

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2003

N°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury interrégional
le 6 Octobre 2003

par Mlle Carine PAPY

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 10 Septembre 1990 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

SEQUENCAGE DES ONCOGENES E6 ET E7 D'HPV DE TYPE 16.
EPIDEMIOLOGIE DES VARIANTS ET RISQUE DE PROGRESSION VERS DES
LESIONS GENITALES CANCEREUSES.

Président : Pr B.M. IMBERT
Membres du jury : Dr M. COSTE-BUREL
Pr P.LOPES
Pr C. LABOISSE

Je tiens à remercier,

Madame le Professeur B.M. Imbert,

Pour avoir accepté d'être la présidente de ce jury,
Pour m'avoir initiée à la virologie dès mes premières années de faculté,
Pour votre énergie débordante qui m'a motivée tout au long de ce travail,
Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance

Madame le Docteur M. Coste-Burel,

Pour m'avoir confié ce travail et permis de le mener à bien,
Pour votre gentillesse et vos précieux conseils,
Pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire,
Veuillez trouver toute l'expression de ma gratitude

Monsieur le Professeur P. Lopes,

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail,
Pour m'avoir permis de consulter librement certains dossiers cliniques,
Veuillez trouver dans ce témoignage l'expression de ma reconnaissance

Monsieur le Professeur C. Laboisie,

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury,
Pour votre précieuse collaboration avec le service de virologie dans le cadre de ce travail,
Veuillez trouver le témoignage de mon profond respect

Je dédie cette thèse,

A toute l'équipe du laboratoire de virologie,
pour votre gentillesse et votre bonne humeur,
à Bernard surtout, qui m'a fait découvrir les joies de la biologie moléculaire, merci beaucoup
pour ta patience et ta disponibilité,
à Céline aussi, avec qui j'ai passé un excellent stage de virologie, encore merci pour tout...

A Jean-Luc,
en témoignage de mon amour,
pour ton soutien et ta patience à toute épreuve,
avec toute ma tendresse...

A mes parents,
pour être toujours à mes côtés,
vous faites de moi la plus heureuse des filles

A toute ma famille,
recevez le témoignage de mon affection

A tous mes amis,
pour tous les bons moments passés et à venir...

A l'ensemble des internes, de Nantes et d'ailleurs, avec qui j'ai passé ces 4 belles années
d'Internat...

LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	11
GENERALITES	14
I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'HPV16.....	15
1- HISTORIQUE.....	15
2- STRUCTURE DU VIRUS.....	16
2.1- Structure générale.....	16
2.2- Organisation génomique.....	16
3- PHYLOGENIE DES PAPILOMAVIRUS.....	18
4- TRANSMISSION DU VIRUS.....	21
4.1- Transmission sexuelle.....	21
4.2- Transmission maternofoetale.....	21
4.3- Transmission indirecte.....	22
5- CYCLE DE REPLICATION.....	22
5.1- Pénétration cellulaire du virus.....	22
5.2- Infection virale productive avec ADN viral extrachromosomique.....	23
5.3- Infection latente.....	24
5.4- Intégration de l'ADN viral au génome cellulaire.....	25
6- HPV16 ET CANCER DU COL UTERIN.....	25
7- ASPECTS CLINIQUES DES INFECTIONS HPV16.....	26
7.1- Infection asymptomatique.....	27
7.2- Lésions cervicales.....	27
7.2.1 Détection des lésions cervicales.....	27
7.2.2 Classification anatomo-pathologique des lésions cervicales non invasives.....	27
7.2.3 Lésions cervicales intraépithéliales de bas grade.....	28
7.2.4 Lésions cervicales intraépithéliales de haut grade.....	30
7.2.5 Cancer invasif du col utérin.....	30
8- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS HPV.....	31
8.1- Techniques d'hybridation moléculaire.....	32
8.1.1 Le southern blot.....	32
8.1.2 Le dot-blot.....	32
8.1.3 L'hybridation <i>in situ</i> (HIS).....	33
8.1.4 L'hybridation en phase liquide.....	34
8.2- Les techniques d'amplification.....	34
8.2.1 La PCR.....	34
8.2.2 La PCR <i>in situ</i>	35
8.2.3 La PCR quantitative.....	35
9- TRAITEMENTS ET PROPHYLAXIE.....	36
9.1- Traitements.....	36
9.1.1 Traitement des néoplasies intraépithéliales du col utérin.....	36
9.1.2 Traitements des condylomes et dysplasies des organes génitaux externes.....	37
9.2- Prophylaxie.....	38
II- ONCOGENICITE DES HPV16.....	40
1- FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DU COL UTERIN.....	40
1.1- Principal facteur de risque : l'infection HPV.....	40
1.1.1 Importance de l'infection HPV.....	40

1.1.2	Importance du génotype viral	41
1.1.3	Importance de la persistance virale dans les cellules.....	41
1.1.4	Importance de la charge virale.....	41
1.2-	Cofacteurs agissant sur la carcinogénèse.....	42
1.2.1	Facteurs sexuels	42
1.2.2	Statut immunitaire.....	43
1.2.3	Autres cofacteurs	44
2-	RÔLE DES PROTEINES VIRALES DANS LA CARCINOGENESE	44
2.1-	Importance de l'intégration génomique.....	45
2.2-	Mécanisme général de la transformation cellulaire par les protéines virales	46
2.3-	Interaction entre la protéine E6 et les protéines virales.....	47
2.3.1	Rappels sur le cycle cellulaire	47
2.3.2	Fonctions de la p53	48
2.3.3	Interaction E6/p53.....	53
2.3.4	Autres cibles de la protéine E6	54
2.4-	Interaction entre la protéine E7 et les protéines cellulaires	56
2.4.1	Fonctions de la pRB/p105rb	56
2.4.2	Interaction E7/pRB	57
2.4.3	Autres cibles de E7	59
2.5-	Importance de la coopération E6/E7.....	61
2.6-	Rôle de la protéine E5.....	62
III-	VARIATIONS GENOMIQUES DES REGIONS E6 ET E7 DE L'HPV16.....	64
1-	VARIANTS HPV16 ET PROTOTYPE.....	64
2-	EPIDEMIOLOGIE DES VARIANTS HPV16	65
3-	INTERETS DE L'ETUDE DE CETTE VARIABILITE.....	67
4-	VARIABILITE DU GENE E6.....	68
4.1-	Variabilité selon l'origine géographique	68
4.1.1	Définition des variants E6 des 5 branches géographiques.....	68
4.1.2	Variants géographiques E6 et pouvoir oncogène	70
4.2-	Variant E-350G.....	72
4.2.1	Répartition mondiale du variant E-350G.....	72
4.2.2	Variant E-350G et risque de cancer cervical	72
4.3-	Autres variants du gène E6	73
4.4-	Variants E6 et pouvoir oncogène.....	74
4.5-	Variants E6 et pouvoir immunogène	75
5-	VARIABILITE DU GENE E7.....	76
5.1-	Variabilité du gène E7 selon l'origine géographique	77
5.2-	Variant A647G.....	77
5.3-	Autres variants E7.....	78
MATERIELS ET METHODES	80
I-	MATERIELS	81
1-	POPULATION ETUDIEE	81
2-	PRELEVEMENTS	82
3-	TEMOINS POSITIFS	83
II-	METHODES.....	84
1-	CHOIX DES AMORCES	84
1.1-	Amorces choisies pour la PCR E6.....	84
1.2-	Amorces choisies pour la PCR E7	85
2-	PARAMETRES OPTIMISES DANS LA MISE AU POINT DE LA PCR	87

2.1- La température d'hybridation des amorces.....	87
2.2- La concentration en chlorure de magnésium	87
2.3- Autres réactifs constituant les mélanges réactionnels.....	88
2.4- Les échantillons	88
3- REACTIONS D'AMPLIFICATION	88
4- ANALYSE DES PRODUITS DE PCR	89
4.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide	89
4.2- Révélation	90
5- SEQUENCAGE DES PRODUITS DE PCR	91
5.1- Principe général du séquençage	91
5.2- Etape de purification des produits de PCR	92
5.3- Réaction de séquence	93
5.4- Purification des produits de séquence.....	94
5.5- Analyse des produits de séquence	94
6- ANALYSE PHYLOGENIQUE DES HPV16.....	95
7- ANALYSE STATISTIQUE.....	96
RESULTATS	99
I- MISE AU POINT DES CONDITIONS DE LA PCR.....	101
1-TEMPERATURE D'HYBRIDATION ET CONCENTRATION EN MgCl ₂	101
2- CONDITIONS DEFINITIVES DE LA PCR E6 et E7	104
II- ANALYSE DES VARIANTS HPV16 E6/E7 AU SEIN D'UNE COHORTE DE FEMMES	106
1- CARACTERISTIQUES DES PRELEVEMENTS ETUDIES.....	106
2- ANALYSES DES FROTTIS CERVICO-VAGINAUX ET DES BIOPSIES	107
3- ANALYSE DE LA VARIABILITE DES GENES E6 ET E7	108
3.1- Variabilité du gène E6	109
3.2- Variabilité du gène E7	113
3.3- Analyse combinée des séquences E6 et E7.....	116
3.3.1 Répartition des variants et du prototype en fonction du stade clinique	117
3.3.2 Répartition des variants et du prototype en fonction de l'âge des patientes atteintes de dysplasie	119
3.4- Analyse d'un groupe de patientes ayant présenté une évolution clinique connue	119
DISCUSSION	125
CONCLUSION	135
BIBLIOGRAPHIE	137

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Asian-American
ADN : acide désoxyribonucléique
Af : African
AMP : adénosine monophosphate
ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
AP-1 : facteur de transcription (complexe des produits c-fos et c-jun)
ARN(m) : acide ribonucléique (messenger)
ASCUS : atypical squamous cells of undetermined significance
ASGUS : atypical glandular cells of undetermined significance
Ala : alanine
Asn : asparagine
Asp : acide aspartique
ATM : ataxia-telangiectasia mutated
ATP : adénosine triphosphate
CAK : cycline activated kinase
CBP : cointegrator associate protein
CDB : cassure double brin
Cdc : cell division cycle
CDK (cdk) : cycline dependent kinase
c-fos : proto-oncogène cellulaire (origine initiale : virus de l'ostéosarcome FBJ de la souris)
Chk1 : check point kinase 1
CIN : cervical intraepithelial neoplasia
CIP : cdk inhibitory protein
CIS : carcinome *in situ*
C-jun : proto-oncogène cellulaire (origine initiale : virus du fibrosarcome du poulet)
CK II : caséine kinase II
CKI : cycline kinase inhibitor
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
c-myc : proto-oncogène cellulaire (origine initiale : virus de la myélocytomatose aviaire)
c-ras : proto-oncogène cellulaire (origine initiale : virus du sarcome du rat)
Cys : cystéine
dNTP : desoxyribonucléotidetriphosphate
DP : facteur de transcription associé à E2F
E : early (précoce)
E : European
E2BS : E2 binding site
E6-AP : E6 associated protein
E6-BP : E6 binding protein
E6-TP1 : E6 targeted protein 1
ECP : effet cytopathogène
EGF : epidermal growth factor
ERC55 : endoplasmic reticulum calcium-binding protein of 55 kDa
G : gap
GADD45 : growth arrest and DNA damage inductible gene
Gln : glutamine
Gly : glycine
Gps2 : G-protein pathway suppressor 2

GTP : guanosine triphosphate
Glu : acide glutamique
H : histone
hADA3 : human homologue alteration/deficiency in activation 3
HCl : acide chlorhydrique
HDAC : histone déacétylase
HDlg : human homologue of the Drosophila disks large protein
HGSIL : high grade squamous intraepithelial lesion
His : histidine
HLA : human leukocyte antigen
HPV : human papillomavirus
hSrib : human homologue of the Drosophila sribble
HSV2 : herpes simplex de type 2
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1
IFNAR1 : récepteur de l'interferon-alpha de type 1
Ile : isoleucine
INK : inhibitor of cdk
IRF-3 : interferon-regulatory factor
KCL : chlorure de potassium
KIP : cyclin kinase inhibitory protein
L : late (tardif)
LCR : long control region
LED : lupus érythémateux disséminé
Leu : leucine
LGSIL : low grade squamous intraepithelial lesion
Lys : lysine
M : mitose
MAP : mitogen activated protein
Mcm7 : minichromosome maintenance protein 7
Mdm2 : mouse double minute
Met : méthionine
MgCl₂ : chlorure de magnésium
MPF : mitosis promoting factor
MST : maladies sexuellement transmissibles
MUPP1 : multi-PDZ domain protein 1
NA1 : North American 1
NIH3T3 : cellules fibroblastiques de lignée continue de souris
NJ : Neighbor Joining
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCNA : proliferating cellular nuclear antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : platelet derived growth factor
Phe : phénylalanine
PK : protéin kinase
POL : phase ouverte de lecture ou **ORF** (open reading frame)
pRB : protéine du rétinoblastome
Pro : proline
RP-A : protéine de réparation de l'ADN

RB1 : gène de susceptibilité au rétinoblastome
Ser : sérine
SDS : sodiumdodécylsulfate
SPF : start promoting factor
TAP1 : transporter associated peptide
TBP : TATA-box binding protein
TNF : tumor necrosis factor
Thr : thréonine
Trp : tryptophane
Tyk2 : protéine à activité tyrosine kinase
Tyr : tyrosine
Ub : ubiquitine
UV : ultraviolets
Val : valine
VCAM-1 : vascular adhesion molecule 1
VIH : virus de l'immunodéficience acquise
VLP : virus-like particles
WAF : wild-type p53 activated fragment
YY1 : yin-yang 1

INTRODUCTION

Autrefois rattachés aux *papovaviridae* avec les polyomavirus, les papillomavirus sont individualisés depuis peu et forment l'unique genre de la famille des *papillomaviridae*. Ces papillomavirus (du latin *papilla*, diminutif de *papula* signifiant bouton, et du suffixe grec –ome, désignant le caractère tumoral) sont des virus très anciens et extrêmement stables mais leur caractérisation fut relativement longue, car il n'existe pas de système cellulaire permettant leur propagation *in vitro*. C'est le développement de la biologie moléculaire dans les années 70, qui a permis d'établir leur remarquable pluralité, leur spécificité tissulaire et leur pathogénicité dépendante du génotype.

A ce jour, plus de 120 types de papillomavirus ont été identifiés ; environ 80 sont spécifiques de l'espèce humaine, dont une quarantaine ont un tropisme anogénital. Sur le plan clinique, ils sont responsables, chez l'Homme et les animaux, d'une grande variété de lésions cutanées et muqueuses, dont la plupart sont bénignes (verrues palmaires et plantaires, papillomes laryngés, condylomes acuminés anogénitaux, ...).

Les infections génitales liées aux HPV sont très fréquentes, en particulier chez les jeunes femmes en période d'activité sexuelle, et peuvent passer inaperçues ou être responsables de dysplasies. Ces lésions régressent dans la majorité des cas mais peuvent évoluer vers un carcinome invasif, à la suite notamment de l'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire. Cependant, le risque de développement tumoral et la rapidité de progression des lésions, qui dépendent surtout du génotype HPV, sont également liés à de nombreux cofacteurs endogènes et exogènes (prédisposition génétique, statut immunitaire, comportement sexuel, tabac, ...). Ainsi, certains génotypes, fréquemment retrouvés dans les condylomes génitaux (HPV6, HPV11, ...), sont dits à bas risque oncogène, alors que d'autres (HPV16, HPV18, HPV31, ...), dits à haut risque oncogène, sont directement impliqués dans la genèse des néoplasies du col utérin.

Le cancer du col de l'utérus représente un problème important de santé publique ; classé au 2^{ème} rang des cancers de la femme dans les pays en voie de développement et au 8 ou 9^{ème} dans les pays développés, il apparaît comme le premier cancer viro-induit prouvé puisque la présence du génome HPV est observée dans plus de 95% des cancers cervicaux. Parmi les HPV oncogènes responsables de ces carcinomes, le génotype 16 possède la plus forte prévalence (plus de 50%), quelque soit le pays étudié.

Les protéines virales E6 et E7 sont particulièrement impliquées dans le processus de carcinogénèse, en interagissant notamment avec les protéines antitumorales p53 et pRB. Cependant, ces mécanismes oncogènes sont complexes et font intervenir de nombreux

facteurs cellulaires.

Depuis une dizaine d'années, plusieurs travaux ont porté sur la variabilité des gènes E6 et E7. Certains auteurs ont montré que des variants, notamment le variant E6 T350G, étaient particulièrement impliqués dans le risque de persistance virale et de progression tumorale. Ces mutations génétiques, parfois responsables de la substitution d'un acide aminé, modifieraient donc la structure des protéines oncogènes. Les peptides mutés pourraient alors différer dans leur pouvoir oncogène (par exemple dans leur capacité à interagir avec les protéines suppresseurs de tumeur) et/ou immunogène (par exemple en modifiant la reconnaissance de certains épitopes par les molécules du CMH).

Dans cette étude rétrospective, nous avons amplifié et séquencé les régions E6 et E7 d'HPV16, à partir de prélèvements génitaux d'une cohorte de 78 femmes, ayant consulté dans le service de Gynécologie-Obstétrique du C.H.U. de Nantes entre le 1^{er} Janvier 2000 et le 31 Décembre 2002. Nous avons répertorié l'ensemble des mutations et analysé la phylogénie de ces HPV16. A l'aide des résultats anatomo-pathologiques des frottis et des biopsies, nous avons ensuite tenté d'établir une relation entre certains variants E6/E7 et la progression de lésions dysplasiques, dans le but de mieux cibler les femmes particulièrement à risque de développer un carcinome.

GENERALITES

I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'HPV16

1- HISTORIQUE

Dès 500 avant J-C, des médecins grecs et romains décrivent des lésions verruqueuses au niveau de la sphère génitale.

Le caractère sexuellement transmissible de ces verrues est mis en évidence en 25 avant J-C par un médecin romain, Celsus, dans son ouvrage « *De Arte Medica* ». C'est en 1907 que G. Ciuffo démontre la nature virale de ces lésions : il s'inocule un broyat de verrues, filtré pour éliminer la présence de bactéries ou de champignons, et voit apparaître des lésions identiques au point d'injection.

Les papillomavirus sont décrits pour la première fois chez le lapin par R. Shope en 1933 et ils représentent le premier modèle d'étude de l'oncogénèse virale chez les mammifères. Les particules virales ne seront mises en évidence par microscopie électronique qu'en 1950 par M.J. Strauss.

Dans les années 70, zur Hausen (zur Hausen *et al.*, 1977), en Allemagne, et Orth (Orth *et al.*, 1977), en France, identifient certains types de papillomavirus comme facteurs associés aux lésions précancéreuses du col utérin ; de nombreux travaux épidémiologiques et fondamentaux confirment le rôle majeur du papillomavirus humain (HPV), en particulier de type 16, dans la carcinogénèse du col de l'utérus.

2- STRUCTURE DU VIRUS

2.1- Structure générale

Les papillomavirus sont des virus de petite taille (environ 55nm de diamètre), non enveloppés, composés d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire d'environ 8000 paires de bases entourée d'une capsidie à symétrie icosaédrique formée de 72 capsomères (figure 1).

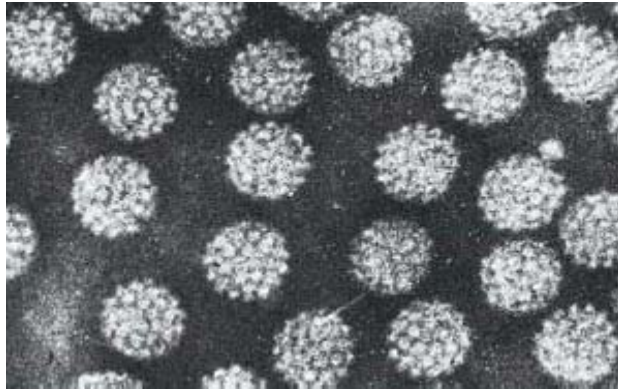


Figure 1 : particules virales HPV, visibles en microscopie électronique

2.2- Organisation génomique

Elle est commune à tous les HPV (figure 2). Un seul des 2 brins d'ADN est codant : il comporte une dizaine de phases ouvertes de lecture (POL) ou *open reading frames* (ORF) pour les anglo-saxons, regroupées en deux régions POL E (early) et POL L (late). La position de l'ensemble des gènes sur le génome HPV16 est indiquée dans le tableau I.

La région POL E code pour des protéines non structurales (E1, E2, E4, E5, E6, E7), nécessaires à la régulation de la réplication virale et l'immortalisation cellulaire. Les protéines E6 et E7 sont particulièrement impliquées dans les mécanismes d'oncogénicité au niveau génital.

Les POL L (L1 et L2), codent pour des protéines structurales de capsidie L1 (protéine majeure de capsidie) et L2 (protéine mineure de capsidie). Ces protéines sont exprimées seulement dans les cellules différenciées, lors d'une infection productive.

La région non codante, comprenant environ 1000 paires de bases, est située entre les séquences POL L1 et POL E6/E7. C'est une longue région de contrôle (LCR ou *long control region*), jouant un rôle important dans la promotion et la transcription virale : elle contient notamment les promoteurs des gènes précoces E (p97 pour l'HPV16) et en amont des promoteurs, des séquences de régulation de la réplication et de la transcription virale parmi lesquelles un site « ori » (site d'origine de la réplication) et une séquence « enhancer » ou cis-régulatrice (site de fixation spécifique de facteurs trans-régulateurs, de nature virale ou cellulaire, responsables de la modulation de l'activité de ces promoteurs).

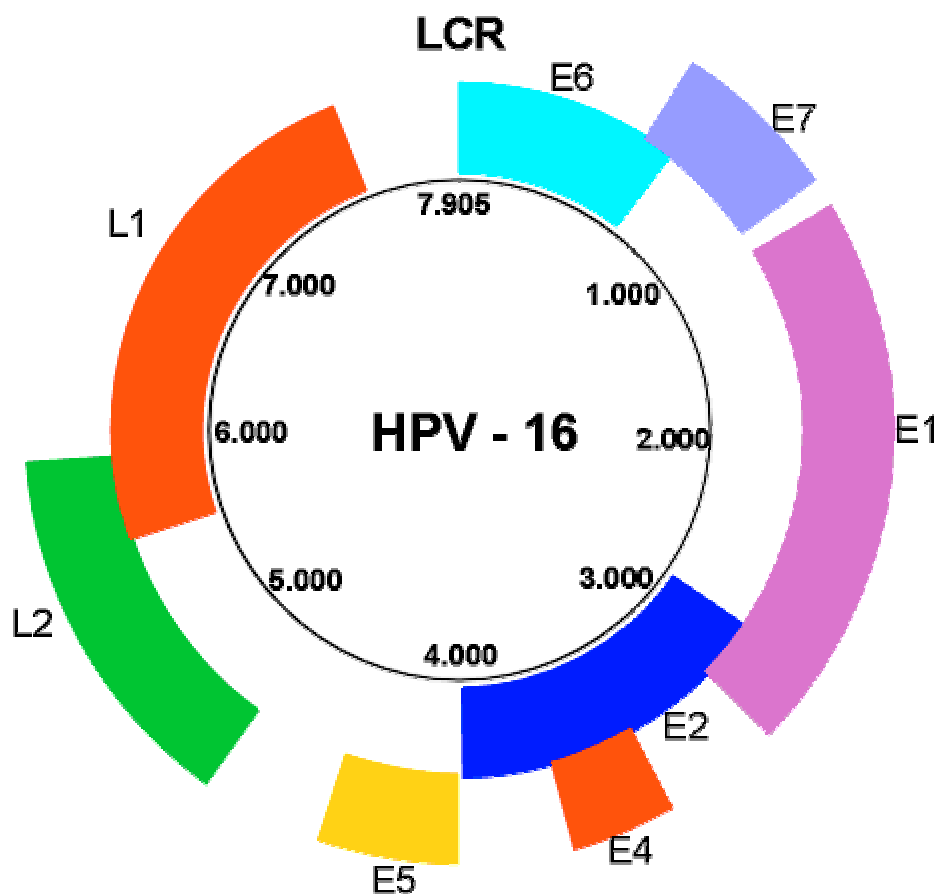


Figure 2 : organisation du génome HPV 16

Tableau I : position des gènes sur le génome HPV16 (en gras figure la position des 2 gènes codant pour les protéines oncogènes de l'HPV16)

Nom du gène	Position du gène sur le génome HPV16 (nucléotides)
E1	865-2814
E2	2756-3853
E4	3333-3620
E5	3850-4101
E6	83-559
E7	562-858
L1	5561-7156
L2	4237-5658

3- PHYLOGENIE DES PAPILOMAVIRUS

Les HPV sont des virus très anciens et de nombreux travaux ont montré la pluralité de ces virus. A l'heure actuelle, plus de 120 types de papillomavirus ont été identifiés, dont 80 sont spécifiques de l'espèce humaine. Une quarantaine de types ont un tropisme pour les muqueuses.

La classification de ces virus en types, sous-types et variants est basée sur l'espèce d'origine et le degré d'homologie des génomes viraux.

Pour une même spécificité d'espèce, un **type** est classiquement défini comme un papillomavirus présentant moins de 90% d'homologie de séquence nucléotidique dans le gène POL L1 avec le virus prototype.

Au sein d'un même type, les **sous-types** ont entre 90 et 98% d'homologie génomique.

Quant aux **variants**, ils ont plus de 98% d'homologie de séquence avec la souche de référence.

Les analyses phylogéniques, basées sur l'analyse des séquences ADN des différentes régions du génome viral, montrent une classification des types HPV en concordance avec leur tropisme cellulaire et leur potentiel oncogénique :

- les HPV préférentiellement associés aux lésions cutanées

Les HPV de types 1, 2 et 4 par exemple, sont fréquemment retrouvés dans les verrues, alors que les HPV de type 5 et 8 sont incriminés dans l'épidermodysplasie verruciforme.

- les HPV infectant les muqueuses anogénitales (col utérin, vulve, vagin, pénis et anus) et oropharyngées

Parmi ces virus, certains sont dits à bas risque ou à faible pouvoir oncogène : c'est le cas des HPV de type 6 et 11, communément retrouvés dans les condylomes génitaux, alors que d'autres sont dits à haut risque ou à fort pouvoir oncogène : c'est le cas des HPV de type 16 et 18, impliqués dans la génèse des néoplasies du col utérin. Récemment, les HPV dits « à risque intermédiaire » (HPV 31, 33, 35, 51 ...) ont été reclassés dans le groupe des HPV à haut risque oncogène (Munoz *et al.*, 2003).

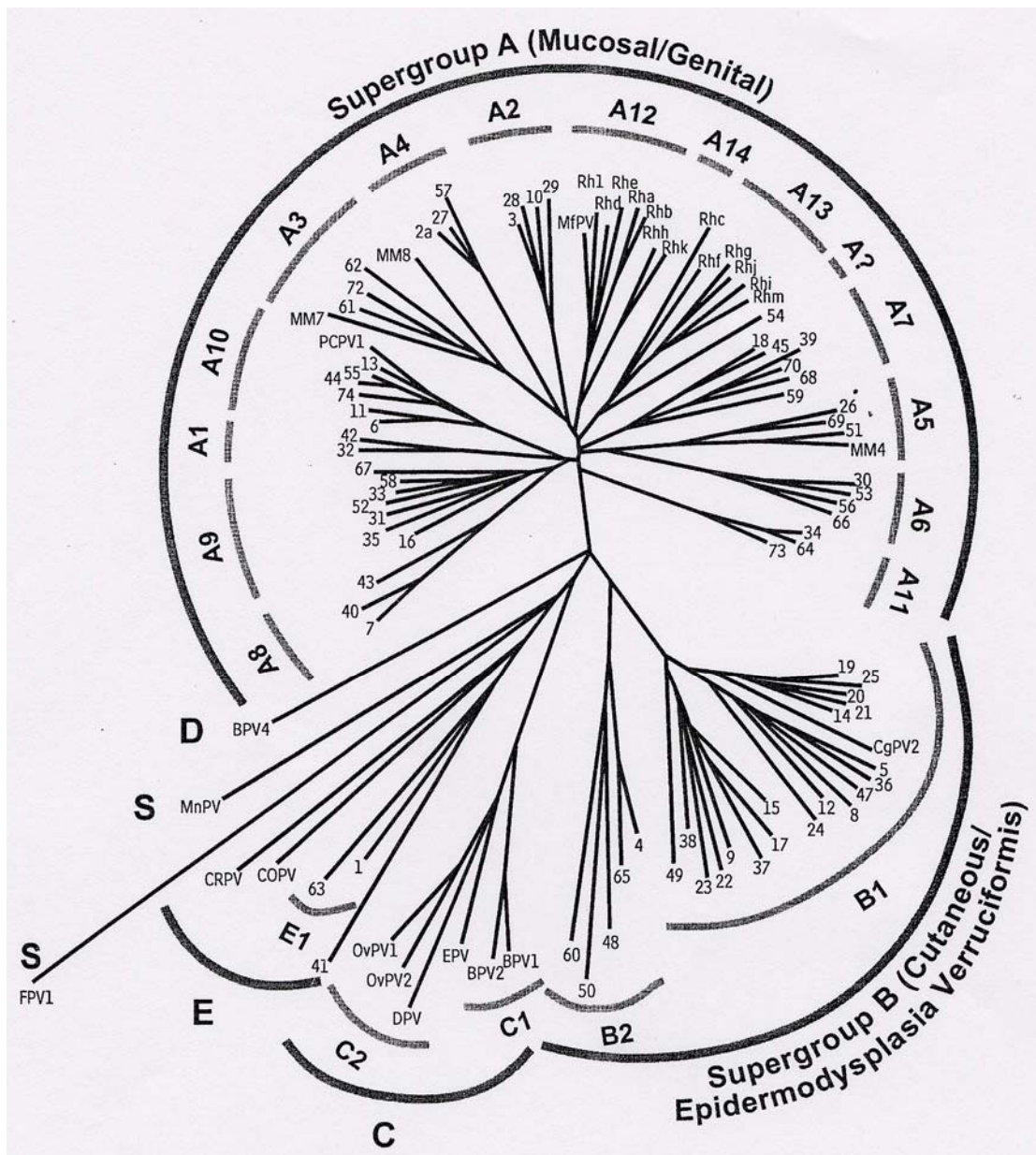


Figure 3 : arbre phylogénique des papillomavirus, toutes espèces confondues, construit à partir de l'homologie de séquence de la région L1 du génome (d'après Bonnez *et al.*, 2002). Classement de ces virus en 5 groupes désignés de A à E :

- supergroupe A: papillomavirus à tropisme génital
- supergroupe B : virus responsables de l'épidermodysplasie verruciforme
- supergroupes C et D : virus strictement animaux (bovins, ovins, cerfs, ...)
- supergroupe E : virus responsables de verrues cutanées (mains, pieds, ...)

Une classification simplifiée des HPV (figure 4) a été proposée par Birley et ses collaborateurs (Birley *et al.*, 1995).

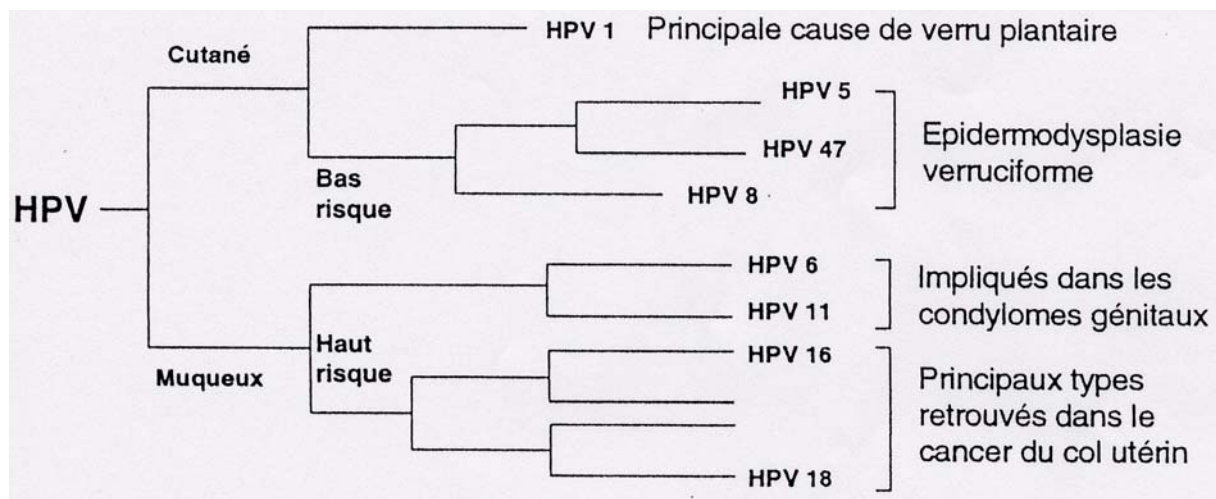


Figure 4 : arbre phylogénique des HPV basé sur le tropisme de ces virus et leur potentiel oncogénique (d'après Birley *et al.*, 1995)

4- TRANSMISSION DU VIRUS

4.1- Transmission sexuelle

La voie sexuelle représente la voie classique de contamination pour les papillomavirus à tropisme anogénital, l'infection à HPV étant la plus fréquente des maladies sexuellement transmissibles diagnostiquées. Ces infections, exceptionnelles chez les femmes vierges, sont très fréquentes chez les jeunes femmes en période d'activité sexuelle. Selon Koutsky (Koutsky *et al.*, 1997), 7 femmes sur 10 rencontreraient l'HPV au cours de leur vie sexuelle.

Le taux de contamination après un contact sexuel infectant varie entre 60 et 70%. Cette transmission se fait par contact direct du virion présent dans les cellules koilocytaires avec les cellules basales de l'épithélium.

4.2- Transmission maternofoetale

La transmission des HPV à fort potentiel oncogène, notamment l'HPV16, a été démontrée chez 55% des nouveaux-nés de mère présentant une infection génitale avec des HPV de même type (Pakarian *et al.*, 1994). Elle s'effectuerait au cours de l'accouchement et serait possible par voie transplacentaire ; mais au contraire de certains virus, les HPV ne se transmettent pas par le lait maternel.

4.3- Transmission indirecte

Ces virus sont très résistants à la chaleur et au froid. Une transmission nosocomiale de l'HPV16 est possible en l'absence d'une décontamination efficace du matériel (spéculum, pinces à biopsies, gants chirurgicaux) lors du diagnostic ou du traitement des lésions. La transmission du virus serait aussi possible par l'eau ou le linge en contact direct avec les lésions anogénitales (Schiffman *et al.*, 1995).

5- CYCLE DE REPLICATION

5.1- Pénétration cellulaire du virus

Les HPV pénètrent dans les cellules basales métaplasiques immatures de l'épithélium cervical, en particulier au niveau de la jonction pavimento-cylindrique du col utérin. Cette zone de transformation est la zone préférentielle de développement des lésions intraépithéliales et des cancers cervicaux car c'est une zone de fragilité à la fois mécanique et immunologique. La faible densité des cellules de Langerhans au niveau de cet épithélium métaplasique pourrait être responsable d'une immunodéficience locale, permettant aux HPV d'infecter aisément cette zone de transformation. Cependant, ces virus ne pourront pénétrer dans les cellules basales qu'à la faveur d'une lésion tissulaire ou d'un microtraumatisme.

Cette étape de pénétration fait intervenir 2 types de récepteurs. Un premier récepteur, de type « héparane sulfate » (appartenant à la famille des glycosaminoglycanes), permettrait la fixation des HPV à la surface de la cellule, alors qu'un deuxième récepteur, de type

« intégrine », favoriserait l'entrée du virus dans la cellule cible (Evander *et al.*, 1997 ; Joyce *et al.*, 1999).

L'ADN peut se répliquer sous forme épisomale, persister à l'état latent ou encore s'intégrer au génome de la cellule hôte.

5.2- Infection virale productive avec ADN viral extrachromosomique

Le cycle de multiplication dépend de l'état de différenciation de la cellule. Dans les cellules basales, seuls les gènes précoces du cadre de lecture s'expriment. L'ADN est maintenu sous forme d'épisomes multiples dans les cellules hôtes et la réplication est surtout assurée par les produits des gènes E1 et E2.

L'expression des gènes des régions tardives n'a lieu que dans les couches plus différenciées, où la réplication s'intensifie. La synthèse des protéines de capsid est régulée par les régions L1 et L2, en corrélation avec la différenciation et la maturation des kératinocytes. Cette synthèse permet l'encapsidation du génome et la production de virions complets. Le cycle de réplication n'est pas lytique et les virions sont donc éliminés par les cellules en voie de desquamation. Il est important de souligner que l'expression des gènes oncogènes E6 et E7 de l'HPV est très faible dans les cellules différenciées car ils sont contrôlés négativement par la protéine E2 (action trans-inhibitrice de E2).

Dans les couches superficielles de l'épithélium, la protéine E4, bien que codée par un gène précoce, est considérée comme une protéine tardive et exprimée le plus souvent en parallèle avec les protéines de structure L1 et L2. Elle s'accumule dans le cytoplasme cellulaire en provoquant un effet cytopathique, ou ECP, caractérisé par la « koïlocytose ». A l'échelon tissulaire, on observe une prolifération et une modification architecturale de l'épithélium avec apparition de micropapilles.

A ce stade, la transmissibilité est maximale.

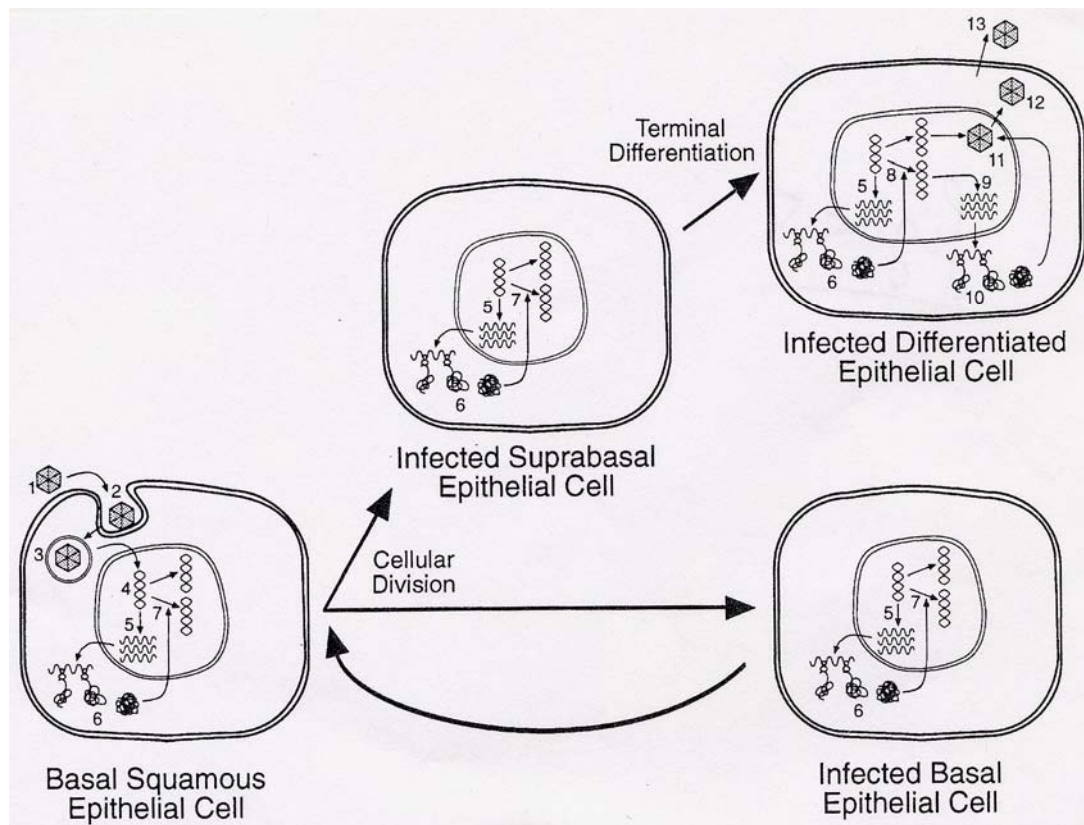


Figure 5 : étapes du cycle de multiplication des HPV (d'après Bonnez *et al.*, 2002)

- 1- interaction virus/cellule
- 2- internalisation du virus
- 3- endocytose
- 4- transport du génome viral dans le noyau cellulaire
- 5- transcription des gènes précoces (E)
- 6- traduction en protéines (E)
- 7 et 8 - réplication de l'ADN viral dans les cellules différenciées
- 9- transcription des gènes tardifs (L)
- 10- synthèse des protéines L1 et L2
- 11- encapsidation du génome viral
- 12- migration des particules virales dans le cytoplasme de la cellule
- 13- relargage des virions complets lors de la desquamation

5.3- Infection latente

Dans un certain nombre de cas, l'ADN viral reste à l'état libre sous forme plasmidique dans la cellule. Une infection latente s'installe, capable sous l'influence de certains facteurs exogènes ou endogènes (immunodépression locale ou générale) d'évoluer vers une infection productive.

A ce stade, la réplication et la transmissibilité sont très faibles.

5.4- Intégration de l'ADN viral au génome cellulaire

Cette intégration est généralement observée dans les cancers invasifs et les lésions cervicales de haut grade, elle est rare au stade de dysplasie légère.

En présence de cofacteurs, l'ADN viral peut s'intégrer au génome de la cellule hôte, après rupture des POL E1/E2 accompagnée de délétions/mutations des séquences E1/E2 et linéarisation du génome. Elle se fait de façon aléatoire ou au voisinage de proto-oncogènes (c-myc par exemple). Cependant, des travaux récents suggèrent qu'il existe des zones préférentielles d'intégration (Thorland *et al.*, 2003).

Cette étape de transformation concerne uniquement les HPV à haut risque, dont le type 16. C'est un évènement important de la dérégulation des gènes E6/E7 car leur transcription n'est plus réprimée par la protéine E2, le gène E2 étant partiellement scindé au cours de la linéarisation du génome viral. On observe alors une augmentation des ARNm E6 et E7, ainsi qu'une augmentation de leur stabilité. La synthèse accrue des protéines oncogènes favorise alors la promotion et la prolifération tumorale. Quant aux transcrits L1 et L2, ils disparaissent en général au décours de cette progression tumorale.

6- HPV16 ET CANCER DU COL UTERIN

Le cancer du col utérin est un problème important de santé publique car il est une des principales causes de mortalité chez la femme à travers le monde : on recense près de 4 millions de femmes atteintes. Le nombre de nouveaux cas par an est estimé à environ 500000 et plus de 200000 en décèdent (Sherris *et al.*, 1993).

Ce cancer est observé majoritairement (80%) dans les pays en voie de développement, où il occupe le 2^{ème} rang après le cancer du sein (Elkas *et al.*, 1998). L'Inde est le pays qui montre la plus forte incidence pour la tranche d'âge 35-64 ans, qui a été évaluée à 99 pour 100000 entre 1982 et 1995 et le nombre de nouveau cas par an est estimé à 100000.

Pour les pays industrialisés, ce cancer arrive en 8 ou 9^{ème} position (Shanta *et al.*, 2000). En France, on détecte environ 3200 nouveaux cas par an, à l'origine de 1600 décès. Les tests de dépistage systématique pratiqués en France ont eu un effet bénéfique, puisque les taux d'incidence standardisés sont passés de 15.6 pour 100000 à 8.6 pour 100000 de 1978 à 1992 (Weidmann *et al.*, 1998). Il est donc évident que les variations géographiques d'incidence, de prévalence et de mortalité sont essentiellement liées aux différences dans l'accès au dépistage.

Des études épidémiologiques ont confirmé que le risque de développer un cancer du col utérin est étroitement associé à la présence et à la persistance d'HPV à haut risque. Sur une série de cancers invasifs provenant de 22 pays (Amérique, Europe, Afrique, Asie), il a été montré que la majorité de ces cancers cervicaux abritait de l'ADN HPV (99.7%), mais que la répartition des génotypes variait avec la géographie (figure 6). Cependant, quelque soit le pays étudié, la prévalence de l'HPV de type 16 est toujours nettement prédominante par rapport aux autres types (50% en moyenne) ; en Amérique du Nord et en Europe, plus de 70% des cancers utérins sont même associés aux HPV16 (Munoz *et al.*, 2000).

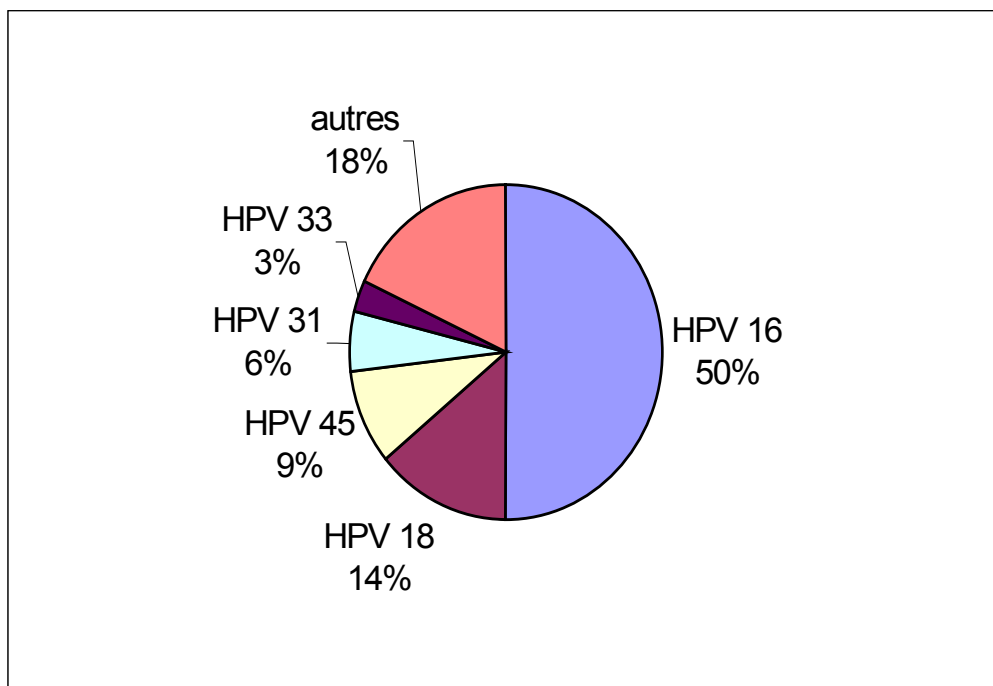


Figure 6 : répartition mondiale des types d'HPV dans les cancers du col utérin (d'après Munoz *et al.*, 2000)

7- ASPECTS CLINIQUES DES INFECTIONS HPV16

7.1- Infection asymptomatique

L'infection à papillomavirus est la plus fréquente des maladies sexuellement transmissibles (MST) diagnostiquées. Elle peut être asymptomatique, correspondant à une infection transitoire sans traduction cytologique ni colposcopique, très répandue chez les jeunes femmes pour lesquelles la prévalence est élevée (de l'ordre de 25%). Le pic de prévalence des infections génitales à HPV chez la femme se situe en effet entre 20 et 24 ans (Ho *et al.*, 1998). Les femmes plus âgées, ayant en général moins de rapports et de partenaires sexuels, limitent ainsi leur risque de contracter une MST.

7.2- Lésions cervicales

7.2.1 Détection des lésions cervicales

Ces lésions sont cliniquement détectables par colposcopie. Cette technique consiste à examiner, à la loupe binoculaire, la muqueuse glandulaire et malpighienne et, à travers elle, la vascularisation du tissu conjonctif sous-jacent. Elle comprend le test à l'acide acétique, permettant de visualiser la zone de jonction pavimento-cylindrique (zone de transformation), et le test au lugol (test de Schiller), afin d'observer l'importance du remaniement de l'épithélium. Cet examen permet donc de localiser les lésions, d'apprécier leur gravité et de diriger la biopsie en vue de l'examen histologique des lésions.

7.2.2 Classification anatomo-pathologique des lésions cervicales non invasives

La classification cytologique et histologique des lésions épidermoïdes non invasives du col utérin a vu se succéder plusieurs nomenclatures depuis 30 ans. L'ancienne classification de l'OMS en 1968 distingue différents grades de dysplasie : légère, modérée, sévère, et le carcinome *in situ* (CIS) alors que la classification de Richart propose en 1973 une classification cytologique et histologique des néoplasies cervicales intraépithéliales en 3

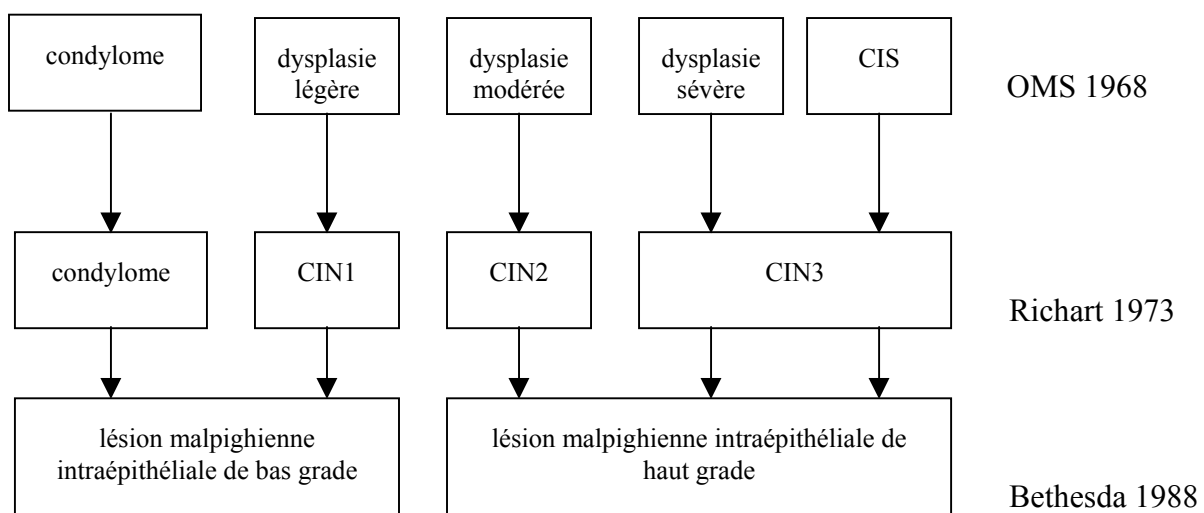
grades: CIN1, CIN2 et CIN3. Les dysplasies légères et modérées sont désignées respectivement CIN1 et CIN2 tandis que la dysplasie sévère et le CIS sont rassemblés dans le même groupe CIN3.

En 1988, un groupe d'experts propose à Bethesda une nouvelle classification des lésions cytologiques en lésions malpighiennes intraépithéliales (SIL) de bas ou de haut grade. Les lésions de bas grade ou LGSIL regroupent les condylomes et les dysplasies légères/CIN1. Les lésions de haut grade ou HGSIL regroupent les dysplasies modérées/CIN2 ainsi que les dysplasies sévères et le carcinome *in situ* (CIN3). Cette classification de Bethesda, initialement proposée pour le diagnostic cytologique, est aussi couramment employée pour le diagnostic histologique.

La terminologie de Bethesda a également introduit la notion de frottis ASCUS correspondant à des frottis équivoques, de signification indéterminée. Selon C. Mougin, ces frottis ASCUS représenteraient selon les laboratoires 2 à 5 % des frottis cervico-vaginaux. Dans 80% des cas, le frottis serait normal, dans 10 à 15% des cas, une LGSIL, et dans 5 à 10% des cas, une HGSIL (Mougin *et al.*, 2000).

Le tableau II montre les différentes concordances entre la classification des lésions cervicales de l'OMS, de Richart et de Bethesda.

Tableau II : classification des lésions cervicales selon l'OMS, Richart et Bethesda



7.2.3 Lésions cervicales intraépithéliales de bas grade

Elles regroupent les condylomes et les dysplasies légères/CIN1.

Ces LGSIL régressent dans 60% des cas, persistent dans 25% des cas et évoluent vers une lésion de haut grade dans 10 à 15% des cas. Les HPV16 sont mis en évidence dans environ 20% des LGSIL (Syrjänen *et al.*, 1992).

Les condylomes

Lors de la réplication active du virus, l'ECP provoqué sur les cellules infectées (koïlocytes) est responsable sur le plan tissulaire d'une modification architecturale de l'épithélium appelée condylome : on distingue sur le plan histologique et clinique les condylomes plans (lésions subcliniques mises en évidence le plus souvent par examen colposcopique) et les condylomes acuminés (formation de digitations caractéristiques ou « crêtes de coq », visibles à l'œil nu, situé le plus souvent au niveau vulvovaginal). Dans les condylomes, il n'existe ni atypies cellulaires ni anomalies de maturation de l'épithélium.

Sur le plan cytologique, les koïlocytes sont caractérisés par un cytoplasme translucide avec une aire péri- ou paranucléaire étendue ; la forme cellulaire est régulière, parfois irrégulière, et le noyau présente une chromatine dense plus ou moins pycnotique. Ces noyaux peuvent être augmentés de taille ou être multiples (en général double ou triple).

La durée moyenne d'incubation des condylomes après un rapport contaminant est évaluée à 3 mois. L'évolution normale de l'infection HPV est la guérison (environ 90% des cas) avec une clairance virale de 8 mois en moyenne. Cependant, la clairance de l'HPV16 serait plus longue que celle des autres types d'HPV, jusqu'à 16 mois ; or, l'infection persistante à HPV est le principal facteur de risque d'évolution vers un cancer invasif (Liaw *et al.*, 1999).

Les CIN1 et dysplasies légères

Les lésions évocatrices d'une dysplasie sont caractérisées par la présence d'anomalies cytologiques et/ou une mauvaise maturation de l'épithélium.

Les atypies cytologiques sont essentiellement nucléaires : les noyaux sont augmentés de volume, hyperchromatiques, les nucléoles sont multiples et les mitoses sont nombreuses et parfois atypiques.

Plus les lésions dysplasiques sont sévères et plus les koïlocytes sont rares : en effet, au cours du processus d'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire, la multiplication virale diminue (au stade de cancer la production virale devient même nulle). Les anomalies liées à la présence du virus sont alors de moins en moins faciles à mettre en évidence.

Le degré de dysplasie ou de CIN est fondé sur la proportion de l'épithélium occupé par les cellules basales/parabasales et plus la lésion est sévère, moins la maturation de l'épithélium est bonne.

Dans les CIN1 ou dysplasies légères, on observe dans le tiers inférieur de l'épithélium une désorganisation de la polarité cellulaire avec des mitoses fréquentes, parfois anormales, et un retard à la différenciation.

7.2.4 Lésions cervicales intraépithéliales de haut grade

Elles regroupent les dysplasies modérées/CIN2 et les dysplasies sévères-CIS/CIN3.

Ces HGSIL régressent dans moins de 40% des cas, persistent dans 20% des cas et évoluent vers un carcinome invasif dans 20 à 40% des cas, en l'absence de traitement chirurgical (Syrjänen *et al.*, 1992).

Les HPV à haut risque oncogène sont mis en évidence dans plus de 90% de ces lésions et l'HPV16 est retrouvé dans 50 à 60% des cas.

Dans les CIN2 ou dysplasie modérée, on observe, sur le plan histologique, une atteinte des 2/3 de la hauteur de l'épithélium alors que dans les CIN3 ou dysplasies sévères/CIS, l'atteinte porte sur l'ensemble du revêtement épithélial.

7.2.5 Cancer invasif du col utérin

Leurs caractéristiques sont identiques à celles des carcinomes *in situ*, mais la rupture de la membrane basale fait suspecter l'infiltration dans le stroma sous-jacent. L'invasion est d'abord minime (cancer micro-invasif avec présence de cellules malignes dans le chorion sous-jacent) puis s'accroît (cancer invasif avec diffusion locorégionale du processus néoplasique, envahissement ganglionnaire et métastases).

Ces lésions sont en général diagnostiquées 10 ans avant le carcinome microinvasif, qui précède lui-même de 10 ans le carcinome invasif. La longue période qui s'écoule entre l'apparition d'une lésion cervicale et celle d'un cancer infiltrant correspond à l'intégration du génome viral à l'ADN cellulaire avec une expression accrue des protéines virales oncogènes E6 et E7 (Mougin *et al.*, 1997).

Toutes ces lésions, de bas grade et haut grade, peuvent régresser, persister ou progresser vers le carcinome mais leur évolution dépend étroitement de leur stade, du type de papillomavirus et de sa persistance, ainsi que d'autres cofacteurs (figure 7).

L'évolution des lésions cervicales classiquement proposée est la suivante :

Métaplasie → LGSIL → HGSIL → carcinome *in situ* puis infiltrant

Cependant, selon certains auteurs (Kiviat *et al.*, 1993), les papillomavirus à haut risque oncogène comme l'HPV de type 16, peuvent conduire directement à des lésions cervicales de haut grade sans passer par le stade de LGSIL.

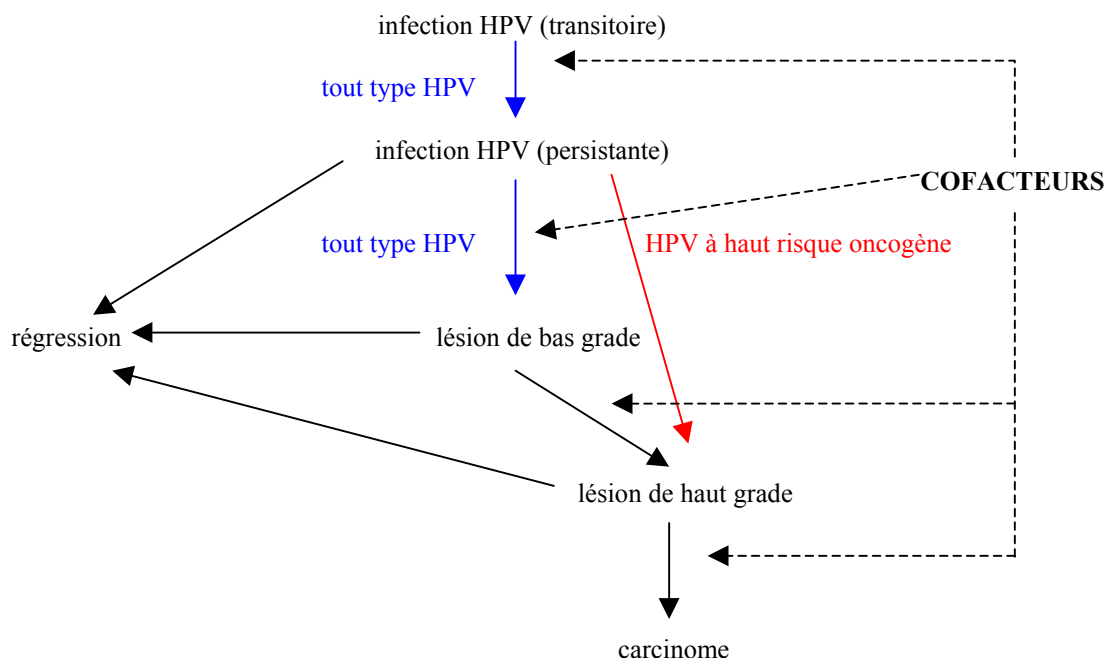


Figure 7 : évolution de l'infection par les HPV

8- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS HPV

Les papillomavirus ne sont pas détectables en routine par des tests sérologiques (domaine de la recherche) ; ils ne sont pas cultivables *in vitro*, mais les particules virales complètes peuvent être visibles en microscopie électronique (technique très lourde et peu sensible, non utilisable en routine). Les méthodes de détection qualitative et quantitative, ainsi que le typage de ces virus sont donc essentiellement des techniques de biologie moléculaire,

et reposent sur la mise en évidence de l'ADN viral dans les cellules infectées. On distingue les techniques de détection de l'ADN viral sans amplification (techniques d'hybridation moléculaire) et après amplification par PCR (techniques d'amplification).

8.1- Techniques d'hybridation moléculaire

8.1.1 Le southern blot

Cette technique a longtemps été la technique de référence. L'ADN extrait des cellules est coupé par une enzyme de restriction (endonucléase de référence : Pst 1), puis est soumis à une électrophorèse. Les produits de l'électrophorèse sont ensuite transférés sur une membrane et hybridés avec une sonde nucléique spécifique d'un ou plusieurs HPV, le plus souvent radiomarquée.

Cette méthode permet à la fois de mettre en évidence le virus dans les prélèvements génitaux mais aussi de typer les principaux génotypes connus (hybridation avec des sondes très spécifiques) ou non encore caractérisés (hybridation partielle non spécifique) ; elle permet aussi la détection de plusieurs génotypes au sein d'un même prélèvement et la mise en évidence de l'ADN viral sous forme intégrée au génome cellulaire ou sous forme épisomale.

Cette méthode reste cependant une technique très longue (plusieurs jours), lourde et onéreuse, qui manque de sensibilité (donc non acceptable pour le dépistage de masse).

8.1.2 Le dot-blot

Le principe est le même que pour la technique du southern-blot mais il n'y a pas de digestion enzymatique de l'extrait au préalable, ni de migration électrophorétique.

Cette méthode présente l'intérêt d'être plus sensible, plus simple et plus rapide que le southern-blot mais elle manque de spécificité (faux positifs).

8.1.3 L'hybridation *in situ* (HIS)

L'hybridation *in situ* est réalisée sur frottis cellulaires et/ou coupes tissulaires. Elle permet de préserver la morphologie du prélèvement et de localiser spécifiquement les cellules infectées, donc d'établir des corrélations avec l'histopathologie.

Les échantillons sont prétraités, le plus souvent par des enzymes (de type protéinase K) pour mieux permettre l'accessibilité de la sonde à l'ADN nucléaire. Après prétraitement et dénaturation des acides nucléiques, l'hybridation consiste à déposer une sonde marquée (différents marquages existent : marqueur radioactif, enzymatique, ...) directement sur les cellules ou les coupes de tissus, et à laisser incuber une nuit à une certaine température. L'aspect du signal final de révélation permet alors la localisation des zones infectées et aussi de préjuger l'état de l'ADN viral dans le noyau : un signal ponctué est en faveur d'une intégration au génome cellulaire alors qu'un signal diffus et homogène évoque plutôt des formes libres de l'ADN viral dans les cellules.

Cette technique est cependant peu sensible (moins sensible que le southern-blot et le dot-blot), en particulier pour les formes cliniques évoluées (lésions de haut grade et carcinome) et présente un important problème de bruit de fond. De plus, la quantité de sondes nécessaire est généralement très importante et proportionnelle à la surface cellulaire ou tissulaire à explorer.

8.1.4 L'hybridation en phase liquide

Cette technique d'hybridation moléculaire non radioactive, commercialisée par Digene Diagnostics sous le nom de Hybrid CaptureTM, a été agréée comme méthode de détection des HPV par la Food and Drug Administration. Une trousse de 2^{ème} génération (plus sensible que Hybrid Capture ITM) est de plus en plus utilisée depuis 1997, comme complément de la cytologie, aux Etats-Unis et dans la plupart des pays européens (Lazar *et al.*, 1999).

A partir d'un brossage cervico-vaginal, la détection de l'ADN viral se fait par hybridation avec des sondes ARN. La capture des hybrides est réalisée avec un anticorps spécifique des hybrides et ces couples ADN/ARN sont ensuite révélés par une technique immunoenzymatique utilisant un substrat qui permet une amplification du signal par un mécanisme de chimioluminescence. Il existe deux mélanges de sondes : sondes d'ARN spécifiques de 13 types d'HPV à haut risque oncogène (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) et de 5 types HPV à bas risque oncogène (6, 11, 42, 43, 44).

C'est une méthode simple, rapide (environ 4 heures), reproductible, très sensible et applicable en routine à de grandes séries. Elle permet aussi une analyse semi-quantitative de la charge virale mais elle ne permet pas de génotyper spécifiquement l'HPV isolé à partir des cellules infectées.

8.2- Les techniques d'amplification

8.2.1 La PCR

A l'heure actuelle, la technique d'amplification en chaînes de séquences d'ADN par la polymérase (*polymerase chain reaction* ou PCR) est la méthode la plus sensible (elle nécessite 10 à 100 copies d'ADN dans le prélèvement pour être positive) pour mettre en évidence l'HPV au niveau des prélèvements génitaux.

Au laboratoire, la PCR « consensus » a permis leur détection en utilisant des amorces dégénérées ou consensus, de type MY09/MY011 (Manos *et al.*, 1989) ou GP5+/GP6+ (de

Roda Husman *et al.*, 1995) pour les plus utilisées, et sélectionnées dans les régions génomiques les plus conservées du virus au niveau de la région L1 (la taille du fragment obtenu est d'environ 450 paires de bases), permettant la détection d'un large spectre de génotypes. Cette technique permet aussi de génotyper les types de virus déjà connus en utilisant des amorces spécifiques de type, au niveau de la région E6 du génome HPV (Van den Brule *et al.*, 1990). Les produits de PCR sont ensuite révélés par différentes méthodes : électrophorèse sur gel de polyacrylamide et coloration au bromure d'éthidium (lecture sous lumière UV), séquençage des produits d'amplification et comparaison des séquences avec une banque de données génétique (étude notamment de variants), hybridation des produits de PCR avec des sondes plus ou moins spécifiques de type, digestion des produits de PCR par une enzyme de restriction et électrophorèse en gel d'agarose afin d'analyser les profils de restriction.

Elle peut être semi-automatisée mais elle reste une technique délicate, exposée aux risques de contamination. Pour augmenter la sensibilité de la méthode, on peut utiliser 2 couples d'amorces et réaliser 2 PCR successives (PCR nichée ou *nested-PCR*).

8.2.2 La PCR *in situ*

Au même titre que l'hybridation *in situ*, cette technique permet d'associer la très grande sensibilité de la PCR et la localisation tissulaire des acides nucléiques mais les inconvénients sont les mêmes (surtout risque de faux positifs lié à un bruit de fond trop élevé et problème de reproductibilité). Elle permet notamment de génotyper des HPV sur des coupes fixées en paraffine.

8.2.3 La PCR quantitative

Si la présence d'HPV oncogènes augmente fortement le risque de lésion de haut grade, l'appréciation semi-quantitative de la charge virale, détectée par le test Hybrid Capture IITM, ne semble pas toujours prédire clairement ce risque (Clavel *et al.*, 2001 ; Lörincz *et al.*, 2002). La PCR quantitative permettrait de mesurer exactement la charge virale du virus, qui pourrait être un facteur pronostique d'évolutivité de la lésion cervicale.

La PCR en temps réel permet de quantifier précisément un nombre de copies de virus, grâce à des standards internes (comportant un nombre de copies connu). La PCR est optimisée avec un choix d'oligonucléotides spécifiques (dans les diverses séquences génomiques possibles des HPV) et des sondes marquées en fluorescence. La mesure finale de la fluorescence est alors liée à la quantité d'ADN viral. Elle nécessite néanmoins des thermocycleurs particuliers, équipés d'un système de détection de la fluorescence (laboratoires spécialisés).

9- TRAITEMENTS ET PROPHYLAXIE

9.1- Traitements

9.1.1 Traitement des néoplasies intraépithéliales du col utérin

Si toutes les dysplasies n'évoluent pas vers l'état invasif, leur traitement permet une nette diminution de l'incidence du cancer du col utérin, et toutes les « guidelines » de prises en charge actuelle s'accordent sur la nécessité de traiter ces lésions lorsqu'elles sont de haut grade (ANAES, 1999). Concernant les LGSIL, la majorité des auteurs préconise une surveillance accrue de ces femmes plus qu'un traitement (de type destructeur).

Il existe en effet 2 types de traitement, à adapter en fonction de l'agressivité potentielle de la lésion.

Traitement par destruction

Il est simple, rapide, permet de conserver la fonction obstétricale mais ne permet pas de contrôle histologique, donc il nécessite un diagnostic pré-opératoire rigoureux et un suivi opératoire rapproché.

Les différentes techniques chirurgicales utilisées ne peuvent être réalisées que pour des lésions exocervicales de petite taille (<2 cm²) et parfaitement visibles en colposcopie (contrôle colposcopique obligatoire en raison de l'absence de contrôle histologique).

Elles comprennent :

- la vaporisation laser CO2 (technique souvent utilisée en raison du fort taux de guérison et d'une bonne cicatrisation)
- la cryothérapie (réservée aux lésions de très petite taille)
- l'électrocoagulation

En cas de lésions plus importantes, peu visibles ou lorsque la patiente ne peut avoir de suivi régulier après le traitement, la conisation reste la méthode de référence.

Traitement par résection ou exérèse

Il permet surtout une analyse histologique de la pièce d'exérèse (la hauteur de la conisation est guidée par l'examen colposcopique) mais il existe des complications obstétricales (infertilité, menace d'accouchement prématuré, etc...), à prendre en compte surtout chez la femme nullipare, qui désire une grossesse.

Il existe 3 types de conisation, d'efficacité égale :

- la conisation au bistouri froid (taille importante de la biopsie)
- la conisation au laser
- l'électroconisation à l'anse diathermique (technique facile sous anesthésie locale)

Enfin, l'hystérectomie peut être proposée chez la femme de plus de 40 ans, qui ne désire plus de grossesse.

Les traitements des carcinomes reposent sur l'hystérectomie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie.

9.1.2 Traitements des condylomes et dysplasies des organes génitaux externes

Les protocoles thérapeutiques concernant le traitement des lésions externes sont plus complexes que pour les dysplasies du col utérin. Le choix de la thérapeutique est fonction de l'histologie, la localisation des lésions, le nombre et la taille des lésions.

Méthodes thérapeutiques

- podophylline (plus utilisée normalement)
- podophyllotoxine en crème ou solution (application locale)
- 5-fluoro-uracile en crème (local) mais efficacité moyenne
- acide trichloroacétique en solution (local) pour les petites lésions surtout
- interférons (voie générale ou locale) à faibles doses (moins d'effets secondaires)
- Imiquimod (Aldara*) en crème (application locale) surtout pour les condylomes
- vaccins thérapeutiques
- cryothérapie

Méthodes chirurgicales

- laser CO2 (couramment utilisé)
- autres (électrochirurgie, vulvectomy, ...)

9.2- Prophylaxie

Les premiers essais cliniques de phase I/II, avec différentes doses de VLP (*virus-like particles*) d'HPV16 purifiées de cellules d'insectes, ont été menés avec succès, mais seuls les résultats des essais de type III permettront de valider l'efficacité d'un vaccin prophylactique. Les premiers résultats de l'étude financée par Merck (Etats-Unis) ont été publiés après un suivi de 18 mois (Koutsky *et al.*, 2002), où la vaccination s'est révélée très efficace, puisque aucune femme vaccinée sur 768 n'a développé d'infection HPV16, versus 41 infections HPV16 sur les 765 femmes ayant reçu le placebo.

Pour améliorer encore l'efficacité de ces vaccins VLP, des études proposent d'ajouter au vaccin des propriétés thérapeutiques, qui consistent à introduire des lymphocytes T cytotoxiques pouvant reconnaître et détruire des cellules déjà infectées par le virus.

La vaccination à grande échelle serait particulièrement intéressante dans les pays en voie de développement, où l'incidence du cancer du col utérin est particulièrement importante.

II- ONCOGENICITE DES HPV16

1- FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DU COL UTERIN

L'incidence du cancer du col de l'utérus, ainsi que sa mortalité, ont diminué de façon importante ces dernières années et ceci grâce, en partie, à une meilleure connaissance des facteurs de risque.

1.1- Principal facteur de risque : l'infection HPV

1.1.1 Importance de l'infection HPV

Basé sur de nombreuses études épidémiologiques et biologiques, il est maintenant établi que l'infection par les papillomavirus est le principal facteur étiologique du cancer de l'utérus et qu'elle joue un rôle très important dans la progression des lésions précancéreuses et des cancers invasifs. Selon certains auteurs (Walboomers *et al.*, 1999 ; Munoz *et al.*, 2000), l'infection HPV apparaît même comme une condition nécessaire au développement du carcinome cervical : sur une grande série d'environ 1000 cancers invasifs du col utérin provenant de 22 pays différents, la présence du génome HPV a été observée dans la quasi totalité des cancers cervicaux (99,7%), parmi lesquels l'HPV de type 16 était nettement prédominant (53%), suivi par l'HPV de type 18 (15%).

Le cancer du col de l'utérus apparaît donc comme le premier cancer viro-induit prouvé. L'association HPV à haut risque et cancer ne concerne pas seulement le col de l'utérus, mais il existe également des localisations anales, vulvaires et vaginales (Bonnez *et al.*, 2002).

1.1.2 Importance du génotype viral

Le risque de développer un carcinome ainsi que la rapidité de la progression des lésions (pré)cancéreuses dépend surtout du type de papillomavirus. Parmi les 40 espèces d'HPV à tropisme ano-génital, seule une quinzaine de génotypes est retrouvée dans les lésions de haut grade (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Les génotypes les plus fréquemment retrouvés dans les carcinomes sont les HPV à haut risque oncogène (Munoz *et al.*, 2003), en particulier les types 16 et 18 (Lombard *et al.*, 1998).

Le génotypage HPV apparaît donc souhaitable dans le cadre du dépistage des femmes présentant des lésions cervicales précancéreuses.

1.1.3 Importance de la persistance virale dans les cellules

Le risque de développer une dysplasie cervicale puis un carcinome invasif est d'autant plus augmenté que l'infection virale persiste dans le temps. Il a été montré que la clairance virale de l'HPV16 est plus longue que celle des autres virus (Elfgren *et al.*, 2000).

Une étude londonnienne, menée à partir d'une cohorte de 258 femmes suivies pendant 2 ans, a montré que la persistance du virus (et en particulier l'HPV16) était étroitement corrélée avec le développement de lésions de haut grade (Londesborough *et al.*, 1996).

1.1.4 Importance de la charge virale

Les données sur l'évolution de la charge virale (déterminée par PCR quantitative) au cours de l'infection à HPV sont encore peu nombreuses, la mise au point des techniques permettant d'évaluer avec précision cette charge virale par rapport au nombre de cellules présentes dans un échantillon étant récente. Les études sont même parfois contradictoires. Woodman et ses collaborateurs ont effectué une estimation de cette charge virale dans une étude longitudinale et rapportent des fluctuations tout au long de l'infection HPV, avec de faibles charges virales au début et à la fin d'une période infectieuse (Woodman *et al.*, 2001).

Par ailleurs, une charge virale stable ou qui augmente serait associée à un risque plus grand de persistance, alors qu'une charge virale qui diminue serait associée à une probabilité plus importante de clairance (van Duinn *et al.*, 2002).

1.2- Cofacteurs agissant sur la carcinogénèse

Si la présence d'HPV oncogènes est nécessaire au développement des lésions intra-épithéliales, le fait qu'une minorité de femmes soit susceptible de développer un cancer, indique qu'elle ne saurait, à elle seule, expliquer l'évolution vers la cancérisation. En effet, de nombreux facteurs exogènes et endogènes jouent un rôle dans les étapes d'initiation, de promotion et de progression tumorale : comportement sexuel, statut immunitaire, prédisposition génétique, tabac, etc...(figure 8).

1.2.1 Facteurs sexuels

Comme l'HPV n'infecte que les cellules basales, le risque de transmission du virus est nettement augmenté lorsqu'il existe au préalable une lésion ou un microtraumatisme au niveau de l'épithélium.

Ainsi, le risque d'infection par l'HPV serait lié à certains facteurs sexuels (Ferrera *et al.*, 2000) et notamment :

- au nombre de partenaires sexuels
- à la précocité des premiers rapports sexuels et des grossesses, car l'épithélium est encore fragile (surtout avant 20 ans)
- aux grossesses multiples (traumatismes lors de l'accouchement mais aussi lié à des modifications hormonales et immunologiques pendant la grossesse)
- aux antécédents de lésions génitales ou de MST chez le partenaire (infection herpétique HSV2 en particulier, infection à Chlamydiae,...)

Enfin, les cervicites et cervicovaginites à répétition fragilisent l'épithélium, augmentant également le risque d'infection par ces virus.

1.2.2 Statut immunitaire

La perturbation des défenses immunitaires locales et générales est considérée comme un cofacteur endogène majeur impliqué dans la carcinogénèse cervicale : en effet, elle provoque une diminution de la clairance virale donc le risque d'évolution des lésions vers le carcinome est plus important.

Ainsi, les femmes particulièrement à risque sont les immunodéprimées (Broker *et al.*, 2001) et notamment :

- les transplantées rénales et les dialysées (chez les allogreffées de moelle osseuse, la prévalence des infections HPV est moins élevée)
- les patientes VIH+ : la progression des lésions est d'autant plus importante que le nombre de lymphocytes CD4+ est faible. Le risque est en effet très élevé si le taux de CD4+ est inférieur à 500 par μl (Bernard *et al.*, 1992)

Les défenses immunitaires sont également perturbées lors d'une longue période de stress, de dépression et chez les femmes atteintes de maladies auto-immunes (LED, sarcoïdose, polyarthrite rhumatoïde, diabète...). Tous ces événements sont fréquemment associés au développement des lésions à HPV.

De plus, certaines prédispositions génétiques, notamment au niveau du système HLA (particulièrement impliqué dans les mécanismes de défenses de l'organisme), augmenteraient le risque de développer un cancer. L'immunité cellulaire joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection à HPV et dans l'évolution des lésions dysplasiques ; en particulier, la présence d'une immunité cellulaire spécifique vis-à-vis de la protéine E6 des HPV16 (lymphocytes T mémoires) favoriserait la clairance virale (Welters *et al.*, 2003).

Enfin, la présentation des peptides viraux par le CMH de classe II aux lymphocytes T serait influencée par certains polymorphismes génétiques des molécules HLA (en particulier DQB1*03, DRB1*07 et DRB1*1501), mais ces études sont controversées (Bontkes *et al.*, 1998).

1.2.3 Autres cofacteurs

D'autres cofacteurs interviennent sur la persistance virale et sur la rapidité d'évolution des lésions précancéreuses en carcinome :

- co-infections génitales avec d'autres agents de MST, en particulier l'HSV2 (Smith *et al.*, 2002)
- grossesse (perturbations immunologiques et hormonales)
- contraception orale au long court (modifications hormonales mais études controversées)
- facteurs diététiques (effet protecteur des vitamines A et C, des folates, des caroténoïdes et du thé mais études controversées)
- tabac, avec un effet dose-dépendant (Kjellberg *et al.*, 2000)
- carcinogènes chimiques environnementaux (monoxyde de carbone, hydrocarbures aromatiques polycycliques, oxydes de soufre et d'azote libérés lors de la combustion de bois de chauffage, sont des facteurs favorisant la carcinogénèse chez des femmes déjà infectées par l'HPV (Ferrera *et al.*, 2000)
- milieu socio-économique défavorisé (souvent lié à l'association de plusieurs facteurs : déficit nutritionnel, nombreuses naissances, infections génitales à répétition...)

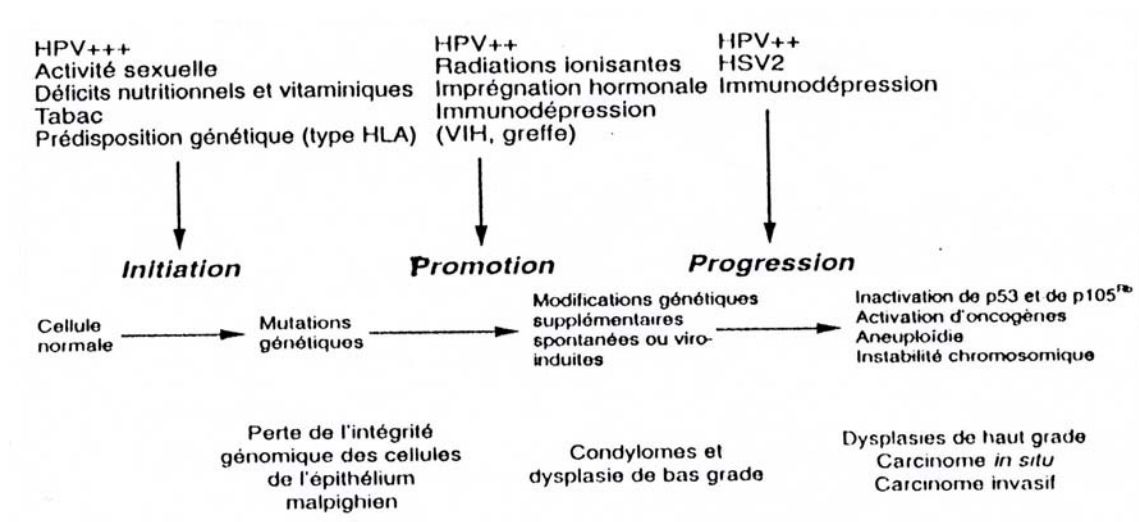


Figure 8 : facteurs régissant les étapes de la carcinogénèse des lésions à HPV

2- RÔLE DES PROTEINES VIRALES DANS LA CARCINOGENESE

Les protéines virales E6 et E7, synthétisées par les gènes viraux E6 et E7, sont les principales protéines du virus HPV impliquées dans le processus de cancérisation. Elles sont exprimées préférentiellement après intégration de l'ADN viral au génome cellulaire.

2.1- Importance de l'intégration génomique

L'intégration de l'ADN viral au génome de la cellule-hôte est une caractéristique des HPV à haut risque, en particulier l'HPV16.

Pendant la phase de réplication virale, la protéine E2 se lie aux sites E2BS situés à proximité de la *TATA-box* du promoteur p97 du génome HPV16, provoquant un encombrement stérique au site d'initiation de la transcription des gènes E6 et E7. Ainsi, la protéine E2, en gênant la liaison avec les facteurs de transcription, inhibe la synthèse des protéines E6 et E7.

Au cours de la linéarisation du génome viral, le gène E2 est en partie scindé. Après intégration au génome cellulaire, les gènes E6/E7 ne sont donc plus réprimés par la protéine E2 et l'on observe alors une augmentation de la synthèse des protéines oncogènes. Les ARNm E6 et E7, détectés par hybridation *in situ*, sont présents sur toute la hauteur de l'épithélium dans les lésions de haut grade et les carcinomes, en quantité beaucoup plus importante que dans les dysplasies légères.

Il a été démontré que l'expression de ces oncogènes était identique dans les lésions de haut grade et dans les cancers, suggérant que l'intégration de l'ADN viral est un événement précoce dans le processus de cancérogénèse.

De plus, l'intégration de l'ADN viral HPV16 a lieu dans des sites chromosomiques fragiles et spécifiques (Thorland *et al.*, 2003), à proximité notamment du proto-oncogène c-myc (gènes cellulaires présentant des similitudes avec certains gènes viraux : après transformation de ces proto-oncogènes en oncogènes, ils codent pour des protéines capables d'induire une transformation cellulaire). Le gène c-myc peut alors subir des réarrangements génétiques et être surexprimé dans les cellules infectées par le virus : le produit du gène c-myc participe donc au processus de transformation en favorisant la prolifération cellulaire.

Cependant, des travaux ont montré que l'intégration de l'ADN viral n'est pas toujours observée. Des mutations et des délétions au niveau des séquences de régulation négative YY1 (yin-yang 1 : facteur cellulaire réprimant l'expression de certains gènes viraux) peuvent conduire à une dérégulation de l'activité du promoteur p97 des HPV16, provoquant une augmentation de l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 en particulier.

2.2- Mécanisme général de la transformation cellulaire par les protéines virales

Le processus de carcinogénèse est très complexe. Le principal rôle des protéines E6 et E7 est d'inhiber certaines protéines cellulaires, dites « supresseurs de tumeur » (en particulier p53 et pRB), intervenant dans la régulation du cycle cellulaire ; les cellules deviennent alors immortelles, ont une croissance accrue et accumulent les anomalies chromosomiques au cours des divisions cellulaires : ce sont les principales caractéristiques des cellules malignes dites « transformées » (elles ont aussi perdu la propriété d'inhibition de contact, leur permettant de se multiplier indéfiniment). La coopération entre les protéines E6 et E7 est même indispensable pour obtenir une immortalisation efficace (Bernard *et al.*, 1994).

Ces protéines virales peuvent aussi interagir avec certains proto-oncogènes, qui vont favoriser la prolifération cellulaire.

Enfin, elles se lient à de nombreuses autres cibles pour favoriser la croissance cellulaire, inhiber les mécanismes de mort cellulaire et même altérer la réponse immunitaire.

Transformation Cellulaire et Virus

Ainsi, le nombre élevé d'évènements génétiques et de facteurs requis pour la transformation des cellules normales en tumeur, ainsi que la complexité des mécanismes mis en jeu, expliqueraient en partie la rareté relative de ces tumeurs (la durée d'infection nécessaire à la transformation complète des cellules infectées).

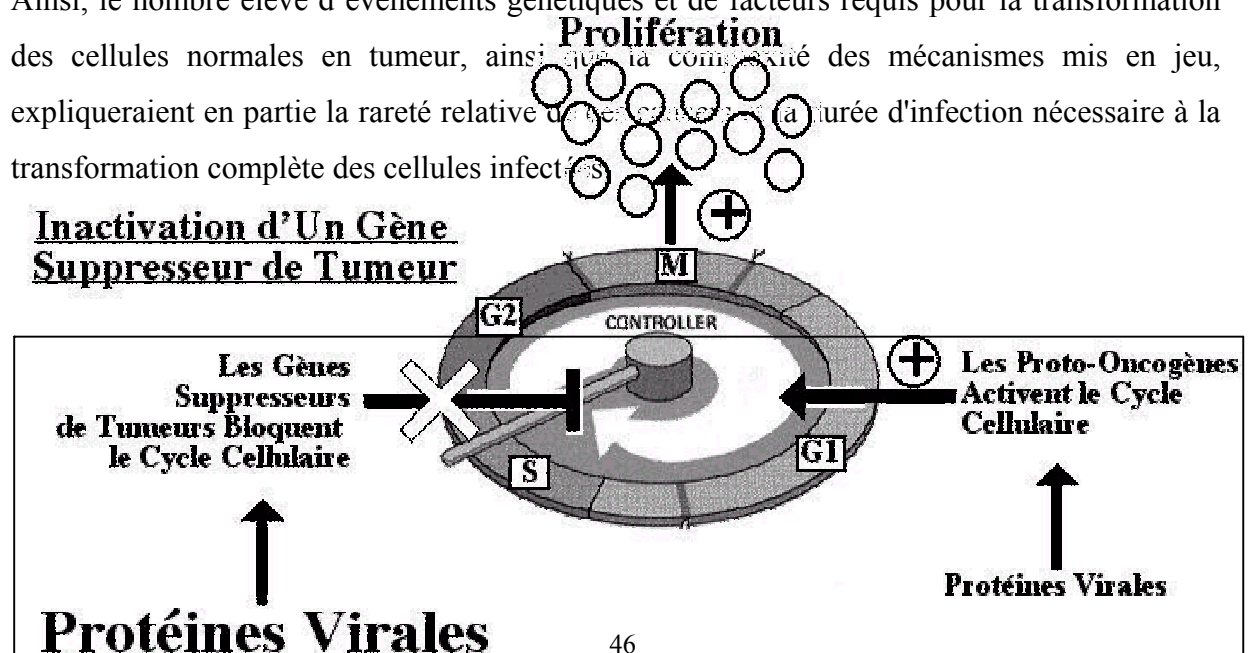


Figure 9 : principe de transformation cellulaire par les HPV16 (d'après Coqueret O., Transformation Cellulaire et Protéines Virales (Faculté de Médecine d'Angers))

2.3- Interaction entre la protéine E6 et les protéines virales

2.3.1 Rappels sur le cycle cellulaire

Lors de leur division, les cellules normales et tumorales traversent différentes phases du cycle cellulaire. On distingue 4 phases entre deux divisions successives :

- phase G1 (*Gap* ou étape de transition) : état cellulaire diploïde à 2n chromosomes
- phase S (synthèse d'ADN ou duplication) : état cellulaire tétraploïde à 4n chromosomes
- phase G2 (étape de transition) : état tétraploïde
- phase M (mitose ou division cellulaire) : cellule mère tétraploïde donnant 2 cellules filles diploïdes.

La progression dans le cycle est étroitement dépendante de la phosphorylation de protéines par des protéines enzymatiques, que sont les cdk (*cycline dependent kinases*), actives uniquement lorsqu'elles sont complexées à d'autres protéines, appelées cyclines.

Le passage de la phase G1 à la phase S implique particulièrement les complexes **cdk2-cycline A/E** (régulés par les protéines cellulaires inhibitrices de cdk, dont p21) et **cdk4/6-cycline D** (sous le contrôle de certaines protéines de régulation négative, dont p16) (figure10). L'expression de ces protéines de régulation est elle-même régulée par certaines protéines suppresseurs de tumeur.

Le passage de G2 à M implique le complexe **cdk1-cycline B** (figure 10).

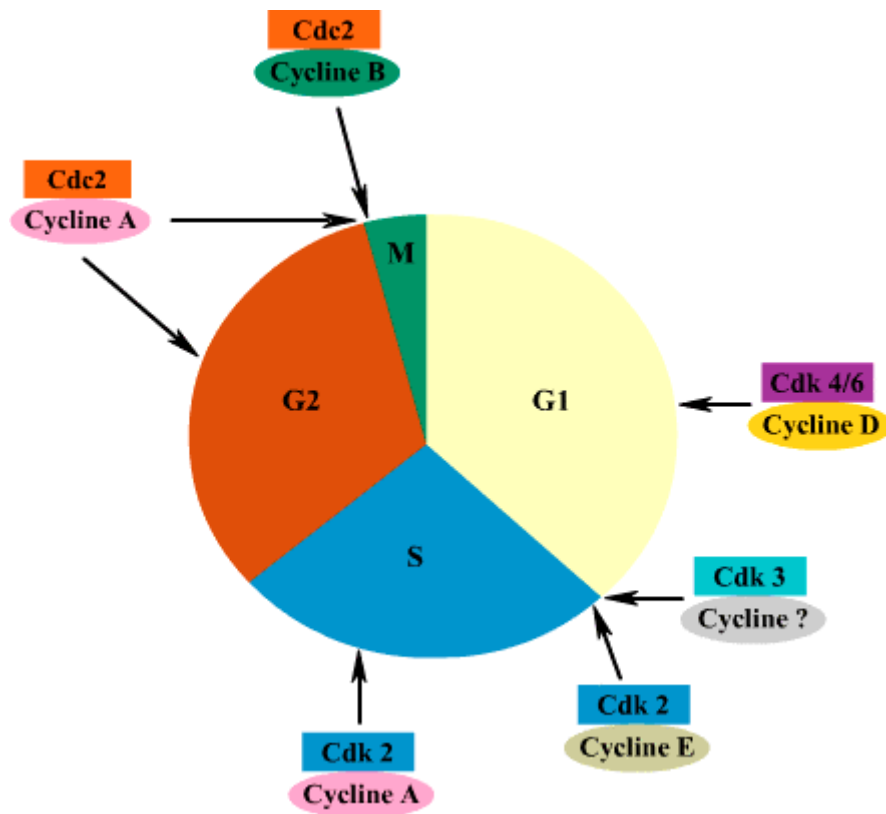


Figure 10 : différentes phases du cycle cellulaire et régulation par les complexes cdk-cyclines (d'après Pires *et al.*, 1995)

2.3.2 Fonctions de la p53

La protéine p53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés. Elle est codée par le gène humain p53, localisé sur le bras court du chromosome 17. Elle est constituée de 2 parties : une partie N-terminale (région acide) riche en proline correspondant au domaine de transactivation transcriptionnelle (qui interagit avec des facteurs de transcription tels que TBP ou *TATA-box binding protein*) et une partie C-terminale permettant à la protéine de pénétrer dans le noyau et de se fixer de manière spécifique ou non à l'ADN. Cette protéine, une fois activée par différents stimuli (lésions de l'ADN, hypoxie, stress cellulaire, etc...) et synthétisée en grande quantité, a 3 grandes fonctions antitumorales :

- blocage du cycle cellulaire en phase G1 et G2, pour permettre la réparation de l'ADN lésé
- induction de l'apoptose (phénomène d'autodestruction cellulaire génétiquement contrôlé) lorsque le génome cellulaire est trop endommagé pour être réparé
- réparation directe de l'ADN lésé

◆ blocage du cycle cellulaire en phase G1 :

La protéine p53 (dans le noyau cellulaire) se lie spécifiquement à des séquences spécifiques d'ADN du gène codant pour la protéine cellulaire p21/WAF-1/Cip-1, entraînant une stimulation de sa transcription : la protéine p21 se lie alors au complexe cdk2-cycline A/E et inhibe la phosphorylation de la protéine pRB, qui reste complexée au facteur de transcription E2F. E2F ne peut plus activer les gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (phase S du cycle) et le cycle cellulaire reste bloqué en phase G1.

De même, le gène GADD45a (*Growth Arrest and DNA Damage inducible gene*) est transactivé par p53 : la synthèse de la protéine GADD45 est stimulée, permettant la réparation du génome (GADD45 reconnaît directement la chromatine lésée et interagirait avec les protéines de réparation). La transactivation du gène GADD45a permet aussi de bloquer la réplication du génome en interagissant avec PCNA (*Proliferating Cellular Nuclear Antigen* : facteur jouant un rôle dans la réparation et dans la réplication de l'ADN).

La protéine MDM2, découverte en 1987 et produit du gène *mdm2* (*mouse double minute*), a rapidement été identifiée comme un régulateur de l'activité de la protéine p53 dans le temps, après un stress génotoxique. La p53 activée stimule l'expression du gène *mdm2*. La protéine MDM2 produite va en retour se fixer spécifiquement sur le domaine de transactivation de la protéine p53, et inhiber son activité transcriptionnelle (Freedman *et al.*, 1999). Ainsi, MDM2 exerce un deuxième niveau de régulation de p53 en induisant la dégradation protéolytique de p53.

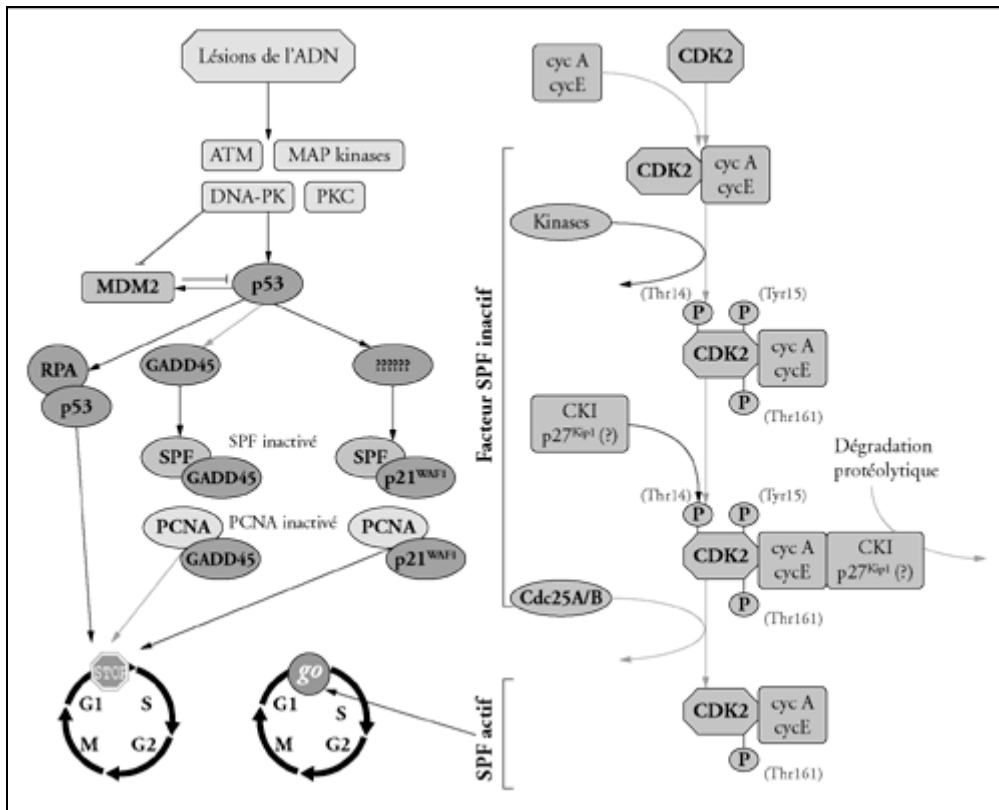


Figure 11 : régulation de la transition G1/S par la p53

ATM : ataxia telangiectasia mutated (protéine kinase)

DNA-PK : DNA-dependent protein kinase

RPA : protéine de réparation de l'ADN lésé

CKI : inhibiteur de cdk (p21 par exemple)

Cdc25A/B : phosphatases du cycle de division cellulaire

SPF : start promoting factor (actif après phosphorylation, il provoque l'entrée en phase S de la cellule, de manière irréversible)

→ : activation

—| : inhibition

◆ blocage du cycle cellulaire en phase G2 :

Le passage de G2 à M est principalement assuré par le complexe cdk1-cycline B ; il est cytoplasmique et ne rentre dans le noyau qu'au moment de la mitose. Le gène *14-3-3-sigma*, transactivé par p53, est capable de séquestrer le complexe cdk1-cycline B dans le cytoplasme en provoquant un arrêt de la division cellulaire en phase G2.

La transactivation du gène *GADD45a* entraîne aussi un blocage du cycle en G2, par des mécanismes encore mal connus.

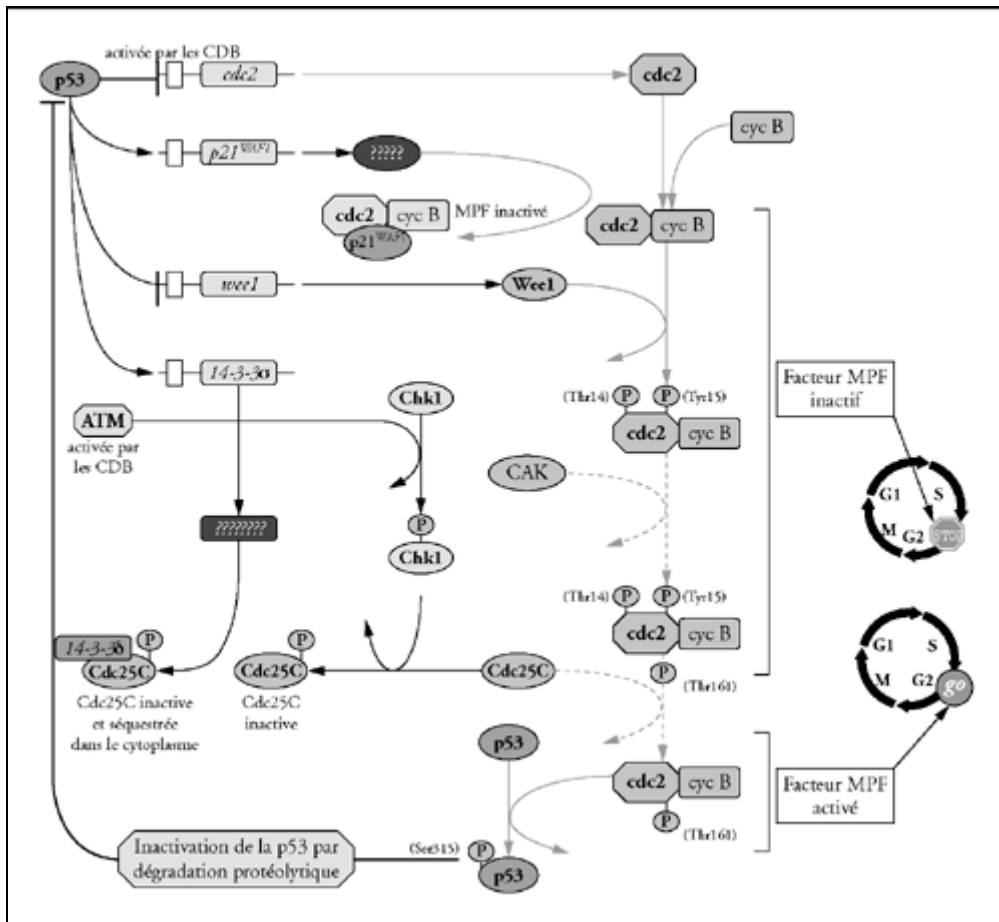


Figure 12 : régulation de la transition G2/M par la p53

CDB : cassures double brin d'ADN

Cdc25C : phosphatase (active uniquement lors du passage de la cellule en mitose)

Chk1 : *Check-point protein kinase*

Cdc2 : correspond à la cdk1

MPF : facteur de déclenchement de la mitose (*mitosis promoting factor*)

CAK : *cycline activated kinase*

wee1 : protéine kinase « wee » (petit)

→ : activation

—| : inhibition

◆ induction de l'apoptose :

Les voies principales conduisant à la mort cellulaire physiologique programmée sont la voie des récepteurs de mort et la voie de la mitochondrie. La voie mitochondriale est déclenchée par de nombreux signaux tels que l'altération de l'ADN par certains virus, les radiations ionisantes, les ultraviolets.... La p53 y joue un rôle important car elle transactive le gène codant pour la protéine **Bax** (proapoptotique). La protéine cytoplasmique Bax s'insère dans la membrane mitochondriale externe, s'oligodimérise pour former des pores lipidiques et interagit avec certaines protéines mitochondriales pour contribuer notamment au relargage du cytochrome c dans le cytosol. D'autres molécules sont libérées dans le cytoplasme

(procaspases 3 et 9 en particulier) permettant avec le cytochrome c d'activer la cascade des caspases. Ces caspases sont des enzymes cellulaires autrement appelées protéases à cystéine (*cysteiny aspartate-specific proteinases*) car elles sont capables de cliver un substrat après un résidu aspartate. Elles provoquent le clivage de différents substrats cytoplasmiques et nucléaires modifiant ainsi la morphologie de la cellule et induisent la destruction cellulaire par phagocytose (les cellules en apoptose sont « digérées » par les cellules voisines).

La p53 induit également la répression du gène codant pour **bcl2** (facteur antiapoptotique). Bcl2 inhibe notamment Bax au niveau de la membrane mitochondriale, régulant ainsi de manière négative la mort cellulaire.

◆ **activité directe de réparation de l'ADN :**

La partie C-terminale de p53 permet à la protéine de migrer dans le noyau cellulaire et de se fixer directement et spécifiquement à l'ADN lésé pour être ensuite éliminé ou réparé.

De même, p53 interagit avec la protéine cellulaire **RP-A** (protéine de réparation), impliquée dans la réparation du génome par excision de nucléotide.

2.3.3 Interaction E6/p53

La protéine E6 des HPV16 induit la dégradation de la **p53** en formant un complexe avec une protéine cellulaire appartenant à la famille des E3 ligases, E6-AP (*E6 associated protein*). Ce complexe est alors capable de transférer une molécule d'ubiquitine activée sur la p53 : la liaison s'effectue entre un résidu glycine de la partie carboxy-terminale de l'ubiquitine et un résidu lysine de la protéine p53. L'activation de la molécule d'ubiquitine est assurée par 2 enzymes (E1, enzyme activant l'ubiquitine et E2, enzyme conjuguant l'ubiquitine). L'énergie des réactions enzymatiques est fournie par une molécule d'ATP (figure 13).

L'ubiquitination de la protéine p53 entraîne son inactivation par protéolyse (dégradation par le 26S protéasome), ce qui explique la faible quantité de p53 retrouvée dans les cellules cervicales tumorales. Cependant cette interaction fonctionnelle entre E6 et p53 (*via* E6-AP) n'est pas détectable *in vivo* pour les HPV à bas risque. Selon certains auteurs (Storey *et al.*, 1998), l'inactivation de la p53 est étroitement lié au polymorphisme au niveau du résidu 72 de cette protéine : les individus homozygotes arginine/arginine présenteraient 7 fois plus de risque de développer un cancer par rapport aux individus hétérozygotes arginine/proline ou homozygotes proline/proline, suite à une sensibilité accrue de la p53 à l'ubiquitination et donc à la protéolyse ; mais ces études restent controversées (Klug *et al.*, 2001).

De plus, E6 interagirait de manière compétitive avec le coactivateur **CBP/p300** sur le site de liaison à la p53, provoquant la suppression de l'activité transcriptionnelle de p53 (Zimmermann *et al.*, 2000).

Enfin, une étude récente (Kumar *et al.*, 2002) a montré *in vitro* et *in vivo* l'existence d'un mécanisme de dégradation de la p53 indépendant de E6-AP, concernant uniquement les HPV à haut risque oncogène : E6 peut dégrader **hADA3** (homologue humain du coactivateur transcriptionnel yADA3 présent chez la levure de bière), qui ne peut plus activer la transcription de la p53.

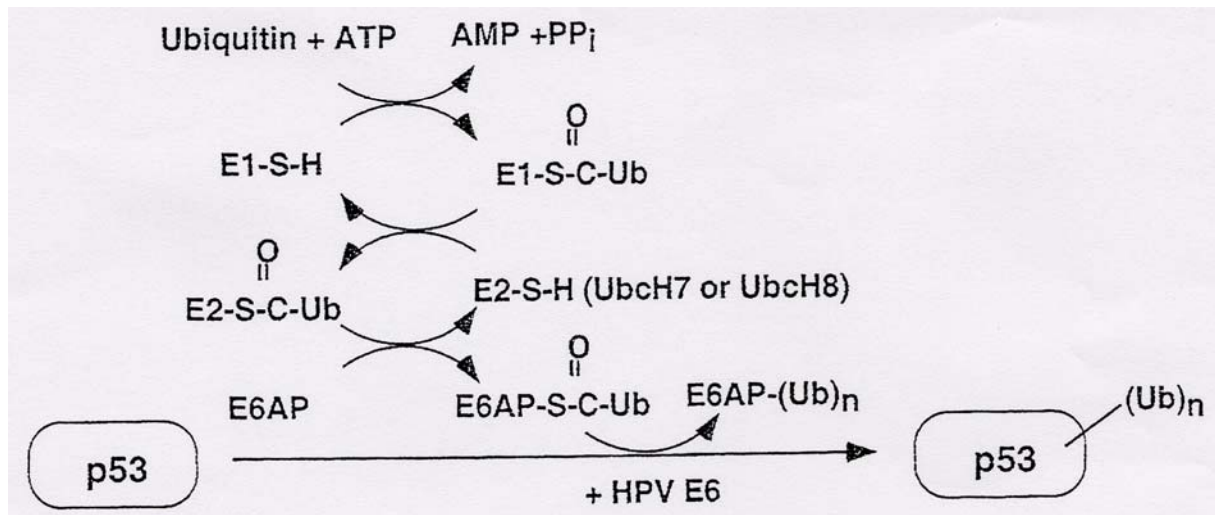


Figure 13 : cascade réactionnelle aboutissant à la fixation d'une molécule ubiquitine sur la p53 (d'après Howley *et al.*, 2001)

2.3.4 Autres cibles de la protéine E6

Nous avons vu que la protéine E6 joue un rôle majeur dans l'immortalisation cellulaire en interagissant avec la p53. Elle peut aussi inhiber les mécanismes de mort cellulaire en se fixant au niveau du **TNF1** (récepteur pour le TNF-alpha ou *tumor necrosis factor*) par un mécanisme de compétition vis-à-vis du TNF : on observe alors une inhibition des caspases 3 et 8, nécessaires au phénomène d'apoptose (Filippova *et al.*, 2002).

Cette protéine virale possède également des propriétés transformantes indépendantes de p53. Des études récentes ont montré que la protéine E6 interagissait avec d'autres protéines cellulaires, en particulier pour les HPV à fort pouvoir oncogène, provoquant *in vivo* l'immortalisation et la transformation des cellules. Elle favorise la multiplication cellulaire par différents modes d'action, qui ne sont pas encore tous complètement élucidés :

- elle se lie à plusieurs protéines suppresseurs de tumeur autres que la p53 : **hDlg** (*human homologue of the Drosophila disks large protein*), **hScrib** (*human homologue of the Drosophila scribble*), **MUPP1** (*multi-PDZ domain protein 1*) par un mécanisme identique à celui de l'interaction avec la p53 (ubiquitination et protéolyse par un protéasome)

- elle est capable d'induire la dégradation de **E6TP1** (*E6 targeted protein 1* : GTPase de la famille Rap), inhibant son rôle de régulation négative sur la multiplication cellulaire (uniquement pour les HPV à haut risque) (Gao Q. *et al.*, 2001)
- elle serait phosphorylée en interagissant avec une protéine kinase **PKN** (sérine/thréonine kinase possédant un domaine catalytique homologue à la protéine kinase C), modifiant les voies de signalisation cellulaires mais son rôle exact dans la transformation cellulaire est encore peu connu (uniquement pour les HPV à haut risque) (Gao Q. *et al.*, 2000)
- elle s'associe avec la **paxilline** (uniquement pour les HPV à haut risque), provoquant la dépolymérisation du réseau de filaments d'actine et la désorganisation du cytosquelette cellulaire (propriété de nombreuses cellules tumorales) (Tong *et al.*, 1997)
- elle interagit avec la tyrosine kinase **Tyk2** (concerne essentiellement les HPV à haut risque) et inhibe les voies de signalisation (Jak et Stat) liées à la fixation de l'interféron-*alpha* sur son récepteur (IFNAR1), jouant un rôle important à la fois dans le contrôle de la prolifération cellulaire mais aussi dans la réponse immunitaire (Li *et al.*, 1999)
- elle peut dégrader **Gps2** (*G-protein pathway suppressor 2*) en inhibant son activité dans la régulation de la transcription de certains gènes (*via* la formation d'un complexe avec p300), qui protégerait la cellule de la transformation mais ces mécanismes (propriété commune à tous les HPV) ne sont pas encore complètement élucidés (Degenhardt *et al.*, 2001)
- elle interagit avec **Mcm7** (mécanisme commun à tous les HPV) et stimule l'activation des étapes d'initiation et de réplication de l'ADN. De même, E6 active fonctionnellement la **téломérase** (hTERT), par une action directe sur le promoteur du gène et favorise la réplication de l'ADN (Howley *et al.*, 2001)
- elle active les facteurs transcriptionnels **c-myc** et **c-ras** en coopération avec E7 (la surexpression des protéines Myc et Ras induit la prolifération cellulaire en l'absence de stimulation par des facteurs de croissance)

E6 intervient également dans le contrôle de la réponse immunitaire, en se fixant au niveau du facteur transcriptionnel **IRF-3** (*IFN-regulatory factor*): ainsi, E6 inhibe la synthèse d'interféron-*béta* (Ronco *et al.*, 1998)

Enfin, d'autres cibles cellulaires sont décrites mais on ne connaît pas encore les conséquences biologiques de ces interactions (elle peut notamment former un complexe avec **E6BP** (*E6 binding protein*) ou **ERC55** (*endoplasmic reticulum calcium-binding protein*).

L'oncoprotéine E6 des HPV16 possède donc des propriétés transformantes, en favorisant notamment la dégradation de la protéine antitumorale p53. L'interaction entre E6 et p53, ainsi que les conséquences de cette interaction, sont maintenant bien connues. De nombreuses autres cibles cellulaires ont été récemment décrites mais tous les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore clairement établis. Les facteurs responsables du pouvoir oncogène de cette protéine virale sont donc multiples et les mécanismes mis en jeu sont très complexes. E6 joue également un rôle important dans le contrôle de la réaction immunitaire.

2.4- Interaction entre la protéine E7 et les protéines cellulaires

La protéine virale E7 possède, comme E6, des propriétés immortalisantes. Elle interagit avec de nombreuses protéines cellulaires, notamment la protéine suppresseur de tumeur pRB. Elle participerait également au phénomène d'échappement à la réaction immunitaire.

2.4.1 Fonctions de la pRB/p105rb

La protéine pRB est le produit du gène suppresseur de tumeur RB1, situé sur le chromosome 13, et appelé gène de susceptibilité au rétinoblastome. Pendant les phases du cycle cellulaire G0 et G1, la pRB est sous forme hypophosphorylée et se lie au facteur E2F (protéine cellulaire indispensable à l'entrée de la cellule en phase S et à l'activation de certains gènes impliqués dans la réplication de l'ADN) permettant de le maintenir sous forme de répresseur transcriptionnel.

Au moment de l'entrée de la cellule en phase S, la phosphorylation de pRB (au niveau de certains résidus sérine) est assurée par les complexes cyclines-cdk, en particulier les complexes cycline D-cdk4 et cycline E-cdk 2, permettant la libération du facteur E2F, qui peut alors activer les gènes nécessaires à la prolifération cellulaire.

2.4.2 Interaction E7/pRB

L'oncoprotéine E7 des HPV16 est une petite phosphoprotéine de 99 acides aminés, codée par le gène E7 (562-858) et localisée principalement dans le noyau. Au niveau de la partie C-terminale, elle présente 2 motifs Cys-X-X-Cys (Cys représente une molécule cystéine), impliqués dans sa dimérisation et nécessaires à son activité transformante. La partie N-terminale comprend en particulier 2 domaines très conservés appelés CDI et CDII, homologues aux régions contrôle CR1 et CR2 de la protéine E1A de l'adénovirus de type 5 et de l'antigène T du virus simien SV40 (virus capables d'induire des tumeurs chez l'homme et l'animal). C'est le domaine CDII qui lie spécifiquement la protéine pRB. La région N-terminale possède également un site de phosphorylation sur un résidu sérine par la caséine kinase II (ou CK II) et la protéine E7 des HPV à haut risque tel que l'HPV de type 16 est un meilleur substrat pour la CK II que la protéine E7 des HPV à bas risque comme l'HPV6.

Or, la protéine **pRB** se lie préférentiellement à la protéine E7 phosphorylée ; ainsi, une étude a montré que l'HPV 6 se lie avec une affinité 10 fois plus faible à la pRB par rapport à l'HPV de type 16 (Heck *et al.*, 1992). L'affinité réduite de la protéine E7 pour pRB des HPV à bas risque comparée à celle des HPV à haut risque oncogène résulterait également d'une différence structurale de la protéine E7 : la substitution d'un résidu glycine (Gly en position 22 pour HPV6-E7) par un résidu aspartate (Asp en 21 pour HPV16-E7) serait également un élément déterminant pour affecter l'affinité de pRB vis-à-vis de l'oncoprotéine virale.

E7 se lie préférentiellement à la forme hypophosphorylée de la pRB (avant que la cellule ne rentre en réplique) et l'interaction E7/pRB entraîne la libération du facteur E2F : la protéine E7 favorise donc, de manière indirecte, la prolifération cellulaire. La capacité de cette oncoprotéine à séquestrer la pRB et à libérer E2F fait intervenir la partie N-terminale de E7 (site de liaison entre E7 et pRB) mais également des séquences génomiques situées dans la région C-terminale.

De plus, E7 est aussi capable, par son interaction directe avec la pRB, de déstabiliser cette protéine, favorisant sa protéolyse par un mécanisme dépendant du protéasome.

Il a été également décrit que cette oncoprotéine est responsable, en inactivant pRB, de l'augmentation de la transcription du gène codant pour un inhibiteur de cdk, p16^{INK4} (inhibe particulièrement la cdk4 et cdk6), impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1. Néanmoins, malgré des niveaux élevés d'expression de cette protéine, les cellules proliféreraient (Klaes *et al.*, 2001). Ce mécanisme semble donc insuffisant pour inhiber le processus de transformation.

E7 peut aussi se lier à d'autres protéines de régulation du cycle cellulaire, appartenant à la même famille que la pRB, notamment la **p107** (active lors de la transition G1/S et en phase G2) et la **p130** (active lors de la transition G0/G1) (figure 14).

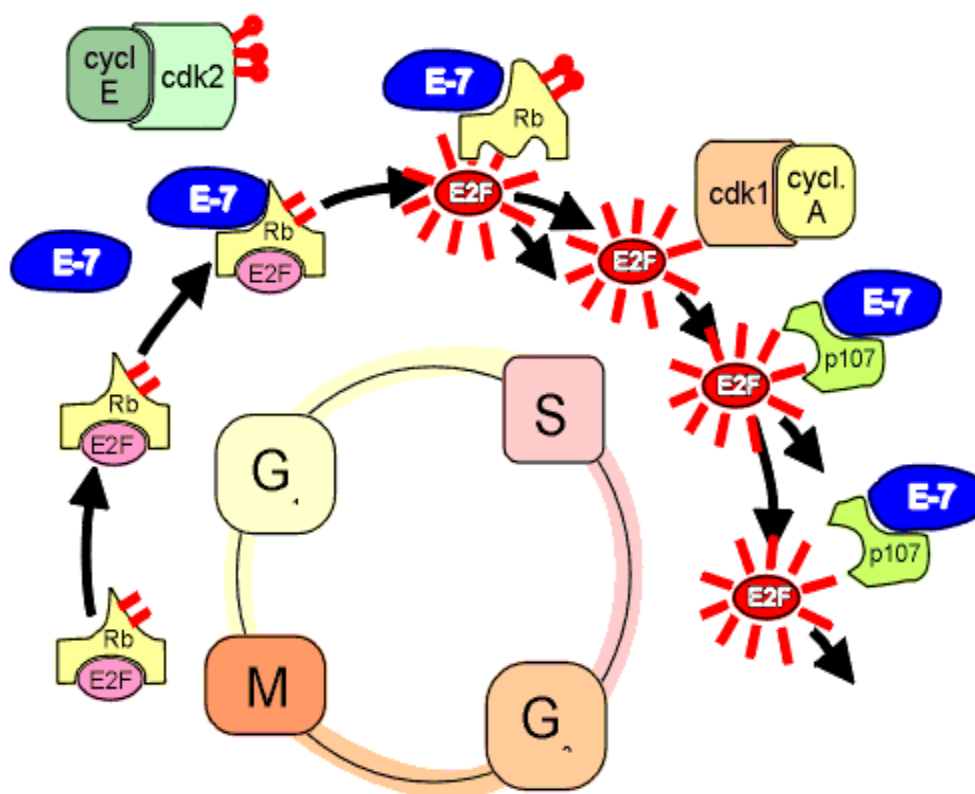


Figure 14 : interaction entre les protéines E7 et pRb (d'après Charcosset M., Carcinogénèse virale (Faculté de Médecine de Caen))

2.4.3 Autres cibles de E7

Comme l'oncoprotéine E6, E7 a de nombreuses autres cibles, dont les mécanismes d'action sont complexes et les conséquences physiologiques ne sont pas encore tous parfaitement connus.

E7 favoriserait également la prolifération cellulaire en :

- activant la protéine phosphatase **Cdc25A** (nécessaire pour l'entrée en phase S)
- formant des complexes avec certains inhibiteurs de cdk (**p21/WAF1/cip1** et **p27/kip1**) permettant l'inactivation de ces protéines cellulaires et donc absence d'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2
- activant certains proto-oncogènes cellulaires (**c-myc** et **c-ras**) en coopération avec la protéine virale E6
- inhibant l'activité transcriptionnelle de la p53, par l'intermédiaire de l'interaction E7 avec **TBP** (*TATA-box binding protein*) (Massimi *et al.*, 1997)

De plus, E7 favoriserait l'expression de certaines molécules d'adhésion (**VCAM-1**, **ICAM-1**,...), nécessaires aux cellules métastatiques pour coloniser d'autres territoires.

Elle participerait également à l'échappement de la réponse immunitaire en inhibant l'activité du **TNF** (*tumor necrosis factor*) et de l'**IFN-alpha** permettant au virus HPV d'échapper à la réponse immunitaire.

Il a été aussi récemment montré que HPV16-E7 serait responsable d'anomalies centrosomiques et de polyploïdies chromosomiques et donc interviendrait dans l'instabilité génomique, favorisant la transformation tumorale des cellules. Cependant le mécanisme d'action est mal connu : E7 pourrait notamment interagir avec le gène **Mi-2bêta**, dont le produit, porteur d'une activité histone déacétylase HDAC, interviendrait dans le remodelage chromatinien (Howley *et al.*, 2001).

Enfin, d'autres cibles cellulaires sont décrites (M2 pyruvate kinase, *alpha*-glucosidase, ...) mais leurs rôles dans les mécanismes de transformation cellulaire sont pour l'instant inconnus (Howley *et al.*, 2001).

La figure 15 schématise l'ensemble des mécanismes évoqués.

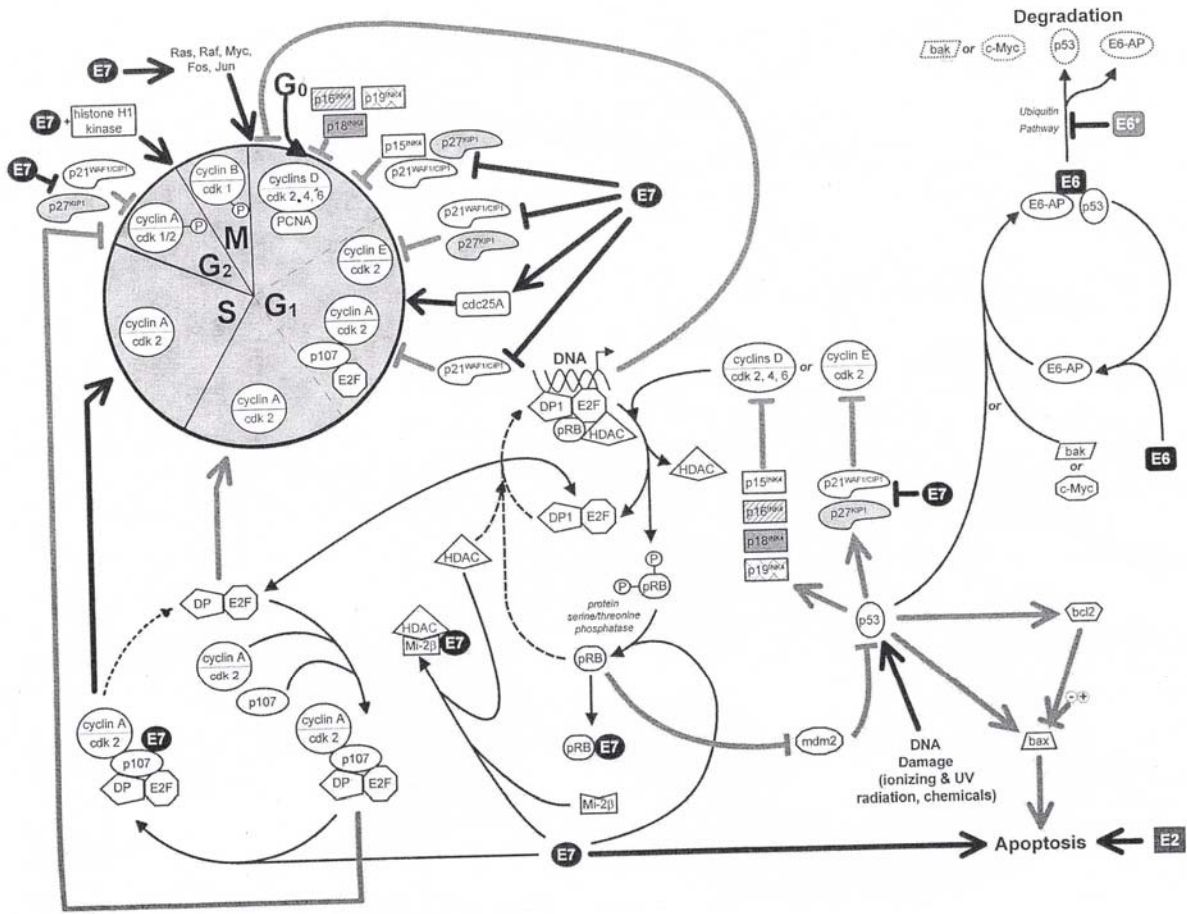


Figure 15 : principales interactions des oncoprotéines virales E6/E7 mises en jeu dans la processus de carcinogénèse (d’après Bonneze *et al.*, 2002).

2.5- Importance de la coopération E6/E7

Pour induire une immortalisation efficace et une transformation cellulaire en tumeur, les protéines pRB et p53 doivent être simultanément inactivées. Dans une cellule infectée par un HPV à haut risque oncogène exprimant E7 en l'absence de E6, la division cellulaire est stimulée et la p53 est activée par E7, *via* la protéine p19, en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. En présence de E6, la p53 est inhibée et la cellule est alors immortalisée. La coopération des 2 oncoprotéines virales permet à la cellule de proliférer indéfiniment et d'accumuler les anomalies chromosomiques (figure 16).

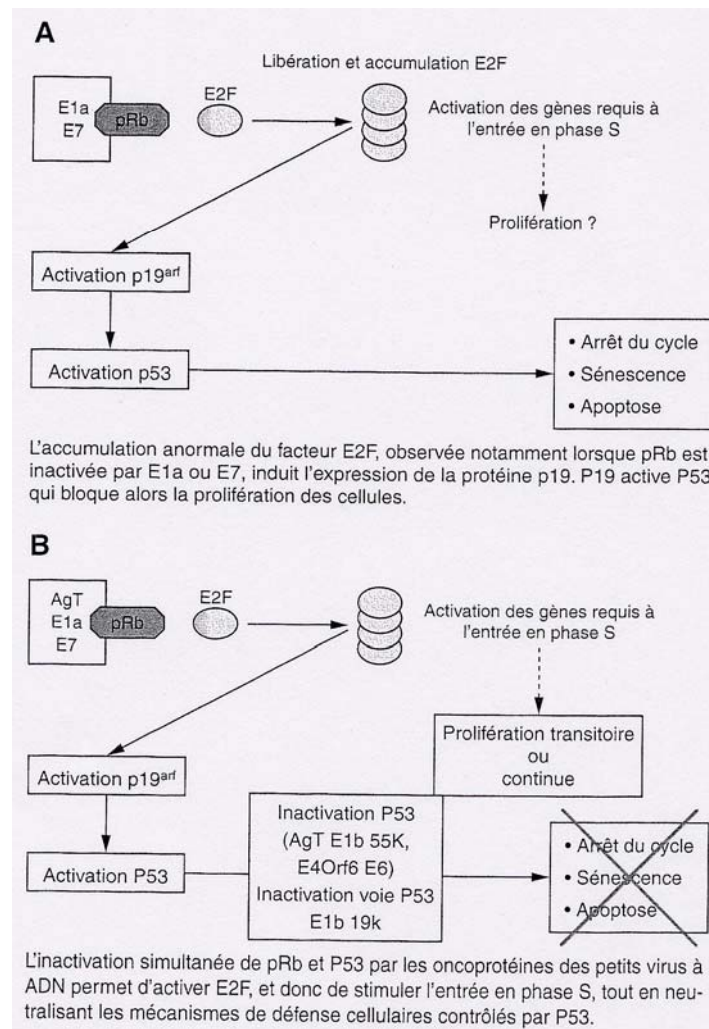


Figure 16 : base de la coopération moléculaire entre les oncoprotéines E6 et E7 (d'après Maréchal *et al.*, 1999)

Les protéines E6 et E7 coopèrent également pour activer plusieurs oncogènes cellulaires, en particulier **c-myc** et **c-ras**, pour une meilleure efficacité du processus tumoral.

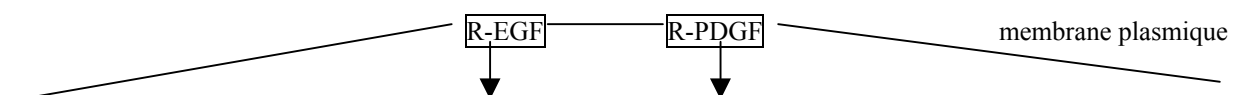
2.6- Rôle de la protéine E5

La protéine E5 des HPV est hydrophobe, en particulier dans sa région centrale et N-terminale. Cette propriété confère à la protéine la capacité à s'ancrer au niveau des membranes cellulaires et des compartiments subcellulaires (membranes nucléaires, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique et endosomes).

E5 est responsable de l'activation du **récepteur à l'EGF** (*epidermal growth factor*). Elle est capable d'interagir directement avec le récepteur R-EGF, en retardant le mécanisme d'endocytose (elle augmente donc sa demi-vie). De même, elle forme un complexe avec une protéine cellulaire de 16 kDa, entrant dans la constitution de la pompe à protons des endosomes : il en résulte une diminution de l'acidification des endosomes limitant la dégradation du récepteur. E5 peut aussi activer directement le **récepteur au PDGF** (*platelet derived growth factor*). Les activités MAP-kinases (*mitogen activated protein*) ainsi que l'expression des oncogènes cellulaires de type c-fos et c-jun (les produits de ces 2 oncogènes forment le complexe AP1), résultant de l'activation de ces récepteurs, sont augmentées. Ainsi, E5 favorise la prolifération et la différenciation cellulaire (figure 17).

Le facteur de transcription AP1 peut également se fixer sur des séquences spécifiques du génome viral et activer l'expression de certains gènes viraux.

E5 participerait donc au mécanisme de transformation cellulaire.



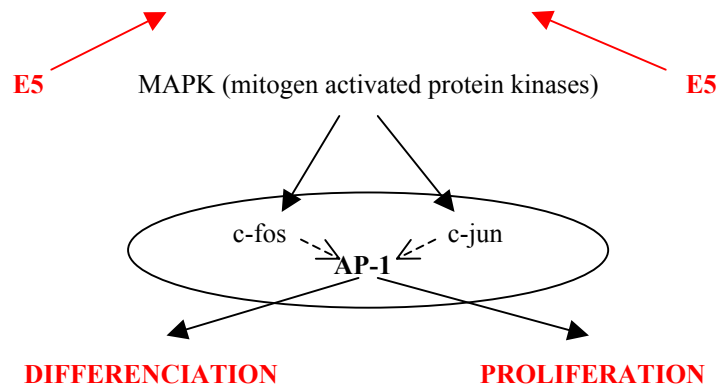


Figure 17 : mécanismes oncogènes de la protéine E5 (→ : activation)

Cependant, l'expression du gène E5 est faible voire nulle dans de nombreux cancers-HPV+, suggérant un rôle limité dans les cancers du col utérin. La protéine E5 interviendrait plutôt lors de la phase d'initiation, à un stade précoce du processus tumoral.

E5 semble également impliqué dans le défaut d'apprêtement des antigènes viraux, en diminuant l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (**CMH I**) et de la protéine **TAP1** (*transporter associated peptide*), laquelle permet le transport des antigènes vers la lumière du réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi après dégradation des protéines virales dans le protéasome. La protéine virale E5 participe donc au processus de tolérance immunitaire lors de l'infection HPV.

Les protéines virales E5, E6 et E7 participent donc au processus de transformation tumorale et à l'altération de la réaction immunitaire. Cependant, dans les cancers du col utérin, ce sont surtout E6 et E7 des HPV à haut risque oncogène, qui sont responsables de ces phénomènes. L'étude de la variabilité des gènes HPV16 codant pour ces 2 protéines présente donc un grand intérêt : les peptides issus de ces variants pourraient différer dans leur capacité à interagir avec certaines cibles cellulaires et modifier ainsi le pouvoir oncogène et immunogène de ces virus.

III- VARIATIONS GENOMIQUES DES REGIONS E6 ET E7 DE L'HPV16

Les papillomavirus sont des virus très anciens, relativement stables et ont évolué depuis des milliers d'années avec leurs hôtes. De nombreuses études ont montré la diversité de cette famille de virus, pouvant infecter l'Homme et les animaux.

1- VARIANTS HPV16 ET PROTOTYPE

La définition des termes « types », « sous-types » et « variants » (classification basée sur l'espèce d'origine et le degré d'homologie des génomes viraux) figure au chapitre I-3. Rappelons qu'au sein d'une même espèce (exemple : l'Homme) et d'un même génotype de papillomavirus, un variant HPV est classiquement défini comme ayant plus de 98% d'homologie de séquence nucléotidique avec le virus dit « prototype » (souche de référence). La séquence génomique des HPV de type 16 a pu être entièrement décodée pour la première fois chez une patiente allemande atteinte d'un carcinome invasif au niveau du col utérin (Seedorf *et al.*, 1985) et a constitué la séquence de référence des HPV16.

Par la suite, de nombreux travaux ont porté sur la variabilité des HPV16 à travers le monde (Chan *et al.* , 1992 ; Ho *et al.*, 1993 ; Yamada *et al.*, 1995, 1997 ; Hu *et al.*, 1999, 2001a ; Villa *et al.*, 2000 ; Matsumoto *et al.*, 2000 ; Tornesello *et al.*, 2000 ; Berumen *et al.*, 2001 ; Watts *et al.* , 2002 ; Picconi *et al.*, 2003).

2- EPIDEMIOLOGIE DES VARIANTS HPV16

Des analyses génétiques ont clairement montré l'appartenance de l'ensemble des variants HPV16 à 5 branches phylogéniques distinctes, en fonction de leur degré d'homologie et de leur origine géographique. Ces groupes de variants sont les suivants :

- E (*European*) : variants retrouvés dans le monde entier (principalement en Europe et en Amérique)
- As (*Asian*) : variants principalement retrouvés dans l'Asie du Sud-Est
- Af1 (*African 1*) et Af2 (*African 2*) : variants principalement retrouvés en Afrique
- AA (*Asian-American*) : variants retrouvés en Espagne, en Amérique Centrale et du Sud

Cette classification phylogénique a été établie à partir de différents travaux ayant étudié la variabilité de séquence de différents gènes. Ainsi, en 1993, l'analyse des séquences de la longue région de contrôle non codante (LCR) de 301 HPV16, isolés parmi 25 groupes ethniques d'origine géographique différente, a permis de distinguer 48 variants, qui ont été ensuite classés en 5 branches (Ho *et al.*, 1993). Les groupes E et As sont décrits comme des classes très proches, qui se distinguent nettement des 3 autres groupes Af1, Af2 et AA. Les mouvements de population dans l'Histoire pourraient expliquer la distribution géographique des variants HPV16 dans le monde, et en particulier la colonisation du Nouveau Monde par les Européens et l'esclavage de la population africaine pourraient justifier cette distribution au sein du continent Nord-Américain. Ces analyses confirment aussi le caractère très ancien de ces virus et leur longue évolution parmi les espèces, dont l'espèce humaine (Chan *et al.*, 1992 ; Ho *et al.*, 1993).

D'autres auteurs ont élargi la recherche de variants au niveau des régions codantes et en particulier E6, L1 et L2, afin de les comparer aux variations dans la LCR (Yamada *et al.*, 1995). Les 29 séquences d'HPV16 isolées dans cette étude américaine (Etats-Unis) ont été alignées, analysées et présentées sous forme d'arbre phylogénique, confirmant le regroupement de ces variants en plusieurs branches distinctes, précédemment décrites : E et As (As est même un sous-groupe parmi E), Af1 et Af2, AA. Cet arbre phylogénique fait également apparaître une souche très proche du groupe AA appelée NA1 (*North American 1*) et une nouvelle sous-classe au sein du groupe E, correspondant à une mutation ponctuelle au

niveau du nucléotide 131 (A→G) placé sur le gène codant pour l'oncoprotéine E6. La région L1 apparaît ici comme la plus conservée du génome alors que L2, avec la LCR, est la plus variable. La comparaison des variants dans les différentes régions du génome semble aussi indiquer que les recombinaisons entre les variants sont rares voire inexistantes.

Plus récemment, une large étude a été menée sur 407 cancers invasifs cervicaux dans 22 pays répartis sur les 5 continents. Les analyses phylogéniques ont porté sur les séquences E6, L1 et la LCR. L'analyse combinée des séquences LCR, L1 et E6 montre précisément les différentes mutations associées à chaque classe (E, Af1 et Af2, AA et NA) (Yamada *et al.*, 1997). Des sous-classes sont également décrites : As (sous-classe du groupe E), Af1-a, Af1-b, Af1-c, Af1-d, etc.... La répartition géographique des différents variants est représentée figure 18 et les résultats obtenus corroborent parfaitement les précédents travaux :

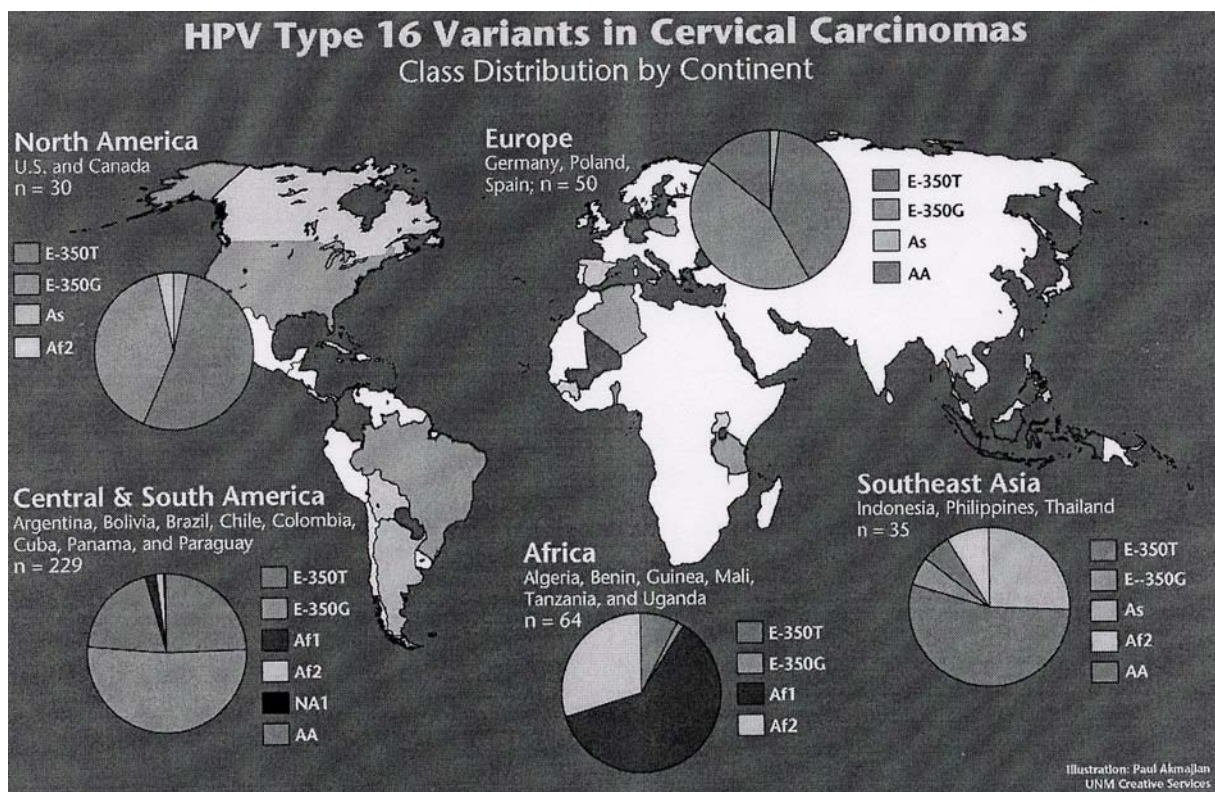


Figure 18 : répartition mondiale des principaux groupes de variants HPV16 au niveau des régions E6, L1, L2 et LCR. La classe E est divisée en 2 principales sous-classes en fonction d'une mutation ponctuelle fréquemment décrite au niveau du nucléotide 350 (T→G) (d'après Yamada *et al.*, 1997)

D'autres auteurs se sont intéressés à la variabilité de l'oncogène E7 (Icenogle *et al.*, 1991 ; Eschle *et al.*, 1992 ; Hu *et al.*, 2001b). Ces auteurs n'ont reporté que peu de mutations sur la région E7, contrairement à la LCR du génome HPV16. E7 semble donc être un gène particulièrement stable. L'étude de Eschle, publiée en 1992, comprenait 32 biopsies génitales tumorales provenant de Tanzanie et d'Allemagne (l'HPV16 de référence a été isolé chez une patiente d'origine germanique). En comparant les séquences obtenues, ces auteurs ont montré une forte dépendance géographique à la présence de mutants E7 : en effet, aucune mutation n'est observée pour les 10 HPV16 isolés en Allemagne alors que 19 sur 22 souches africaines présentent des mutations.

Enfin, une étude sur la variabilité du gène E5 dans différentes régions du monde a également attribué une relation entre certains variants E5 (mutation au niveau du nucléotide 4042) et leur origine géographique (Eriksson *et al.*, 1999).

3- INTERETS DE L'ETUDE DE CETTE VARIABILITE

Les différentes recherches sur la variabilité du génome HPV16 ont recensé uniquement des mutations ponctuelles : aucune délétion ou insertion n'a été observé. Parmi les mutations recensées, certaines engendrent le changement d'un acide aminé lors de la traduction protidique, par rapport à la protéine d'origine, mais cette modification ne concerne pas toutes les mutations. Il peut être intéressant d'étudier les mutations susceptibles de modifier la structure des protéines virales car les propriétés fonctionnelles ou antigéniques de ces peptides pourraient en être affectées. Il a d'ailleurs été décrit que certaines mutations au niveau des gènes L1 et L2, codant pour les protéines de capsid, seraient responsables de la modification d'épitopes à la surface des particules virales, participant au phénomène d'échappement au système immunitaire ou de non susceptibilité à un vaccin par exemple (Strang *et al.*, 1990). Par conséquent, certains variants HPV16, notamment au niveau des régions E6 et E7, pourraient avoir un pouvoir oncogène accru et seraient plus fréquemment associés au développement de lésions cancéreuses.

Une étude africaine (Tornesello *et al.*, 2000) a mis en évidence, au sein d'une population mâle atteinte de carcinome pénien, que certains réarrangements ou mutations au niveau de la région LCR (concernant des HPV du groupe Af1) du génome HPV étaient responsables d'une augmentation de l'activité promotrice de la LCR et donc de l'activité transformante des oncoprotéines virales E6 et E7 (études *in vitro* sur cellules fibroblastiques murines NIH3T3), suggérant que certaines variations pourraient jouer un rôle majeur dans l'évolution des lésions génitales vers un processus tumoral (Tornesello *et al.*, 2000). Cependant, l'augmentation de l'activité transformante dans ce groupe n'était pas significative par rapport à celle du groupe E-prototype.

Concernant la région E6 des HPV16, plusieurs travaux ont été publiés afin d'étudier la valeur pronostique de certains variants sur l'évolution des lésions cervicales. La variabilité du gène E7 a été plus rarement explorée.

4- VARIABILITE DU GENE E6

4.1- Variabilité selon l'origine géographique

4.1.1 Définition des variants E6 des 5 branches géographiques

Les principales variations portant sur le gène E6 selon leur appartenance aux classes AA, Af1, Af2 et NA1 (ainsi que la sous-classe As) et comparées à la souche prototype du groupe E sont reportées dans le tableau III.

Tableau III : principales variations du gène et de la protéine E6 dans les différents groupes géographiques d'HPV16 (d'après Yamada *et al.*, 1995, 1997). En gras figurent les mutations spécifiques à chacun des groupes

position et type de la mutation	classes
T178G → Asp25Glu	As (sous-classe du groupe E)
C143G et G145T → Gln14Asp T286A → absence A289G → absence C335T → His78Tyr	Af (Af1 et Af2)
G145T → Gln14His T286A → absence A289G → absence T350G → Leu83Val A532G → absence	AA
G145T → Gln14His T286A → absence A289G → absence C335T → His78Tyr T350G → Leu83Val	NA1

D'autres mutations sur le gène E6 sont décrites au sein des différents groupes et définissent des sous-classes et sont parfois couplées à des mutations spécifiques sur L1. Elles sont répertoriées dans le tableau IV.

Tableau IV : mutations spécifiques sur E6 et L1 au sein des groupes E, Af (Af1-a à Af1-d ; Af2-a et Af2-b) et AA (AA-a à AA-d) (d'après Yamada et al., 1997)

Mutations spécifiques au niveau de E6	Mutations spécifiques au niveau de L1	Sous-classes
G132C	aucune	Af1-a
G132C et A532G	aucune	Af1-b
A131G	aucune	Af1-c
A131G et G132C	aucune	Af1-d
T109C, G132T et A403G	aucune	Af2-a
aucune	aucune	Af2-b
aucune	G6721A et A6803T	AA-a
aucune	aucune	AA-b
E6 T183G	G6721A	AA-c

4.1.2 Variants géographiques E6 et pouvoir oncogène

Selon certains auteurs, les variants géographiques appartenant aux groupes non-E seraient plus oncogènes et plus fréquemment associés au cancer du col utérin. Les travaux de Berumen menés à Mexico, montrent que les HPV16 du groupe AA, au sein d'une cohorte de femmes mexicaines (181 sont atteintes de carcinome cervical et 181 constituent un groupe contrôle « normal »), sont plus fréquemment associés au cancer du col que les variants du groupe E. De plus, les variants AA sont plus souvent retrouvés chez des femmes jeunes, suggérant un pouvoir oncogénique plus important et une progression plus rapide vers le cancer qu'avec les variants du groupe E (Berumen *et al.*, 2001). Ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait que ces variants AA ont une activité promotrice (p97) 3 fois plus élevée que celle du prototype E (liée à une mutation en position 7729), donc expriment plus fortement les protéines oncogènes (Kämmer *et al.*, 2002) et induisent de manière plus importante la dégradation de la p53 (Stöppler *et al.*, 1996).

Une étude américaine (Xi *et al.*, 1997) a également comparé le risque relatif de développer des lésions précancéreuses (bas grade et haut grade) selon que les HPV16 isolés chez les

patientes appartiennent au groupe « non-prototype » (AA, Af, variants du groupe E dont As) ou « prototype ». Cette étude introduit donc la notion de risque oncogène différent selon les variants HPV16. Les HPV16 « non-prototype » confèrent un risque significativement plus important comparés aux souches « prototype », en sachant que la grande majorité des souches HPV16 du groupe « non-prototype » n'appartiennent pas au groupe E. Ceci suggère que les HPV16 appartenant au groupe E ont un pouvoir oncogène plus faible par rapport aux HPV16 appartenant aux groupes AA, NA1 et Af1/Af2.

Une étude brésilienne (Villa *et al.*, 2000) corrobore ces résultats : les infections génitales à HPV16 n'appartenant pas au groupe E persistent plus longtemps et sont plus fréquemment associées aux lésions cervicales précancéreuses que les infections à HPV16 de la classe E. Les cofacteurs associés aux infections HPV (tels que la malnutrition, le manque d'accès aux soins, l'âge précoce des premiers rapports sexuels, etc...), particulièrement importants dans les pays en voie de développement, ne suffisent pas à eux seuls à expliquer la forte incidence des cancers cervicaux en Afrique et en Amérique Latine par rapport aux pays européens et d'Amérique du Nord. Les variants HPV16 non-E, particulièrement nombreux dans ces pays en voie de développement par rapport au reste du monde, pourraient avoir un risque oncogène plus élevé et représenter un facteur supplémentaire contribuant aux différences d'incidence des cancers du col utérin dans les différentes régions du monde (Villa *et al.*, 2000).

Enfin, selon certains auteurs (Kämmer *et al.*, 2002), le potentiel oncogénique des *clusters* AA et NA serait influencé par les polymorphismes de la région LCR (en particulier ceux qui induiraient des modifications de l'activité du promoteur p97), alors que dans le cluster E, il semblerait davantage associé aux variants E6. Rappelons que le groupe E est présent dans le monde entier et est largement représenté en Europe et en Amérique. L'étude de la variabilité du gène E6 semble donc intéressante pour essayer d'évaluer la relation entre certains mutants et le risque de développer un cancer du col utérin.

4.2- Variant E-T350G

4.2.1 Répartition mondiale du variant E-T350G

Au sein du groupe E, le plus largement répandu dans le monde parmi les femmes atteintes de carcinome cervical (environ 67% des HPV16 selon Yamada *et al.*, 1997), la mutation la plus fréquente au niveau du gène E6 et aussi la plus couramment décrite est celle figurant au niveau du nucléotide 350. La souche HPV16 prototype comporte une base T (thymidine) en position 350 alors que les mutants présentent tous une base G (guanine). Cette mutation entraîne une modification de la protéine au niveau du codon 83 : l'acide aminé leucine (Leu) est remplacé par une valine (Val). Selon Yamada et ses co-auteurs (Yamada *et al.*, 1997), parmi les 407 femmes atteintes de cancer du col utérin et infectées par un HPV16, 156 présentaient le variant E-T350G (soit 38% de la population) et la répartition de ce variant dans les 5 continents parmi les HPV16 isolés est le suivant :

- 44% en Europe
- 40% en Amérique du Nord
- 52.2% en Amérique Centrale et en Amérique du Sud
- 5.7% en Asie du Sud-Est
- 1% en Afrique

4.2.2 Variant E-T350G et risque de cancer cervical

Certains auteurs ont montré au sein d'une population féminine suédoise que la mutation E-T350G était fortement associée aux lésions précancéreuses de haut grade (en particulier les CIN3) et aux carcinomes invasifs (ICC) par rapport à l'HPV16 de référence, qu'elle soit ou non associée à d'autres variations sur les gènes E6 et E7. De plus, cette mutation serait liée à un risque de progression plus important des lésions précancéreuses de bas grade vers des lésions de haut grade, mais aussi du stade HGSIL au stade de carcinome invasif (Zehbe *et al.*, 1998b). Cette étude corrobore les résultats de précédents travaux (Londesborough *et al.*, 1996 ; Yamada *et al.*, 1997) et de récentes publications, ayant élargi l'étude de ce type de variant à d'autres régions géographiques, ont confirmé les précédents résultats (Stephen *et al.*, 2000, en Chine ; Watts *et al.*, 2002, en Australie et en Nouvelle-

Calédonie ; Kämmer *et al.*, 2002, en Finlande et Suède ; Radhakrishna *et al.*, 2002, en Inde ; Picconi *et al.*, 2003, en Argentine). Les travaux menés en Inde ont montré une importante distribution du variant E-T350G à tous les stades de la maladie (LGSIL, HGSIL, carcinome invasif) mais surtout aux stades de lésions de haut grade et de cancer invasif.

De plus, certaines mutations, associées au variant E-T350G, pourraient jouer un rôle dans la progression des lésions cervicales : par exemple, le variant E-T350G associé au variant G145T est préférentiellement retrouvé chez les femmes jeunes (<45 ans) aux stades de HGSIL et carcinome, suggérant qu'il est plus agressif et qu'il accélérerait le processus tumoral (Radhakrishna *et al.*, 2002).

Cependant, ces résultats sont remis en cause par différentes études, menées en Allemagne (Nindl *et al.*, 1999), en Suède (Hu *et al.*, 1999, 2001b ; Andersson *et al.*, 2000), en Angleterre (Brady *et al.*, 1999), en Russie (Hu *et al.*, 2001a), en Suède et en Italie (Zehbe *et al.*, 1998a). Dans cette dernière étude, le variant E-T350G semble avoir une oncogénicité différente selon la population étudiée. Ainsi, la distribution de ce variant dans les différents stades de la maladie (CIN et carcinome) montre d'importantes différences entre les 2 populations : au sein de la population suédoise, il apparaît comme un facteur de haut risque d'évolution des lésions vers un carcinome cervical (il représente 27% des CIN contre 69% des carcinomes invasifs) alors que dans la population italienne, il est principalement retrouvé dans les CIN (70% contre 15% dans les lésions cancéreuses invasives).

Ces données soulignent à nouveau l'importance de l'origine géographique dans l'évolution des infections HPV16 mais suggèrent également l'existence de facteurs génétiques, variables selon les différents groupes géographiques, voire même ethniques.

4.3- Autres variants du gène E6

De nombreux variants au niveau du gène E6 ont été décrits. Certains variants sont particulièrement liés à l'origine géographique (Yamada *et al.*, 1995, 1997 ; Wheeler *et al.*, 1997), avec notamment le variant T178G (Asp25Glu), décrit en Asie du Sud-Est (Matsumoto *et al.*, 2000 ; Watts *et al.*, 2002).

Dans la majorité des études, le variant 350G est cependant le plus largement représenté. C'est probablement pourquoi la plupart des auteurs ont étudié plus spécifiquement ce variant et n'ont pas analysé séparément les autres variants, trop peu nombreux pour aboutir à des analyses statistiques significatives, permettant de mettre en évidence une possible relation entre ces variants et l'évolution clinique. Cependant, il a été décrit que le variant E6 350G associé au variant E6 145T pourrait être plus oncogène que le variant 350G isolé, puisqu'il atteint plus particulièrement les femmes jeunes, et qu'à l'inverse, le variant 350G associé au variant E6 419G serait protecteur car il est majoritairement retrouvé dans le groupe contrôle (Radhakrishna *et al.*, 2002).

4.4- Variants E6 et pouvoir oncogène

L'ensemble des données précédentes suggère que le pouvoir oncogène de certains variants serait déterminé par des prédispositions génétiques au sein des différents groupes de population, rendant les femmes plus ou moins susceptibles aux infections HPV. En effet, certains variants du gène E6, associés à certains polymorphismes de la protéine suppresseur de tumeur p53, confèreraient un risque accru de progression vers le cancer cervical (van Duin *et al.*, 2000). Selon les groupes ethniques, le gène de la p53 (constitué de 2 allèles) code pour une proline ou une arginine au niveau du codon 72.

Une étude hollandaise (van Duin *et al.*, 2000) a montré une prévalence élevée de prélèvements génitaux positifs en HPV16 parmi les patientes homozygotes arginine/arginine (au niveau de la p53). La présence de cet acide aminé en position 72 rendrait donc les femmes plus sensibles à l'infection HPV16 car la p53 serait plus facilement dégradée par la protéine virale E6. Cependant, ce polymorphisme n'est pas suffisant à lui seul pour faire augmenter le risque d'évolution des lésions cervicales en carcinome : dans le même groupe de patientes, le « variant 350T » est fortement associé au cancer cervical comparé au groupe de patientes ayant une proline en position 72 de la p53. Ces résultats suggèrent la nécessité d'une association entre un variant E6 et un certain polymorphisme au niveau de la p53 pour favoriser la progression tumorale.

Une autre étude (Klug *et al.*, 2001), menée au Pérou, a montré une différence non significative entre le polymorphisme isolé de la p53 et le risque de survenue d'un carcinome

du col, évoquant également la nécessité d'une association avec des variants au niveau du gène E6 (Klug *et al.*, 2001). Enfin, des travaux britanniques n'ont pas mis en évidence de relation entre ce même variant et le polymorphisme au niveau du codon 72 de la p53 (Brady *et al.*, 1999).

D'autres auteurs se sont intéressés aux substitutions d'acides aminés relatives aux variations du gène E6. En effet, certaines mutations seraient responsables de la modification structurale de l'oncoprotéine E6, augmentant ou diminuant son activité transformante et la dégradation de la protéine cellulaire antitumorale p53 (Stöppler *et al.*, 1996).

En effet, les HPV16 présentant des variations sur la protéine E6 en position 14, 78, 83 et 138, auraient une forte affinité pour la p53 (ce variant appartient en fait au groupe géographique AA selon Yamada *et al.*, 1997) et seraient plus fréquemment retrouvés dans les carcinomes tandis que les HPV16 ayant des variations protéiques E6 au niveau des codons 10, 14 et 78 (groupe Af2) seraient plus souvent isolés de patients ayant des lésions précancéreuses de type CIN. Le degré d'affinité de la protéine E6 pour la protéine suppresseur de tumeur p53 semble donc important dans le processus de progression tumorale (Stöppler *et al.*, 1996).

Enfin, la partie C-terminale de l'oncoprotéine E6 (codons 96 à 105, 106 à 115 et 118 à 132) est importante pour la liaison de la p53 (propriété commune à tous les types de papillomavirus, mais qui ne permet pas la dégradation de la p53) tandis que certains résidus dans la partie N-terminale de E6 sont impliqués dans la dégradation de la p53 (codons 3, 10, 11, 78) et sont spécifiques des HPV à haut risque oncogène (Crook *et al.*, 1991).

4.5- Variants E6 et pouvoir immunogène

Les molécules de classe I (HLA A, B, C) et de classe II (HLA DP, DQ, DR) du CMH jouent un rôle très important dans la reconnaissance des antigènes viraux par les lymphocytes T. L'augmentation du risque de développement tumoral d'un variant HPV16 pourrait être dû à un déficit de la présentation de peptides viraux par les molécules HLA, permettant au virus d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire.

Certaines études sont en faveur d'une association entre certains profils HLA et la susceptibilité à l'infection HPV16 : par exemple, les travaux de Bontkes (Bontkes *et al.*, 1998) montrent que le type HLA DRB1*07 est significativement plus représenté dans le

groupe de patientes HPV16+ comparé au groupe contrôle, mais aucune relation n'a pu être mise en évidence entre cet HLA et le risque de progression des lésions. Cependant, une étude britannique a permis de montrer que ce type HLA DRB1*07 était fréquemment retrouvé parmi les patientes atteintes de cancer du col utérin (Brady *et al.*, 2000). Si certains haplotypes augmentent le risque d'infection HPV16 et de progression des lésions, certains sont décrits comme protecteurs vis-à-vis du cancer du col, notamment le type HLA B15 (Brady *et al.*, 2000 ; Zehbe *et al.*, 2003).

Le risque d'infection par le virus et d'évolution rapide des lésions précancéreuses en tumeur pourrait être dû à l'association de certains types HLA avec des variants HPV16 spécifiques, en particulier dans la région E6 du génome viral. Il a été montré que le type HLA DRB1*07 était plus fréquemment retrouvé chez les femmes infectées par le variant E6 T350G, comparé au prototype E6 350T (Bontkes *et al.*, 1998). Ces résultats corroborent ceux de Ellis (Ellis *et al.*, 1995) qui a identifié, chez les patients HLA B7+, le variant E6 E-A131G (correspondant à un changement d'acide aminé en position 10 : une arginine est remplacée par une glycine) avec une fréquence de 30%, contre aucune mutation sur le gène E6 chez les individus HLA B7-. Bien que cette mutation ne semble pas affecter la liaison de l'épitope viral à HLA B7, il est probable qu'il existe une altération significative dans la séquence d'acides aminés nécessaire à l'interaction efficace avec le récepteur des lymphocytes T cytotoxiques.

De récents travaux suédois (Zehbe *et al.*, 2003) ont également mis en évidence que les types HLA de classe I B*44, B*51 et B*57, associés au variant T350G, avaient un risque 4 à 5 fois plus important de développer un carcinome invasif par rapport au groupe contrôle.

Cependant, une étude britannique (Brady *et al.*, 2000) n'a retrouvé aucun haplotype HLA de classe I ou II en corrélation avec ce même variant.

Les molécules de classe II du CMH seraient également impliquées : selon Zehbe et co-auteurs (Zehbe *et al.*, 2001), l'haplotype DR04-DQ03 est particulièrement associé au variant T350G, dans 3 populations étudiées (Suède, Italie, République Tchèque), mais ce type HLA est plus fréquemment retrouvé en Suède par rapport aux 2 autres pays, pouvant expliquer que ce variant présente un risque plus élevé pour la population suédoise (Zehbe *et al.*, 1998a). Les autres variants du gène E6 sont en nombre trop faible pour avoir des résultats statistiquement significatifs, donc l'ensemble des auteurs suggère de réaliser des études épidémiologiques plus larges.

5- VARIABILITE DU GENE E7

La variabilité du gène E7 a été beaucoup moins étudiée que celle du gène E6. De plus, l'ensemble des travaux concernant la région E7 montre que c'est une région très conservée du génome HPV : peu de mutations (mutations ponctuelles comme E6) sont décrites et peu correspondent à des substitutions d'acides aminés au niveau de l'oncoprotéine E7.

5.1- Variabilité du gène E7 selon l'origine géographique

La variabilité du gène E7 selon les régions géographiques demeure peu établie : les travaux d'Eschle et ses co-auteurs ont montré la forte incidence de certains variants E7 (T789C et T795G sans changement d'acide aminé ; A647G, correspondant à la modification d'un acide aminé en position 29 : Asn29Ser) dans le groupe de patients en Tanzanie, contrairement au groupe européen Allemand, suggérant une répartition géographique des variants E7 (Eschle *et al.*, 1992).

5.2- Variant A647G

Il correspond à une modification structurale de la protéine E7 au niveau du codon 29 : l'asparagine est remplacée par une sérine. Ce variant, décrit dans plusieurs études (Icenogle *et al.*, 1991 ; Eschle *et al.*, 1992 ; ...), serait plus souvent associé aux lésions cancéreuses du col de l'utérus par rapport à la souche prototype (Song *et al.*, 1997) et serait aussi fréquemment retrouvé dans les carcinomes anaux (Youk *et al.*, 2001). Cependant ces résultats sont controversés : le variant 647G est uniformément retrouvé à tous les stades cliniques de la maladie et est également isolé de prélèvements génitaux normaux (Icenogle *et al.*, 1991 ; Fujinaga *et al.*, 1994).

Certains auteurs (Fujinaga *et al.*, 1994) se sont intéressés au pouvoir oncogénique de ce variant : la protéine E7 mutée au niveau du codon 29 (sérine) présente un pouvoir transformant identique à la souche prototype, après la mesure de la coopération E7/Ras sur des cellules fibroblastiques embryonnaires de rat.

De plus, le changement d'acide aminé en position 29 est impliqué dans la liaison avec la pRB et pourrait modifier l'affinité de la protéine pour la pRB, d'où une modification du pouvoir oncogène. Mais, il a été prouvé que le variant A647G seul se lie avec une affinité identique à celle du prototype (Chow *et al.*, 2000).

Enfin, comme pour la protéine E6, certains sites de la protéine E7 sont déterminants dans la reconnaissance d'épitopes par les cellules du système immunitaire, en particulier la séquence d'acides aminés 21 à 34 (Kast *et al.*, 1994 ; Jenison *et al.*, 1991). Des hypothèses ont été émises sur une modification de la réaction immunitaire par ce variant (Fujinaga *et al.*, 1994 ; Song *et al.*, 1997), mais elles n'ont pas encore été élucidées.

5.3- Autres variants E7

Les autres variants E7 sont peu nombreux et ne sont parfois décrits qu'une seule fois dans la littérature. De plus, peu de ces variants correspondent à des modifications protéiques : G549A (Gly3Glu), T633G (Cys24Trp), A671G (Glu37Gly) (Chow *et al.*, 2000) et A645C (Leu28Phe) (Youk *et al.*, 2001).

Certains variants seraient associés à une modification de la liaison à la pRB : le variant A647G associé au variant T633G a une affinité significativement plus faible par rapport au prototype (ce variant jouerait un rôle protecteur mais n'a pas été confronté à des données cliniques) (Fujinaga *et al.*, 1994).

De plus, le changement d'acide aminé en position 28 correspond à un site majeur de liaison de l'oncoprotéine E7 à la pRB (acides aminés 21 à 29) ; mais il n'a pas été montré d'augmentation du potentiel oncogène chez ce variant.

A partir de l'ensemble de ces études, il nous a semblé particulièrement intéressant d'étudier la variabilité des gènes E6 et E7 d'HPV16, isolés de prélèvements génitaux de femmes dans la région nantaise, et de comparer nos résultats avec les données de la littérature.

MATERIELS ET METHODES

I- MATERIELS

1- POPULATION ETUDIEE

Entre le 1^{er} janvier 2000 et le 31 décembre 2002, 78 femmes, chez lesquelles un HPV16 a été détecté et typé au niveau génital, ont été incluses dans cette étude rétrospective. Ces patientes consultaient, soit dans le cadre d'un suivi systématique, soit à la suite d'un frottis anormal pratiqué en ville, soit aux urgences gynécologiques. Elles étaient âgées de 20 à 75 ans (moyenne d'âge de 35.2 +/- 11,2), avec une répartition selon l'âge comme suit (figure 19) :

- 23 femmes âgées de 20 à 29 ans (29.5%)
- 34 femmes âgées de 30 à 39 ans (43.6%)
- 13 femmes âgées de 40 à 49 ans (16.7%)
- 5 femmes âgées de 50 à 59 ans (6.4%)
- 3 femmes âgées de plus de 59 ans (3.8%)

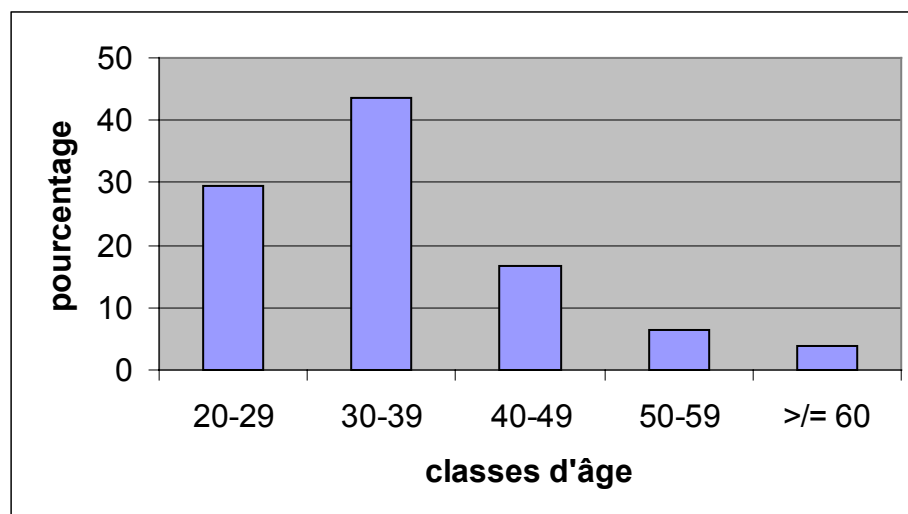


Figure 19 : répartition des HPV16 (en pourcentage) dans la population étudiée par tranches d'âge (en années)

2- PRELEVEMENTS

Les prélèvements génitaux analysés dans cette étude correspondent, pour chaque patiente, à un frottis cervico-vaginal associé ou non à une biopsie, et adressé(s) parallèlement au laboratoire d'anatomo-pathologie et au laboratoire de virologie.

Les frottis cervicaux et les biopsies envoyés au laboratoire d'anatomo-pathologie ont été analysés au microscope après coloration par la méthode traditionnelle de Papanicolaou. La classification de Bethesda instituée en 1991 et classant les anomalies malpighiennes en corrélation avec les lésions histologiques, a été utilisée pour décrire les lésions cervicales observées.

Les cytobrossages ont été effectués à l'aide d'une brosse endocervicale type Cytobrush ou Scrinet permettant de recueillir un plus grand nombre de cellules par rapport à l'utilisation d'un écouvillon classique. Ils ont ensuite été placés dans un tube contenant un millilitre de tampon PBS stérile (*Phosphate Buffer Saline*). Quant aux biopsies, elles ont été effectuées à l'occasion d'une colposcopie et placées dans un pot stérile sans milieu de transport ni PBS. Ces biopsies et cytobrossages ont ensuite été acheminés au centre de tri des laboratoires du C.H.U. de Nantes puis au laboratoire de virologie au niveau de l'unité de préamplification (pré-PCR) afin d'en extraire l'ADN viral.

L'extraction d'ADN à partir de brossages d'endocol a été réalisée à l'aide du Minikit QIAamp DNA* (QIAGEN) et l'extraction d'ADN à partir des biopsies est une extraction phénol-chloroforme classique (Life Technologie). Ces techniques d'extraction sont décrites en annexe 1 (page 95).

Une amplification génique (PCR), utilisant les amorces consensus MY09/MY11 (ciblant la région L1 des HPV), est effectuée pour mettre en évidence la présence d'HPV. Le séquençage du fragment amplifié permet secondairement de génotyper le papillomavirus.

Pour toutes les patientes de cette étude, un HPV de type 16 a ainsi été mis en évidence. Ces extraits d'ADN cellulaire, conservés à -20°C en pièce d'extraction, ont été utilisés dans cette étude pour amplifier et séquencer spécifiquement les régions E6 et E7 du virus.

Au total, 89 échantillons ont pu être analysés. Ils proviennent de 64 brossages et de 25 biopsies (20 biopsies du col utérin et 5 biopsies vulvaires). Parmi les 89 extraits d'ADN, 84

ont pu être amplifiés et séquencés pour la région E6 et 88 pour la région E7. Ainsi, 83 extraits ont pu à la fois être analysés en E6 et E7.

3- TEMOINS POSITIFS

Une solution de plasmide renfermant la totalité du génome HPV16 (Institut Pasteur, Dr Orth) a servi de témoin positif. A partir de la solution mère à la concentration de 460ng/μl, 4 dilutions ($10^{-6}/10^{-7}/10^{-8}/10^{-9}$) ont été testées à chaque température et à chaque concentration en MgCl₂ afin d'étudier la sensibilité de la technique.

II- METHODES

La figure 20 résume les différentes étapes du séquençage des régions E6 et E7 réalisées dans cette étude :

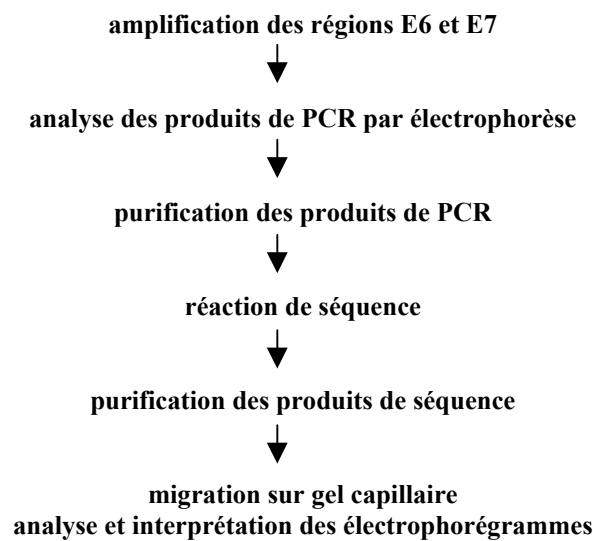


Figure 20 : différentes étapes du séquençage des régions E6 et E7

1- CHOIX DES AMORCES

1.1- Amorces choisies pour la PCR E6

Les amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la région E6 du génome de l'HPV de type 16 sont décrites dans le tableau V. Elles sont synthétisées par Genosys. Elles ont été choisies en référence à la publication de Luxton et collaborateurs (Luxton *et al.*, 2000). Ces amorces permettent d'amplifier un fragment de 469 paires de bases du nucléotide

94 au nucléotide 562 (figure 21), alors que la partie du gène, codant pour la protéine E6, est comprise entre les nucléotides 83 et 559.

Tableau V : amorces utilisées pour l'amplification de la région E6

	Séquence 5' → 3'	Tm* (en °C)	Position**
HPV16 E6 1A (Genosys)	5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGG-3'	58	94-113
HPV16 E6 2A (Genosys)	5'-TGATTACAGCTGGGTTTCTC-3'	58	543-562

*Tm : température de fusion

**Position sur le génome HPV16 en nucléotides

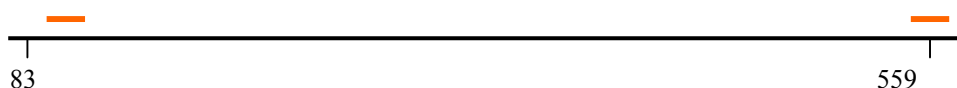


Figure 21 : position des amorces (en orange) sur le gène codant pour la protéine E6 des HPV16 (nucléotides 83 à 559)

1.2- Amorces choisies pour la PCR E7

Les amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage de la région E7 du génome HPV16 sont décrites dans le tableau VI. Elles sont synthétisées par Genosys.

Peu de travaux expérimentaux ont été menés sur la variabilité génomique de l'oncogène E7 des HPV. En conséquence, les amorces ont été construites à partir de banques de données génomiques (Genbank) permettant d'accéder à la séquence de référence du gène E7 (la partie codante pour l'ensemble de la protéine E7 de l'HPV16 est comprise entre les nucléotides 562 et 858), et à l'aide de logiciels informatiques (Oligo*, Blast*) afin d'optimiser ce choix.

Certaines conditions doivent être respectées :

- leur composition en bases doit être équilibrée et ne doit pas correspondre à des séquences génomiques répétées (éviter surtout les longues répétitions de CG)
- les Tm des 2 amorces ne doivent pas être trop différents l'une de l'autre
- absence d'hybridation inter et intra-amorces
- spécificité des amorces pour la cible analysée à travers les banques de données génomiques

L'analyse de spécificité de nos amorces, à l'aide du logiciel Blast*, a montré une possible interférence avec de l'ADN humain. En conséquence, un échantillon d'ADN humain commercialisé par Roche, à la concentration de 0.20 µg/µl, a été utilisé dans la mise au point de la PCR pour chaque série et testé en parallèle des échantillons positifs, pour s'assurer de la spécificité des amorces vis-à-vis de l'HPV16. Aucune amplification avec cet échantillon n'a été observé. Il a donc servi de témoin négatif dans chaque série.

La longueur du fragment E7, amplifié avec ces amorces, est de 352 paires de bases. Cette région amplifiée est située entre les nucléotides 546 et 897 du génome HPV16 (figure 22).

Tableau VI : amorces utilisées pour l'amplification de la région E7

	Séquence 5' → 3'	Tm* (en °C)	Position**
HPV16 E7 A (Genosys)	5'-AAACCCAGCTGTAATCATGCA -3'	60	546-566
HPV16 E7 B (Genosys)	5'-CTCTTCCCCATTGGTACCTG- 3'	62	878-897

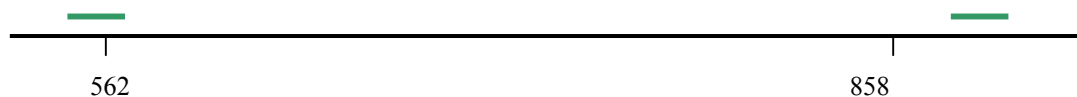


Figure 22 : position des amorces (en vert) sur le gène codant pour la protéine E7 des HPV16 (nucléotides 562-858)

2- PARAMETRES OPTIMISES DANS LA MISE AU POINT DE LA PCR

Les réactifs nécessaires à l'amplification des régions E6 et E7, comprenant le tampon de réaction 10X (sans adjonction de chlorure de magnésium), les désoxyribonucléotides (dAUGC), le chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et l'enzyme thermostable ou Taq polymérase (*Thermus aquaticus*) sont fournis par le laboratoire Promega.

Les paramètres testés dans la mise au point de ces 2 PCR sont la température d'hybridation des différentes amorces et la concentration en chlorure de magnésium.

2.1- La température d'hybridation des amorces

La température de fixation des amorces (T_m) est déterminée théoriquement grâce aux pourcentages respectifs des bases CG et AT contenues dans les amorces. En pratique, la température idéale est souvent plus faible, de l'ordre de 5°C en dessous du T_m théorique. Lorsque le T_m est trop faible, des bandes non spécifiques apparaissent et s'il est trop élevé, le signal devient très faible et peut même disparaître, la sensibilité est donc diminuée. Cette température d'hybridation est donc variable selon les amorces choisies. Trois températures d'hybridation différentes ont été testées pour chaque amplification.

2.2- La concentration en chlorure de magnésium

La concentration en $MgCl_2$ est très importante à ajuster. En effet, le chlorure de magnésium en excès peut être un inhibiteur de la polymérase, enzyme permettant la réaction de répllication de l'ADN, mais il est indispensable à la réaction d'amplification pour la stabilisation des nucléotides. En général, les concentrations optimales sont comprises entre 1 et 3 mM. Quatre concentrations en chlorure de magnésium ont été testées pour la PCR E6 et E7 : 1.5mM, 2mM, 2.5mM et 3mM.

2.3- Autres réactifs constituant les mélanges réactionnels

Les autres réactifs présents dans chaque mélange réactionnel sont :

- 2.5µl de tampon, utilisé à la concentration initiale 10X (reçu au laboratoire sous forme congelée, prête à l'emploi et constitué de Tris HCl 100mM, de KCl 500mM et de 0.1% de Triton*X-100)
- 2µl de nucléotides dNTP, à la concentration initiale de 2.5mM (chaque nucléotide dATP, dGTP, dCTP et dTTP est reçu sous forme congelée à la concentration de 100mM et est ensuite dilué au 1/10^{ème} ; le mélange des nucléotides en quatre fractions égales donne la solution de dNTP à la concentration de 2.5mM)
- 0.125µl de Taq, prête à l'emploi sous forme congelée et liquide, à la concentration de 5UI/µl
- 1.25µl de chaque amorce, à la concentration de 20µM. Elles sont commercialisées sous forme lyophilisée et reconstituées en eau distillée à la concentration de 200µM. Puis, elles sont diluées au 1/10^{ème}, aliquotées et congelées à -20°C avant utilisation.

Enfin, l'eau distillée complète le volume des mélanges à 22µl, auquel s'ajoutera 3µl d'extrait pour atteindre un volume final de 25µl par mélange réactionnel.

2.4- Les échantillons

Chaque mélange réactionnel est préparé en pièce blanche (secteur pré-PCR) et réparti dans des microtubes de 500µl (Applied Biosystems), puis placé dans une boîte isotherme sur glace afin d'éviter toute activité prématurée de la polymérase sur le mélange réactionnel. Ils sont ensuite recouverts d'une fine pellicule d'huile minérale (Roche) afin d'éviter toute évaporation. Ensuite, en dehors du secteur pré-PCR, 3µl de chaque extrait et du témoin négatif sont déposés au fond des microtubes.

3- REACTIONS D'AMPLIFICATION

Elles sont réalisées sur le thermocycleur HYBAID automatisé et programmable (Omnigene). Plusieurs programmes ont été testés, faisant varier la température d'hybridation (tableau VII).

Tableau VII : programme type d'amplification sur le thermocycleur HYBAID pour la mise au point de la PCR E6 et E7

Température (°C)	Temps	Nombre de cycles	Opérations effectuées
94	5 minutes	1	1 ^{ère} dénaturation de l'ADN
94	30 secondes	40	séparation des 2 brins d'ADN
Différentes températures pour l'hybridation des amorces	1 minute		hybridation des amorces
	72		1 minute
72	5 minutes	1	élongation finale (reconstitution complète de l'ADN)
30	10 secondes	1	refroidissement rapide

La durée moyenne des programmes est d'environ 3h35.

Les microtubes sont ensuite conservés à +4°C avant l'analyse des produits de PCR.

4- ANALYSE DES PRODUITS DE PCR

Les produits de l'amplification peuvent être visualisés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et coloration au bromure d'éthidium.

4.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Au niveau du secteur de virologie moléculaire, les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 9% en fonction de la taille des fragments obtenus.

La composition pour un gel de polyacrylamide à 9% est :

- 10ml du mélange acrylamide/bisacrylamide 37.5/1 à 9% (QBiogène)
- 100µl de persulfate d'ammonium à 10% (Sigma)
- 10µl de Temed (N,N,N',N-tétraméthyléthylènediamine) (Amresco)

Le gel polymérisé est placé en position verticale. 5µl de chaque échantillon, additionné de 3µl de tampon de chargement (contenant du bleu de bromophénol , du saccharose et du SDS) sont déposés dans les puits du gel.

Deux microlitres de marqueur de taille moléculaire (marqueur V, 8pb-587pb, Roche) sont également déposés sur chaque gel. La migration dure environ une heure au voltage constant de 150V (38 mA).

4.2- Révélation

Le gel est placé pendant 10 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (à 0.001%) et photographié sous lumière ultraviolette. Le fragment amplifié est alors visualisé sous forme de bande, dont la longueur est comparée aux différents fragments du marqueur de taille moléculaire. Les longueurs des fragments amplifiés E6 et E7 attendus sont respectivement de 469 paires de bases et 352 paires de bases.

5- SEQUENCAGE DES PRODUITS DE PCR

5.1- Principe général du séquençage

La réaction de séquence est effectuée selon la méthode de Sanger ou méthode des terminateurs de chaîne dont le principe est de rajouter, en plus des désoxyribonucléotides normaux (dNTPs), des di-désoxynucléotides (ddNTPs) fluorescents (avec une couleur différente par type de bases, soit 4 couleurs au total), qui arrêteront l'élongation de la copie du brin à séquencer, en obtenant alors des brins de différentes tailles. Les produits de séquence migrent ensuite dans un gel capillaire et un laser détecte la fluorescence des fragments qui passent devant son faisceau (figure 23).

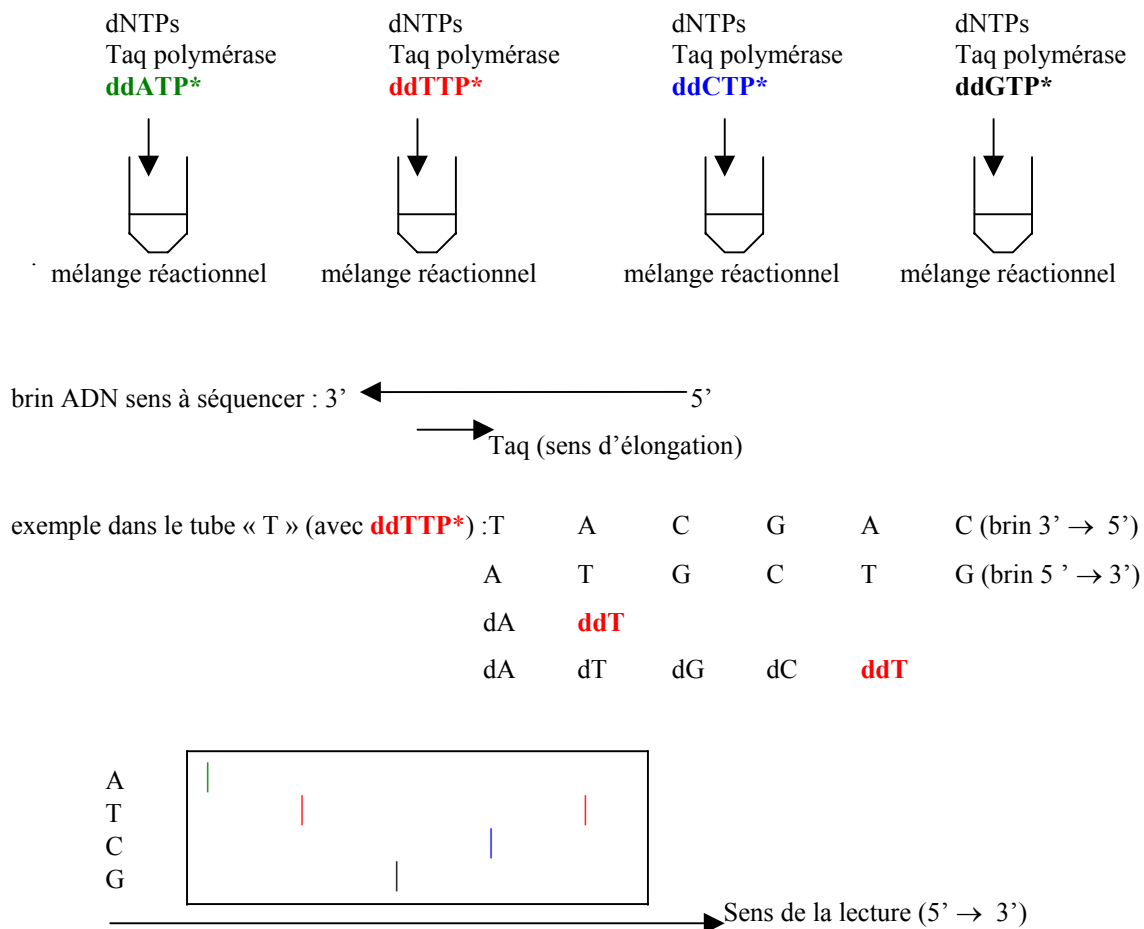


Figure 23 : principe du séquençage selon la méthode de Sanger

Après traitement informatique des données, on obtient un électrophorégramme déterminant la séquence que l'on veut analyser (figure 24). Chaque pic correspond à un fluorochrome dont la couleur détermine le type de base :

- noir pour G (guanine)
- rouge pour T (thymidine)
- vert pour A (adénosine)
- bleu pour C (cytosine)

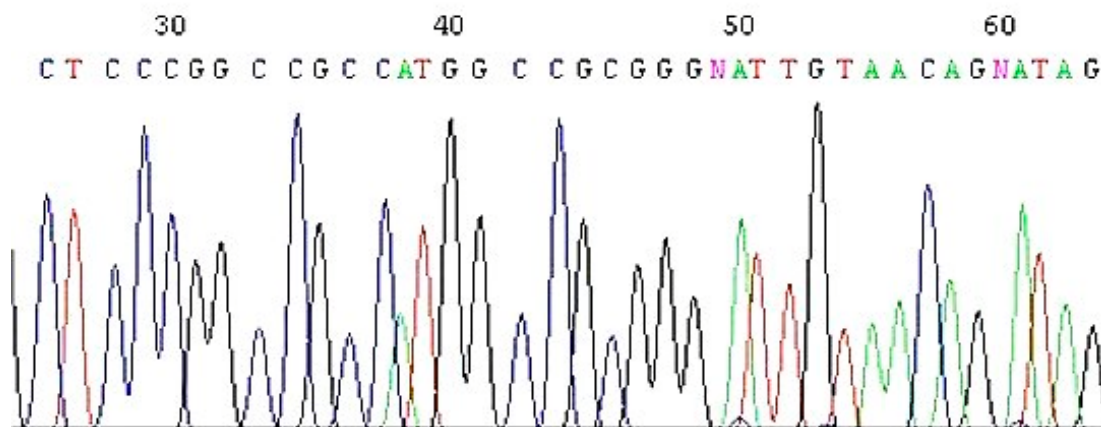


Figure 24 : électrophorégramme (laboratoire de Virologie, CHU Nantes)

Après lecture des électrophorégrammes, les résultats sont interprétés en s'appuyant sur des banques de données et des algorithmes d'interprétation validés.

5.2- Etape de purification des produits de PCR

A partir des produits d'amplification obtenus précédemment, cette étape permet d'éliminer les amorces et autres produits qui pourraient gêner la réaction de séquence.

La purification des produits de PCR est effectuée par filtration à travers un biogel : les puits filtrants d'une microplaque de 96 puits (Millipore MultiScreen) sont remplis avec 350µl de gel P100 (Bio-gel P100 Fine, Biorad). Le gel est ensuite tassé par centrifugation (centrifugeuse Jouan : 1000 trs/min pendant 3 minutes) et les produits d'amplification sont

déposés au milieu des puits. Une nouvelle centrifugation permet alors la filtration de ces produits de PCR au travers du gel (1000trs/min pendant 5 minutes) et les filtrats sont ensuite collectés dans une plaque Costar 96 puits à fond rond (Polylabo). Les produits purifiés peuvent ainsi être conservés à -20°C si la réaction de séquence est différée.

5.3- Réaction de séquence

L'ensemble des réactions de séquence a été réalisé avec le kit ABI PRISM* Big Dye Terminator de Perkin Elmer-Applied Biosystems contenant l'AmpliTaq* DNA polymérase. Elle est réalisée à l'aide de 2 amorces différentes pour un même fragment à séquencer, afin d'obtenir 2 brins, l'un sens et l'autre anti-sens, de la séquence à analyser. Les amorces pour cette réaction de séquence sont les mêmes que celles utilisées pour l'amplification des régions E6 et E7, soit (E6 1A ; E6 1B) pour E6 et (E7 A ; E7 B) pour E7, mais à la concentration de $4\mu\text{M}$.

Le kit ABI PRISM* Big Dye Terminator renferme le tampon (5X), le mix BDT contenant les désoxyribonucléotides marqués (avec un fluorochrome) et non marqués, l'AmpliTaq* DNA polymérase et un témoin positif permettant de valider la réaction.

Pour chaque échantillon, le mélange réactionnel est réalisé dans des microtubes de $200\mu\text{l}$ (Applied Biosystems) déposés sur de la glace.

La composition du mélange réactionnel, pour une réaction de séquence, figure dans le tableau VIII.

Tableau VIII : composition du mélange réactionnel pour une réaction de séquence

Composants du mélange réactionnel	Echantillons (volume en μl)	Témoin du kit (volume en μl)
Eau distillée	8	8.4
Amorce E6 ou E7 ($4\mu\text{M}$)	1	amorce du témoin pGEM : 4
Produit de PCR purifié	5	plasmide pGEM : 1.6
Mix BDT	4	4
Tampon 5X	2	2

La réaction de séquence proprement dite est ensuite réalisée sur un thermocycleur automatisé à effet Peltier PTC 100 (MJ Research, INR) selon le programme présenté dans le tableau IX.

Tableau IX : programme de réaction de la réaction de séquence sur le thermocycleur PTC100

Température en °C	Temps	Nombre de cycles	Opération effectuée
96	15 secondes	25	Dénaturation
50	5 secondes		Hybridation
60	3 minutes		Élongation
4			conservation

Cette étape dure environ 2 heures.

Les réactions de séquence peuvent être conservées à +4°C et à l'abri de la lumière avant analyse.

5.4- Purification des produits de séquence

Cette étape utilise le même procédé que pour la purification des produits de PCR (paragraphe 5.2- page 89) mais le gel utilisé ici est un Bio-gel G50 Fine (Pharmacia) préparé extemporanément. Il est commercialisé sous forme de poudre et reconstitué par 38.4ml d'eau ultra-pure, pour une plaque de 96 puits. Les produits purifiés sont récupérés dans une microplaque MicroAmp Optical de 96 puits (Applied Biosystems).

5.5- Analyse des produits de séquence

Les produits de séquence, une fois purifiés, sont analysés par électrophorèse en gel capillaire à l'aide du séquenceur ABI PRISM* 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Il est constitué de 16 capillaires permettant de traiter 16 puits de la microplaque en 1 heure sans risque de contamination inter-puits par rapport à un gel de séquence classique.

Plusieurs logiciels informatiques ont été développés par la société Applied Biosystems pour le traitement des données numériques (3100 Genetic Analyser* pour le recueil des données sur

le séquenceur, Sequencing Analysis* pour analyser le gel et Sequence MT Navigator* pour analyser les électrophorégrammes) et les différents traitements informatiques ont été effectués sur du matériel Apple fonctionnant sous système d'exploitation Mac OS version 9.0. Le logiciel Sequencing Analysis* permet de transformer les signaux de fluorescence enregistrés par le séquenceur et émis par les terminateurs de chaîne, en électrophorégramme.

Après analyse des électrophorégrammes (par l'intermédiaire du logiciel MT Navigator*), les séquences E6 et E7 obtenues ont été comparées aux séquences de référence, puis alignées à l'aide du logiciel ClustalW* afin de rechercher les mutations au niveau de ces 2 régions génomiques de l'HPV16.

6- ANALYSE PHYLOGENIQUE DES HPV16

La phylogénie est une reconstruction de l'histoire évolutive des espèces. La phylogénie moléculaire est l'étude des relations de parenté entre gènes homologues afin de déterminer les relations de parenté entre les individus dont ils sont issus. Elle associe techniques de biologie moléculaire et méthodes statistiques. Les objectifs des études phylogénétiques sont d'une part, de reconstruire le lien généalogique entre les organismes et d'autre part, d'estimer le temps de divergence entre ces mêmes organismes. Ces études sont représentées par un arbre phylogénique. Il est composé de nœuds et de branches, où la longueur de chaque branche représente le nombre de changements survenus au cours de l'évolution.

L'analyse phylogénique des HPV16 à partir des séquences génomiques E6 et E7 a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA*, à partir de l'alignement des séquences par le logiciel Clustal W*. Il a permis de construire plusieurs arbres non enracinés (étude des relations entre les différents individus sans indication de l'ancêtre commun à tous ces individus, appelés aussi « dendrogrammes ») : 2 arbres ont pris en compte les séquences E6 et E7 séparément et un arbre a été construit à partir de l'alignement « combiné » des séquences E6 et E7.

Les méthodes utilisées pour la construction de ces arbres sont :

Méthode basée sur les distances

La méthode basée sur les distances convient particulièrement pour les séquences de forte homologie comme dans cette étude, où les variants ont plus de 98% d'homologie de séquence.

La distance représente le nombre de sites distincts divisé par la longueur totale de la séquence étudiée. La méthode choisie ici, et utilisée par le logiciel MEGA pour calculer les distances, est la méthode dite du « voisin le plus proche » ou NJ (*Neighbor Joining*). Parmi les différentes méthodes permettant de calculer les distances, aucun algorithme particulier n'est retenu par la communauté scientifique.

Méthode « Bootstrap »

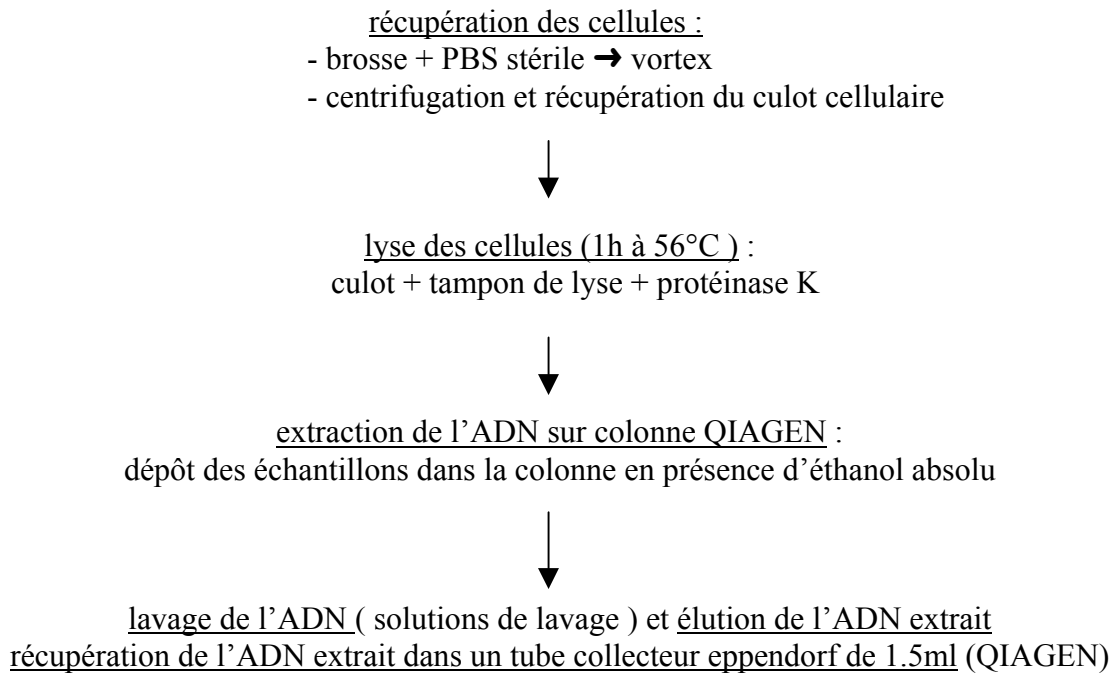
La méthode *bootstrap* est la plus souvent utilisée pour tester la robustesse des branches internes de l'arbre (formation de groupes internes où tous les individus d'un même groupe sont très proches entre eux, comparés aux individus d'un autre groupe). On considère généralement que les branches définies par une valeur de *bootstrap* supérieure ou égale à 85% sont robustes.

7- ANALYSE STATISTIQUE

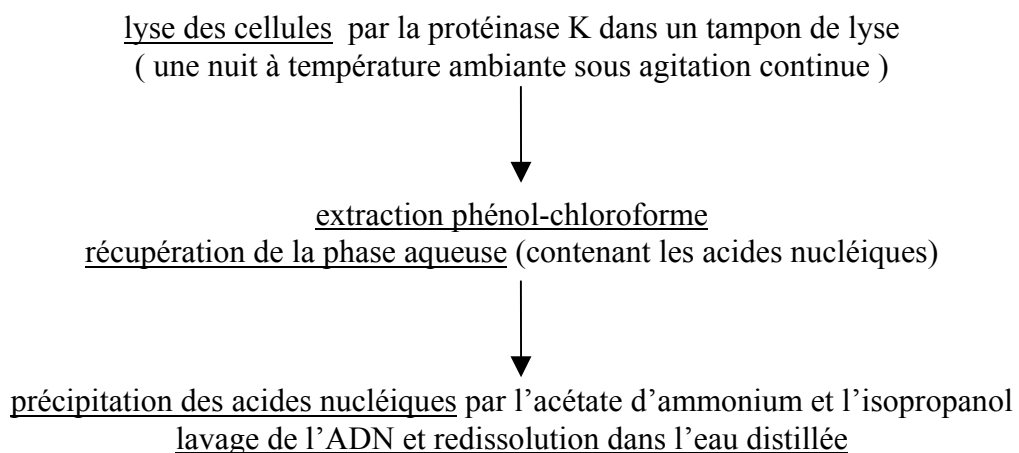
La recherche d'une relation entre le développement de lésions génitales et le risque de progression de ces dysplasies avec un caractère qualitatif (variants E6 et E7), ainsi que la recherche d'une association entre des variants et l'âge des patientes atteintes de dysplasie est réalisée à l'aide du logiciel Epi Info* : le test du χ^2 de Mantel-Haenszel et le test exact de Fisher ont été utilisés dans cette étude (comparaison de 2 moyennes). Le seuil de significativité retenue est de 0.05 (soit 5%).

Annexe 1 : techniques d'extraction de l'ADN

➤ Pour les **cytobrossages** de l'endocol, l'extraction d'ADN est réalisée ici à l'aide du Minikit QIAamp DNA* (QIAGEN). Le principe de l'extraction est le suivant :



➤ Pour les **biopsies**, la technique utilisée au laboratoire est une extraction phénol-chloroforme classique, dont le principe est rappelée ci dessous :



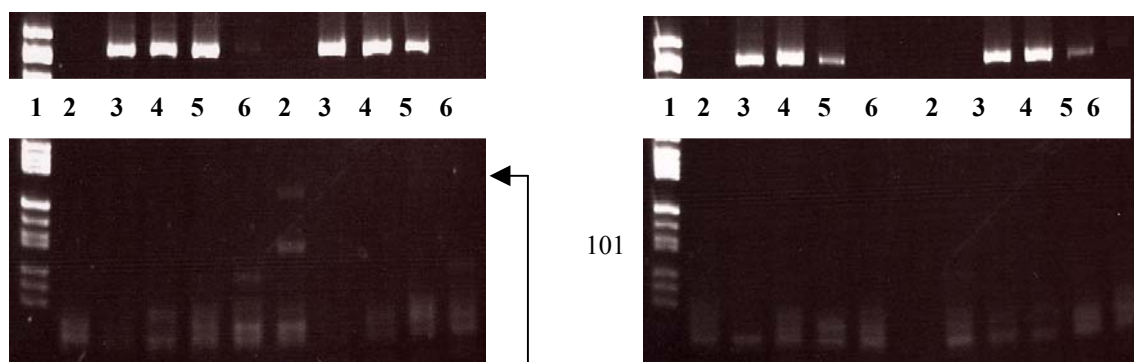
RESULTATS

La première étape de notre travail a consisté à mettre au point les PCR et à optimiser les conditions d'amplification des oncogènes E6 et E7 d'HPV16. Ensuite, le séquençage des amplicons obtenus a permis de recenser l'ensemble des variations génétiques présentes sur ces mêmes régions et d'étudier la phylogénie de ces souches. Enfin, ces séquences ont été utilisées pour tenter d'évaluer si, dans notre population, certains variants étaient associés à une oncogénicité supérieure à celui du papillomavirus 16 prototype ou à un risque accru de progression des lésions précancéreuses en carcinome.

I- MISE AU POINT DES CONDITIONS DE LA PCR

1-TEMPERATURE D'HYBRIDATION ET CONCENTRATION EN MgCl₂

Pour la mise au point de la PCR E6, 3 températures d'appariement des amorces (52, 54 et 56°C) et 4 concentrations de chlorure de magnésium (1,5mM, 2mM, 2,5mM et 3mM) ont été testées en parallèle dans les mêmes conditions opératoires sur 4 dilutions (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9}) du témoin positif et un témoin négatif (ADN humain, Roche), afin d'optimiser la sensibilité et la spécificité de l'amplification génique. Les amplicons E6, d'une longueur de 469 paires de bases, obtenus après les différentes conditions opératoires sont visualisés sur les gels de la figure 25.



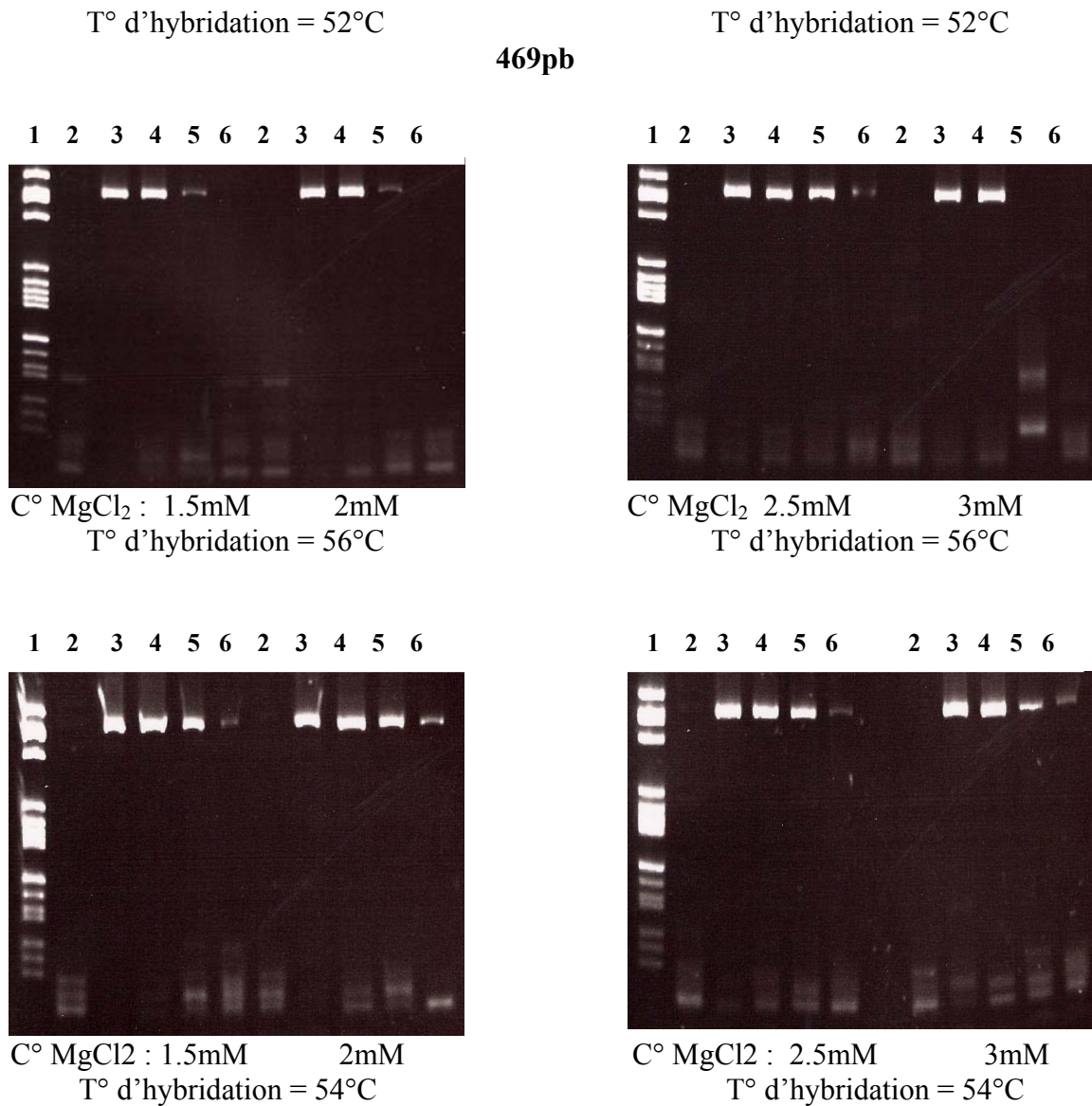


Figure 25 : Comparaison des 3 températures d'hybridation (T°) et des 4 concentrations en MgCl₂ (C°) pour la mise au point de la PCR E6

- | | |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1- marqueur de taille V | 4- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁷ |
| 2- témoin négatif | 5- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁸ |
| 3- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁶ | 6- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁹ |

Cette figure montre que la meilleure sensibilité est obtenue dans les conditions suivantes :

- température d'hybridation des amorces : 54°C
- concentration en MgCl₂ : 2 mM

De même, pour la mise au point de la PCR E7, 3 températures d'appariement des amorces (55, 57 et 59°C) et 4 concentrations en MgCl₂ ont été testées. Les amplicons E7, d'une

longueur de 352 paires de bases, obtenus après les différentes conditions opératoires, sont visualisés sur les gels de la figure 26.

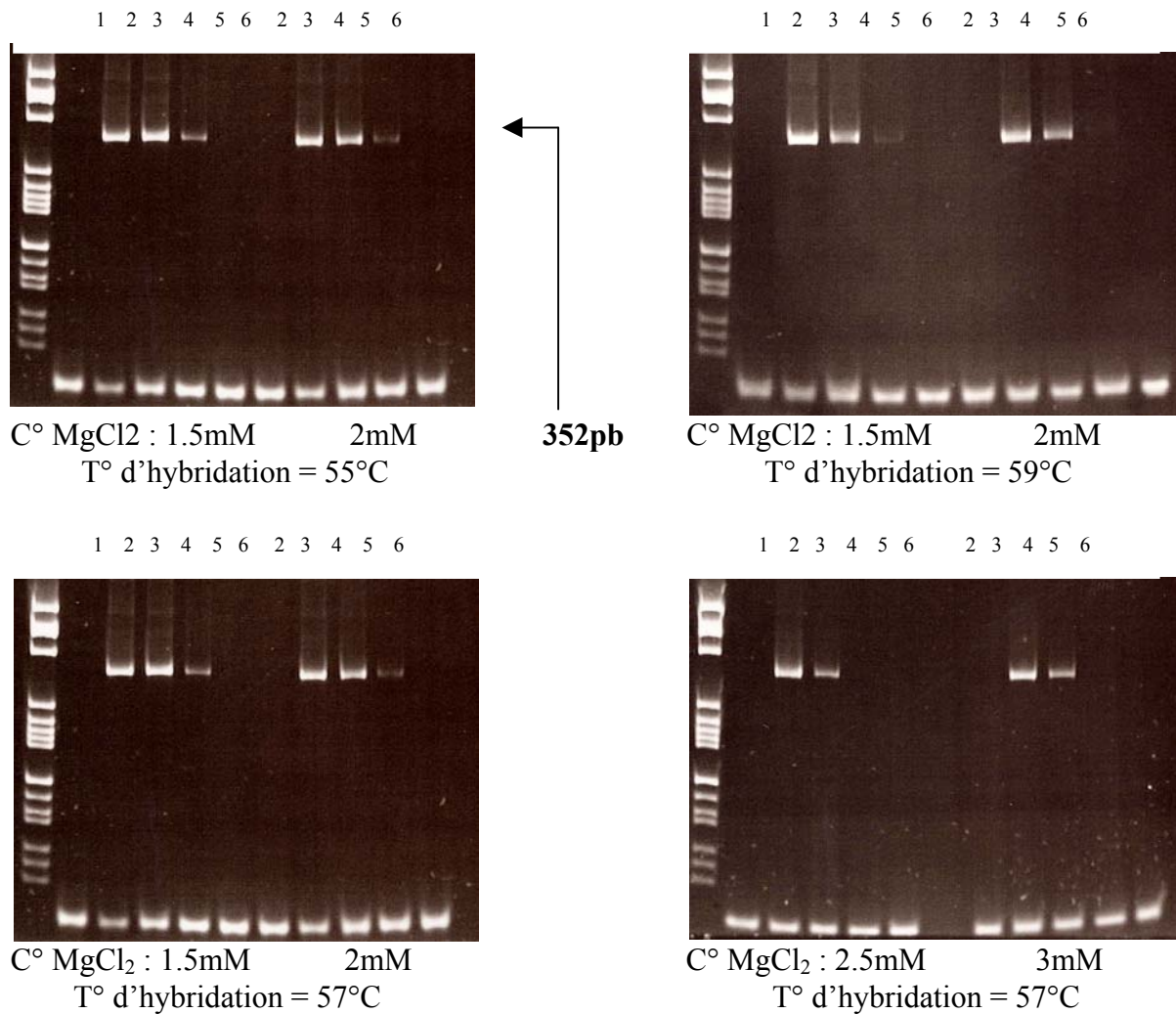


Figure 26 : Comparaison des 3 températures d'hybridation (T°) et des 4 concentrations en MgCl₂ (C°) pour la mise au point de la PCR E7

- | | |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1- marqueur de taille | 4- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁷ |
| 2- témoin négatif | 5- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁸ |
| 3- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁶ | 6- dilution du témoin positif à 10 ⁻⁹ |

Ces gels montrent que la meilleure sensibilité d'amplification de la région E7 est obtenue dans les conditions suivantes :

- température d'hybridation des amorces : 57°C
- concentration en MgCl₂ : 1.5 mM

En comparant les différents gels, la PCR E6 est plus sensible que la PCR E7, à une dilution de raison dix du témoin positif.

2- CONDITIONS DEFINITIVES DE LA PCR E6 et E7

Les concentrations et volumes définitifs de chaque composants du mélange réactionnel pour les réactions d'amplification sont rapportés dans le tableau X pour la PCR E6 et le tableau XI pour la PCR E7.

Tableau X : constituants du mélange réactionnel pour l'amplification de la région E6

	Concentration initiale	Quantité de réactif en μ l	Concentration finale
Tampon 10X	10X	2.5	1X
MgCl₂	25mM	2	2mM
Amorce E6 1A	20 μ M	1.25	1 μ M
Amorce E6 2A	20 μ M	1.25	1 μ M
DNTP ATCG (Promega)	2.5mM	2	0.2mM
Taq (Promega)	5U/ μ l	0.125	0.025U/ μ l
Eau distillée		12.875	
Extrait d'ADN		3	
Volume final par tube		25	

Tableau XI : constituants du mélange réactionnel pour l'amplification de la région E7

	Concentration initiale	Quantité de réactif en μ l	Concentration finale
Tampon 10X	10X	2.5	1X
MgCl₂	25mM	1.5	1.5mM
Amorce E7 A	20 μ M	1.25	1 μ M
Amorce E7 B	20 μ M	1.25	1 μ M
DNTP ATCG (Promega)	2.5mM	2	0.2mM
Taq (Promega)	5U/ μ l	0.125	0.025U/ μ l
Eau distillée		13.375	
Extrait d'ADN		3	
Volume final par tube		25	

La programmation des cycles d'amplification, après optimisation des températures d'hybridation des amorces, comprend donc les différentes étapes suivantes :

- 5 min. à 94°C (dénaturation)

- pour chaque cycle : 30 sec. à 94°C, 1 min. à 54/57°C pour E6/E7, 1 min. à 72°C (40 cycles d'amplification)

-5 min. à 72°C (élongation finale)

-10 sec. à 30°C (refroidissement rapide des échantillons)

II- ANALYSE DES VARIANTS HPV16 E6/E7 AU SEIN D'UNE COHORTE DE FEMMES

L'ensemble des résultats virologiques (variants E6 et E7), anatomo-pathologiques et cliniques au sein de la cohorte de patientes incluses dans ce travail figurent en annexe 2 (pages 119-121).

1- CARACTERISTIQUES DES PRELEVEMENTS ETUDIES

Au sein des 78 femmes de cette cohorte, 89 échantillons ont été analysés (64 brossages cervico-vaginaux et 25 biopsies dont 20 du col utérin et 5 vulvaires). Cinquante cinq patientes ont eu un frottis positif en HPV16, 25 ont eu une biopsie positive en HPV16 et 2 patientes ont eu à la fois un frottis et une biopsie positifs en HPV16.

Durant les 2 années de notre étude, 11 de ces femmes ont été prélevées au moins 2 fois dans le cadre d'un suivi cytologique et virologique (les numéros des patientes figurent en annexe 2):

- 9 d'entre elles ont bénéficié de 2 frottis cervico-vaginaux (FCV) (patientes n°15, 21, 25, 39, 46, 50, 58, 65, 74)
- 1 femme a bénéficié de 4 FCV (patiente n°63)
- 1 biopsie vulvaire suivie quelques mois plus tard d'un brossage d'endocol après vaporisation laser (traitement d'un VIN3) (n°55)

Par ailleurs, 1 FCV et une biopsie ont été prélevés lors de la même consultation chez une femme (n°52).

2- ANALYSES DES FROTTIS CERVICO-VAGINAUX ET DES BIOPSIES

Les résultats des examens cytologiques ou histologiques ont été analysés, en se référant à la classification de Bethesda, utilisée par le service d'anatomo-pathologie du CHU de Nantes. L'interprétation fournie par les anatomo-pathologistes a été codifiée dans le cadre de cette étude (tableau XII). Le but de cette codification est de regrouper certaines classes pour faciliter la lecture et l'interprétation des résultats.

Tableau XII : codification des résultats anatomo-pathologiques

Codification simplifiée	Signification anatomo-pathologique de la cytologie et l'histologie des prélèvements génitaux
A	Frottis normal
B	Frottis sans valeur
C	Frottis dont l'interprétation est limitée : -par l'hémorragie -par l'inflammation -par l'absence de cellules endocervicales
D	Frottis inflammatoire Mycose Trichomonas Herpès Dystrophie
E	Cellules épithéliales atypiques de signification indéterminée (ASCUS) Cellules glandulaires atypiques de signification indéterminée (ASGUS)
F	Condylome SIL de bas grade
G	SIL de haut grade Carcinome invasif

Dans la suite de l'analyse des variants HPV16 E6 et E7, les résultats ont parfois été regroupés, afin de faciliter l'étude statistique. Ainsi, 2 classes ont été individualisées :

- le groupe dit « négatif » : les frottis normaux ainsi que les frottis d'interprétation limitée par les phénomènes inflammatoire ou hémorragique, ainsi que les frottis dystrophiques, ont été regroupés (il s'agit des catégories A, B, C et D). En effet, les phénomènes inflammatoires, hémorragiques ou dystrophiques sont la plupart du temps des événements transitoires et bénins, qui nécessitent en général un nouveau contrôle cytologique à 3 mois après un traitement local (désinfection, hormonothérapie).

- le groupe dit « positif » : regroupement des dysplasies de bas grade, dysplasies de haut grade et carcinomes (classes F et G) : ces cytologies ou histologies signent toutes la présence d'un processus néoplasique qu'il soit précancéreux ou tumoral.

Le classement anatomo-pathologique de nos échantillons figure dans le tableau XIII.

Tableau XIII : classement des résultats anatomopathologiques des échantillons

cytologie ou histologie	Nombre de patientes/89	% de la population
A	5	5.6
C	1	1.1
D	12	13.5
F	11	12.3
G	59	66.3
Absence de cytologie	1	1.1

Parmi les 89 échantillons analysés, aucun n'était classé dans la catégorie B ou E. Une seule patiente sur 78 n'a pas eu de cytologie en parallèle du génotypage HPV.

Le classement simplifié selon les 2 groupes « positif » ou « négatif » figure dans le tableau XIV.

Tableau XIV : classement simplifié des résultats anatomo-pathologiques en 2 groupes

Cytologie ou histologie	Nombre de patientes/89	% de la population
« négatif »	18	20.2
« positif »	70	78.7

Plus des $\frac{3}{4}$ des patientes de notre étude présentent donc des lésions dysplasiques.

3- ANALYSE DE LA VARIABILITE DES GENES E6 ET E7

Dans notre étude, la souche prototype a été retrouvée dans 31.3% (26/83) des prélèvements génitaux (séquençage E6 et E7). Elle concerne 32.8% (24/73) des patientes.

3.1- Variabilité du gène E6

Seuls 84 échantillons sur 89 ont pu être amplifiés et donc séquencés pour le gène E6. Le tableau XV résume les caractéristiques des différentes mutations que nous avons mis en évidence sur le gène E6 après séquençage des 84 échantillons. La position et la nature du nucléotide substitué sont indiquées. Certaines mutations n'occasionnent pas de modification de la traduction protidique, à savoir une substitution d'acide aminé. Dans le tableau XV figurent également la fréquence à laquelle chaque mutation a été observée dans nos échantillons, et pour chacune, les publications éventuelles y faisant déjà référence.

Tableau XV : Analyse des gènes E6 des HPV16 retrouvés au sein de la population étudiée dans le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de Nantes entre 2000 et 2002. Fréquence de ces variations parmi ces patientes et comparaison avec l'ensemble des données de la littérature (page suivante).

Tableau XV

Position du nucléotide	Substitution de nucléotide	Position du codon	Substitution d'acide aminé	Fréquence de la mutation	Publication de la mutation
131	A→G	10	Arg→Gly	2	Yamada, 1995, 1997 ; Londesborough, 1996 Stöppler, 1996 ; Xi, 1997 Wheeler, 1997 ; Zehbe, 1998b, 2001 Brady, 1999 ; Nindl, 1999 Hu, 1999, 2001b, 2001a ; Yamada, 1995, 1997 Villa, 2000 ; van Duin, 2000 Buonaguro, 2000 ; Berumen, 2001 Kämmer, 2002 ; Picconi, 2003
132	G→T	10	Arg→Thr	2	Yamada, 1995, 1997 ; Stöppler, 1996 Xi, 1997 ; Wheeler, 1997 ; Bontkes, 1998 Zehbe, 1998b, 2001 ; Villa, 2000 Matsumoto, 2000 ; van Duin, 2000 Buonaguro, 2000 ; Picconi, 2003 Vaeteewoottacharn, 2003
183	T→G	27	Iso→Arg	2 (un patient)	Yamada, 1995, 1997 ; Wheeler, 1997 Zehbe, 1998b, 2001 ; Matsumoto, 2000 van Duin, 2000 ; Watts, 2002 ; Picconi, 2003
256	C→T	51	absence	1	Zehbe, 1998b, 2001 ; Nindl, 1999 Perez-Gallego, 2001 ; Hu, 2001b
278	C→G	59	Pro→Ala	1	Non publiée
286	T→A	61	absence	1	Yamada, 1995, 1997 ; Londesborough, 1996 Xi, 1997 ; Wheeler, 1997 ; Bontkes, 1998 Zehbe, 1998b, 2001 ; Brady, 1999 ; Villa, 2000 Matsumoto, 2000 ; van Duin, 2000 Buonaguro, 2000 ; Hu, 2001a Perez-Gallego, 2001 ; Watts, 2002 Vaeteewoottacharn, 2003
289	A→G	62	absence	3	Yamada, 1995, 1997 ; Londesborough, 1996 Xi, 1997 ; Wheeler, 1997 ; Bontkes, 1998 Zehbe, 1998b, 2001 ; Brady, 1999 ; Villa, 2000 Matsumoto, 2000 ; van Duin, 2000 Buonaguro, 2000 ; Hu, 2001a Perez-Gallego, 2001 ; Watts, 2002 Picconi, 2003 ; Vaeteewoottacharn, 2003
295	T→G	64	Asp→Glu	1	Stöppler, 1996 ; Brady, 1999 van Duin, 2000 ; Zehbe, 2001
335	C→T	78	His→Tyr	4	Yamada, 1995, 1997 ; Londesborough, 1996 Stöppler, 1996 ; Xi, 1997 ; Wheeler, 1997 Bontkes, 1998 ; Brady, 1999 ; Villa, 2000 Matsumoto, 2000 ; Chow, 2000 Stephen, 2000 ; van Duin, 2000 Buonaguro, 2000 Hu, 2001a ; Perez-Gallego, 2001 Zehbe, 2001 ; Watts, 2002 ; Radhakrishna, 2002 ; Picconi, 2003 Vaeteewoottacharn, 2003
350	T→G	83	Leu→Val	48	Yamada, 1995, 1997 ; Londesborough, 1996 Stöppler, 1996 ; Xi, 1997 ; Wheeler, 1997 Bontkes, 1998 ; Zehbe, 1998a et b, 2001 ; Brady, 1999 Nindl, 1999 ; Hu, 1999, 2001a et b ; Villa, 2000 Andersson, 2000 ; Matsumoto, 2000 Chow, 2000 ; Stephen, 2000 ; van Duin, 2000 Buonaguro, 2000 ; Berumen, 2001 Perez-Gallego, 2001 ; Pang, 2002 ; Watts, 2002 Radhakrishna, 2002 ; Kämmer, 2002 Picconi, 2003 ; Vaeteewoottacharn, 2003
359	A→G	86	Thr→Ala	1	Non publiée
384	A→C	94	Lys→Thr	1	Non publiée
403	A→G	100	absence	2	Yamada, 1995, 1997 ; Xi, 1997 ; Wheeler, 1997 Bontkes, 1998 ; Zehbe, 1998b, 2001 ; Villa, 2000 Chow, 2000 ; van Duin, 2000 ; Picconi, 2003 Vaeteewoottacharn, 2003
406	T→C	101	absence	1	Non publiée
470	C→G	123	Gln→Glu	1	Non publiée

Ce tableau suscite plusieurs commentaires :

- l'analyse des 84 séquences montre uniquement des mutations ponctuelles
- aucune délétion ou insertion n'a été observée
- au total, 15 mutations ont été répertoriées, dont 10 correspondent à des substitutions d'aa
- 10 mutations ont été publiées et 5 n'ont jamais été décrites auparavant
- le variant T350G (en gras dans le tableau XV), le plus fréquemment décrit dans la littérature parmi les variants HPV16 E6, est celui que l'on retrouve dans notre étude avec la fréquence la plus élevée : 48 séquences sur 84 analysées (soit 57.1% des cas). Il concerne 42 patientes sur 78 donc est présent dans 53.8% de la population étudiée.

La figure 27 représente graphiquement certaines données du tableau XV. Il permet de visualiser la répartition et la fréquence des différents sites de mutations sur le gène E6.

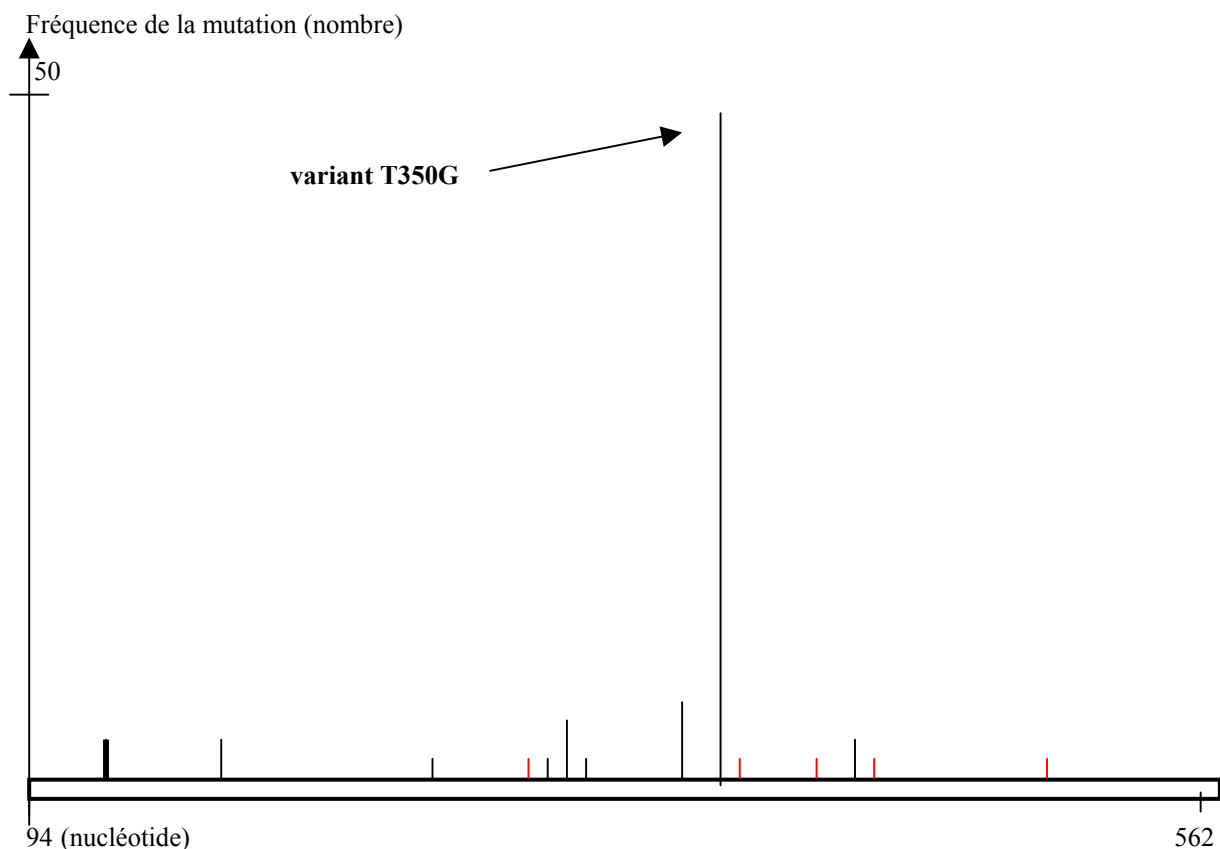


Figure 27 : position et fréquence des points de mutation sur le gène HPV16 E6, au sein des 84 échantillons analysés

- : variant déjà publié
- : mutation non publiée

Enfin, l'alignement de l'ensemble des séquences, à l'aide du logiciel ClustalW*, a permis la

construction d'un arbre phylogénique avec le logiciel MEGA* (figure 28). Pour faciliter la lecture de l'arbre, les HPV16 prototypes et les variants T350G isolés, fréquemment retrouvés dans notre étude, ont été regroupés en une seule séquence « type », dans les groupes respectifs « prototype » et « variant T350G ».

L'arbre indique différents paramètres :

- les groupes « prototype » et « variant T350G » ou le numéro de la patiente (figurant en annexe 2, pages 119-121), correspondant à l'analyse de la séquence HPV16 E6, sont indiqués à chaque terminaison de branche
- la distance entre 2 séquences nucléotidiques représente le nombre de substitutions différentes, divisé par la longueur de la séquence analysée (échelle représentée sur la figure 28). La longueur des branches horizontales de l'arbre est proportionnelle à cette distance (la longueur des branches verticales n'intervient pas dans le calcul de la distance ; elle facilite juste la lecture de l'arbre). La distance entre 2 souches est alors calculée en additionnant la longueur des différentes branches horizontales, les reliant entre elles.
- la robustesse des branches internes (méthode du *bootstrap*) est indiquée en pourcentage et figure au niveau des branches internes divergentes

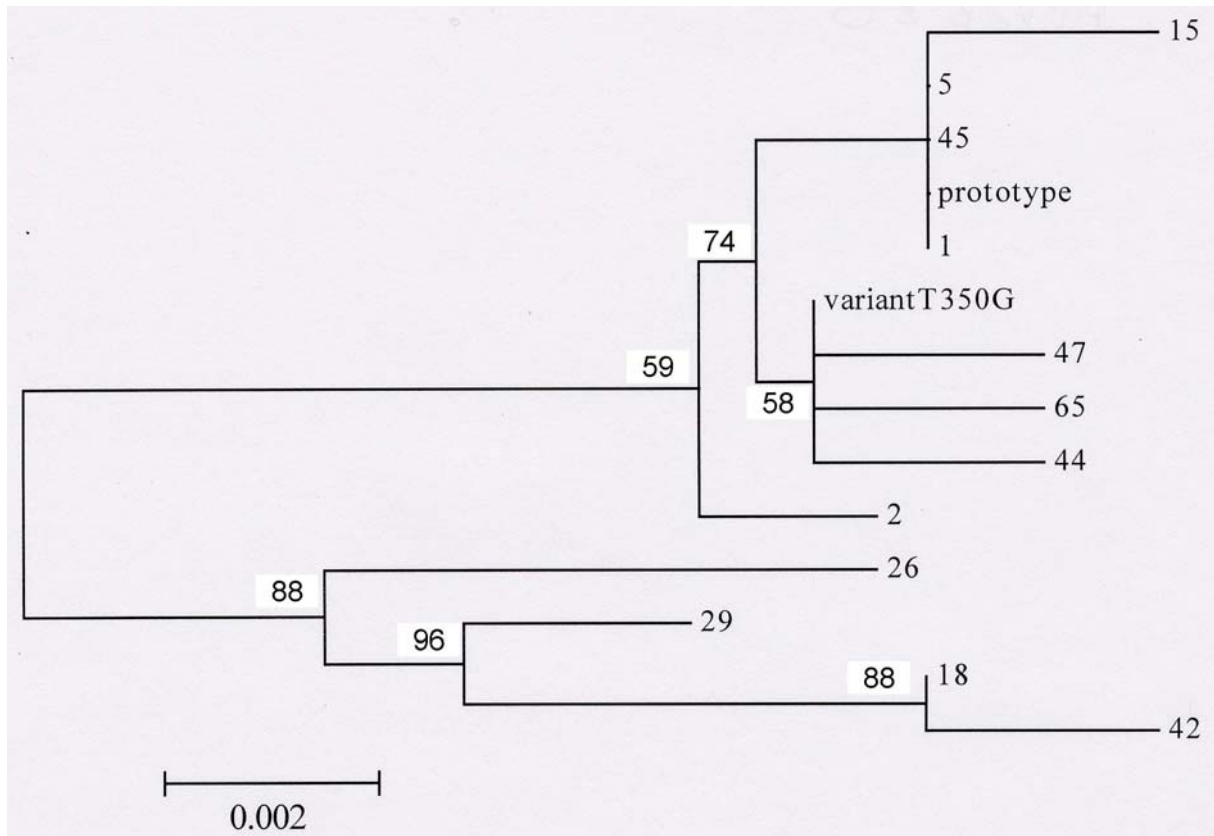


Figure 28 : arbre phylogénique, construit à partir des 84 séquences E6

L'arbre de la figure 28 montre, compte tenu de l'échelle des distances, que les HPV16 analysés dans notre étude ont une homologie de séquence supérieure à 98% (donc une distance inférieure à 2%, soit 0.02). Ils appartiennent donc tous à des variants au sein d'un même type.

Quatre séquences (26, 29, 18 et 42) se distinguent cependant nettement des autres, avec une robustesse élevée (88%) et formeraient un groupe relativement distant des autres souches.

Au sein de ce groupe de 4 patientes, 2 autres branches s'individualisent (*bootstrap* à 96% et 88%).

3.2- Variabilité du gène E7

Quatre-vingt huit séquences ont pu être amplifiées puis séquencées dans la région E7. Ici, la région étudiée comprend l'intégralité du gène codant pour la protéine E7 (nucléotides

562 à 858). Le tableau XVI regroupe l'ensemble des variants E7, selon le même modèle que pour les variants E6 :

Tableau XVI : Analyse des gènes E7 des HPV16 retrouvés au sein de la population étudiée dans le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de Nantes entre 2000 et 2002. Fréquence de ces variations parmi ces patientes et comparaison avec l'ensemble des données de la littérature.

Position du nucléotide	Substitution de nucléotide	Position du codon	Substitution d'acide aminé	Fréquence de la mutation	Publication de la mutation
597	G→A	12	Met→Ile	1	Non publiée
647	A→G	29	Asn→Ser	2	Icenogle, 1991 ; Eschle, 1992 Fujinaga, 1994 ; Stöppler, 1996 Song, 1997 ; Zehbe, 1998b, 2001 Nindl, 1999 ; Chow, 2000 Stephen, 2000 ; van Duin, 2000 Buonaguro, 2000 ; Youk, 2001 Radhakrishna, 2002 Vaeteewoottacharn, 2003
789	T→C	76	absence	4	Icenogle, 1991 ; Eschle, 1992 Fujinaga, 1994 ; Song, 1997 Zehbe, 1998b, 2001 ; Nindl, 1999 van Duin, 2000 ; Buonaguro, 2000
795	T→G	78	absence	4	Icenogle, 1991 ; Eschle, 1992 Fujinaga, 1994 ; Song, 1997 Zehbe, 1998b ; Nindl, 1999 van Duin, 2000 ; Buonaguro, 2000 Radhakrishna, 2002
822	A→G	87	absence	4	Zehbe, 1998b, 2001 ; Nindl, 1999 van Duin, 2000 ; Hu, 2001b

Ce tableau suscite également plusieurs commentaires :

- l'analyse des 88 séquences E7 ne montre, comme pour E6, que des mutations ponctuelles
- 5 mutations seulement ont été mises en évidence, dont 2 correspondent à un changement d'acide aminé
- 1 mutation n'a jamais été décrite dans la littérature
- le variant A647G (Asn29Ser) (en gras dans le tableau XVI), le plus fréquemment retrouvé dans les publications, a été mis en évidence dans 2 cas sur 88
- les mutations sur le gène E7 concerne ici 9 séquences sur 88 soit 10.2% des échantillons analysés en E7 et concerne 9 patientes sur 78, soit 12% de la population étudiée

La figure 29 représente graphiquement certaines données du tableau XVI. Il permet notamment, comme pour E6, de visualiser la répartition et la fréquence des différents sites de mutations sur le gène E7.

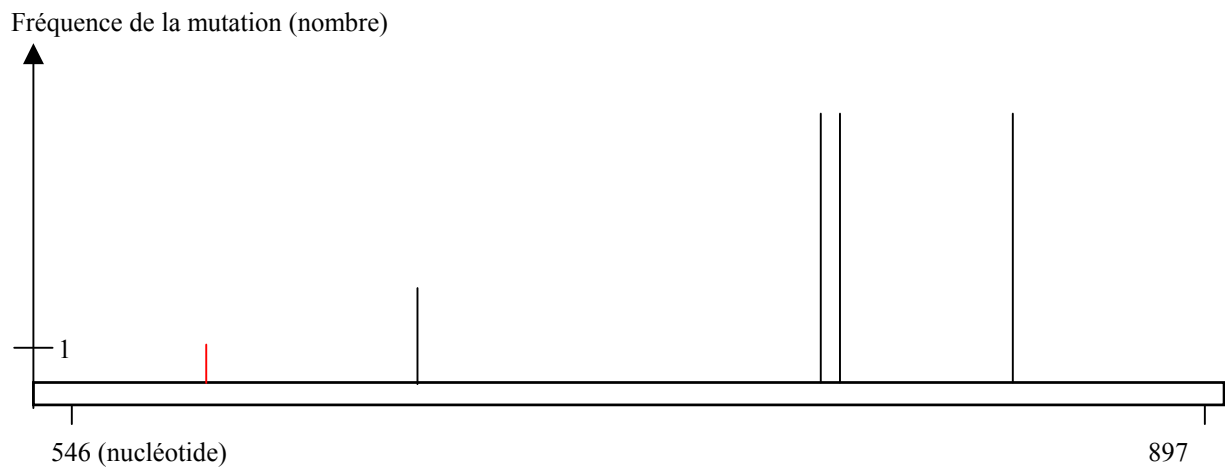


Figure 29 : position et fréquence des points de mutation sur le gène HPV16 E7, au sein des 88 échantillons analysés

- : variant déjà publié
- : mutation non publiée

Un arbre phylogénique a également été construit à partir des séquences E7, de manière identique à E6 (figure 30).

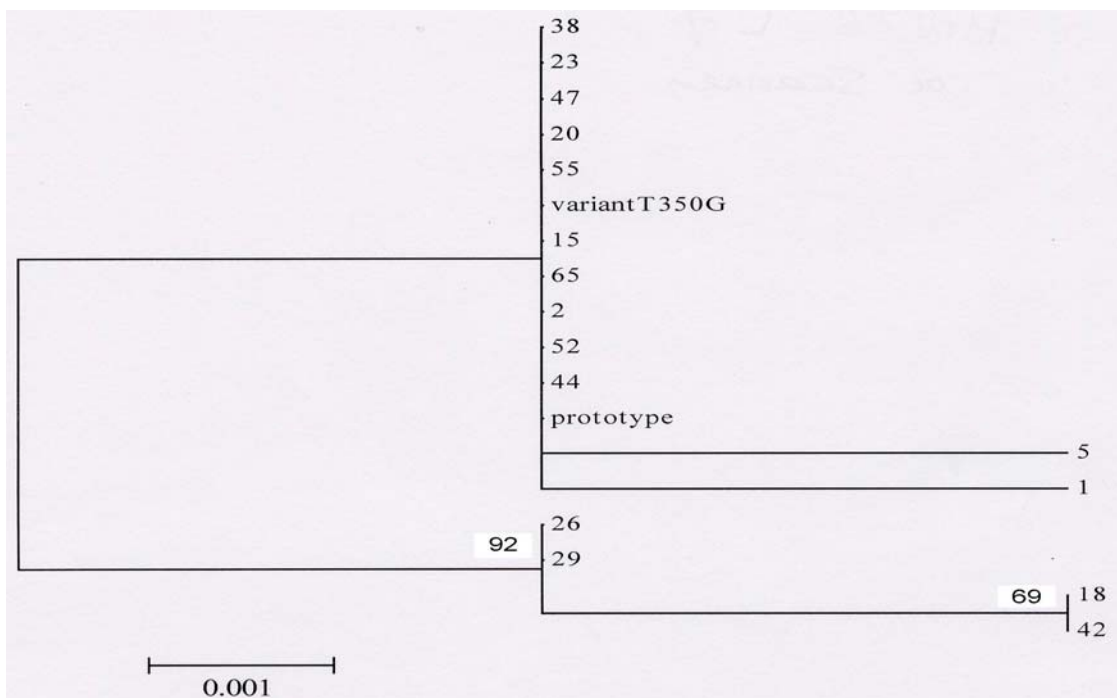


Figure 30 : arbre phylogénique, construit à partir des 88 séquences E7

Cet arbre montre que les séquences E7 analysées dans cette étude sont moins éloignées que pour E6 et ceci illustre le fait que E7 est une zone très conservée du génome HPV16. Cependant, le test de robustesse montre que les 4 souches citées précédemment pour E6, appartiennent également à un groupe de variants qui se distingue des autres HPV16 (contrairement à E6, elles semblent former un seul groupe : *bootstrap* 69%).

3.3- Analyse combinée des séquences E6 et E7

L'alignement des 83 séquences analysées en E6 et E7 a permis de construire un 3^{ème} arbre phylogénique (figure 31).

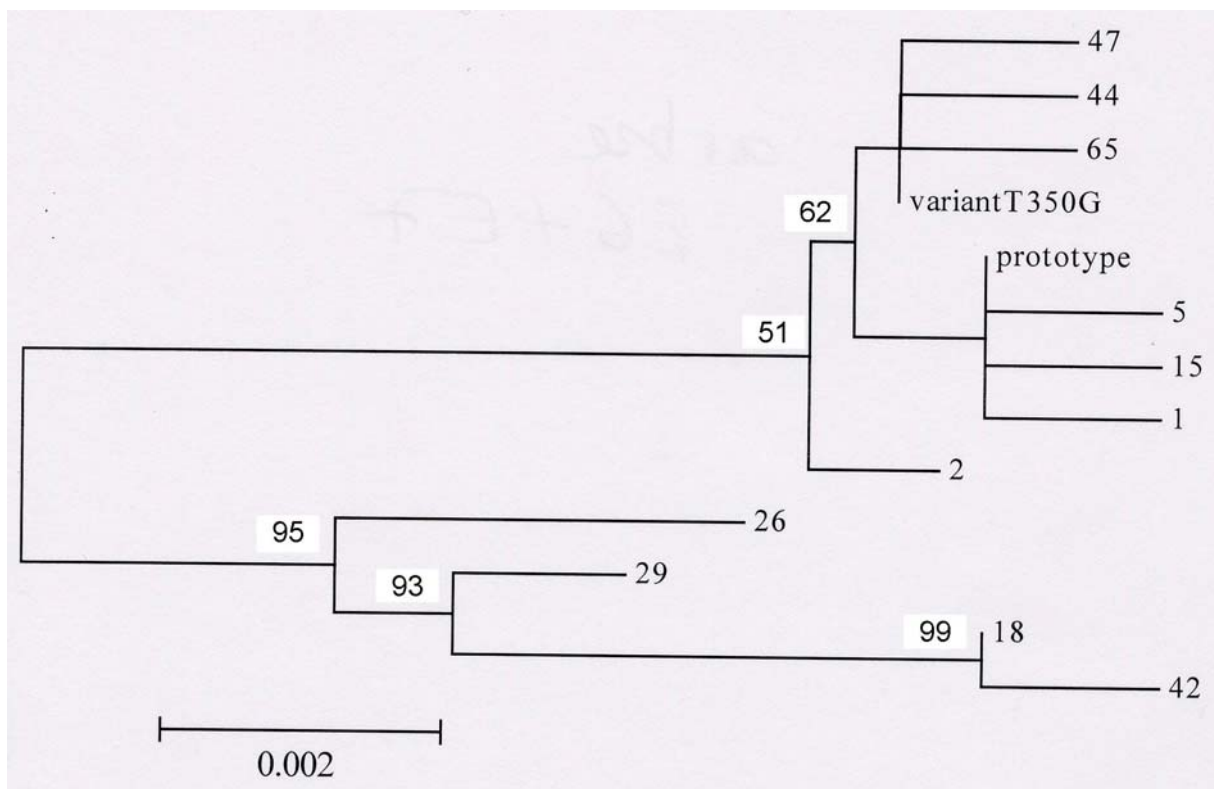


Figure 31 : arbre phylogénique, construit à partir des 83 séquences E6 et E7

Cet arbre montre de fortes similitudes avec l'arbre « E6 », compte tenu de la faible variabilité du gène E7.

3.3.1 Répartition des variants et du prototype en fonction du stade clinique

Le tableau XVII répertorie les résultats des analyses univariées, explorant le risque lié à la présence ou non d'un variant dans le développement de lésions précancéreuses et cancéreuses au niveau génital.

Tableau XVII : influence des variants sur le risque de développement de lésions génitales

	lésions (F+G)		RR (risque relatif)	p
	oui	non		
tous types de variants versus prototype	39 16	8 6	1.14	0.96
variant T350G versus non variant T350G	31 25	8 7	1.02	0.02
variant 350G isolé versus variant 350 associé	26 5	7 1	0.95	1
autres variants que T350G versus variant T350G	8 31	0 8	non interprétable	

Les 69 patientes incluses dans cette première analyse statistique sont celles, chez lesquelles l'HPV16 n'a été mis en évidence qu'une seule fois entre début 2000 et fin 2002, et celles ayant été prélevées plusieurs fois sans évolution clinique ni variation au niveau des séquences E6 et E7 entre les différents prélèvements. Cinquante cinq des 69 femmes (80%) ont présenté des lésions génitales ; parmi elles, un variant HPV16 a été retrouvé dans 39 cas (71%) et la souche prototype a été retrouvée dans 16 prélèvements génitaux sur 55.

Parmi les 14 femmes présentant une cytologie ou histologie « négative », un variant a été mis en évidence dans 8 cas (57%) et la souche prototype a été retrouvée dans 6 cas. Ces résultats montrent que la présence de variants n'est pas un facteur de risque de développement de lésions dysplasiques et cancéreuses par rapport à la souche prototype (risque relatif proche de 1, soit RR=1.14).

Le variant E6 T350G a été retrouvé chez 31 des 56 femmes présentant une dysplasie (55%) contre 8 des 15 patientes ayant un frottis normal (53%). Ce variant n'est donc pas

significativement retrouvé plus fréquemment dans les dysplasies et carcinomes que dans le groupe « négatif » (RR=1.02).

Parmi les 31 patientes ayant un HPV16 T350G et présentant des lésions génitales, le variant T350G isolé a été mis en évidence chez 26 d'entre elles (84%) contre 7 des 8 femmes ne présentant aucune dysplasie (88%). L'association de mutations supplémentaires à celle en position 350 n'aurait donc pas d'influence sur le risque de développement de lésions génitales (RR=0.95).

L'analyse du risque relatif lié aux autres variants versus le T350G n'a pas pu être réalisée. Nous pouvons cependant remarquer que tous ces autres variants sont associés à une histologie/cytologie « positive » (stade F/G).

Le tableau XVIII montre les résultats des analyses univariées, en ne prenant en compte que les femmes atteintes de dysplasie. Les lésions dysplasiques sont alors séparées en 2 groupes : stades F et G. Le but est de rechercher des variants, facteurs de risque de progression des lésions précancéreuses de bas grade en HGSIL et carcinome.

Tableau XVIII : influence des variants sur le risque de progression des lésions génitales

	lésions dysplasiques		RR (risque relatif)	p
	G	F		
tous types de variants versus prototype	32 13	6 2	0.97	1
variant T350G versus non variant T350G	25 20	5 4	1	1
variant 350G isolé versus variant 350 associé	20 5	5 0	non interprétable	
autres variants que T350G versus variant T350G	5 25	2 5	0.86	0.60

L'ensemble de ces résultats montrent que la présence d'un « variant » HPV16, quelque soit le type de variant, n'est pas un facteur de risque de progression des dysplasies, comparé à la souche prototype. Les variants T350G associés à d'autres mutations sont cependant retrouvés uniquement dans les lésions de haut grade et les carcinomes, suggérant un risque de progression élevé associé à ces variants mais l'analyse statistique n'a pas pu être réalisée.

3.3.2 Répartition des variants et du prototype en fonction de l'âge des patientes atteintes de dysplasie

Le tableau XIX montre les résultats des analyses univariées, à la recherche de mutants retrouvés en particulier chez les femmes jeunes (âge inférieur à la moyenne d'âge, soit 35.2 ans) atteintes de dysplasie, afin de mieux cibler les patientes susceptibles de développer un cancer du col.

Tableau XIX : influence des variants sur l'âge des patientes atteintes de dysplasie

	âge des patientes		RR (risque relatif)	p
	<35.2 ans	>35.2 ans		
tous types de variants	20	19	1.03	0.01
prototype	8	8		
variant T350G	17	14	1.14	0.25
non variant T350G	12	13		
variant 350G isolé	14	12	0.90	1
variant 350 associé	3	2		
autres variants que T350G	4	4	0.91	1
variant T350G	17	14		

Ces résultats montrent que les variants, quelque soit le type de variant, ne sont pas significativement retrouvés plus fréquemment chez les femmes jeunes atteintes de dysplasie, par rapport aux patientes âgées de plus de 35 ans.

3.4- Analyse d'un groupe de patientes ayant présenté une évolution clinique connue

Nous avons tenté d'analyser un groupe de patientes, pour lequel nous avons des antécédents cliniques connus et une évolution clinique entre les différents prélèvements génitaux, afin de voir si certains variants étaient associés à un réel risque de progression tumorale. Au total, 21 patientes ont été répertoriées dans le tableau XX. Dans ce tableau XX figurent le numéro de la patiente (annexe 2, pages 119-121) et l'âge correspondant au premier frottis anormal. Les

stades cliniques au premier (1) et au deuxième (2) prélèvement, le temps (en mois ou année) entre les 2 prélèvements, et les variants retrouvés sont également répertoriés dans le tableau XX.

Tableau XX : variabilité des gènes E6/E7 d'HPV16 isolés de patientes ayant présenté une évolution clinique connue

patiente n°	âge	stade clinique 1	stade clinique 2	temps entre 1 et 2	variabilité de E6 et E7
3	23	E	G	3 mois	absence
4	40	G	G (récidive)	4 mois	T350G (E6)
6	40	A	G	environ 3 ans	absence
13	22	A	F (récidive)	10 mois	T350G (E6)
16	21	F	G	11 mois	T350G (E6)
17	73	A	G	32 mois	T350G (E6)
22	37	F	G	7 mois	T350G (E6)
22	28	A	F	11 mois	T350G (E6)
27	32	F	G	environ 8 ans	absence
33	21	D	G	1 mois	T350G (E6)
37	32	A (frottis)	G (biopsie) F (frottis)	environ 2 ans	absence
41	20	D	F	4 mois	absence
42	31	F	G (récidives)	environ 3 ans	G132T (E6) T286A (E6) C335T (E6) A403G (E6) T406C (E6) A647G (E7) T789C (E7) T795G (E7)
50	25	F	G	12 mois	absence
58	56	D	G (récidive)	7 mois	T350G (E6)
62	31	A	G	environ 7 ans	T350G (E6)
63	32	F	G	14 mois	T350G (E6)
69	48	D	G	environ 11 ans	absence
70	28	G	G (récidive)	environ 4 ans	absence
73	43	G	G (récidive)	environ 3 ans	T350G (E6)
74	31	A	G	environ 2 ans	absence

Ce tableau suscite certains commentaires :

- nous avons remarqué que 14 des 21 patientes (67%) étaient âgées de moins de 35 ans à la découverte de lésions génitales.

-la souche prototype a été retrouvée chez 9 femmes sur 21 (43%) alors que le variant T350G isolé a été retrouvé chez 11 des 21 patientes (52%).

- un HPV16, présentant 5 mutations sur E6 et 3 mutations sur E7, a été isolé chez une patiente.

- une évolution cytologique des frottis entre 2 prélèvements consécutifs concerne 18 patientes de notre étude. En effet, ces femmes ont eu, soit une 1^{ère} cytologie « négative » et ont développé par la suite des lésions génitales de type LGSIL ou HGSIL, soit une dysplasie de bas grade au stade initial, qui a évolué en HGSIL. Parmi les 18 HPV16 isolés chez ces patientes, 9 correspondent au variant T350G, 8 à la souche prototype et 1 HPV16 présente de nombreuses mutations. Le T350G, présent dans 50% des cas, ne semble donc pas particulièrement associé à un risque de développement ou de progression des lésions. Cependant, le manque de standardisation des données cliniques ne permet pas d'analyser statistiquement ces résultats.
- parmi les 6 femmes ayant présenté une ou plusieurs récurrence(s) après traitement des lésions, il a été retrouvé 4 variants T350G, 1 souche prototype et 1 HPV multivariant. Le variant T350G pourrait donc être plus fréquemment associé à un risque d'échec au traitement.
- l'HPV16 multivariant a été isolé chez une femme jeune (diagnostic à 31 ans), ayant présenté de multiples récurrences depuis 1994, suggérant que ce variant aurait un comportement particulièrement agressif. Il n'a cependant été retrouvé qu'une seule fois au cours de notre étude.

Annexe 2

PATIENTE	N° HPV16	AGE	VARIATION GENE E6	VARIATION PROTEINE E6	VARIATION GENE E7	VARIATION PROTEINE E7	STATUT CLINIQUE	ANTECEDENTS CONNUS
1	20234135	44	absence	absence	A822G	absence	F	non connus
2	20006477	34	A131G	Arg10Gly	absence	absence	G	non connus
			T350G	Leu83Val				
3	20248078	23	absence	absence	absence	absence	G	frottis E (07/02)
4	20204993	40	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	récidive ap ttt (G: 10/01)
5	20024186	25	absence	absence	G597A	Met12Ile	G	frottis G (02/00)
6	20007788	40	absence	absence	absence	absence	G	frottis A (97) et G (01/00)
7	20248716	40	absence	absence	absence	absence	D	non connus
8	20007730	23	T350G	Leu83Val	absence	absence	F	frottis F(01/00)
9	20006362	25	absence	absence	absence	absence	G	frottis G (07/99)
10	20204621	36	absence	absence	absence	absence	G	non connus
11	20134465	27	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
12	20204893	37	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
13	20007871	23	T350G	Leu83Val	absence	absence	F	biop.F(01/99) frot.A (06/99)
14	20042788	30	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	G (09/00)
15	20131374	33	absence	absence	absence	absence	D	non connus
	20220924	34	A384C	Lys94Thr	absence	absence	D	
16	20100481	21	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	F (03/00)
	20162183	73	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	frottis A (04/99)
18	20006286	30	G132T	Arg10Thr	A647G	Asn29Ser	F	F (11/99)
			T286A	absence	T795C	absence		
			C335T	His78Tyr				
			A403G	absence				
19	20042201	23	absence	absence	absence	absence	G	G (06/00)
20	20043091	28	non analysé	non analysé	absence	absence	G	G (10/00)
21	20007825	40	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
21	20025497	41	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	
22	20154705	37	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	frottis F(04/01)
23	20100298	23	non analysé	non analysé	absence	absence	F	frottis F (12/00)
24	20243873	33	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
25	20113662	28	T350G	Leu83Val	absence	absence	F	frottis A (04/01)
26	20243338	44	A131G	Arg10Gly	T789C	absence	G	non connus
			A289G	absence	T795C	absence		
			T295G	Asp64Glu				
			C335T	His78Tyr				
			T350G	Leu83Val				
27	20007828	32	absence	absence	absence	absence	G	frottis F (92)
28	20248721	60	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
29	20042066	34	A289G	absence	T789C	absence	G	non connus
			C335T	His78Tyr	T795G	absence		
			A359G	Thr86Ala				
30	20229675	31	absence	absence	absence	absence	D	non connus
31	20024086	75	absence	absence	absence	absence	G	non connus
32	20234628	41	absence	absence	absence	absence	G	frottis G (07/02)
33	20043422	21	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	frottis D (10/00)

34	20007547	20	T350G	Leu83Val	absence	absence	A	non connus
----	----------	----	-------	----------	---------	---------	---	------------

35	20220348	56	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	G (03/02)
36	20213528	29	T350G	Leu83Val	absence	absence	D	frottis G (06/99)
37	20134110	32	absence	absence	absence	absence	G	frottis A (99)
38	20131584	33	non analysé	non analysé	absence	absence	A	non connus
39	20213807	34	T350G	Leu83Val	absence	absence	A	non connus
40	20248417	53	absence	absence	absence	absence	G	non connus
41	20101818	20	absence	absence	absence	absence	F	frottis D (12/00)
42	20101882	38	G132T	Arg10Thr	A647G	Asn29Ser	G	G (94,95,96) F (97,98)
			T286A	absence	T789C	absence		
			C335T	His78Tyr	T795G	absence		
			A403G	absence				
			T406C	absence				
43	20101091	30	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
44	20248107	24	C256T	absence	absence	absence	G	non connus
			T350G	Leu83Val				
45	20006719	39	absence	absence	non analysé	non analysé	G	frot.E(09/99) bio.G(12/99)
46	20229905	39	T350G	absence	absence	absence	G	frottis G (06/02)
	20234171	39	absence	absence	absence	absence	G	
47	20243561	22	C470G	Gln123Glu	absence	absence	C	frottis F (08/99 et 08/01)
			T350G	Leu83Val				
48	20220428	38	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	frottis G (03/02)
49	20243246	36	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
50	20134437	25	absence	absence	absence	absence	F	non connus
	20243241	26	absence	absence	absence	absence	G	
51	20243340	21	T350G	Leu83Val	absence	absence	D	non connus
52	20100109	29	non analysé	non analysé	absence	absence	G	frottis D (10/00)
	20100110	29	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	
53	20162189	54	T350G	Leu83Val	absence	absence	D	non connus
54	20248326	24	absence	absence	absence	absence	D	frottis col A (01/01)
55	20043834	45	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus (frottis A)
	20131127	46	non analysé	non analysé	absence	absence	?	
56	20154894	38	absence	absence	A822G	absence	G	non connus (frottis F)
57	20243339	24	absence	absence	absence	absence	D	non connus
58	20042245	56	T350G	Leu83Val	absence	absence	D	G (06/00) conisation (07/00)
	20101616	57	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	
59	20234787	31	T350G	Leu83Val	absence	absence	A	non connus
60	20134255	30	T350G	Leu83Val	absence	absence	F	G (03/01)
61	20006133	41	C278G	Pro59Ala	absence	absence	G	biop.vulv. G (11/99)
			T350G	Leu83Val				
62	20100300	31	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	frottis A (94) et F (09/99)
63	20043058	32	T350G	Leu83Val	absence	absence	F	frottis F (10/00)
	20204056	34	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	
	20213921	34	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	
64	20229946	64	absence	absence	A822G	absence	G	non connus
65	20042485	30	T183G	Iso27Arg	absence	absence	G	non connus
			T350G	Leu83Val				
	20101125	30	T183G	Iso27Arg	absence	absence	G	
			T350G	Leu83Val				
66	20243922	37	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
67	20043055	35	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	biopsie G (09/99)
68	20024203	33	absence	absence	absence	absence	G	non connus
69	20154268	48	absence	absence	absence	absence	G	frottis D (90)
70	20006872	32	absence	absence	absence	absence	F	b. vulv. G (87,01) ttt laser
71	20101415	28	absence	absence	absence	absence	A	non connus

72	20134722	57	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	frottis G (08/01)
73	20100578	46	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	G (97) récidence ap. laser (98)
74	20042176	31	absence	absence	absence	absence	G	frottis A (02/98)
	20042442	31	absence	absence	absence	absence	G	
75	20006060	44	T350G	Leu83Val	absence	absence	G	non connus
76	20042196	38	absence	absence	absence	absence	D	non connus
77	20100933	35	absence	absence	A822G	absence	G	frottis G (01/01)
78	20101622	32	T350G	Leu83Val	absence	absence	D	non connus

DISCUSSION

Parmi les papillomavirus humains associés aux cancers de col de l'utérus, le génotype 16 est le plus fréquemment retrouvé. Le pouvoir oncogène de ces virus implique essentiellement les protéines E6 et E7. La démarche de notre travail a été d'amplifier et de séquencer les 2 gènes codant pour ces oncoprotéines afin d'étudier la variabilité de ces 2 régions. Ces données ont été confrontées avec les résultats cytologiques et/ou histologiques des prélèvements cervico-vaginaux d'une cohorte de femmes suivies dans le service de gynécologie-obstétrique au CHU de Nantes entre le 1^{er} Janvier 2000 et le 31 Décembre 2002. Sur le plan épidémiologique, l'objectif était de répertorier l'ensemble des variants E6/E7, d'analyser la phylogénie des HPV16 à partir de ces séquences et la fréquence de chaque variant parmi les 78 patientes incluses dans cette étude. Sur le plan clinico-biologique, nous avons tenté d'établir une relation entre certains variants E6/E7 et un risque accru de progression vers des lésions génitales cancéreuses.

Quatre-vingt neuf extraits d'ADN ont été analysés dans cette étude rétrospective, à partir du recrutement de 78 femmes. Le nombre important d'échantillons testés dans notre étude nous permet d'envisager une exploitation épidémiologique des données. Il est comparable à celui d'autres travaux : Nindl a publié une étude à partir de l'analyse de 112 échantillons, soit 75 frottis et 37 biopsies (Nindl *et al.*, 1999), Hu et ses collaborateurs ont séquencé les régions E5, E6 et E7 des HPV16 mis en évidence dans 61 cas de HGSIL ou carcinome (Hu *et al.*, 2001b), et 101 échantillons ont été séquencés en E6 dans l'étude de Luxton (Luxton *et al.*, 2000). Certains auteurs ont même publiés sur des cohortes 2 fois moins importantes (Hu *et al.*, 1999 ; Buonaguro *et al.*, 2000 ; Perez-Gallero *et al.*, 2001). Cependant, quelques études multicentriques ont analysé un très grand nombre de femmes : 301 patientes ont été incluses dans l'étude des variants LCR publiée par Ho en 1993 (Ho *et al.*, 1993) et Yamada a analysé la variabilité des gènes E6, L1 et LCR à partir de 407 cancers invasifs (Yamada *et al.*, 1997).

Dans un premier temps, nous avons mis au point les PCR afin d'amplifier les gènes E6 et E7 des HPV16 identifiés dans les différents prélèvements génitaux de notre cohorte. La PCR E7 a été réalisée sur 88 des 89 échantillons, par manque de matériel génétique pour l'un d'entre eux. L'amplification du gène E6 n'a pas été possible pour 5 échantillons.

L'hypothèse d'un manque de sensibilité de cette PCR ne peut être avancée du fait que ces mêmes échantillons ont été amplifiés par la PCR E7, pourtant moins sensible que la PCR E6. Une autre hypothèse serait que des mutations soient présentes au niveau du site de fixation de nos amorces. En effet, la partie du gène codant pour l'oncoprotéine E6 de la souche de référence HPV16 est située entre les nucléotides 83 et 559 (Seedorf *et al.*, 1985) alors que la région que nous avons amplifiée est un fragment de 469 pb, compris entre les nucléotides 94 et 562 (en incluant les zones d'hybridation des 2 amorces : 94-113 et 543-562). Par conséquent, l'ensemble du gène codant pour E6 n'a pas été totalement exploré dans notre étude. Or, certains travaux ont décrit des variants au début du gène E6, en particulier au niveau de la fixation de notre première amorce : A83C (Xi *et al.*, 1997 ; van Duinn *et al.*, 2000), C99A (Stephen *et al.*, 2000), T109C (Weehler *et al.*, 1997 ; Hu *et al.*, 2001a ; ...), C110G (Zehbe *et al.*, 2001 ; Kämmer *et al.*, 2002) et A111C (Hu *et al.*, 2001b ; Kämmer *et al.*, 2002 ; ...). Par ailleurs, aucune étude n'a montré de variation sur ce même gène après le nucléotide 532. La variation d'un seul nucléotide au niveau de la zone d'hybridation des amorces peut gêner leur fixation, ne permettant plus l'amplification. Ceci pourrait donc expliquer que pour un même échantillon, la PCR E6 soit négative et la PCR E7 positive. Concernant E7, la zone amplifiée est un fragment situé entre les nucléotides 546 et 897 (352 pb). L'intégralité du gène codant pour la protéine E7 (562-858) a donc été amplifiée et analysée.

Dans un deuxième temps, nous avons séquencé les fragments amplifiés E6 et E7. Au niveau de ces 2 régions, seules des mutations ponctuelles ont été mises en évidence, ce qui corrobore l'ensemble des données de la littérature sur la variabilité de ces gènes, puisque aucune délétion ou insertion n'a été décrite.

Nous avons ainsi répertorié 15 mutations au niveau de la région E6, concernant 63% (46/73) de la population étudiée. Dix de ces mutations ont déjà été publiées. Nous décrivons donc 5 nouveaux variants, dont 4 correspondent à un changement d'acide aminé : C278G (Pro59Ala), A359G (Thr86Ala), A384C (Lys94Thr), T406C et C470G (Gln123Glu). Chacun de ces variants n'a été mis en évidence qu'une seule fois. De nombreux autres variants ont été mentionnés dans la littérature au niveau du gène E6 et de nouvelles mutations sont régulièrement décrites, pour la plupart, avec une faible fréquence (Xi *et al.*, 1997 ; Hu *et al.*, 2001a, 2001b ; van Duinn *et al.*, 2000).

Au sein du gène E7, le nombre de mutations retrouvées est plus réduit. En effet, seules 5 mutations ont été mises en évidence et elles ne concernent que 10.4% (8/77) des femmes incluses dans notre étude. Le variant G597A, correspondant à la substitution d'une méthionine par une isoleucine au niveau du codon 12 de la protéine E7, n'a jamais été décrit dans la littérature, à l'inverse des 4 autres. Le gène E7 apparaît donc comme une zone très conservée du génome HPV16, confirmant de précédentes études (Icenogle *et al.*, 1991 ; Eschle *et al.*, 1992).

A l'issue de ces analyses de séquences, nous avons construit 2 arbres phylogéniques, sur la base des gènes E6 et E7, afin de visualiser d'une part, le degré d'homologie des différentes séquences entre elles par la méthode des distances NJ, et d'autre part, d'éventuels regroupements de variants au sein de branches distinctes par la méthode du *bootstrap*. Nous avons ensuite construit un 3^{ème} arbre à partir de l'alignement des 2 séquences (E6 et E7). Celui-ci présente de nombreuses similitudes avec le premier arbre (E6), du fait de l'appartenance du gène E7 aux zones les plus conservées du génome HPV16.

Ces 3 arbres phylogéniques montrent clairement 2 groupes distincts, avec une des branches internes comprenant 4 souches, définie par un *bootstrap* supérieur ou égal à 85% (soit une robustesse élevée). Ces 4 HPV16 semblent donc appartenir à une classe différente des autres HPV16 retrouvés dans notre étude. Les autres tests de robustesse montrent des *bootstrap* élevés également au sein même de ces 4 souches. Elles pourraient donc appartenir à des classes différentes.

La détermination des *clusters* au sein des HPV16 fait référence, dans les classifications les plus récentes, à l'analyse cumulée des gènes LCR, L1 et E6 (Yamada *et al.*, 1997). Néanmoins, à partir de notre arbre phylogénique construit seulement sur l'analyse de E6, nous pouvons tout de même extrapoler la classification de certains de nos variants. Ainsi, la mutation en position 335, décrite uniquement dans les groupes NA1 (*North American 1*), Af (*African*) et AA (*Asian-American*) d'après Yamada (Yamada *et al.*, 1997) (tableau III, page 66), n'a été retrouvée que pour les 4 souches citées précédemment. Ceci suggère l'appartenance de ces HPV16 à l'un de ces *clusters*. En dehors de ces 4 souches, les HPV16 identifiés à partir des prélèvements génitaux de notre population, appartiendraient donc au cluster E, largement majoritaire en Europe (Yamada *et al.*, 1997).

Les souches 18 et 42 présentent une mutation commune en position 132 (G132T). Cette mutation n'a été décrite que dans le *cluster* Af2 selon Yamada et Hu (Yamada *et al.*, 1997 ; Hu *et al.*, 1997), suggérant l'appartenance de cet HPV16 à cette même classe. Cependant certaines mutations spécifiques retrouvées dans ce groupe et décrites par Yamada (en position 143 et 145), n'ont pas été mises en évidence dans notre étude.

Par ailleurs, la souche 26 semble appartenir à un groupe différent (robustesse élevée). Elle présente une mutation en position 131 (A131G), associée à C335T. Ce multivariant n'a été décrit que dans le *cluster* Af1, mais comme pour les 2 souches décrites précédemment, les variations en position 143 et 145 n'ont pas été retrouvées.

La souche 29 semble également appartenir à une classe spécifique, en raison d'un *bootstrap* supérieur à 85%, mais aucune mutation spécifique de groupe, décrite dans la littérature, n'a été retrouvée.

L'analyse des régions L1 et de la LCR pourrait alors permettre de mieux définir les *clusters* auxquels sont rattachés ces 4 HPV16. Il semble cependant très probable que les autres souches isolées dans notre étude appartiennent au groupe E.

Nous avons ensuite réalisé une analyse clinico-biologique et statistique, afin d'explorer la relation entre certains variants et le risque d'évolution vers un processus tumoral.

Les résultats de la répartition des lésions au sein de notre cohorte montrent que plus des $\frac{3}{4}$ des patientes HPV16+ incluses dans notre étude présentent des lésions dysplasiques, soulignant la fréquence importante de lésions génitales avec ce génotype (Munoz *et al.*, 2000).

Nous avons d'abord comparé la distribution des variants, tous types confondus, avec la souche prototype en fonction des résultats cytologiques et histologiques « positifs » ou « négatifs ». Ainsi, la présence d'un variant ne semble pas significativement être un facteur de risque de développement des lésions dysplasiques comparé au prototype (RR=1.14).

Nous avons alors tenté une analyse statistique de chacun des variants pris isolément. Au cours de notre étude, le variant E6 T350G a été retrouvé avec la plus grande fréquence, dans 57% (48/84) des échantillons, soit chez 58% (42/73) des femmes. Ces résultats rappellent ceux de Yamada, qui montre que le variant T350G est présent dans 38% des carcinomes invasifs

(Yamada *et al.*, 1997) et de Nindl, où ce même variant est retrouvé dans 46% des cas (Nindl *et al.*, 1999). Dans notre étude, ce variant a été mis en évidence dans 55% des lésions contre 53% dans le groupe « négatif », suggérant que ce variant n'est pas un facteur de risque de développement de dysplasies génitales (RR=1.02). Ces résultats confirment ceux de Nindl (Nindl *et al.*, 1999) : parmi 75 femmes, le variant T350G a été retrouvé avec la même prévalence dans tous les stades de la maladie et dans le groupe contrôle (cytologie normale). Une autre étude a montré, au contraire, au sein d'une cohorte de 28 femmes, que le variant T350G était fortement lié à une persistance virale accrue, favorisant le risque d'évolution vers le cancer (Londesborough *et al.*, 1996).

Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre le risque associé au variant T350G isolé et celui lié à ce même variant, associé à d'autres mutations sur le gène E6 et/ou E7 (RR=0.95). La présence de mutations supplémentaires ne serait donc pas associée à un risque accru de développement de lésions génitales, confirmant en ceci les travaux de Zehbe : celui-ci a en effet montré, chez 90 femmes atteintes de CIN3 ou de carcinome invasif, une prévalence élevée du variant T350G dans les carcinomes (88%) contre 44% des CIN3, mais l'absence de modification du risque de progression lorsque d'autres mutations y sont associées (Zehbe *et al.*, 1998b).

Au sein du groupe « positif », nous avons ensuite distingué les différents stades cliniques (LGSIL, HGSIL et carcinomes). Des variants sont retrouvés dans 75% (6/8) des lésions de bas grade et dans 71% (32/45) des HGSIL et carcinomes, ne montrant pas de différence significative (RR=0.97). De même, pour le variant T350G pris isolément, il est retrouvé avec la même prévalence dans les LGSIL et les HGSIL/cancers, soit 56% (5/9 des LGSIL contre 25/35 des lésions de type « G ») (RR=1). Ainsi, dans notre étude, aucun variant ne semble particulièrement associé à un risque de progression élevé des lésions de bas grade vers des lésions de haut grade ou en carcinome. Ces résultats sont en accord avec ceux de Nindl, en Allemagne (Nindl *et al.*, 1999) et de Andersson et Hu, en Suède (Andersson *et al.*, 2000 ; Hu *et al.*, 2001a, 2001b). Cependant, ces résultats sont controversés : Londresborough a montré au sein d'une cohorte de 47 femmes que le variant T350G était lié à une progression des lésions dysplasiques (Londesborough *et al.*, 1996) et Zehbe a confirmé que parmi 38 patientes suédoises (22 lésions de types CIN3 et 16 carcinomes invasifs) le variant T350G était beaucoup plus fréquemment retrouvé dans les carcinomes, soit dans 69% des cancers contre

27% dans les CIN3 (Zehbe *et al.*, 1998a).

La modification de structure de la protéine E6 occasionnée par la substitution d'une valine par une leucine au niveau du 83^{ème} codon pourrait expliquer la majoration du pouvoir oncogène de ce variant. En effet, cette substitution pourrait altérer le bon fonctionnement de la réaction immunitaire, en particulier lors de la reconnaissance de certains épitopes par les molécules du CMH et favoriser ainsi la persistance virale et donc le risque de progression vers le cancer (Londesborough *et al.*, 1996). La protéine mutée pourrait également différer dans sa capacité à interagir avec les protéines régulatrices du cycle cellulaire, notamment les protéines suppresseurs de tumeur. Stöppler a d'ailleurs décrit qu'une variation au niveau du 83^{ème} codon de la protéine E6 augmenterait son affinité pour la protéine antitumorale p53, et que les HPV mutés en position 350 seraient plus fréquemment retrouvés dans les carcinomes (Stöppler *et al.*, 1996).

De plus, Zehbe a introduit le facteur d'ethnicité comme facteur associé au pouvoir oncogène du variant T350G. En effet, il a montré des résultats contradictoires entre 2 populations, d'une part en Suède, où ce variant semblerait lié à un risque élevé de développement de cancer cervical et d'autre part, en Italie, où il serait lié à l'inverse à un facteur de bon pronostic (Zehbe *et al.*, 1998a). Bontkes a montré que le type HLA DRB1*07 était plus fréquemment retrouvé chez les femmes infectées par le variant T350G, comparé au prototype (Bontkes *et al.*, 1998) et Zehbe a récemment mis en évidence que certains types HLA de classe I (B*44, B*51 et B*57), associés à ce même variant, avaient un risque 4 à 5 fois plus important de développer un carcinome invasif par rapport au groupe contrôle (Zehbe *et al.*, 2003). Par ailleurs, ces résultats émettent l'hypothèse que certaines prédispositions génétiques, en particulier le type HLA, sont impliquées dans le potentiel oncogénique de certains variants et donc influent sur le risque de progression des lésions vers le cancer.

Par ailleurs, certains auteurs évoquent l'hypothèse de l'existence de polymorphismes génétiques modifiant l'interaction de la protéine E6 avec certaines cibles cellulaires et prédisposant au développement d'un cancer cervical. Une étude hollandaise (van Duinn *et al.*, 2000) a notamment montré que la présence d'une arginine en position 72 de la p53, associée au prototype, était fortement associée au cancer cervical comparé au groupe de patientes ayant une proline en position 72 (la p53 ayant une arginine au 72^{ème} codon serait plus facilement dégradée par la protéine virale E6 mutée). A l'inverse, aucune différence significative n'est retrouvée si le polymorphisme seul de la p53 est comparé au risque de survenue d'un carcinome (Klug *et al.*, 2001). Il faut noter que le variant T350G n'a jamais été

incriminé dans la modification de l'affinité de E6 vis-à-vis de la protéine suppresseur de tumeur, quelque soit sa structure (Brady *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces différents résultats souligne la complexité des mécanismes concourant au processus oncogène. Il semble que l'association de certaines mutations avec certains facteurs, génétiques en particulier, soit nécessaire pour augmenter le risque de progression.

Dans cette étude, nous nous sommes également intéressés aux variants, autres que le T350G du gène E6. Nous avons approfondi les observations des 4 souches portant la mutation C335T, qui se différenciaient très distinctement sur les arbres phylogéniques. Ces 4 HPV16 présentent tous une accumulation de mutations sur E6 mais également sur le gène E7. Or, la totalité des autres variants analysés ne présentent pas plus de 2 mutations au niveau de E6 et E7. Du point de vue clinique, ce groupe de 4 patientes était systématiquement associé à des lésions dysplasiques au niveau cervical (1 LGSIL et 3 HGSIL), suggérant une oncogénicité particulièrement élevée de ces virus. Or, plusieurs études ont montré que les HPV16 appartenant aux *clusters* non-*European* étaient plus oncogènes que dans le groupe *European* (Xi *et al.*, 1997 ; Villa *et al.*, 2000 Berumen *et al.*, 2001), ce qui renforce l'hypothèse de l'appartenance de ces 4 souches à une classe phylogénique non-E.

Un nombre élevé de mutations pourrait expliquer un pouvoir oncogène supérieur de ces souches, bien qu'aucune référence bibliographique n'ait à l'heure actuelle, souligné l'intérêt de comptabiliser le nombre de mutations au niveau de ces gènes. Une autre hypothèse serait que ces mutations soient responsables de la modification de la structure de la protéine, au niveau des zones impliquées dans la réaction immunitaire d'une part, et dans la liaison avec la protéine antitumorale p53 d'autre part, comme cela avait été évoqué précédemment pour le variant T350G. En effet, Crook a décrit les variants A131G, G132T et C335T, correspondant à des substitutions d'acides aminés au niveau de la région N-terminale en position 10 et 78, comme responsables d'une dégradation accélérée de la p53 (Crook *et al.*, 1995). Il a également montré que les variants A403G, T406C, C470G, correspondant à des changements d'acides aminés au niveau de la région C-terminale en position 100, 101 et 123, seraient impliqués dans l'augmentation de l'affinité pour la p53. Toutes ces mutations, identifiées dans notre travail, l'ont été uniquement dans le groupe des 4 patientes appartenant à des classes phylogéniques non-E, donc chez des patientes présentant toutes des dysplasies. Le pouvoir particulièrement oncogène de ces souches pourrait donc s'expliquer par de

nombreuses mutations dans des zones impliquées d'une part, dans la réaction immunitaire (favorisant le phénomène d'échappement par la modification d'épitopes), et d'autre part, dans les zones particulièrement impliquées dans la liaison de E6 avec la protéine antitumorale p53 (augmentant l'affinité de l'oncoprotéine pour la p53 et favorisant sa dégradation : principal mécanisme oncogène mis en évidence pour la protéine E6).

Considérant plus particulièrement le gène E7, nous avons remarqué que le variant A882G, jamais associé à d'autres mutations sur E6 et E7, n'était retrouvé que chez 4 patientes présentant toutes une dysplasie cervicale (1 LGSIL, 2 HGSIL et 1 carcinome). Cette mutation a déjà été associée à une prévalence élevée dans les lésions cervicales (Nindl *et al.*, 1999). Cependant, ce variant n'entraîne pas de substitution d'acide aminé, suggérant que le pouvoir oncogène et immunogène ne seraient pas strictement lié à une modification structurale de la protéine. Aucune hypothèse à ce jour n'a été formulée concernant l'explication du risque associé à ce type de variant.

Quant au variant A647G, il n'a été isolé que chez 2 patientes, présentant une LGSIL et une HGSIL. Cette mutation était associée à de multiples variations sur E6 et E7 (« groupe » phylogénique particulier). Ce variant est le principal décrit dans la littérature (Icenogle *et al.*, 1991 ; Eschle *et al.*, 1992 ; ...) sur E7. Il est associé à un changement d'acide aminé en position 29 (Asn29Ser). Or, la substitution d'une asparagine par une sérine au niveau du codon 29 serait impliquée dans la liaison de E7 avec la pRB et dans la reconnaissance par les cellules du système immunitaire (Kast *et al.*, 1994), suggérant que ce variant est un facteur de risque d'évolution vers le cancer. Cependant, des études ont montré une affinité identique de ce variant à celle du prototype pour la pRB (Chow *et al.*, 2000) et aucune étude n'a pu montré de réel échappement à la réaction immunitaire par la modification d'épitopes au niveau de la protéine E7 mutée. Dans notre étude, le faible recrutement de ce variant n'a pas permis de réaliser une analyse statistique exploitable. Il est donc difficile d'associer ce variant à un risque accru de progression.

Nous avons enfin analysé la répartition des variants et du prototype en fonction de l'âge des patientes atteintes de dysplasie, pour tenter de cibler plus précisément les femmes,

parmi lesquelles la surveillance clinico-biologique devrait être accrue. Les variants sont retrouvés avec la même prévalence chez les femmes jeunes (inférieur à la moyenne d'âge de 35.2 ans) et les patientes âgées de plus de 35 ans (RR=1.03). Les différentes analyses réalisées suggèrent également qu'il n'y a pas de variant spécifique retrouvé plus fréquemment chez ces femmes jeunes atteintes de dysplasies. Ces résultats ne sont donc pas en accord avec les travaux de Radhakrishna (Radhakrishna *et al.*, 2002), qui a montré que le variant E350G associé au variant G145T était plus fréquemment retrouvé chez les femmes jeunes, suggérant que ce variant, en accélérant le processus tumoral, aurait un pouvoir oncogène supérieur aux autres.

Au total, nos résultats montrent que le variant T350G est fréquemment retrouvé dans la population. Il est présent à tous les stades de la maladie, mais aussi chez les femmes ayant une cytologie normale. Les variants HPV16, en particulier le T350G, ne sembleraient pas associés à une augmentation du risque de progression des lésions dysplasiques, allant à l'encontre de certains travaux, mais les mécanismes d'oncogénicité sont complexes et associés à de nombreux cofacteurs endogènes et exogènes.

Concernant le gène E7, nos résultats montrent un faible niveau de variabilité, de façon similaire aux rares données de la littérature existantes. Une étude statistiquement fiable nécessiterait de poursuivre ces travaux en incluant un nombre beaucoup plus important de patientes afin d'évaluer spécifiquement le rôle de chaque variant dans le risque de développement d'un cancer du col de l'utérus. Ainsi, la recherche de mutations seule sur E7 semble à priori avoir un intérêt clinique limité.

Une importante analyse prospective, multicentrique et multivariée, prenant en compte d'autres cofacteurs (épidémiologiques, cliniques, génétiques, ...) en parallèle de l'étude de la variabilité des oncogènes, E6 en particulier, pourrait permettre de définir de manière plus significative le rôle des variants E6 et E7 dans le risque de progression des lésions et de mieux cibler les femmes les plus à risque de développer un cancer du col utérin.

CONCLUSION

Nous avons amplifié et séquencé les gènes E6 et E7 d'HPV16 isolés de prélèvements génitaux au sein d'une cohorte de 78 femmes dans la région nantaise. Sur le plan épidémiologique, nous avons mis en évidence, pour environ 2/3 des patientes, des mutations ponctuelles au niveau de la région E6, dont certaines correspondent à des substitutions d'acides aminés lors de la traduction protidique et c'est le variant T350G, retrouvé chez plus de 50% des femmes, qui est le plus largement représenté dans cette cohorte. A l'inverse, les variations au niveau du gène E7 sont peu nombreuses et ne concernent qu'un petit nombre de patientes.

Sur le plan clinico-biologique, cette mutation en position 350 ne semble pas être un facteur de risque pour le développement de lésions dysplasiques et aucun variant en particulier ne paraît être associé à un risque élevé d'évolution des lésions vers le cancer. La recherche de mutations seule semble donc présenter un intérêt clinique limité, mais les mécanismes oncogènes sont très complexes.

A l'heure actuelle, le génotypage reste donc encore insuffisant pour définir précisément les femmes les plus susceptibles de développer un cancer du col utérin. D'autres facteurs (prédispositions génétiques et en particulier le type HLA, statut immunitaire, comportement sexuel, ...), associés à la recherche de variants (E6 en particulier) doivent également être inclus dans une importante étude prospective afin de mieux prédire le réel risque de progression des lésions génitales lié à certaines mutations.

BIBLIOGRAPHIE

- Andersson, S., M. Alemi, E. Rylander, A. Strand, B. Larsson, J. Sallstrom, and E. Wilander.** 2000. Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer* **83**:307-10.
- Bernard, C., C. Mougin, R. Laurent, and M. Lab.** 1994. Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. *Cancer Detect Prev* **18**:273-82.
- Bernard, C., C. Mougin, L. Madoz, C. Drobacheff, H. Van Landuyt, R. Laurent, and M. Lab.** 1992. Viral co-infections in human papillomavirus-associated anogenital lesions according to the serostatus for the human immunodeficiency virus. *Int J Cancer* **52**:731-7.
- Berumen, J., R. M. Ordonez, E. Lazcano, J. Salmeron, S. C. Galvan, R. A. Estrada, E. Yunes, A. Garcia-Carranca, G. Gonzalez-Lira, and A. Madrigal-de la Campa.** 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* **93**:1325-30.
- Birley, H. D., C. A. Hart, and S. N. Stacey.** 1995. Human papillomaviruses and the genital tract: old virus, new developments. *J Med Microbiol* **43**:81-4.
- Bonnez W.** 2002. Papillomavirus. In: Richman D.D., Whitley, Hayden F.G., eds. *Clinical Virology*. 2nd ed. Vol.1 Washington : ASM Press 557-96.
- Bontkes, H. J., M. van Duin, T. D. de Gruijl, M. F. Duggan-Keen, J. M. Walboomers, M. J. Stukart, R. H. Verheijen, T. J. Helmerhorst, C. J. Meijer, R. J. Scheper, F. R. Stevens, P. A. Dyer, P. Sinnott, and P. L. Stern.** 1998. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer* **78**:166-71.
- Brady, C. S., M. F. Duggan-Keen, J. A. Davidson, J. M. Varley, and P. L. Stern.** 1999. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol* **80**:3233-40.
- Broker, T. R., G. Jin, A. Croom-Rivers, S. M. Bragg, M. Richardson, L. T. Chow, S. H. Vermund, R. D. Alvarez, P. G. Pappas, K. E. Squires, and C. J. Hoesley.** 2001. Viral latency--the papillomavirus model. *Dev Biol (Basel)* **106**:443-51; discussion 452-3, 465-75.
- Buonaguro, F. M., M. L. Tornesello, I. Salatiello, P. Okong, L. Buonaguro, E. Beth-Giraldo, B. Biryahwaho, S. D. Sempala, and G. Giraldo.** 2000. The uganda study on HPV variants and genital cancers. *J Clin Virol* **19**:31-41.
- Chan, P. K., C. W. Lam, T. H. Cheung, W. W. Li, K. W. Lo, M. Y. Chan, J. L. Cheung, L. Y. Xu, and A. F. Cheng.** 2002. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Infect Dis* **186**:696-700.

- Chow, V. T., E. Loh, W. M. Yeo, S. Y. Tan, and R. Chan.** 2000. Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. *Pathology* **32**:204-8.
- Clavel C., M. Masure, J.P. Bory, I. Putaud, C. Mangeonjean, M. Lorenzato, P. Nazeyrollas, R. Gabriel, C. Quereux, P. Birembaut.** 2001. Human Papillomavirus testing in primary screening for the detection of high grade cervical lesions :a study of 7932 women. *Brit J Cancer*, **89**:1616-23.
- Crook, T., J. A. Tidy, and K. H. Vousden.** 1991. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* **67**:547-56.
- de Roda Husman, A. M., J. M. Walboomers, A. J. van den Brule, C. J. Meijer, and P. J. Snijders.** 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76**:1057-62.
- Degenhardt, Y. Y., and S. J. Silverstein.** 2001. Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* **75**:151-60.
- Elfgren, K., M. Kalantari, B. Moberger, B. Hagmar, and J. Dillner.** 2000. A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* **183**:561-7.
- Elkas, J., and R. Farias-Eisner.** 1998. Cancer of the uterine cervix. *Curr Opin Obstet Gynecol* **10**:47-50.
- Ellis, J. R., P. J. Keating, J. Baird, E. F. Hounsell, D. V. Renouf, M. Rowe, D. Hopkins, M. F. Duggan-Keen, J. S. Bartholomew, L. S. Young, and et al.** 1995. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med* **1**:464-70.
- Eriksson, A., J. R. Herron, T. Yamada, and C. M. Wheeler.** 1999. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* **80**:595-600.
- Eschle, D., M. Durst, J. ter Meulen, J. Luande, H. C. Eberhardt, M. Pawlita, and L. Gissmann.** 1992. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **73**:1829-32.
- Evander, M., I. H. Frazer, E. Payne, Y. M. Qi, K. Hengst, and N. A. McMillan.** 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**:2449-56.

Ferrera, A., J. P. Velema, M. Figueroa, R. Bulnes, L. A. Toro, J. M. Claros, O. de Barahona, and W. J. Melchers. 2000. Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol* **29**:817-25.

Filippova, M., H. Song, J. L. Connolly, T. S. Dermody, and P. J. Duerksen-Hughes. 2002. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**:21730-9.

Freedman, D. A., L. Wu, and A. J. Levine. 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* **55**:96-107.

Fujinaga, Y., K. Okazawa, A. Nishikawa, Y. Yamakawa, M. Fukushima, I. Kato, and K. Fujinaga. 1994. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes* **9**:85-92.

Gao, Q., A. Kumar, S. Srinivasan, L. Singh, H. Mukai, Y. Ono, D. E. Wazer, and V. Band. 2000. PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol Chem* **275**:14824-30.

Gao, Q., L. Singh, A. Kumar, S. Srinivasan, D. E. Wazer, and V. Band. 2001. Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells. *J Virol* **75**:4459-66.

Heck, D. V., C. L. Yee, P. M. Howley, and K. Munger. 1992. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:4442-6.

Ho, G. Y., R. Bierman, L. Beardsley, C. J. Chang, and R. D. Burk. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* **338**:423-8.

Ho, L., S. Y. Chan, R. D. Burk, B. C. Das, K. Fujinaga, J. P. Icenogle, T. Kahn, N. Kiviat, W. Lancaster, P. Mavromara-Nazos, and et al. 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* **67**:6413-23.

Howley P.M., D.R. Lowy. 2001. Papillomaviruses and their replication. In : Knipe D.M., P.M. Howley, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Vol.2 Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins 2197-2229.

Hu, X., Z. Guo, P. Tianyun, F. Ponten, E. Wilander, S. Andersson, and J. Ponten. 1999. HPV typing and HPV16 E6-sequence variations in synchronous lesions of cervical squamous-cell carcinoma from Swedish patients. *Int J Cancer* **83**:34-7.

Hu, X., T. Pang, Z. Guo, J. Ponten, M. Nister, G.B. Afink. 2001b. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma. *J Pathol*, **195**:307-11.

- Hu, X., T. Pang, Z. Guo, N. Mazurenko, F. Kisseljev, J. Ponten, and M. Nister.** 2001a. HPV16 E6 gene variations in invasive cervical squamous cell carcinoma and cancer in situ from Russian patients. *Br J Cancer* **84**:791-5.
- Icenogle, J. P., P. Sathya, D. L. Miller, R. A. Tucker, and W. E. Rawls.** 1991. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virology* **184**:101-7.
- Joyce, J. G., J. S. Tung, C. T. Przysiecki, J. C. Cook, E. D. Lehman, J. A. Sands, K. U. Jansen, and P. M. Keller.** 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* **274**:5810-22.
- Kammer, C., M. Tommasino, S. Syrjanen, H. Delius, U. Hebling, U. Warthorst, H. Pfister, and I. Zehbe.** 2002. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer* **86**:269-73.
- Kast, W. M., R. M. Brandt, J. Sidney, J. W. Drijfhout, R. T. Kubo, H. M. Grey, C. J. Melief, and A. Sette.** 1994. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol* **152**:3904-12.
- Kiviat, N. B., and L. A. Koutsky.** 1993. Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. *J Natl Cancer Inst* **85**:934-5.
- Kjellberg, L., G. Hallmans, A. M. Ahren, R. Johansson, F. Bergman, G. Wadell, T. Angstrom, and J. Dillner.** 2000. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* **82**:1332-8.
- Klaes, R., T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy, U. Petry, G. Dallenbach-Hellweg, D. Schmidt, and M. von Knebel Doeberitz.** 2001. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* **92**:276-84.
- Klug, S. J., R. Wilmotte, C. Santos, M. Almonte, R. Herrero, I. Guerrero, E. Caceres, D. Peixoto-Guimaraes, G. Lenoir, P. Hainaut, J. M. Walboomers, and N. Munoz.** 2001. TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**:1009-12.
- Koutsky, L.** 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* **102**:3-8.
- Koutsky, L. A., K. A. Ault, C. M. Wheeler, D. R. Brown, E. Barr, F. B. Alvarez, L. M. Chiacchierini, and K. U. Jansen.** 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347**:1645-51.

Kumar, A., Y. Zhao, G. Meng, M. Zeng, S. Srinivasan, L. M. Delmolino, Q. Gao, G. Dimri, G. F. Weber, D. E. Wazer, H. Band, and V. Band. 2002. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* **22**:5801-12.

Lazar J.G., A.P. Cullen, I. Mielzynska, M.G. Meijide, A.T. Lorincz. 1999. Hybrid capture^R : a sensitive signal amplification-based chemiluminescent test for the detection and quantification of human viral and bacterial pathogens. *J Clin Ligand Assay* **22**:139-51.

Li, S., S. Labrecque, M. C. Gauzzi, A. R. Cuddihy, A. H. Wong, S. Pellegrini, G. J. Matlashewski, and A. E. Koromilas. 1999. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* **18**:5727-37.

Liaw, K. L., A. G. Glass, M. M. Manos, C. E. Greer, D. R. Scott, M. Sherman, R. D. Burk, R. J. Kurman, S. Wacholder, B. B. Rush, D. M. Cadell, P. Lawler, D. Tabor, and M. Schiffman. 1999. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* **91**:954-60.

Lombard, I., A. Vincent-Salomon, P. Validire, B. Zafrani, A. de la Rochefordiere, K. Clough, M. Favre, P. Pouillart, and X. Sastre-Garau. 1998. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* **16**:2613-9.

Londesborough, P., L. Ho, G. Terry, J. Cuzick, C. Wheeler, and A. Singer. 1996. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* **69**:364-8.

Lörincz A.T., P.E. Castle, M.E. Sherman, D.R. Scott, A.G. Glass, S. Wacholder, B.B. Rush, P.E. Gravitt, J.E. Schussler, M. Shiffman. 2002. Viral load of human Papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet*, **360**:228-229.

Luxton, J., C. Mant, B. Greenwood, N. Derias, R. Nath, P. Shepherd, and J. Cason. 2000. HPV16 E6 oncogene variants in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* **60**:337-41.

Manos M.M., D.K. Wright, A.D.J. Lewis, T.R. Broker, S.M. Wolinsky. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Molecular diagnostics of human cancer.* New York : Cold Spring Harbor Press, 209-14.

Maréchal V., T. Piolot. 1999. Oncogène et cycle biologique des virus. *Virologie*, **3(1)**:297-308.

- Massimi, P., D. Pim, and L. Banks.** 1997. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *J Gen Virol* **78**:2607-13.
- Matsumoto, K., H. Yoshikawa, S. Nakagawa, X. Tang, T. Yasugi, K. Kawana, S. Sekiya, Y. Hirai, I. Kukimoto, T. Kanda, and Y. Taketani.** 2000. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Lett* **156**:159-65.
- Mougin, C., B. Bernard, and M. Lab.** 1997. [Biology of papillomavirus infections. I. General characteristics]. *Ann Biol Clin (Paris)* **55**:555-63.
- Mougin C., D.Reithmuller, C. Gay et al.** 5-9 avril 2000. Cervical cancer screening : a french experience. 4th International Multidisciplinary Congress EUROGIN 2000, Global Challenge of Cervical Cancer Prevention, Paris (communication orale).
- Munoz, N.** 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* **19**:1-5.
- Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders, and C. J. Meijer.** 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**:518-27.
- Nindl, I., K. Rindfleisch, B. Lotz, A. Schneider, and M. Durst.** 1999. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* **82**:203-7.
- Orth, G., M. Favre, and O. Croissant.** 1977. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* **24**:108-20.
- Pakarian, F., J. Kaye, J. Cason, B. Kell, R. Jewers, N. W. Derias, K. S. Raju, and J. M. Best.** 1994. Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. *Br J Obstet Gynaecol* **101**:514-7.
- Pang, T., X. Hu, N. Mazurenko, F. Kisseljev, and J. Ponten.** 2002. Multiple variants of HPV16 E6 gene in cervical invasive squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* **22**:1011-6.
- Perez-Gallego, L., G. Moreno-Bueno, D. Sarrío, A. Suarez, C. Gamallo, and J. Palacios.** 2001. Human papillomavirus-16 E6 variants in cervical squamous intraepithelial lesions from HIV-negative and HIV-positive women. *Am J Clin Pathol* **116**:143-8.
- Picconi, M. A., L. V. Alonio, L. Sichero, V. Mbayed, L. L. Villa, J. Gronda, R. Campos, and A. Teysse.** 2003. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *J Med Virol* **69**:546-52.

- Radhakrishna Pillai, M., S. Sreevidya, B. H. Pollock, P. G. Jayaprakash, and B. Herman** 2002. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol Oncol* **87**:268-73.
- Pires J.** 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinase : a biochemical view. *Biochem J*, **308**:679-711
- Ronco, L. V., A. Y. Karpova, M. Vidal, and P. M. Howley.** 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* **12**:2061-72.
- Schiffman, M. H., and L. A. Brinton.** 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* **76**:1888-901.
- Seedorf, K., G. Krammer, M. Durst, S. Suhai, and W. G. Rowekamp.** 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **145**:181-5.
- Shanta, V., S. Krishnamurthi, C. K. Gajalakshmi, R. Swaminathan, and K. Ravichandran.** 2000. Epidemiology of cancer of the cervix: global and national perspective. *J Indian Med Assoc* **98**:49-52.
- Sherman, L., A. Jackman, H. Itzhaki, M. C. Stoppler, D. Koval, and R. Schlegel.** 1997. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology* **237**:296-306.
- Sherris J.D., Wells E.S., Tsu V.D., Bishop A.** 1993. Cervical cancer in developing countries : a situation analysis. Seattle : Program for Appropriate Technology in health.
- Smith, J. S., R. Herrero, C. Bosetti, N. Munoz, F. X. Bosch, J. Eluf-Neto, X. Castellsague, C. J. Meijer, A. J. Van den Brule, S. Franceschi, and R. Ashley.** 2002. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**:1604-13.
- Song, Y. S., S. H. Kee, J. W. Kim, N. H. Park, S. B. Kang, W. H. Chang, and H. P. Lee.** 1997. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol* **66**:275-81.
- Stephen, A. L., C. H. Thompson, M. H. Tattersall, Y. E. Cossart, and B. R. Rose.** 2000. Analysis of mutations in the URR and E6/E7 oncogenes of HPV 16 cervical cancer isolates from central China. *Int J Cancer* **86**:695-701.
- Stoppler, M. C., K. Ching, H. Stoppler, K. Clancy, R. Schlegel, and J. Icenogle.** 1996. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* **70**:6987-93.
- Strang, G., J. K. Hickling, G. A. McIndoe, K. Howland, D. Wilkinson, H. Ikeda,**

and J. B. Rothbard. 1990. Human T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 and E6 synthetic peptides: identification of T cell determinants, HLA-DR restriction and virus type specificity. *J Gen Virol* **71**:423-31.

Syrjanen, K., V. Kataja, M. Yliskoski, F. Chang, S. Syrjanen, and S. Saarikoski. 1992. Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System. *Obstet Gynecol* **79**:675-82.

Thorland, E. C., S. L. Myers, B. S. Gostout, and D. I. Smith. 2003. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* **22**:1225-37.

Tong, X., and P. M. Howley. 1997. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:4412-7.

Tornesello, M. L., F. M. Buonaguro, L. Buonaguro, I. Salatiello, E. Beth-Giraldo, and G. Giraldo. 2000. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *J Gen Virol* **81**:2969-82.

Vaeteewoottacharn, K., P. Jearanaikoon, and M. Ponglikitmongkol. 2003. Co-mutation of HPV16 E6 and E7 genes in Thai squamous cervical carcinomas. *Anticancer Res* **23**:1927-31.

van den Brule, A. J., C. J. Meijer, V. Bakels, P. Kenemans, and J. M. Walboomers. 1990. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **28**:2739-43.

van Duin, M., P. J. Snijders, M. T. Vossen, E. Klaassen, F. Voorhorst, R. H. Verheijen, T. J. Helmerhorst, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers. 2000. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* **81**:317-25.

Villa, L. L., L. Sichero, P. Rahal, O. Caballero, A. Ferenczy, T. Rohan, and E. L. Franco. 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* **81**:2959-68.

Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**:12-9.

Watts, K. J., C. H. Thompson, Y. E. Cossart, and B. R. Rose. 2002. Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. *Int J Cancer* **97**:868-74.

Weidmann C., Schaffer P., Hedelin G. 1998. L'incidence du col de l'utérus régresse

régulièrement en France. Bull Epid Hebd ; **5**:17-20.

Welters, M. J., A. de Jong, S. J. van den Eeden, J. M. van der Hulst, K. M. Kwappenberg, S. Hassane, K. L. Franken, J. W. Drijfhout, G. J. Fleuren, G. Kenter, C. J. Melief, R. Offringa, and S. H. van der Burg. 2003. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* **63**:636-41.

Wheeler, C. M., T. Yamada, A. Hildesheim, and S. A. Jenison. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* **35**:11-9.

Woodman C.B., S. Collins, H. Winter, A. Bailey, J. Ellis, P. Prior, M. Yates, T.P. Rollason, L.S. Yong. 2001. Natural history of cervical cancer human papillomavirus infection in young women : a longitudinal cohort study. *Lancet* **357**:1831-36.

Xi, L. F., J. J. Carter, D. A. Galloway, J. Kuypers, J. P. Hughes, S. K. Lee, D. E. Adam, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky. 2002. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**:343-51.

Xi, L. F., C. W. Critchlow, C. M. Wheeler, L. A. Koutsky, D. A. Galloway, J. Kuypers, J. P. Hughes, S. E. Hawes, C. Surawicz, G. Goldbaum, K. K. Holmes, and N. B. Kiviat. 1998. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res* **58**:3839-44.

Xi, L. F., L. A. Koutsky, D. A. Galloway, J. Kuypers, J. P. Hughes, C. M. Wheeler, K. K. Holmes, and N. B. Kiviat. 1997. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**:796-802.

Yamada, T., M. M. Manos, J. Peto, C. E. Greer, N. Munoz, F. X. Bosch, and C. M. Wheeler. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* **71**:2463-72.

Yamada, T., C. M. Wheeler, A. L. Halpern, A. C. Stewart, A. Hildesheim, and S. A. Jenison. 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* **69**:7743-53.

Youk, E. G., J. L. Ku, and J. G. Park. 2001. Detection and typing of human papillomavirus in anal epidermoid carcinomas: sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus Type 16. *Dis Colon Rectum* **44**:236-42.

Zehbe, I., J. Mytilineos, I. Wikstrom, R. Henriksen, L. Edler, and M. Tommasino. 2003. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum Immunol* **64**:538-42.

Zehbe, I., R. Tachezy, J. Mytilineos, G. Voglino, I. Mikyskova, H. Delius, A. Marongiu, L. Gissmann, E. Wilander, and M. Tommasino. 2001. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer* **94**:711-6.

Zehbe, I., G. Voglino, H. Delius, E. Wilander, and M. Tommasino. 1998a. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* **352**:1441-2.

Zehbe, I., E. Wilander, H. Delius, and M. Tommasino. 1998b. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* **58**:829-33.

Zimmermann, H., C. H. Koh, R. Degenkolbe, M. J. O'Connor, A. Muller, G. Steger, J. J. Chen, Y. Lui, E. Androphy, and H. U. Bernard. 2000. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol* **81**:2617-23.

zur Hausen, H. 1977. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* **78**:1-30.

Nom-prénom : **PAPY Carine**Titre de la thèse : **Séquençage des oncogènes E6 et E7 d'HPV de type 16.
Epidémiologie des variants et risque de progression vers des lésions
génétales cancéreuses.**

Résumé de la Thèse : Les papillomavirus humains, d'une importante pluralité, sont cliniquement responsables de lésions cutanéomuqueuses variées. Parmi eux, le génotype 16 est le plus fréquemment associé au carcinome du col utérin, selon un processus oncogène complexe et multifactoriel, impliquant notamment les protéines virales E6 et E7. Nous avons rétrospectivement amplifié et séquencé les oncogènes E6 et E7 d'HPV16 de 78 patientes, suivies en Gynécologie-Obstétrique au CHU de Nantes entre 2000 et 2002. Nos résultats montrent que les mutations ponctuelles, modifiant parfois la structure protéique, concernent essentiellement E6 avec le variant T350G, présent dans 57.1% des cas. Dans notre série, la présence seule de variants n'a statistiquement pas d'incidence sur le risque de développement ou de progression des lésions dysplasiques vers le cancer ; ceci souligne la nécessité d'inclure en parallèle d'autres facteurs afin de mieux cerner ce risque, en vue d'améliorer la prise en charge des patientes.

Mots clés : HPV16 - cancer du col utérin - oncogènes E6 et E7 - séquençage - variants

JURYPrésident : **IMBERT B.M., Professeur de virologie, CHU de Nantes**Assesseurs : **COSTE-BUREL M., PH au laboratoire de virologie, CHU de Nantes****LOPES P., Professeur de gynécologie, CHU de Nantes****LABOISSE C., Professeur d'anatomie pathologique, CHU de Nantes**

Adresse de l'auteur : **300 rue de Vieille Cour 44521 OUDON**