV16		7 (4%)	9 (5%)		

5b

N	Biomarker	RT-PCR- / OHR-	RT-PCR+ / OHR+	RT-PCR+ / OHR-	RT-PCR- / OHR+	% Agreement
179	CK19	160 (89%)	15 (8%)	1 (1%)	3 (2%)	97%
179	HPV16	153 (85%)	16 (9%)	6 (3%)	4 (2%)	93%
179	MUC1	122 (68%)	16 (9%)	37 (21%)	4 (2%)	77%
179	CK19 and HPV16	152 (85%)	11 (6%)	0	0	97%
	CK19 or HPV16		10 (6%)	6 (3%)		

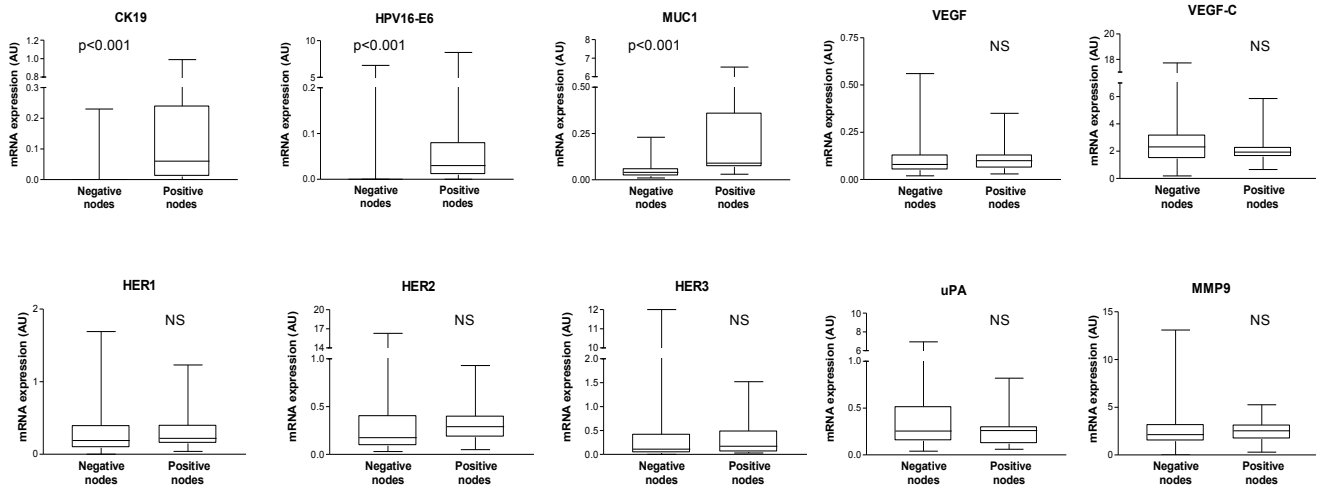
Samouelian et al.

FIGURE 1



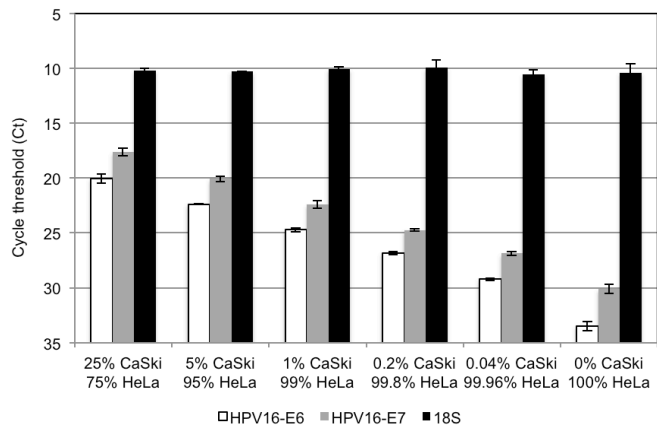
Samouelian et al.

FIGURE 2



Samouelian et al.

FIGURE 3



Samouelian et al.