

2m11.3479.9

Université de Montréal

Rôle du polymorphisme du papillomavirus humain de type 33 (VPH-33) dans le cancer du  
col de l'utérus

Par  
Khouadri Soraya  
Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M. sc.)  
En Microbiologie/ Immunologie

Avril, 2006

© Soraya Khouadri, 2006  
Université de Montréal





Direction des bibliothèques

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle du polymorphisme du papillomavirus humain de type 33 (VPH-33) dans le cancer du  
col de l'utérus

Présenté par :  
Soraya Khouadri

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Annie-Claude Labbé

François Coutlée

Hugo Soudeyns

Mémoire accepté le :

22 déc 2004

Présidente du jury

## RÉSUMÉ

Les papillomavirus humains (VPH) à haut risque sont les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus et peuvent causer des dysplasies sévères des tissus épithéliaux du col. Une étude préliminaire réalisée en 2004 dans notre laboratoire portait sur le polymorphisme du VPH-33 et décrivait des variantes de E6, E7 et du LCR (long control region), incluant une délétion de 78 pb. Cette délétion a été associée avec la persistance de l'infection au VPH. Dans la présente étude, nous avons analysé 89 spécimens provenant de femmes participant à quatre études internationales regroupant 5344 femmes, et infectées par le VPH-33. Des spécimens génitaux de ces patientes ont été analysés par PCR-séquençage au niveau du LCR, de E6, E7 et E2 dont la région charnière se chevauche avec E4. Au terme de cette étude, nous avons décrit 7, 4, 4, 15 et 9 nouvelles variantes pour le LCR, E6, E7, E2 et E4, respectivement. De ces variantes, nous avons dérivé 25 nouvelles variantes SK incluant le prototype, qui résultaient de la combinaison des variantes individuelles du LCR, de E6 et E7. Une variante SK7 (33-LCR-12, prototypique pour E6 et E7) a été associée avec les lésions intraépithéliales squameuses de haut grade (HSILs) avec un ratio de cote de 3.0. La variante SK9 était plus fréquente au Brésil qu'au Canada. Cependant, le polymorphisme de E2 n'a pas été associé avec l'ethnicité ou les HSILs.

**Mots-clés : virus du papillome humain, polymorphisme, lésions intraépithéliales squameuses de haut grade, PCR.**

## ABSTRACT

It is now well established that cervical infection with high-risk human papillomavirus (HPV) types is a necessary cause for cancer of the uterine cervix and that they can cause severe cervical dysplasia that could eventually evolve into cervical cancer. In 2004, an extensive study investigated the polymorphism of HPV-33 E6, E7 and has associated a 78 bp deletion localized into the long control region (LCR) with the persistence of HPV-33 infection. In the present study, we analyzed cervical cytobrush samples that were obtained from 89 women selected from 5344 subjects participating in four epidemiological studies who had tested positive for HPV-33. Each one of these specimens was tested for molecular variants by PCR-sequencing of the LCR, E6, E7 and E2, including E4 gene. We describe, here, 7, 4, 4, 15 and 9 LCR, E6, E7, E2 and E4 new variants respectively. From these variants, we identified 25 new SK variants including the prototype, obtained by combining variations in all three regions of HPV-33 genome, LCR, E6 and E7. The SK7 variant (33-LCR-12, E6 and E7 prototypic) has been associated with high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) (relative risk of 3.0). The SK9 variant was statistically more present in Brazil than in Canada. However, none of the the E6, E7, E2, E4 regions polymorphism were associated to age, ethnicity or HSILs.

**Mots-clés : Human Papillomavirus, polymorphism, high-grade squamous intraepithelial lesions, PCR.**

# PRÉSENTATIONS À DES CONGRÈS

## SCIENTIFIQUES

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

### **1. Présentations par affiche :**

S. Khouadri, S. Gagnon, A. Koushik, H. Richardson, S. Ferreira, J. Simao, G. Matlashewski, L.L. Villa, E. Franco, F. Coutlée. «*HPV-33 polymorphism is associated with high-grade cervical lesions of the uterine cervix*».

22<sup>ème</sup> congrès international des papillomavirus, Vancouver, du 30 avril 2005 au 06 mai 2005.

S. Khouadri, S. Gagnon, A. Koushik, H. Richardson, S. Ferreira, J. Simao, G. Matlashewski, L.L. Villa, E. Franco, F. Coutlée. «*Rôle du polymorphisme du VPH-33 dans les cancers du col utérin* ».

8<sup>ème</sup> congrès du CHUM, 20 décembre 2005.

### **2. Présentation orale :**

S. Khouadri, S. Gagnon, A. Koushik, H. Richardson, S. Ferreira, J. Simao, G. Matlashewski, L.L. Villa, E. Franco, F. Coutlée. «*Rôle du polymorphisme du VPH-33 dans les cancers du col utérin* ».

16<sup>ème</sup> journée scientifique de l'Institut de Cancer de Montréal (ICM), 16 décembre 2005.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
Présentations à des congrès scientifiques.....	v
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<u>Revue de littérature.....</u>	viii
<u>Article.....</u>	x
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xi</b>
<u>Article.....</u>	xi
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xii</b>
<i>Dédicace.....</i>	<i>xiv</i>
<i>Remerciements.....</i>	<i>xv</i>
<b><u>REVUE DE LITTÉRATURE.....</u></b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>1. <i>Le virus du papillome humain.....</i></b>	<b>4</b>
<b>1.1. Historique.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Classification.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Structure du virion.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Organisation génomique.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Tropisme cellulaire.....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Cycle de réplication.....</b>	<b>10</b>
<b>2. <i>Épidémiologie.....</i></b>	<b>14</b>
<b>3. <i>Histoire naturelle de l'infection.....</i></b>	<b>16</b>
<b>3.1. Pathologies et lésions cervicales associées aux VPHs.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Facteurs de risque.....</b>	<b>19</b>
3.2.1. <i>Facteurs du virus.....</i>	19
3.2.2. <i>Facteurs de l'hôte.....</i>	22
3.2.3. <i>Facteurs de l'environnement.....</i>	24
3.2.4. <i>Facteurs tertiaires.....</i>	25



<b>3.3. Rôle de E2 et des oncoprotéines virales E6 et E7 dans le cycle d'infection des VPHs-HR.....</b>	<b>26</b>
3.3.1. <i>Rôle multifonctionnel et «anti-oncogène» de la protéine E2.....</i>	<i>26</i>
3.3.2. <i>Rôle de la protéine E6 dans le cycle de l'infection des VPHs.....</i>	<i>28</i>
3.3.3. <i>Rôle de la protéine E7 dans le cycle de l'infection des VPHs.....</i>	<i>29</i>
<b>4. Variantes moléculaires des PVs .....</b>	<b>34</b>
4.1. <b>Phylogénie des VPHs.....</b>	<b>34</b>
4.2. <b>Définition d'une variante moléculaire.....</b>	<b>35</b>
4.3. <b>Variantes moléculaires et facteurs de risque.....</b>	<b>36</b>
4.3.1. <i>Variantes du LCR.....</i>	<i>39</i>
4.3.2. <i>Variantes de E6/E7.....</i>	<i>44</i>
4.3.3. <i>Variantes de E2.....</i>	<i>46</i>
4.4. <b>Le virus du papillome humain de type 33.....</b>	<b>49</b>
<b>OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....</b>	<b>51</b>
<b><u>ARTICLE</u>.....</b>	<b>55</b>
<i>Déclaration de l'étudiant.....</i>	<i>54</i>
<b><u>DISCUSSION</u>.....</b>	<b>91</b>
1. Variabilité du LCR.....	93
1.1. <i>Polymorphisme du LCR et effets sur la liaison aux FT cellulaires.....</i>	<i>94</i>
1.2. <i>Association du FT USF avec les HSILs.....</i>	<i>96</i>
2. Polymorphisme du gène E6.....	97
3. Polymorphisme du gène E7.....	99
4. Polymorphisme du gène E2.....	100
5. Polymorphisme du gène E4.....	102
6. Les variantes SK.....	102
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>107</b>

## LISTE DES FIGURES

### Revue de littérature :

Figure 1 : *Structure de la capsidie icosaédrique des VPHs.*

Source: Stephen C. Harrison et al., Howard Hughes Medical Institute.  
[www.hhmi.org/news/popups/hpv\\_pop1.html](http://www.hhmi.org/news/popups/hpv_pop1.html).

Figure 2 : *Organisation génomique des VPHs.*

Source : Walter prendiville, Philip Davies : The Health professional's HPV Handbook (Paperback). London: UK, 2005.

Figure 3 : *Organisation du cycle de vie du VPH-16 durant une infection productive par des types de VPH appartenant au supergroupe A.*

Source : Doorbar, J: The papillomavirus life cycle. J Clin Virol. 2005. 32 Suppl 1:S7-15.

Figure 4 : *Cycle de vie du VPH*

Source : figure adaptée à l'article de Eckert et Welter, Biol Rep, 1996.  
<http://www.urmc.rochester.edu/gebs/imv/courses/MBI456PPT/Bob's%20hpv.ppt>

Figure 5: *Histoire naturelle des VPH à haut-risque.*

Source: Figure adaptée de celle d'Arin Farrington et al., The association of reproductive health professionals.

<http://www.arhp.org/healthcareproviders/onlinepublications/clinicalproceedings/cphpv/types.cfm?ID=149>

Figure 6 : *Les différents stades de progression des lésions squameuses intraépithéliales.*

Source : E.J. Mayeaux, LSU Health Sciences Center Shreveport  
<http://www.sh.lsuhscc.edu/fammed/Images/PAP-fig1.jpg>

Figure 7 : *Histoire naturelle de l'infection à VPH.*

Source: Figure adaptée de l'illustration réalisée par J. Midwifery Womens Health, Elsevier Science, Inc.

[http://www.medscape.com/viewarticle/467126\\_3](http://www.medscape.com/viewarticle/467126_3)

**Figure 8 :** *Rôle de la protéine E2 chez le VPH-18 et le BPV*

Source: Dr. Boulaga Isabelle.

<http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/13.html>

**Figure 9 :** *Rôle physiologique des suppresseurs de tumeurs p53 et pRb dans la cellule*

Source : Figure traduite à partir de celle d' Hiller et Iftner, 2004.

**Figure 10 :** *Rôle des oncoprotéines E7 et E6 dans l'inactivation de pRb et p53 respectivement.*

Source : Figure traduite à partir de celle d' Hiller et Iftner, 2004.

**Figure 11 :** *Résumé de l'action en synergie des deux oncoprotéines E6 et E7 réduction l'induction des néoplasies cervicales.*

Source : Dr. Boulaga Isabelle.

<http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/14.html>

**Figure 12.** *La région du LCR et les facteurs de transcription.*

Source : Dr. Boulaga Isabelle.

<http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/14.html>

**Figure 13 :** *Distribution des types de VPH les plus prévalents dans les cancers du col de l'utérus.*

Source : Figure adaptée de celle de Munoz N et al., The New England Journal Of Medicine.

[http://www.medscape.com/viewprogram/4331\\_pnt](http://www.medscape.com/viewprogram/4331_pnt)

**Article :**

**Figure 1:**

HPV-33 polymorphism in the LCR, E6 and E7.

**Figure 2:**

Intratype diversity of HPV-33.

**Figure 3:**

HPV-33 E2 and E4 polymorphism in 80 isolates.

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Article**

#### **Table 1 :**

Cervical lesion status in 89 HPV-33 positive women from four epidemiologic studies.

#### **Table 2 :**

Association of human papillomavirus type 33 polymorphism with high-grade cervical lesions and cancer.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AA : asiatique-américain
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AP-1 : «Activator protein-1»
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- BPV : «Bovine papillomavirus»
- CBP : «CRE binding protein»
- CC: Cancer du col de l'utérus
- Cdks : «cyclin dependent kinase »
- C/EBP $\beta$  : «CCAAT/enhancer binding protein beta»
- CIN: «Cervical intraepithelial neoplasia»
- CIS : cancer *in situ*
- CO: Contraceptifs oraux
- CRE : «cAMP response element»
- DPV: «Deer papillomavirus»
- E: Européen
- EGF : «Epidermal growth factor»
- EGFR : «Epidermal growth factor receptor»
- FT: facteur (s) de transcription
- HSIL: «High-grade squamous intraepithelial lesion»
- hTERT: «Human telomerase reverse transcriptase»
- IGF: «Insulin-like Growth Factor»
- IGFBP-3 : «Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3»
- IFN $\gamma$  : «Interféron gamma»
- IRF-1 : «Interferon regulatory factor»
- Kd: Kilodaltons

LCR: Long control region  
LSIL: «Low-grade squamous intraepithelial lesion»  
NE: Non européen  
Nm: Nanomètres  
NPL: «non-prototype-like»  
Nt : Nucléotide  
Oct-1 : «Octamer binding factor-1»  
ORF: «open reading frame»  
Pb: Paire de bases  
PL: «prototype-like»  
PV: Virus du papillome  
Rb: Rétinoblastome  
SARS: « severe acute respiratory syndrome »  
SIL: «squamous intraepithelial lesion»  
SV40: Simian vacuolating virus 40  
TBP: «Tata binding protein»  
TGF- $\beta$ : «Tumor growth factor  $\beta$  »  
TNF: «Tumor necrosis factor»  
VIH: Virus de l'immunodéficience humaine  
VLP: «Virus-like particles»  
VPH : Virus du papillome humain  
VPH-HR : VPH à haut risque  
VPH-LR : VPH à bas risque  
YY1: «Ying Yang-1»

## **DÉDICACE**

*Je dédie ce mémoire à ma famille, incluant ma mère Najat, mon père Mohamed et mon petit frère Mehdi, qui ont toujours su démontrer une grande fierté à mon égard et qui n'ont jamais cessé de me pousser à donner le meilleur de moi-même dans tout ce que j'ai entrepris. Je dédie également ce mémoire à la famille Maalaoui, plus particulièrement à ma petite cousine que j'adore, Boutaina et ma seconde mère Mama Rajaa qui, de leurs côtés également, ont toujours manifesté de l'intérêt pour mes recherches tout en étant fières de mes accomplissements.*



## **REMERCIEMENTS**

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de recherche, François Coutlée, pour la sollicitude qu'il m'a manifestée et l'opportunité qu'il m'a accordée en m'intégrant dans son équipe. Je tiens également à le remercier pour sa disponibilité en ma faveur tout au long de ma maîtrise malgré son emploi du temps extrêmement chargé.

Mes remerciements vont également aux assistants de recherche pour m'avoir encadrée tout le long de mon projet, Pierre Forest, Hélène Voyer et Simon Gagnon et qui n'ont ménagé aucun effort afin de me permettre de mener à bon port ma maîtrise.

Enfin je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu à réaliser ma maîtrise aux côtés de mes collègues : Leila Alotaibi, Émilie Bauwens et Naoufel Azizi.

**REVUE DE LITTÉRATURE**

## INTRODUCTION

Il est maintenant clairement établi que le VPH est l'agent étiologique du cancer du col de l'utérus où il est impliqué dans 99,7 % des cas (Durst et *al.*, 1983; Boshart et *al.*, 1984; Gissmann et *al.*, 1984; zur Hausen et *al.*, 1991; Judson, 1992; Eluf-Neto et *al.*, 1994; Munoz et *al.*, 1992; Bosch et *al.*, 1995; IARC, 1995; Walboomers et *al.*, 1999; Bosch et Munoz, 2002a; Bosch et *al.*, 2002b; Clifford et *al.*, 2003a et 2003b; Munoz et *al.*, 2003; Bosch et *al.*, 2003).

Mondialement, le cancer du col utérin est classé comme étant le sixième en importance et le troisième cancer le plus commun chez les femmes. Chaque année, 510 000 nouveaux cas de cancer du col de l'utérus sont diagnostiqués à travers le monde parmi lesquels on compte 288 000 décès. Parmi ces décès, 80% surviennent dans les pays en développement, en particulier dans les régions les plus pauvres d'Asie du Sud, d'Afrique Subsaharienne et d'Amérique latine, où le cancer du col utérin représente 24% de tous les cancers des femmes (Organisation mondiale de la santé, 2006 ; Cancer Research UK, 2006).

L'infection aux VPHs constitue l'infection sexuellement transmissible la plus commune dans le monde, et survient au moins une fois chez plus de 75% des femmes sexuellement actives (Koutsky et *al.*, 1992). À ce jour, plus de 120 types de VPHs ont été identifiés chez l'humain, dont le tiers a été séquencé (de Villiers et *al.*, 2004).

Les manifestations cliniques des infections au VPH incluent les lésions hyperprolifératives bénignes telles que les verrues, papillomes ou condylomes, les cancers ano-génitaux et les stades intermédiaires de lésions intraépithéliales de bas et de haut grade. Malgré l'incidence élevée des infections au VPH chez les jeunes femmes, seule une minorité des femmes infectées développeront une infection persistante qui pourra éventuellement évoluer vers des lésions squameuses intraépithéliales de haut grade. Cette persistance de l'infection constitue le marqueur le plus important pour le développement de SILs et du cancer (Aho et *al.*, 2004).

Parmi les types de VPHs, il est possible de caractériser des variantes moléculaires par l'analyse de leur polymorphisme génomique en les comparant au génome du prototype.

Dans cette étude, nous évaluerons si certaines variantes moléculaires du VPH de type 33 sont associées aux lésions de haut grade (HSILs). Une telle hypothèse fait actuellement l'objet de débats, bien que certaines études ont démontré que les variantes non prototypiques du VPH-16 confèrent un risque plus élevé pour le développement de lésions cervicales ou du cancer du col utérin que le prototype, comme il sera discuté plus loin dans la section «variantes moléculaires et facteurs de risque». Dans cette étude, nous caractériserons des variantes moléculaires par l'analyse des régions du LCR, de E6, E7 et E2 (incluant E4) du VPH-33.

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

À ce jour, les PVs constituent un groupe très diversifié de virus et ont été identifiés comme infectant des reptiles, des oiseaux et plus d'une vingtaine d'espèces de mammifères différentes. Compte tenu de leur importance clinique, les VPHs ont été les plus étudiés par rapport aux autres PVs et plus de 100 types différents ont été identifiés à ce jour, parmi lesquels 40 infectent le tractus anogénital (zur Hausen, 1996). Parmi ces VPHs identifiés, 13 types ont été classés comme étant à haut risque pour le développement du cancer du col utérin, 3 ont été classés comme étant à risque intermédiaire, 11 comme étant à faible risque et 3 dont le risque demeure à définir (Munoz, 2003; IARC, sous presse 2006).

Les types de VPHs transmis sexuellement sont regroupés au sein d'un groupe appelé le supergroupe A, également connu sous le terme d'Alpha-papillomavirus (Myers et *al.*, 1994; de Villiers, 2004). Les virus de ce groupe sont des pathogènes sexuellement transmissibles qui semblent affecter 1% de la population sexuellement active. Ces virus peuvent également infecter des sites oraux mais ceux-ci sont généralement associés à des papillomes bénins. Pour leur part, les VPHs à haut risque du supergroupe A, comme le VPH-16 et le VPH-18 causent l'apparition de lésions mucosales qui peuvent progresser chez certains individus pour induire des néoplasmes de haut grade et le cancer du col de l'utérus. (Walboomers et *al.*, 1999; Bosch et *al.*, 2002).

### **1.1. Historique**

La nature virale des verrues chez l'homme fut déterminée au cours des années '80 par Ciuffo, qui démontra la transmission des verrues communes en utilisant des filtres acellulaires. Le premier PV fut décrit par Richard Shope en 1933, lorsqu'il identifia un papillomavirus (CRPV) comme agent étiologique de la papillomatose cutanée chez le lapin (White, Livanos et Tlsty, 1994). En effet, ce dernier réussit à reproduire un papillome cutané

chez un lapin domestique sain en l'infectant de virus prélevé à partir du papillome d'un autre lapin infecté. Ce papillome évolua pour entraîner l'apparition de carcinomes dans la majorité des cas. L'invention du microscope électronique permit par la suite la description de la morphologie des virions. La caractérisation plus spécifique des PVs ne pouvait toutefois pas aller plus loin du fait de l'absence de modèle de culture permettant leur propagation dans des tissus. Ce n'est que vers la fin des années '70 que le premier génome du PV fut cloné dans des bactéries et que les chercheurs ont finalement réussi à mettre au point des techniques leur permettant d'étudier la biologie moléculaire de ce groupe de virus et de constater la multiplicité des VPHs (Howes et al., 1994). Au cours des années '80, le développement des expériences de transformation *in vitro* ont finalement permis l'analyse des fonctions virales impliquées dans l'activation de la prolifération cellulaire.

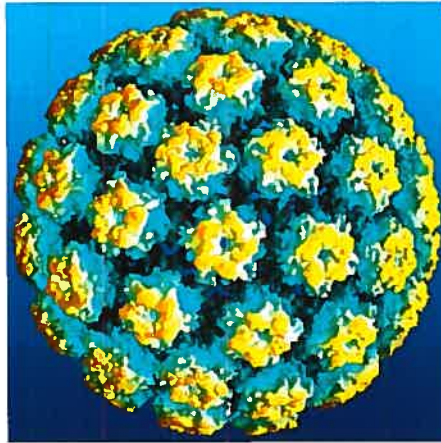
## 1.2. Classification

À l'origine, les papillomavirus étaient initialement regroupés avec les polyomavirus formant la famille des papovavirus. Le terme «papovavirus» est dérivé du papillomavirus du lapin, polyomavirus murin et du virus simien vacuolé (SV40). Ces trois virus partagent des propriétés communes comme leur petite taille et l'absence d'enveloppe, possèdent une capsidie icosaédrique et de l'ADN circulaire double brin, et se multiplient dans le noyau de la cellule hôte.

Des études plus récentes sur l'organisation biologique et génomique des papillomavirus et des polyomavirus ont mené à considérer ces deux familles comme deux sous-groupes différents de la famille des papovavirus. En 1980, des études de leurs séquences et de leurs fonctions ont indiqué que les similarités entre ces deux groupes de virus étaient trop superficielles pour établir une relation taxonomique entre les deux (Danos et *al.*, 1982). En effet, ils différaient par leurs tailles et par le fait que la transcription des polyomavirus s'effectue au niveau des deux brins, alors que celle des papillomavirus n'a lieu que sur un seul brin. Enfin, ils se distinguaient par une dernière propriété qui est aussi la plus

importante, le fait qu'ils ne partagent aucune similarité au niveau de leur séquence nucléotidique et de leur séquence d'acides aminés à l'exception d'un petit segment, l'antigène T chez les polyomavirus homologue au gène E1 chez les papillomavirus (Rebrikov et al., 2002). Comme les classifications taxonomiques doivent permettre de refléter une relation naturelle entre les membres d'une même famille, il a été conclu que les deux groupes de virus formeraient deux familles séparées. Il est à noter que ce n'est que récemment que la famille des «papillomavirus» (papillomavirinae) a été officiellement reconnue par le Conseil International de la Taxonomie des Virus (ICTV) (Bernard, 2004). En ce qui concerne la classification des VPHs, depuis 1995, la Conférence Annuelle du Papillomavirus qui s'est tenue à Québec, a décrété que pour qu'un nouveau type de VPH soit reconnu, sa séquence nucléotidique doit diverger d'au moins 10% au niveau du gène L1 par rapport aux autres types préalablement caractérisés (de Villiers et al., 2004).

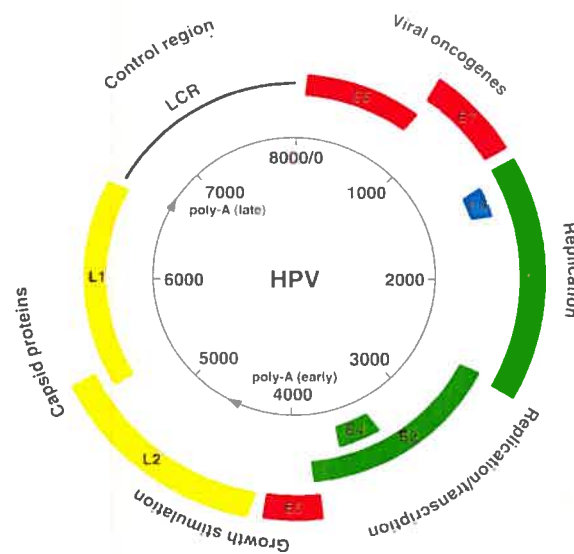
### 1.3. Structure du virion



*Figure 1 : Structure de la capsidie icosaédrique des VPHs. Elle est formée des protéines majeure L1 et mineure L2.*

Les papillomavirus sont de petites particules d'environ 52 à 55 nm de diamètre, non enveloppées, qui possèdent une capsid icosaédrique (**Fig. 1**). Le virion contient une molécule d'ADN à double brin circulaire d'environ 8,000 pb. Cet ADN est contenu dans une capsid tapissée de protéines et composée de 72 capsomères. Elle est formée de deux protéines structurales, la protéine majeure L1 avec un poids moléculaire d'environ 55 kD qui représente 80% de la capsid, ainsi qu'une protéine mineure L2 d'environ 70 kD. L'analyse des protéines virales révèle que l'ADN viral est associé à des histones cellulaires, formant un complexe similaire à celui constitué par la chromatine et les histones (Fields, p. 2947).

#### 1.4. Organisation génomique



*Figure 2 : Organisation génomique des VPHs. On distingue trois régions distribuées sur une longueur d'environ 8 Kb : la région régulatrice du LCR contenant les principaux sites de liaison aux facteurs de transcription et de réplication, huit gènes précoces, numérotés de E1 à E8, E1, E2, E4, E5, E6 et E7 étant impliqués dans la transactivation de la transcription, la maturation du virus, la transformation et la réplication, et enfin deux cadres de lecture tardifs responsables de la formation de la capsid (L1, L2). Les oncoprotéines E6 et E7 forment des complexes avec les suppresseurs de tumeurs de l'hôte (p53 et pRb) et inactivent leurs fonctions, menant à l'altération du contrôle du cycle cellulaire.*



L'organisation génomique des papillomavirus est très similaire parmi les différents types. Des analyses d'ARNm encodés par les papillomavirus ont également révélé qu'un seul brin sert de matrice pour la transcription du génome viral. Le génome du papillomavirus peut se subdiviser en trois régions principales : une région codante «précoce» E pour *early* et «tardive» L pour *late* comportant dix cadres de lecture classifiés E ou L dépendamment de leur position dans le génome, et une région non codante appelée LCR (*long control region*) d'environ 1 Kb. Un nombre est attribué aux gènes E et L selon leur taille dans un ordre décroissant. Ainsi, la protéine E1 sera plus grosse que E2, elle-même de taille plus importante que celle de E3 et ainsi de suite (**Fig. 2**). La position, la taille et la fonction de plusieurs ORFs sont conservées parmi les différentes espèces de PVs.

Au niveau de la région précoce, Le gène E1 code pour la plus grosse protéine des VPHs et agit comme une ATPase et une hélicase ADN-dépendante et comme facteur d'élongation lorsqu'il forme un complexe de réplication avec la protéine E2 (Hughes et Romanos, 1993; Loo et Melendy, 2004).

E2, pour sa part, dont le rôle sera décrit plus en détail dans la section «3.3», code pour un modulateur de transcription possédant un site de liaison sur l'origine de réplication et peut se retrouver sous deux formes. En effet, lorsque la protéine E2 se trouve sous la forme complète E2TA, elle agit comme transactivateur sur le promoteur p97 du VPH-16, et lorsqu'elle se trouve sous la forme tronquée E2TR, elle agit comme un répresseur en inhibant la liaison de E2TA à son promoteur par compétition au niveau de son site de liaison (Shwarz *et al.*, 1985; Goodwin et Dimaio, 2000).

Le gène E4 encode une protéine dont le rôle est de favoriser la libération des virions en se liant aux filaments intermédiaires via son extrémité C-terminale en synergie avec la protéine E1 (Doorbar, 1991).

Le gène E5 encode une petite protéine hydrophobe retrouvée au niveau des compartiments membranaires, incluant l'appareil de Golgi. Elle joue un rôle au niveau de la stimulation de la croissance des cellules infectées par le VPH de manière précoce et ce, en interagissant avec des protéines cellulaires, comme le récepteur du facteur de croissance EGF (EGFR), un mitogène primaire essentiel des kératinocytes (Reinwald et Green, 1977). E5 intervient également au niveau de l'altération de la réponse cellulaire aux signaux de

croissance et de différenciation (Horwitz, 1988; Martin *et al.*, 1989; Chen et Mounts, 1990; Cohen *et al.*, 1990; Goldstein *et al.*, 1995).

Les protéines E6 et E7 sont deux oncoprotéines responsables de la transformation des cellules en interférant avec l'action des suppresseurs de tumeur cellulaires p53 et pRb, respectivement. Leur mécanisme d'action sera également décrit de manière plus approfondie dans la section «Rôle de E2 et des oncoprotéines virales E6 et E7 dans le cycle d'infection des VPHs à haut risque».

En ce qui a trait aux protéines E3 et E8, très peu d'information est connue à ce jour. Enfin, pour ce qui est des protéines tardives structurales encodées par la région L, on retrouve la protéine majeure de la capsid L1 qui est impliquée dans la formation des particules virales et la protéine mineure L2 qui intervient au niveau de l'empaquetage de l'ADN viral (Christensen *et al.*, 1994; Le Cann *et al.*, 1994).

Enfin, le LCR est la région la moins conservée parmi les PVs, n'encode pas de protéines, et contient des sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaires et pour des protéines virales, comme E2, les promoteurs précoces ainsi que l'origine de réplication de l'ADN viral (Thierry et Yaniv, 1987; Garcia-Carranca *et al.*, 1988; O'Connor *et al.*, 1996).

### **1.5. Tropisme cellulaire**

Les VPHs possèdent non seulement une grande spécificité pour l'hôte qu'ils infectent mais également un tropisme particulier pour les cellules de cet hôte. En effet, aucun exemple de transmission naturelle du VPH d'une espèce à l'autre n'a été décrit jusqu'à ce jour. Les VPHs n'infectent que les cellules épithéliales squameuses de la peau ou des muqueuses générant, dans la majorité des cas, des tumeurs épithéliales bénignes. Le tropisme cellulaire des VPHs s'explique par la restriction aux kératinocytes terminaux différenciés, des fonctions de la réplication virale comme la synthèse de l'ADN végétatif viral, la production des protéines de la capsid virale et l'assemblage des virions (Roden *et al.*, 1994).

Cela étant dit, les VPHs semblent avoir une préférence pour la peau ou les muqueuses dépendamment de leur type. Par exemple, le VPH-11 infecte moins fréquemment l'épithélium cutané que l'épithélium des muqueuses génitales ou du tractus respiratoire (Kridler et al., 1987).

### 1.6. Cycle de réplication :

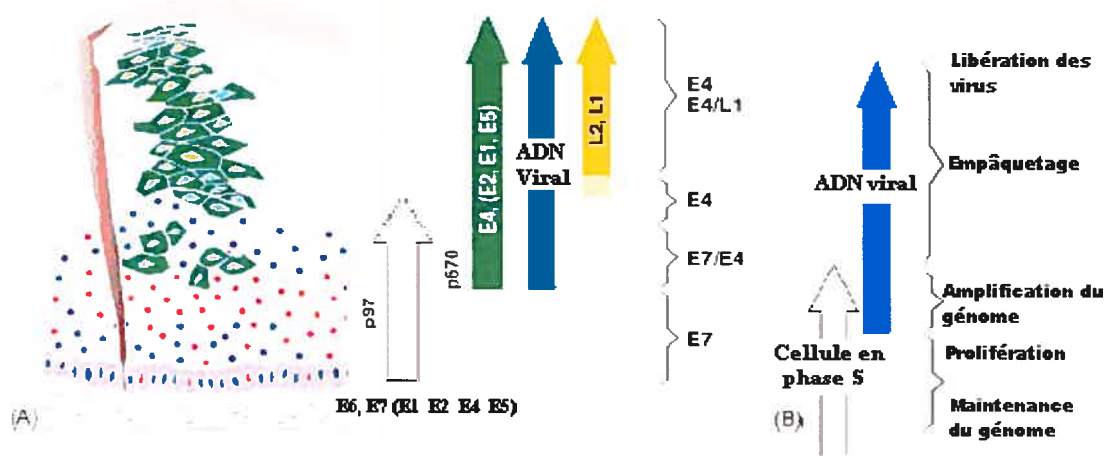


Figure 3 : Organisation du cycle de vie du VPH-16 durant une infection productive par des types de VPH appartenant au supergroupe A. (A) Illustration d'un épithélium squameux infecté par le VPH-16 et du patron d'expression des gènes exprimés au fur et à mesure que les cellules migrent vers la surface de l'épithélium. (B) Schéma des différentes étapes du cycle de réplication des VPHs. Les cellules présentes dans la partie inférieure de l'épithélium sont en phase S et sont celles où se produit l'amplification du génome viral.

Le cycle de réplication du VPH est étroitement associé au programme de différenciation des cellules épithéliales qu'il infecte. La première étape nécessaire pour l'établissement du VPH dans les cellules de l'hôte, est l'infection suivie de la décapsidation. L'intégrine alpha-6 est soupçonnée d'être le récepteur à la surface des cellules épithéliales basales de la protéine L1 de la capsid et semble être requise pour l'entrée du virus dans la cellule (Evander et al., 1997). Il a été suggéré que pour qu'une lésion persiste, le virus doit infecter les cellules souches basales épithéliales (Egawa, 2003). D'autres études ont suggéré

que cette étape se faisait en présence du sulfate d'héparine, ce qui suggère que les PVs peuvent, comme c'est le cas pour le VIH, utiliser un récepteur et un corécepteur pour pénétrer dans la cellule (Giroglou et *al.*, 2001). Des études plus récentes ont révélé qu'en fait, le virus attaché était internalisé par endocytose dans des vésicules tapissées de clathrines, processus qui dure pendant plusieurs heures (Culp et Christensen, 2004).

La décapsidation du virus semble être facilitée par la perturbation des ponts disulfures intracapsomériques, permettant au génome viral d'être transporté jusqu'au noyau. Après l'infection, il semblerait que le virus maintienne son génome à un faible nombre de copies (10-200 par cellule) sous forme d'épisomes au niveau des cellules basales de l'épithélium (De Geest et *al.*, 1993).

Parallèlement, les protéines E1 et E2 sont exprimées à un faible niveau permettant le maintien de l'ADN viral sous forme épisomale et facilitant une ségrégation appropriée des génomes durant la division cellulaire. En 1988, Crum et ses collègues ont suggéré que les protéines oncogènes E6 et E7 sont également exprimées au niveau des cellules basales mais cela n'a pas encore été démontré.

Normalement, lorsqu'un épithélium n'est pas infecté par le VPH, les cellules basales terminent leur cycle cellulaire après avoir migré vers les couches suprabasales de l'épithélium où elles subissent un processus de différenciation. Durant l'infection par les PVs, les protéines E6 et E7 sont exprimées au niveau de ces cellules, et agissent de manière à déréguler le cycle cellulaire via des mécanismes qui seront discutés dans la section «3.3», ce qui résulte en un retard de la différenciation des cellules. Les PVs forcent donc la cellule à se multiplier plutôt qu'à se différencier.

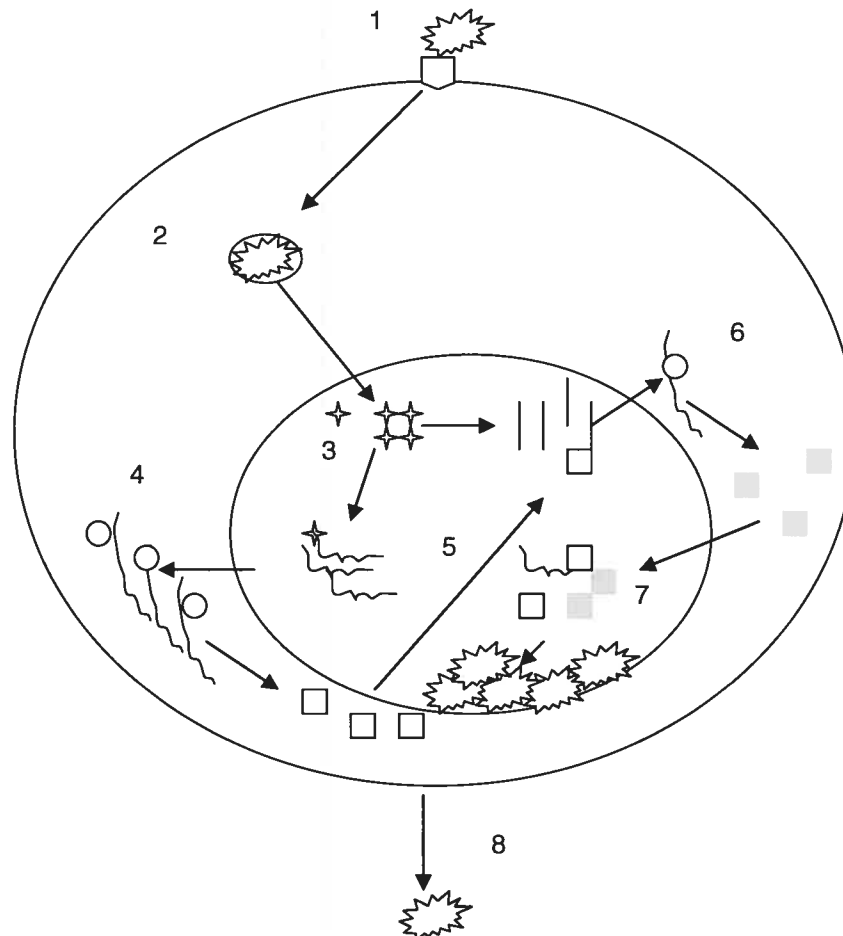
Dans l'étape suivante, les PVs doivent amplifier leur génome et l'empaqueter dans la capsid afin de produire des particules virales infectieuses. Cela se produit soit au milieu, soit au niveau de la couche épithéliale externe. Ce processus coïncide avec l'activation du promoteur tardif qui enclenche l'expression des protéines impliquées dans la réplication du génome (Middleton et *al.*, 2003). L'amplification du génome viral débute dans les cellules épithéliales en division et requiert l'expression des gènes précoces, incluant E4 et E5, dont le rôle demeure encore inconnu à ce stade du cycle. La liaison de E2 à l'origine de réplication

située dans la région du LCR permet le recrutement de la protéine E1, dotée d'une activité hélicase, et ces deux protéines forment un complexe permettant la réplication de l'ADN viral.

Au cours de l'infection virale, le niveau des différentes protéines virales est contrôlé par l'activité du promoteur, par la sélection différentielle du site d'épissage et une augmentation des concentrations de E1 et E2 permettant une augmentation du nombre de copies du virus au niveau des couches supérieures.

Enfin, pour permettre la libération des virions, les protéines L1 et L2 sont exprimées, ce qui favorise l'assemblage des particules infectieuses au niveau de la couche externe de l'épithélium (Doorbar, 2005).

Pour les PVs, il existe deux modes de réplication de l'ADN viral. Le premier survient dans les cellules de la couche basale de l'épiderme (incluant les cellules souches basales, les fibroblastes dermaux, etc.). Dans ces cellules, l'ADN viral est maintenu sous forme de plasmide multicopie stable. Le génome viral se réplique en moyenne une fois par cellule durant la phase S, simultanément avec le chromosome de la cellule hôte.



*Figure 4 : Cycle de vie du VPH. La première étape de l'infection est son attachement (1) via un récepteur soupçonné d'être l'intégrine alpha-6 ou le sulfate d'héparine. Par ailleurs, le virus est internalisé par endocytose (2), et est transloqué dans le noyau où débute la transcription des gènes précoces (3). Ces derniers sont traduits en protéines précoces dans le cytoplasme (4) de la cellule et possèdent un signal de localisation nucléaire leur permettant de retourner dans le noyau pour transcrire les promoteurs tardifs (5). Les gènes tardifs ainsi exprimés dans le noyau, traduits dans le cytoplasme en protéines L1 et L2 (6) qui retournent au noyau (7) où elles seront assemblées en capsid virale, forment une particule virale après qu'elle ait incorporé l'ADN viral prête à être relarguées (8) pour aller infecter les cellules avoisinantes.*

- : endosome
- ✦ : Protéines virales originales
- ⎓ : ARNm dans le cytoplasme
- ⎓ : ARNm précoce
- | : ARNm Tardif
- : Ribosomes
- : Protéines précoces
- : Protéines tardives

Les épisomes viraux se répartissent également dans les cellules filles. Ce premier mode de réplication assure l'établissement d'une infection persistante au niveau des cellules souches basales de l'épiderme. Le second mode de réplication de l'ADN est la réplication végétative et survient au niveau des cellules épithéliales plus différenciées. Dans les cellules épithéliales squameuses, où a lieu la synthèse de l'ADN cellulaire, on observe également une synthèse d'ADN viral explosive, générant des génomes empaquetés et donnant naissance à des virions infectieux (de Villier et *al.*, 1992).

## 2)Épidémiologie :

Le VPH est une infection très commune, bien que la plupart des individus infectés éliminent le virus sans même développer de symptôme clinique. Cependant, une minorité des femmes infectées développent un cancer du col. Une infection par un VPH à haut risque va favoriser le développement d'un tel cancer. En effet, les types de VPHs se divisent en deux catégories principales, ceux qui sont à haut risque (VPH-HR), associés au cancer du col et ceux considérés à faible risque (VPH-LR) qui ne sont pas associés avec des lésions cancéreuses. Ainsi, plus de 40 types de VPHs infectent le tractus anogénital humain (zur Hausen, 1996), dont près de 13 d'entre eux possèdent un potentiel oncogénique plus marqué par rapport aux types à faible risque.

Le cancer du col se classe au 12<sup>ème</sup> rang des cancers les plus fréquemment diagnostiqués parmi les canadiennes, tous âges confondus; par contre, il se classe 3<sup>ème</sup> chez les femmes de 20 à 34 ans et de 35 à 49 ans (Agence de Santé Publique du Canada, 2002).

Près de 80% des femmes sexuellement actives développeront un jour l'infection au VPH (Groopman, 1999), ce qui en fait l'infection sexuellement transmissible la plus commune dans le monde. Dans le monde, on estime que la prévalence de l'infection par le VPH chez les femmes atteint entre 2% à 44% (Bosch et de Sanjose, 2003). Cette vaste variation de prévalence s'explique en partie par les différences d'âge des populations étudiées et par la sensibilité variable des tests utilisés pour la détection des infections au VPH.

Le VPH-16 est l'un des types les plus fréquents chez les femmes ayant une cytologie normale mais constitue également le type le plus fréquemment isolé des cas de cancers du col utérin (Franco et *al.*, 1999; Woodman et *al.*, 2001; Munoz et *al.*, 2003). D'un point de vue des prévisions statistiques, il semblerait que sur 1 million de femmes, 10% d'entre elles développeront des lésions précancéreuses au niveau de leurs tissus cervicaux. Parmi ces 10%, 8000 développeront un carcinome *in situ* et 1600 développeront un cancer invasif, à moins que les lésions ne soient détectées et traitées assez tôt (McIntosh, 2000).

La plupart des études ont révélé qu'une infection au VPH génital dure en général de 4 à 20 mois. Toutefois, 10 à 60% des femmes demeureront infectées avec le même type pendant

plus d'une année. La plupart des études indiquent, cependant, que moins de la moitié des femmes continueront à être infectées avec le VPH après 12 mois. Des études ont démontré que les VPH-HR semblent persister plus longtemps que les VPH-LR (Franco et *al.*, 2003). Alors que la plupart des études confirment cette idée de diminution de la prévalence de l'infection avec l'âge, d'autres ont démontré un pic de la prévalence des infections au VPH chez les femmes de moins de 25 ans, une diminution chez les femmes de 35 à 54 ans et un second pic chez les femmes ayant plus de 55 ans (Herrero et *al.*, 2000). Ce dernier pic chez les femmes plus âgées peut s'expliquer par la réactivation d'un virus latent ou par un «effet de cohorte», c'est-à-dire les différences entre cohortes pour un âge donné, mais cela demeure hypothétique. Lorsque l'on observe la tendance temporelle des infections au VPH aux États-Unis, on remarque que la prévalence du VPH-16 parmi les femmes âgées entre 23 et 31 ans a augmenté de 17% entre 1983 et 1985 et de 24% entre 1995 et 1997 (Baseman et Koutsky, 2005).

Une étude longitudinale conduite entre 1993 et 1999, portait sur l'analyse de l'histoire naturelle des infections au VPH et des néoplasies cervicales chez 1611 femmes résidant dans la ville de Sao Paulo au Brésil. Les résultats ont ainsi permis d'établir une association claire entre les infections au VPH persistantes et l'incidence des SIL (lésions squameuses intraépithéliales, plus particulièrement pour les types 16 et 18 (Schlecht et *al.*, 2003). Une autre étude a indiqué que 16 000 nouveaux cas étaient dénombrés chaque année au Brésil, ce qui place le CC en deuxième place chez les femmes après le cancer du sein (Kalacun et Bozzetti, 2005). Au Canada, on dénombre 1350 nouveaux cas de CC par an dont 410 décès (Radio Canada). Il est à noter que très peu de données sont disponibles sur la prévalence du CC chez les femmes canadiennes et brésiliennes, ce qui dénote un manque évident d'études épidémiologiques chez ces deux populations.



### 3) Histoire naturelle de l'infection :

#### 3.1. Pathologies et lésions cervicales associées aux VPHs.

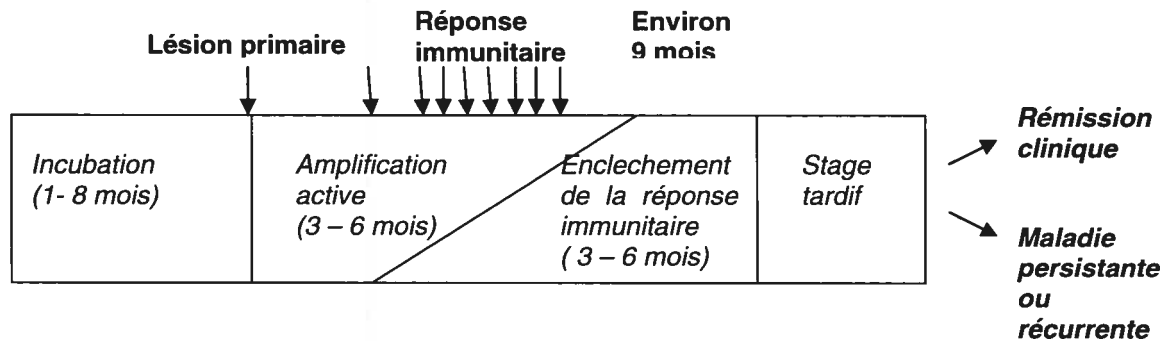


Figure 5 : Histoire naturelle des VPHs-HR.

Les infections au VPH, comme mentionné précédemment, sont le plus souvent transitoires, ce qui rend l'infection dans la majorité des cas asymptomatique. Nonobstant, il arrive que l'infection persiste. Cette persistance peut entraîner la formation de lésions du col dont la gravité relative dépend du degré d'atteinte de l'épithélium squameux.

Les lésions précancéreuses étaient anciennement classées en néoplasie cervicale intraépithéliale (CIN) de grade I, II ou III correspondant respectivement à une dysplasie légère, modérée et sévère ou carcinome *in situ*, mais ce système continue à être utilisé encore aujourd'hui. Un système de classification établi plus récemment, celui de Bethesda, permet de catégoriser ces anomalies cytologiques soit de bas grade (LSIL) ou de haut grade (HSIL) (Reid, 1993). Les LSILs peuvent progresser en HSILs puis atteindre le stade du cancer invasif. Jusqu'au stade des dysplasies sévères, l'infection peut régresser grâce à la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte. Du point de vue de l'évolution clinique, 80 à 90% des «précancers», précurseurs des lésions invasives cervicales, prennent naissance au niveau de la partie exocervicale constituée de cellules tapissant la surface du col et formant la

«zone de transformation». Cette zone est retrouvée à l'endroit où les cellules de l'endocol forment une jonction avec l'épithélium stratifié du vagin. La majorité des lésions cancéreuses du col sont des carcinomes épidermoïdes. Si le cancer du col s'étend, il atteindra le vagin, l'utérus puis s'étendra latéralement pour ensuite atteindre le système lymphatique et s'étendre aux ganglions locaux et distants. Le carcinome épidermoïde se présente habituellement comme une lésion ulcéreuse et se développe généralement à partir de lésions dysplasiques préexistantes (Robbins, p. 1049).

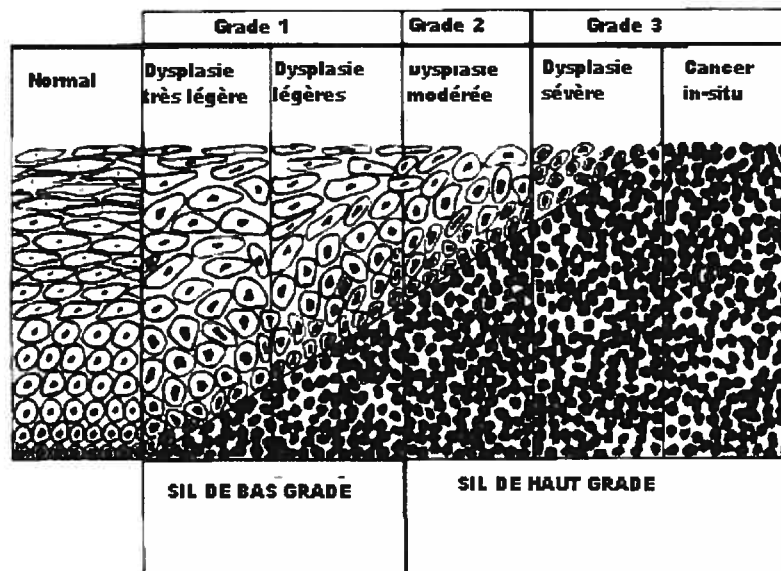
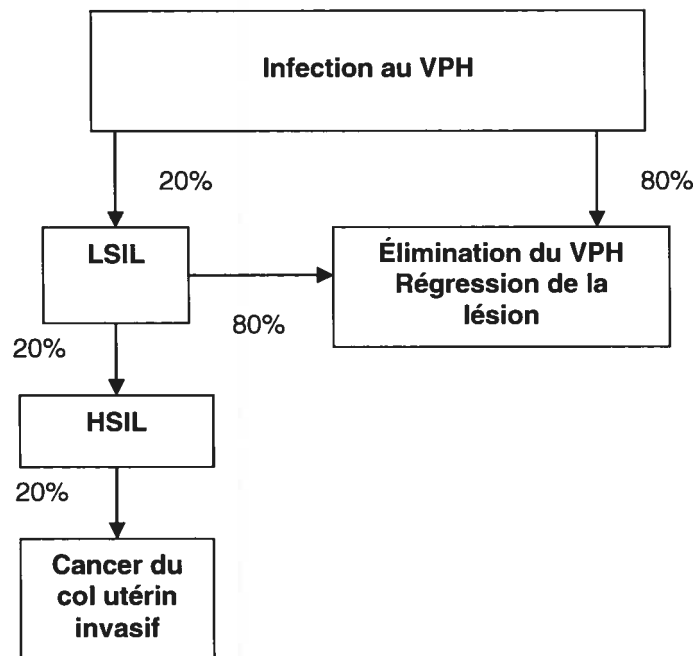


Figure 6 : Les différents stades de progression des lésions squameuses intraépithéliales. À partir d'un épithélium sain, une infection au VPH peut engendrer une lésion LSIL qui peut progresser vers des lésions HSILs entraînant ainsi l'apparition d'un cancer invasif.

Avant d'atteindre l'étape du cancer invasif, les lésions précancéreuses évoluent à travers plusieurs stades intermédiaires adoptant une morphologie cellulaire typique à chaque stade (Fig. 6).



*Figure 7 : Histoire naturelle de l'infection au VPH. À partir de l'infection initiale par un type à haut risque, seule une minorité développera des LSILs dont une infime partie progressera vers des HSILs et parmi cette minorité, un petit nombre de patientes seulement développeront un cancer invasif.*

La sévérité de la lésion dépend de l'étendue des cellules transformées ayant remplacées l'épithélium cervical normalement différencié. La plupart des lésions pré-invasives régressent spontanément et au moins 10 années sont requises pour qu'une lésion CIN-I évolue vers un cancer invasif et près de 15-25% des lésions CIN-3 progressent vers ce stade (Fey et Beal, 2004). D'autres études ont postulé que plusieurs HSILs ne découlaient pas de LSILs mais résultaient directement des infections par des VPHs oncogéniques à haut risque (Kurman et Solomon, 1994).

### 3.2. Facteurs de risque :

Il est maintenant établi que le VPH est une cause nécessaire pour le développement du CC ainsi que son précurseur immédiat, la lésion CIN 3. Une proportion de 60 à 80% des jeunes femmes infectées par le VPH développe des infections transitoires qui régressent en 8 à 14 mois grâce à la réponse immunitaire cellulaire. L'infection à elle seule ne constitue donc pas un facteur suffisant pour mener au développement de la maladie. Les résultats d'études cas-contrôles ont suggéré que plusieurs facteurs contribuent activement à l'induction des lésions précancéreuses et du cancer du col, soit en augmentant la susceptibilité de l'hôte à l'infection au VPH, résultant de l'altération génétique de la réponse immunitaire anti-VPH, soit en contribuant au processus carcinogénique à des étapes différentes du mécanisme d'action des protéines oncogènes du VPH. On peut classer les facteurs de risque en trois catégories principales : les facteurs de risque viraux, les facteurs de l'hôte et les facteurs de l'environnement (Ferenczy et Franco, 2002).

#### 3.2.1. Facteurs du virus

Les VPHs, rappelons le, ou du moins pour ce qui est des types à haut risque, constituent le facteur de risque principal du développement du CC. Les types 16 et 18 sont les plus communément retrouvés dans les cancers invasifs. Contrairement aux VPHs à faible risque, les VPHs à haut risque induisent le processus de transformation en immortalisant *in vitro* les kératinocytes humains par des mécanismes bien précis comme il sera discuté dans la section «3.3» (Schlegel et *al.*, 1988). Il est important de noter que l'on retrouve le génome viral dans toutes les cellules présentes dans les lésions associées aux VPHs où la transcription du génome est constitutivement active.

La capacité de transformation des VPHs est principalement le résultat de l'activité des protéines E6 et E7, qui sont constitutivement exprimées dans les cellules cancéreuses du col et sont transcrites de manière plus marquée au niveau des lésions de haut grade que dans les lésions de bas grade.

Un autre phénomène soutenant le fait que le VPH est directement associé aux lésions précancéreuses et cancéreuses du col est la capacité de certains types à s'intégrer dans le génome de l'hôte. Ce processus d'intégration est en effet observé dans la plupart des lignées cellulaires dérivées des lésions de cancers du col de l'utérus. Des études sur le VPH-18 ont révélé que son génome est toujours intégré dans l'ADN cellulaire (Cullen *et al.*, 1991) alors que l'ADN du VPH-16 peut aussi bien être intégré (72% des cas) que maintenu sous forme épisomale (Das *et al.*, 1992). Cette intégration est un phénomène important pour la transformation cellulaire et l'induction des néoplasies cervicales. Cela est démontré par le fait que l'intégration de l'ADN viral (préalablement linéarisé) au niveau du génome de l'hôte résulte souvent en la délétion d'une partie des protéines E1 ou E2. E2, comme il a été mentionné précédemment dans la section «1.4», peut aussi bien réguler positivement que négativement la transcription de E6 et E7. L'interruption du gène E2 par l'intégration entraîne la disparition de E2 qui ne réprime plus le promoteur des gènes E6 et E7 et résulte en une expression accrue de ces deux oncoprotéines (Ferber *et al.*, 2003; Sathish *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005). Cette augmentation du niveau d'expression des oncoprotéines peut également être due à la stabilisation des ARNm par l'intégration du génome viral (Jeon et Lambert, 1995).

Un autre mécanisme important pour le développement du cancer du col utérin, est la capacité des VPHs à persister dans les cellules de l'épithélium. Chez la plupart des femmes infectées par le virus, celui-ci est dit «cliniquement latent» lorsqu'elles ne présentent pas de symptômes cliniques. La détection de l'ADN du VPH-16 dans les lésions cervicales en absence de manifestation clinique s'explique par la présence du virus dans quelques cellules qui soutiennent le cycle d'infection productive au cours de la différenciation des cellules épithéliales. L'ADN des PVs semble se maintenir au niveau des cellules basales de l'épithélium et s'activer lorsque le niveau de l'immunosurveillance décline (Zhang *et al.*, 1999). Le patron de transcription du génome viral dans les cellules basales durant l'infection latente clinique est similaire à celui présent durant l'infection productive au niveau de ces mêmes cellules. Il a été suggéré que l'expression latente du génome est restreinte à E1 et E2 et que l'expression de E6 et E7 n'est pas requise durant cette phase (Zhang *et al.*, 1999).

La charge virale est un autre biomarqueur potentiel permettant d'identifier les sujets qui sont à risque de développer un cancer. L'association entre la charge virale des VPH-HR et les

maladies du col est actuellement sous investigation. En 1999, Swan et ses collaborateurs ont noté une augmentation marquée du nombre de copies d'ADN du VPH-16 avec le degré d'anomalie de l'épithélium squameux (Swan et *al.*, 1999). En outre, des études récentes ont postulé que la charge virale pouvait constituer un facteur prédictif de la progression néoplasique des lésions associées au VPH et de la persistance de l'infection (Cuzick et *al.*, 1997; Ylitalo et *al.*, 2000; Josefsson et *al.*, 2000; Rousseau et *al.*, 2001; Sherman et *al.*, 2003).

Enfin, un dernier biomarqueur de progression peut être le polymorphisme des VPHs. En effet, il semblerait que certaines variantes moléculaires d'un type de VPH soient plus agressives que d'autres. Ce thème sera largement approfondi dans la section «4.3».

En somme, tous ces paramètres, considérés comme étant impliqués dans l'évolution des lésions vers des stades plus avancés des lésions précancéreuses, sont inter-dépendants. En effet, il est logique de penser que les VPH-HR possédant des propriétés oncogéniques vont se retrouver à une plus grande quantité et donc à une charge virale plus importante par cellule, leur donnant ainsi plus de chance de s'intégrer, de persister plus longtemps et par voie de conséquence d'exprimer une plus grande quantité d'oncogènes intervenant directement au niveau de l'induction des néoplasies cervicales. Étant donné que les VPH-HR se multipliaient à une vitesse plus grande au début de l'évolution, il y a des millénaires de cela, ceux-ci se trouvaient à être plus susceptibles d'acquérir des mutations et de développer des sous-types de VPH (variantes moléculaires). Malgré l'association robuste avec le cancer du col de l'utérus, la majorité des infections au VPH sont transitoires et seule une fraction progresse vers des lésions pré-invasives et invasives (Wallboomers et *al.*, 1999). Cela implique que d'autres facteurs entrent en jeu, prédisposant certaines populations à des infections persistantes pouvant mener au cancer du col.

### 3.2.2. Facteurs de l'hôte

La parité est l'un des cofacteurs que l'on peut associer au risque de développement des lésions précancéreuses, comme l'ont rapporté plusieurs études (Brinton *et al.*, 1989; Munoz *et al.*, 2002). La plupart des études effectuées sur des cohortes de patientes VPH-positives, ont révélé un risque croissant de développement des HSIL/CC avec le nombre de grossesses. En effet, il semblerait que les femmes ayant eu au moins 7 grossesses présentent un risque 4 fois plus élevé que les femmes n'en ayant jamais eues. On a tenté d'expliquer cette association par le régime alimentaire, les facteurs hormonaux liés à la grossesse, le trauma cervical lié à l'accouchement, et possiblement par des mécanismes immunitaires (Kjellberg *et al.*, 2000). L'influence des hormones demeure, toutefois, l'explication la plus plausible du fait des effets de l'utilisation des contraceptifs oraux, comme il sera discuté dans la section «3.2.3».

Un autre facteur qu'il ne faut pas négliger est la précocité des rapports sexuels. En effet, il semblerait que plus la première relation sexuelle survient tôt dans la vie d'une jeune femme, plus elle sera exposée au développement du CC, mais cette hypothèse demeure encore sous investigation (Boyd et Doll, 1964; Kanato et Saranrittichai, 2006). On a ainsi suggéré que la maturité du col pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans la progression des lésions. Dans le même ordre d'idées, il semblerait que l'âge soit un autre facteur de risque important et un sondage récent conduit dans la province de l'Ontario, indique que les femmes âgées entre 20 et 24 ans présente la plus haute prévalence d'infection au VPH (24%). (Sellors *et al.*, 2000). D'autres études ont révélé qu'après l'âge de 25 ans, le risque de développement du CC commence à croître. Après l'âge de 40 ans, ce risque se stabilise mais le risque de décès à cause de ce type de cancer augmente avec l'âge (National Cancer Institute).

Ce risque peut également être accru par le comportement sexuel du partenaire. En effet, on a remarqué que la détection de l'ADN des VPHs au niveau du pénis des hommes était reliée à un risque accru pour leurs partenaires sexuelles de développer le cancer du col. On a également observé une forte association entre le nombre de partenaires extra-maritales d'un homme, particulièrement s'il s'agit de prostituées, et le risque pour son épouse de développer le cancer (Schiffman *et al.*, 1993).

Enfin, la séropositivité des femmes constitue également un facteur intervenant dans la progression des lésions. En effet, les patientes infectées par le VIH semblent être plus à risque de développer le CC puisqu'elles sont immunodéficientes et qu'elles ne disposent donc pas d'immunité efficace pour lutter contre les infections au VPH (Kreiss *et al.*, 1992; Marte *et al.*, 1992; Ellerbrock *et al.*, 2000).

Le polymorphisme des gènes du HLA peut aussi constituer un facteur de susceptibilité à l'infection au VPH, différentes variantes ayant été associées avec les CIN et/ou le CC (Maciag *et al.*, 2000). Ce facteur génétique pourrait affecter l'efficacité des cellules présentatrices d'antigène pour présenter les antigènes dérivés du virus aux lymphocytes T. Il a d'ailleurs été établi que les femmes infectées par le VPH possédant l'allèle HLA-II DQw3 étaient plus à risque de développer le CC (Wank et Thomssen, 1991). En outre, une étude menée chez des patientes africaines a révélé que les femmes possédant l'allèle HLA-DBQ1 étaient également plus susceptibles de développer ce type de cancer (Gregoire *et al.*, 1994), de même que celles possédant les allèles DQB1\*05 et DRB1\*15 qui étaient plus exposées à l'acquisition d'une infection au VPH et au développement des maladies du col (Cuzick *et al.*, 2000). Parallèlement, il a été énoncé que les individus possédant l'allèle HLA-B7 sont plus à risque que les individus HLA-B7 négatifs de développer le cancer (Ellis *et al.*, 1997). À l'inverse, les allèles DRB1\*13 semblent conférer une certaine protection contre le développement du cancer du CC (Sastre-Garau *et al.*, 1996).

D'autres études ont analysé le polymorphisme du suppresseur de tumeur p53, dont certaines variantes semblaient présenter une moindre affinité pour la protéine oncogène E6, responsable de sa dégradation via le système ubiquitine-protéasome. Ainsi, les patientes qui présentaient un p53 homozygote pour l'arginine au codon 72, étaient plus à risque de développer un CC que celles présentant un p53 hétérozygote arginine/proline au même codon (Storey *et al.*, 1998; *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). Toutefois, Rosenthal et ses collaborateurs ont rejeté cette hypothèse car ils n'ont pas réussi à retrouver cette association dans leurs recherches (Rosenthal *et al.*, 1998).



### 3.2.3. Facteurs de l'environnement

Selon l'Institut National du Cancer, l'un des principaux facteurs exogènes impliqués dans la progression des néoplasies du col, est l'utilisation des contraceptifs oraux (CO) à long terme. Des études ont démontré un risque accru du cancer du col avec l'utilisation de CO à long terme (au delà de 12 ans) (Daling et *al.*, 1996; Lacey et *al.*, 1999). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vitro* et *in vivo*, l'oestradiol et la progestérone stimulent la croissance des cellules VPH-positives en stimulant l'activité du LCR, résultant en une surexpression des protéines E6 et E7. D'autre part, cette association avec l'utilisation de CO pourrait tout simplement être due à une absence de protection lors des rapports sexuels et ainsi à une exposition accrue au VPH. Il pourrait également s'agir d'un biais de sélection, considérant que ces femmes doivent probablement procéder à des dépistages plus fréquents que les autres (Shields et *al.*, 2004). Cette association n'a pas été observée chez les femmes ayant consommé des CO pendant moins de 5 ans. Au-delà de cette période, le risque de CC augmente de 4 fois chez les femmes infectées par le VPH. Jusqu'à ce jour, l'association avec des contraceptifs oraux ou hormonaux n'est pas clairement établie et demeure encore sous-investigation (Bosch et *al.*, 2002).

Le tabac est reconnu comme jouant le rôle de cofacteur dans le cancer du col de l'utérus. En effet, le tabagisme semble exercer un impact carcinogène direct sur l'épithélium squameux à cause des nitrosamines qui y sont retrouvées ainsi que les métabolites de nicotine retrouvés dans le mucus cervical des fumeurs, d'autant plus que la nicotine semble inhiber *in vitro* le processus apoptotique dans les systèmes épithéliaux. Ajoutons à cela que les fumeurs présentent souvent une carence en folate et en vitamine B, cette déficience pouvant également jouer un rôle au niveau du développement des dysplasies cervicales (Daling et *al.*, 1996; Kjellberg et *al.*, 1999).

L'exposition des femmes au Diethylstilbestrol (DES), une hormone oestrogène prescrite aux femmes enceintes, semble augmenter le risque de développer le CC chez leur fille. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle celle-ci n'est plus prescrite aux États-unis (Hatch et *al.*, 2001).

Le régime alimentaire peut exercer un impact sur les risques de progression des néoplasies du col utérin. En effet, un régime alimentaire riche en  $\beta$ -carotène, en agents anti-

oxydants, en vitamine C, E et, à moindre mesure, en vitamine A, réduit le risque de développement du CC (Garcia-Closas et *al.*, 2005; Lee et *al.*, 2005).

Le statut socio-économique constitue un autre facteur pouvant intervenir au niveau du risque de développer le CC. Des études ont démontré que le cancer du col est plus commun chez les femmes appartenant à une classe sociale défavorisée et chez celles qui ont eu des relations sexuelles avec plusieurs partenaires (Khan et *al.*, 2005). Néanmoins, il semblerait que ce soit plutôt l'accès limité aux services de santé adéquats et aux techniques de dépistage qui pourrait expliquer ce risque accru de HSIL/CC chez cette catégorie de femmes.

Finalement, plusieurs études ont établi une association entre l'infection à *Chlamydia trachomatis* et le risque de développer le CC chez les femmes infectées par le VPH (Munoz et *al.*, 1993; Dillner et *al.*, 1994). Les infections à *Trichomonas vaginalis* ont également été associées à un risque accru de développement du CC (Yap et *al.*, 1995). Des études ont rapporté que des infections chroniques en conjonction avec des infections sexuellement transmissibles, pourraient provoquer l'inflammation du col de l'utérus résultant en une altération génotoxique via les métabolites oxydatifs. Cette hypothèse demeure, toutefois, un sujet de débat au sein de la communauté scientifique.

Depuis l'introduction du test Pap au Canada, le taux de mortalité par CC a diminué régulièrement et régressé de près de 50% en l'espace de 25 ans. De plus, 1 000 décès par CC sont évités chaque année grâce à l'amélioration des mesures de lutte et de surveillance. (Agence de Santé Publique du Canada, 2002).

#### 3.2.4. Facteurs tertiaires

Park et ses collaborateurs ont observé des altérations chromosomiques dans 95% des cancers du col et le chromosome 1 semble être le plus susceptible à celles-ci. L'allélotypage a montré une perte allélique au niveau du chromosome 5 dans 56% des cancers et dans 21% des lésions précancéreuses (Park et *al.*, 1995). Des altérations au niveau du chromosome 11 sont également associées avec une altération des fonctions des gènes codant pour les suppresseurs de tumeurs (Srivatsan et *al.*, 2002).

Pour conclure cette section, il est important de rappeler que, sans la présence d'une infection aux VPH-HR, les autres cofacteurs discutés ne suffiront pas à mener au développement du CC et que c'est la combinaison de plusieurs de ces paramètres qui vont affecter la vitesse de progression des lésions cervicales vers un stade plus avancé de néoplasie.

### **3.3. Rôle de E2 et des oncoprotéines virales E6 et E7 dans le cycle d'infection des VPH-HR :**

#### *3.3.1. Rôle multifonctionnel et «anti-oncogène» de la protéine E2*

La protéine E2 des papillomavirus joue un rôle fondamental dans le cycle viral. En effet, elle régule l'expression des oncogènes viraux, active la réplication du génome viral en association avec la protéine E1, et exerce une action antiproliférative sur les cellules qui l'expriment. La protéine E2 est une protéine nucléaire d'environ 45 kD divisée en trois domaines fonctionnellement distincts (Yaniv et Giri, 1986). Le premier domaine, dit transactivateur, d'environ 200 acides aminés, est localisé dans la partie amino-terminale de la protéine et est relativement bien conservé entre les géotypes. Il est responsable de la plupart des activités de E2, aussi bien pour l'activation de la transcription que pour l'initiation de la réplication (Bellanger et *al.*, 2001). La région charnière correspond au domaine central de la protéine E2 qui est très peu structuré et peu conservé parmi les papillomavirus. La troisième région contient le domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN. Elle s'étend sur une centaine d'acides aminés à l'extrémité C-terminale de la protéine.

La protéine E2 est principalement un FT. Son action sur le contrôle transcriptionnel des papillomavirus génitaux humains est, avant tout, la répression de l'expression des protéines précoces (Thierry et Yaniv, 1987; Bernard et *al.*, 1989). La région codant pour la protéine E2 est fréquemment interrompue par l'intégration du virus dans le génome cellulaire (Schwarz et *al.*, 1985; Berumen et *al.*, 1994), ce qui favorise la fixation de E1 sur son site, à l'origine de réplication. Considérant que la protéine E2 est un répresseur de l'expression des oncogènes

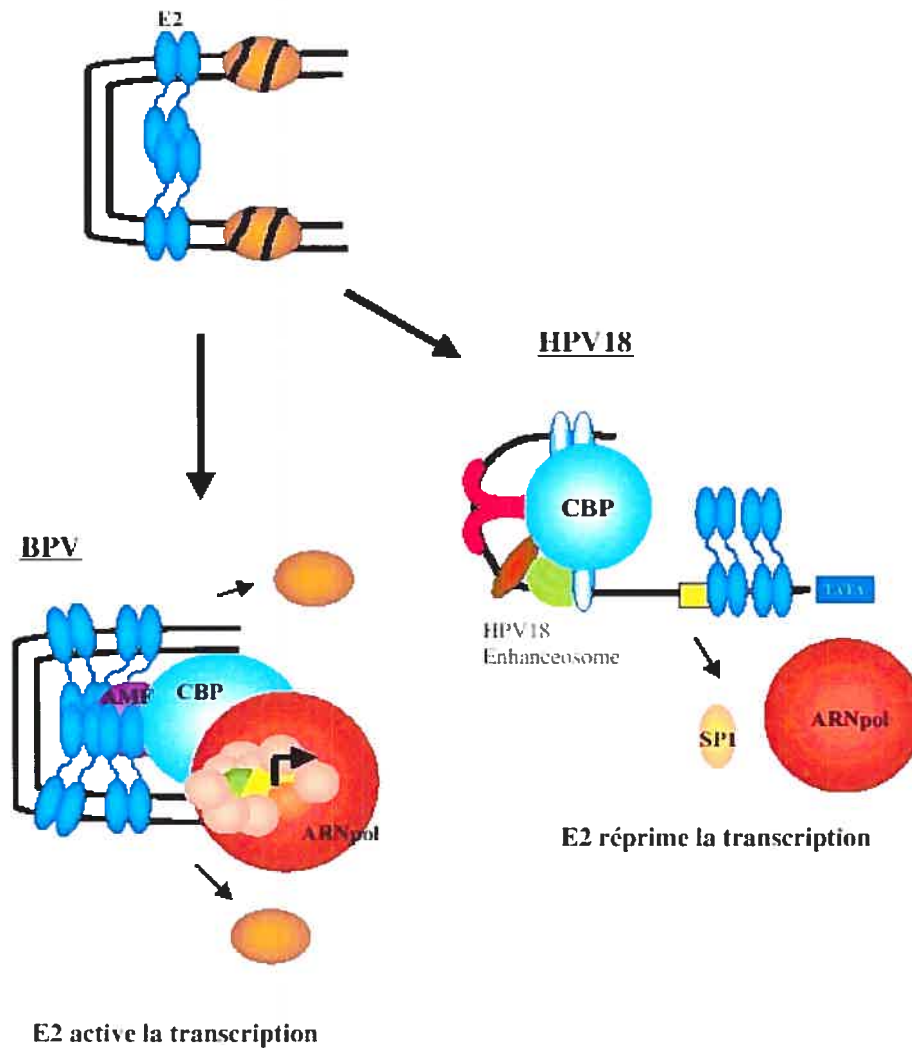


Figure 8 : Rôle de la protéine E2 chez le VPH-18 et le BPV. Suivant la conformation tridimensionnelle de E2, celle-ci peut activer la transcription des promoteurs viraux comme c'est le cas pour le BPV, ou les réprimer comme on l'observe pour le VPH-18.

### 3.3.2. Rôle de la protéine E6 dans le cycle de l'infection des VPHs

Le cadre de lecture de E6 encode une petite protéine d'environ 150 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 17 kD, caractérisée par 4 motifs Cys-X-X-Cys capables de former deux doigts de zinc. Ces motifs seraient impliqués dans le rôle transactivateur de E6 (Desaintes *et al.*, 1992). Le rôle principal de E6 correspond à sa fonction transformante, qui repose principalement sur son interaction avec l'anti-oncogène p53. Ce dernier constitue la protéine «suppressive» de tumeur dont le gène est muté dans plus de 50% des cancers connus, ce qui n'est pas le cas du cancer du col. p53 constitue le principal obstacle à la réplication virale puisqu'elle peut entraîner l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose des cellules infectées (Wu et Levine, 1994) (**Fig. 9**).

Dans des cellules normales, p53 contrôle son activité en modulant sa propre dégradation par un processus qui met en jeu le protéasome par l'entremise de la protéine ubiquitine-ligase Mdm2. Cependant, sous des conditions de stress, comme lors d'une infection virale, la voie de dégradation dépendante de Mdm2 est inactive et p53 est stabilisé, générant ainsi une situation propice à la mort cellulaire et à l'apoptose (Ashcroft et Vousden, 1999). E6 agit donc en altérant la réponse cellulaire médiée par p53 en prévenant l'arrêt de la croissance et l'entrée en apoptose qu'il induit. Ceci peut ainsi contribuer à l'accumulation des mutations génomiques dans les kératinocytes infectés.

Pour médier la dégradation du p53, E6 recrute une protéine E3 ubiquitine-ligase, la protéine E6AP (E6-associated protein) via son domaine N-terminal (Huibregtse *et al.*, 1993). Le complexe se lie à un groupement ubiquitine d'une enzyme de conjugaison sous la forme d'un thioester qu'elle transfère directement au substrat cible, le p53. Le complexe ainsi formé est stable et seule cette structure permettra à E6AP d'initier alors la poly-ubiquitination de p53 grâce à son domaine C-terminal, HECT (domaine E3-ubiquitine ligase). Cette efficacité de la dégradation de p53 par E6 dépend essentiellement de la force d'interaction entre E6 et p53 et donc de la nature de E6. En effet, les protéines E6 des VPH-LR, conservent leur capacité à lier le domaine central de p53, mais cette affinité est beaucoup plus faible que pour les VPH-HR, ce qui diminue l'efficacité de la dégradation de p53 (Talis *et al.*, 1998).

En outre, E6 peut également supprimer l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de p53 (Pim et *al.*, 1994). L'activité télomérase détectée dans les cancers du col utérin résulte d'une activation par E6, indépendante du p53 (Veldman et *al.*, 2001), et de l'activation transcriptionnelle par E6 d'un gène encodant la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT (Veldman et *al.*, 2001). En somme, E6 contribue à l'immortalisation des cellules infectées en les forçant à se répliquer et en augmentant leur durée de vie.

E6 intervient également en induisant l'hyperprolifération cellulaire par sa liaison à un suppresseur de tumeur, E6TP1 (Song et *al.*, 2000). Il interagit avec des facteurs pro-apoptotiques comme bak dans les kératinocytes différenciés, où ils y sont fortement exprimés et induiraient l'apoptose de ces cellules (Thomas et Banks, 1998). E6 est également capable d'inhiber la différenciation terminale des cellules épithéliales qui conduirait à la kératinisation puis à la mort des cellules, indépendamment du p53 (Pan et Griep, 1995).

Enfin, parmi les nombreux rôles qu'exerce E6, on peut citer son interaction via son domaine C-terminal avec les protéines PDZ, impliquées dans la formation de canaux ioniques, la signalisation et l'adhésion cellulaire, nécessaire à la formation des jonctions adhérentes, et dans la polarité et la prolifération des tissus épithéliaux (Kiyono et *al.*, 1997).

Notons que les lésions de CIN-3 constituent le vrai précurseur du cancer du col utérin. Ces lésions sont caractérisées par l'intégration du VPH à haut risque, l'aneuploïdie nucléaire, et par l'instabilité génomique, le tout résultant de l'inactivation des fonctions du p53 (Ferenczy et Franco, 2002).

### 3.3.3. Rôle de la protéine E7 dans le cycle de l'infection des VPHs

La protéine E7 est une phosphoprotéine acide composée d'une centaine d'acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 10 kD. Une partie de son extrémité N-terminale partage une séquence d'homologie avec la protéine E1A des adénovirus et l'antigène T des polyomavirus, impliquées dans l'altération du contrôle du cycle cellulaire (Vousden et Jat, 1989). À l'extrémité C-terminale, deux domaines de liaison au zinc ont été mis en évidence sous la forme de deux copies de Cys-X-X-Cys (McIntyre et *al.*, 1993).

La perturbation des processus dépendants de E2F, FT cellulaire qui régule l'expression des facteurs de réplication de l'hôte par E7, s'effectue principalement au niveau de la protéine du rétinoblastome, pRB. Cette perturbation se traduit par la dégradation de pRB suite à son interaction avec E7 et par la mise en œuvre du protéasome. Cela a pour conséquence de libérer le domaine d'activation transcriptionnelle de l'hétérodimère E2F/DP (Bandara *et al.*, 1993) et ainsi de permettre l'entrée de la cellule en phase S. E7 a la capacité d'activer E2F/DP en inactivant p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>, inhibiteurs des cdk (Funk *et al.*, 1997). Les cdk, complexées avec les cyclines/cdk, sont responsables de la phosphorylation de pRB, ce qui résulte en la libération des complexes E2F/DP. Ainsi, E2F/DP est converti en activateur transcriptionnel qui stimule alors l'entrée de la cellule infectée en phase S.

Parmi les autres fonctions de E7 que l'on ne va citer que brièvement, il faut mentionner la suppression des activités cytotostatiques de certaines cytokines comme le TGF- $\beta$  et le TNF, qui rend, par cet effet, les kératinocytes résistants à leurs effets. E7 peut interagir et inactiver le FT induit par IFN $\gamma$ , IRF-1, activateur transcriptionnel de l'interféron  $\beta$  (Park *et al.*, 2000) et peut se lier à l'histone déacétylase Mi2 $\beta$ , le FT MMP2 et AP-1 (Antinore *et al.*, 1996; Brehm *et al.*, 1999; Luscher-Firzlaff *et al.*, 1999) qui contribuent à la suppression de l'activité transcriptionnelle d'IRF-1 (Park *et al.*, 2000). D'autre part, E7 peut interagir avec IGFBP-3, une cible transcriptionnelle du p53 qui peut limiter la disponibilité des IGFs (facteurs de survie cellulaire) en le séquestrant. Finalement, il semblerait que E7 interfère avec des voies métaboliques fondamentales retrouvées dans un grand nombre de lignées cellulaires dérivées de cancers, comme la voie impliquant l'enzyme glycolytique pyruvique kinase M2 (Mazurek *et al.*, 2001), et semble également interférer avec l'alcalinisation intracellulaire résultant d'une stimulation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> par E7 (Reshkin *et al.*, 2000).

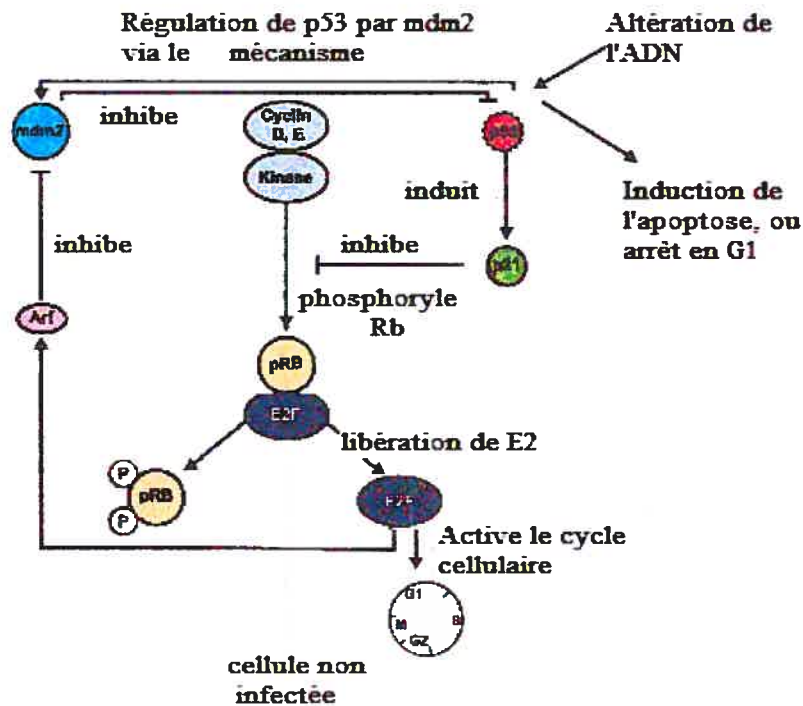


Figure 9 : Rôle physiologique des suppresseurs de tumeurs p53 et pRb dans la cellule. pRb interagit avec le facteur d'élongation E2F lorsque la cellule est en phase de repos et s'en dissocie en phase S lui permettant d'aller exercer son action. p53 agit soit en induisant l'apoptose des cellules en arrêt de croissance soit en activant la protéine p21 qui va inhiber la phosphorylation du pRb et empêcher son action sur E2F.



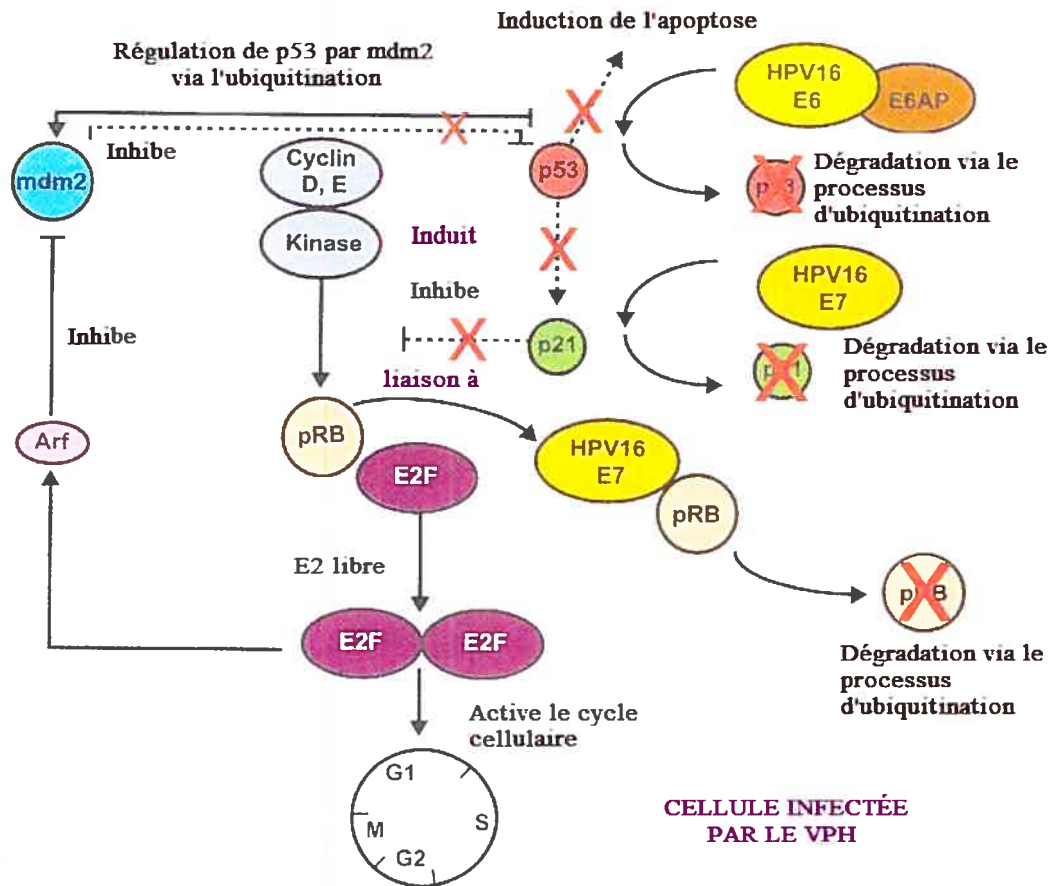


Figure 10 : Rôle des oncoprotéines E7 et E6 dans l'inactivation de pRb et p53, respectivement. E7 agit en séquestrant pRb de manière à ce qu'il ne puisse pas aller se lier au facteur E2F, maintenant ainsi la cellule en division. E6 de par son association avec E6AP, lie p53 et cause sa dégradation par ubiquitination, empêchant la cellule d'entrer en apoptose et favorisant la production d'un maximum de particules virales.

En somme, on peut résumer les principales fonctions des deux oncoprotéines E6 et E7 par le schéma suivant:

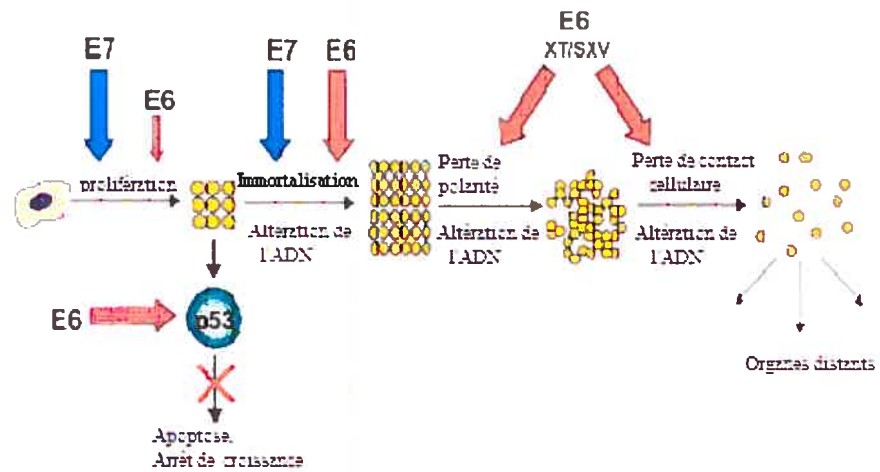


Figure 11 : Résumé de l'action en synergie des deux oncoprotéines E6 et E7.

## **4) Variantes moléculaires des PVs :**

### **4.1. Phylogénie des VPHs**

Grâce à l'émergence des nouveaux outils de la biologie moléculaire ayant permis l'analyse des séquences nucléotidiques, il a été possible d'étudier le processus d'évolution des VPHs du point de vue moléculaire et ainsi de comprendre leur phylogénie. Les papillomavirus constituent une famille de virus très anciens, extrêmement stables, qui ont co-évolué avec leur hôte. En effet, les VPHs sont étiologiquement associés au cancer génital dont l'origine remonte aux primates pré-humains. La diversité moléculaire des isolats viraux reflète l'origine africaine et l'expansion de la race humaine à travers le monde (Bernard, 1994).

Cinq branches phylogénétiques distinctes désignées par la lettre E pour Européen, As pour Asiatique, AA pour asiatique-américain, Af1 pour africain 1 et Af2 pour africain 2, ont été identifiées pour le VPH-16. Cette phylogénie suggérait la co-évolution du virus avec les peuples des trois races majeures, africaine, caucasienne et en provenance de l'Asie de l'Est. Le génome des VPHs-16 semble ainsi avoir évolué sur une longue période de temps, excédant les 200 000 ans, à partir d'un précurseur originaire d'Afrique (Ho et *al.*, 1991; Chan et *al.*, 1992; Ho et *al.*, 1993).

À l'origine, un virus constituait un nouveau type lorsque les séquences des gènes E6, E7 et L1 présentait une homologie inférieure à 90 % avec l'ADN des autres virus. À ce jour, selon la classification moderne des VPHs, le génotype d'un PV est défini comme un ADN viral ayant moins de 90% d'homologie de séquence par rapport à un autre génotype de PV au niveau de la séquence MY09/MY11 du cadre de lecture de L1 (Narechania et *al.*, 2005). Des sous-types, classiquement définis comme des isolats d'un type de papillomavirus donnant des réactions croisées en hybridation sous des conditions stringentes mais ayant un profil de digestion par des enzymes de restriction différent de celui du papillomavirus prototype, sont actuellement reconnus s'ils présentent entre 90 et 98 % d'homologie de

séquence nucléotidique au niveau du gène L1 (Papillomavirus Nomenclature Commette, 1995).

Les sous-types des VPHs sont rarement identifiés. En effet, jusqu'à ce jour, on ne connaît que 7 types qui ont des sous-types, à savoir les VPH-5 et 8, VPH 34 et 64, VPH-44 et 55 et le VPH-68 (Deau et *al.*, 1991; Deau et *al.*, 1993 Bernard et *al.*, 1994).

Chez l'homme, l'aspect morphologique, l'incidence, la répartition selon l'âge, le mode de transmission et l'évolution clinique des divers types de papillomes suggéraient que certains d'entre eux étaient responsables d'entités cliniques distinctes. C'est d'ailleurs à partir de 1977, que zur Hausen en Allemagne et, indépendamment, Orth et collaborateurs, en France, démontrent l'existence de différents types de VPHs (zur hausen, 1977; Orth et *al.*, 1977). Les nombreux travaux qui suivent confirment la remarquable pluralité des papillomavirus humains. Ces virus ont ainsi été classés le plus souvent en fonction de leur tropisme tissulaire et de leur potentiel oncogénique (Walboomers et *al.*, 1999; Swan et *al.*, 1999; Woodman et *al.*, 2001).

#### **4.2. Définition d'une variante moléculaire**

On appelle variante d'un type de VPH donné, tout isolat qui diffère de l'isolat original, ou prototypique, d'un maximum de 5% au niveau de sa séquence nucléotidique. Afin d'identifier une variante, il s'agit de séquencer une partie du génome d'un type donné de VPH, et de la classer sous une variante particulière lorsqu'elle diffère du prototype par au moins un nucléotide. Cette stratégie a été appliquée à un certain nombre de VPHs de différents types à partir d'isolats en provenance de plusieurs régions à travers le monde.

Les études de polymorphisme effectuées jusqu'à présent, ont permis de dégager deux observations principales. D'une part, on a constaté qu'il n'y avait qu'un nombre limité (entre 20 et 100) de variantes communes de chaque type de VPH et d'autre part, que les variantes démontrent une divergence maximale lorsqu'elles sont échantillonnées chez des patientes appartenant à des groupes ethniques différents et ayant donc évolué indépendamment, comme c'est le cas pour les Africains et les Amérindiens. À la lumière de ces deux constats, on peut

supposer que chaque type de VPH a toujours infecté l'homme et a évolué simultanément avec les cohortes infectées tout en se répandant à travers le monde (Bernard, 1994). L'idée qu'à aucun moment dans l'histoire de l'humanité, on a connu une époque où un groupe ethnique n'a pas été atteint de verrues communes, génitales ou de CC, vient appuyer cette hypothèse.

Des études ont soutenu que les variantes d'un même type de VPH diffèrent biologiquement et étiologiquement. Ces différences pourraient contribuer à la disparité de l'incidence du cancer cervical à travers le monde, mais cette question requiert de plus amples recherches avant de pouvoir confirmer cette hypothèse (Calleja-Macias et *al.*, 2005). Il serait donc intéressant de se pencher sur des études de polymorphisme permettant d'identifier des variantes pouvant diverger entre elles par leur potentiel oncogénique et par la persistance de l'intégration et ainsi envisager des outils diagnostiques permettant l'identification des femmes à risque et de les traiter avant l'avènement de la maladie.

#### **4.3. Variantes moléculaires et facteurs de risque**

Les PV constituent un modèle d'intérêt pour l'étude de l'évolution moléculaire des virus à ADN à cause du nombre important d'isolats qui présentent une diversité génomique et une spécificité pour l'hôte et les tissus qu'ils infectent.

Rappelons que le CC est le résultat de l'évolution de différentes lésions au niveau des kératinocytes des cellules épithéliales du col. De plus, on sait à présent que ce ne sont, fort heureusement, pas toutes les personnes infectées par un VPH à haut risque qui développeront ce type de cancer, ce qui suggère que d'autres facteurs doivent probablement contribuer à la transformation néoplasique des cellules épithéliales infectées par les VPHs (Van Duin, 2000). Parmi ces facteurs, certaines variantes moléculaires des VPH-HR pourraient être plus aptes à induire une transformation cellulaire (Koutsky et *al.*, 1997), d'où l'intérêt d'étudier le polymorphisme des VPHs oncogènes.

La diversité des séquences intra et inter-typiques des VPHs ainsi que le potentiel des variantes et des sous-types, constituent un outil épidémiologique prometteur quant à la détermination de la distribution des VPHs et du risque de développement des maladies

associées à l'infection. Il a donc été suggéré que les variantes naturelles du VPH-16 dans une population donnée peuvent différer dans leur comportement biologique. En effet, on pourrait associer certaines variantes à la transmissibilité, à la persistance et à l'oncogénicité d'un type particulier de VPH et l'identification de telles variantes plus persistantes ou plus oncogéniques, pourrait permettre la mise au point de tests de dépistage des VPHs.

À ce jour, la plupart des études de polymorphisme des VPHs se rapportent au type 16 étant donné qu'il est le plus prévalent des types génitaux, suivi du VPH-18, et qu'il est impliqué dans près de 50% des cas de cancer du col de l'utérus (Lorincz et *al.*, 1992; Iwasawa et *al.*, 1996). Les variantes du type 16 semblent être stables et le fait d'avoir retrouvé des variantes identiques chez des individus résidant dans différents pays et n'ayant jamais eu de contact entre eux vient appuyer cette idée.

Les études de polymorphisme de centaines d'isolats de VPHs provenant de spécimens cliniques et de lignées cellulaires dérivées du cancer du col ont démontré une diversité intratypique considérable pour le type 16 (Chan et *al.*, 1992), les types 18 et 45 (Ong et *al.*, 1993), et les types 6 et 11 (Heinzel et *al.*, 1995). Ces variantes moléculaires diffèrent entre elles au niveau de leur séquence génomique de 2% dans la région codante et 5% dans la région non codante (LCR) du génome viral par rapport au prototype du VPH-16. En comparant des séquences nucléotidiques, il a été possible de reconstituer la propagation de ces virus au sein des populations humaines (Bernard et Chan, 1994).

Certaines variantes caractérisées pour le VPH-16 ont un potentiel oncogénique altéré (Stoppler et *al.*, 1996). Toutefois, plusieurs études épidémiologiques ont rejeté cette idée, plus particulièrement pour les variantes non européennes (Hildesheim et *al.*, 2001), européennes et asio-américaines (Chaturvedi et *al.*, 2004). En effet, des études portant sur le polymorphisme des régions du LCR, E6 et L1 du VPH-16 ont permis de subdiviser ce type en deux variantes principales suivant leur distribution géographique, la variante européenne auquel appartient le prototype VPH-16 et la variante non européenne, comme il a été mentionné précédemment. Plusieurs études ont rapporté que les variantes NE étaient plus fréquemment associées avec les lésions ano-cervicales que les variantes E (Calleja-Macias et *al.*, 2004), ce qui pourrait partiellement expliquer la plus haute fréquence des CC en Amérique du Sud, et d'autres régions comme l'Afrique et l'Inde. La région du LCR des variantes NE du VPH-16 possède

une plus grande activité transcriptionnelle que leurs isolats E, ce qui pourrait expliquer pourquoi seulement une fraction des femmes infectées par le VPH-16 développe des néoplasies cervicales. Les variations intratypiques du VPH-16 pourraient également être associées à la persistance des infections et pourrait constituer un élément essentiel à la progression néoplasique. Ainsi, comme mentionné précédemment, la variabilité génomique des VPHs pourraient permettre le développement de tests diagnostiques et de vaccins prophylactiques spécifiques aux variantes moléculaires des VPHs avec un haut potentiel de persistance ou de progression vers un cancer (Ferenczy et Franco, 2002).

Des études de polymorphisme sur le même type, menées dans différentes régions géographiques dans le monde, ont révélé que la colonisation du nouveau monde par les européens et les africains correspondait en fait à la distribution des variantes de VPH-16 sur le continent américain ( Ho *et al.*, 1993; Calleja-Macias *et al.*, 2005).

D'autre part, Fu Xi et ses collaborateurs ont réalisé une étude pour vérifier s'il y avait une différence dans le comportement biologique des différentes variantes naturelles du VPH-16. Effectivement, les résultats obtenus suggéraient que les variantes «nonprototypique-like» (se définissant comme toute variante identique au prototype avec une mutation, tout au plus, par rapport à ce dernier) conféraient un risque accru de développement des néoplasies intraépithéliales de type 2 et 3 (CIN2-3 ou HSIL) comparativement aux variantes «prototypique-like» (Xi *et al.*, 1997).

Peu de différences nucléotidiques retrouvées pour les variantes des VPHs correspondent à des changements dans la séquence d'acides aminés. Cependant, le fait d'identifier des altérations pouvant interférer avec les propriétés fonctionnelles et antigéniques de protéines virales spécifiques demeure d'un intérêt capital pour le développement d'outils épidémiologiques. Par exemple, il a été démontré que la variante 114K du VPH-16 était capable de s'assembler en particules pseudovirales (VLP) à travers un système d'expression hétérologue mais cette propriété n'a pas été observée pour le VPH-16 prototypique. Cette différence a été attribuée à un changement de résidu d'acide aminé au niveau du gène L1. D'autres modifications dans les régions L1/L2 se sont révélées être importantes pour discriminer entre le potentiel infectieux des différents variantes (Kirnbauer *et al.*, 1992, 1993). Un vaccin contre cette variante pourrait, sans conteste, contribuer à réduire le risque d'être

infecté par une telle variante. D'autres études qui seront discutées dans les prochaines pages, souligneront l'intérêt de procéder à des études de polymorphisme chez les différents types de VPHs et présenteront une partie fort intéressante des découvertes réalisées à ce sujet.

#### 4.3.1. Variantes du LCR

La région du LCR est la région régulatrice des VPHs. Elle contient la plupart des séquences d'ADN régulatrices nécessaires à la réplication du génome viral, incluant l'origine de réplication, et à l'expression des gènes viraux (promoteurs). Compte tenu de son rôle important dans la régulation des oncogènes viraux, il est intéressant d'envisager que des mutations à ce niveau puissent générer des variantes présentant des potentiels oncogéniques différents. L'expression des oncogènes viraux E6 et E7 des VPHs est régulée au niveau transcriptionnel par des sites spécifiques de liaison aux protéines retrouvées dans la région du LCR. Les variations de séquence au niveau de cette région peuvent exercer un impact important sur la transcription des oncogènes viraux pouvant conférer des différences dans le potentiel oncogénique du virus, comme il a été rapporté pour le VPH-16 (Kurvinen et *al.*, 2000).

Afin de vérifier le rôle de la région du LCR comme régulatrice de l'expression des gènes viraux, Romanczuk et ses collaborateurs ont comparé le potentiel immortalisant dans les kératinocytes de l'ensemble des gènes LCR/E6/E7 du VPH-16 avec celui du VPH-18. En clonant les gènes E6/E7 du VPH-16 d'une part et du VPH-18 d'autre part dans un plasmide sous le promoteur du SV40, ils observaient un même niveau d'expression pour les deux types de VPH. Ceci suggère que la région du LCR constitue le déterminant majeur dans la différence de l'activité d'immortalisation entre les VPH-16 et -18. Cette différence réside en fait dans l'efficacité plus importante du promoteur P105 du VPH-18 par rapport au P97 du VPH-16, situés dans la région du LCR (Romanczuk et *al.*, 1991; Villa et *al.*, 1991). Une telle étude a permis de souligner le rôle d'une telle région comme régulatrice des gènes E6 et E7 entre autres. Il aurait cependant été intéressant, d'examiner l'activité des gènes E6 et E7 d'un VPH-LR en procédant à la même expérience afin de mettre en évidence l'activité régulatrice



du LCR et de pouvoir la généraliser à tous les types de VPH quelque soit leur tropisme cellulaire.

En 1994, une étude a établi qu'il y'avait, dans la région du LCR, 30 sites potentiels de liaison au FT humain YY1, agissant comme répresseur de l'activité transcriptionnelle du VPH-16 et que certaines mutations ou délétions au niveau de ces sites étaient fréquemment retrouvées dans les isolats provenant des femmes atteintes du cancer du col utérin. Ces isolats tendaient à présenter une activité transcriptionnelle accrue (Schmidt et *al.*, 2001) par rapport aux isolats dérivés des femmes sans cancer qui ne contenaient pas ces mutations. De tels résultats peuvent permettre la mise au point d'un test diagnostique qui permettrait de cibler les patientes plus à risque de développer un cancer. Ce test consisterait à séquencer la région du LCR des VPH-HR provenant de patientes chez qui on aurait détecté des lésions précancéreuses. Ainsi, si l'on retrouve des mutations au niveau des sites de liaison au FT YY1 dans le LCR, cela impliquerait que les patientes seraient davantage exposées à la progression des néoplasies vers un CIS.

À la lumière de ces résultats, une autre équipe de recherche a mené une étude qui indiquait que les variantes isolées des cancers contenaient toutes une mutation à la position 7519 au niveau du site de liaison de YY1 ainsi qu'une délétion de 100 pb alors que les variantes dérivées des patientes asymptomatiques porteuses du virus présentaient une autre mutation mais que l'on retrouvait à proximité des sites de liaisons de facteurs de transcription incluant YY1. La mutation à la position 7519 chez la variante YY1BS (dérivée du cancer du col), que l'on retrouvait dans toutes les variantes du VPH-16 prélevées à partir de lésions cancéreuses du col utérin, supprimait la liaison du FT YY1 à son site, l'empêchant ainsi d'exercer son rôle de répresseur sur l'activité transcriptionnelle des promoteurs situés dans le LCR (Dong et *al.*, 1991). Toujours dans ce sens, en 2001 une autre équipe de recherche a identifié une mutation au niveau du site de liaison au facteur YY1, augmentant l'activité du promoteur P97 de 3 à 5 fois, retrouvée dans les régions de LCR des VPH-16 dans des isolats provenant de tumeur primaire et de métastases. De telles mutations et délétions dans les sites de liaison à YY1, joueraient un rôle significatif dans la surexpression des oncogènes viraux et la progression des néoplasies cervicales (Rose et *al.*, 1997). Toutes ces évidences démontrent clairement que le FT YY1 a un rôle important à jouer dans la suppression de la réplication des

VPH-HR. Il serait donc utile de trouver une méthode telle que la transfection cellulaire, où l'on pourrait exprimer un agoniste synthétique qui aurait la même fonction suppressive que YY1 mais qui pourrait se fixer aux sites mutés dans la région du LCR, dans un plasmide sous le contrôle d'un promoteur assez fort comme celui du CMV (Cytomégalovirus). Cela permettrait ainsi de restaurer l'activité répressive des promoteurs localisés dans le LCR et de bloquer leur activité.

Plus récemment, d'autres études viennent accentuer le rôle de YY1 (**Fig. 12**) comme répresseur du LCR et portaient sur l'étude du polymorphisme de la région du LCR, qui ont été menées par Veressa et ses collaborateurs en 2000. Elles ont également permis l'analyse de l'activité transcriptionnelle du promoteur P97 des oncogènes E6 et E7, retrouvé dans la région du LCR du VPH-16, en investiguant son polymorphisme. Ils ont ainsi pu identifier certaines variantes du VPH-16 avec de longues délétions au niveau du LCR et ont établi que l'activité transcriptionnelle des variantes possédant la délétion au niveau des éléments *enhancer* et *silencer* liant le FT YY1, était diminuée par rapport aux variantes qui en sont exemptes mais qu'une variante avec une délétion ne possédant ni l'élément *enhancer*, ni *silencer*, démontrait une activité importante du promoteur P97 (Veress et *al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que l'altération des sites de liaison au FT YY1 dans le LCR constitue un moyen important pour le VPH-HR d'échapper à la réponse cellulaire, résultant ainsi en une surexpression de E6 et E7. Ces informations révèlent également que les mutations qui surviennent dans la région du LCR, peuvent en partie expliquer les différences dans les propriétés biologiques dans les variantes du VPH-16, résultant en des différences au niveau de leur pathogénicité. L'avantage de cette étude par rapport à d'autres études comme la nôtre est que l'équipe de recherche a séquencé des clones qui regroupaient les différentes variantes de manière à éviter de n'avoir que des variantes minoritaires que l'on aurait obtenu en séquençant directement à partir du spécimen clinique. Un autre élément intéressant de la présente investigation est qu'il s'agit d'une étude rétrospective dans laquelle on a également évalué l'évolution des dysplasies légères sur une période entre 1 et 3 ans.

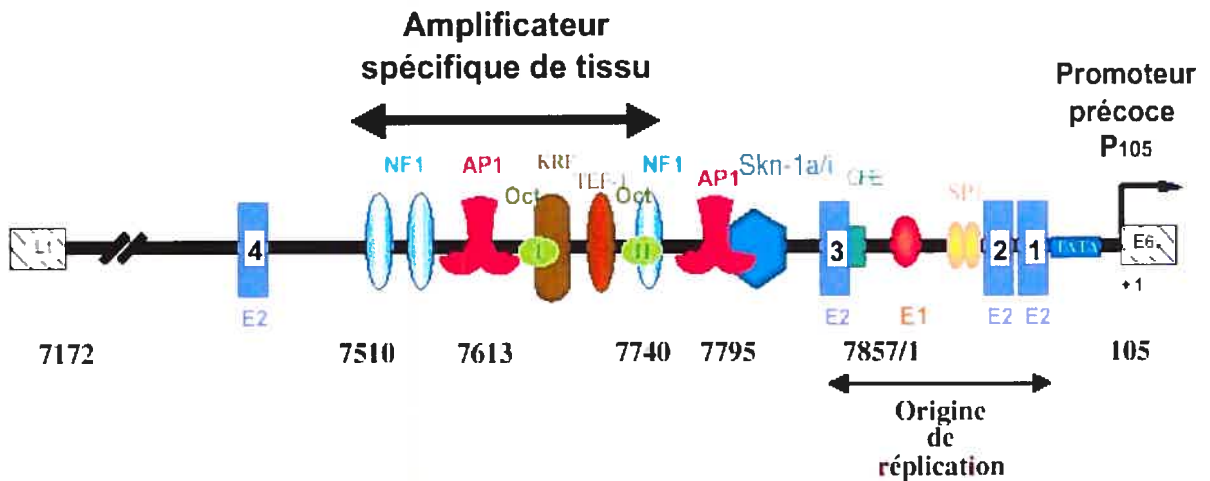


Figure 12. La région du LCR et les facteurs de transcription. Le LCR est divisé en trois régions, le promoteur précoce, l'enhancer et une troisième partie moins connue. Plusieurs facteurs interagissent avec cette région comme les protéines virales E1 et E2, le FT général SP1, le FT AP 1 des facteurs impliqués dans la spécificité tissulaire comme KRF, Skn-1a/i et TEF.

Parallèlement, la même année, une équipe de recherche a tenté d'associer certaines variantes du LCR du VPH-16 avec un potentiel oncogénique du virus plus ou moins important par rapport au prototype dans les isolats Européens, mais les variations de séquences identifiées n'ont pas semblé être responsables de la pathogénicité du virus (Kurvinen *et al.*, 2000).

Cependant, en 2001, une équipe de recherche australienne a identifié des mutations au niveau des sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires dans la région du LCR qui tendaient à augmenter l'activité des promoteurs, contribuant ainsi à l'habileté transformante de certains isolats de VPH-16 épisomaux. En effet, une mutation à la position 7792, au niveau du site de liaison au facteur YY1 de la variante K2, démontrait une activité du promoteur 11 fois supérieure à celle du prototype. Les variantes H1 et K4 présentaient une autre mutation typique aux variantes asiatiques-américaines, à la position 7894 qui résultait en l'augmentation de l'activité du promoteur de 7 fois (Watts *et al.*, 2001).

Plus récemment en 2004, une étude investiguait le polymorphisme du LCR, cette fois pour le VPH-52, et a décrit plusieurs mutations chez des variantes non-prototypiques. Ces dernières variantes ont été associées avec la perte du site de liaison à la protéine cellulaire

C/EBP et avec la persistance de l'infection. Cette association peut s'expliquer par le fait que C/EBP, reconnu pour réprimer l'activité du LCR chez le VPH-18 en interférant avec la liaison de la protéine TBP (TATA binding protein) à la boîte TATA du LCR, peut induire ce même mécanisme pour le VPH-52 (Aho et al., 2004).

Toujours en 2004, une étude menée sur une cohorte de patientes italiennes présentant différentes lésions précancéreuses et cancéreuses du col, a révélé que les variantes NE, identifiées par le regroupement des variations de l'ensemble E6/E7/L1/LCR, étaient associées avec les lésions cancéreuses, suggérant qu'elles étaient plus oncogéniques que les variantes européennes (Tornesello et al., 2004). En 2005, une autre étude est venue appuyer cette idée en partant de l'hypothèse selon laquelle il y avait une association entre les variantes NE des VPH-16 et -18 et les lésions cervicales. Sichero et al. ont ainsi investigué l'activité du promoteur P105 parmi 6 variantes du VPH-18 décrites à partir de l'analyse du polymorphisme du LCR, et ont suggéré que la variante européenne B18-2 présentait l'activité du promoteur la plus faible alors que la variante asiatique-américaine B18-3 démontrait l'activité la plus forte et tous les promoteurs de toutes les variantes étaient plus actifs que le promoteur P97 du VPH-16 prototypique. Cette étude suggère que les mutations au niveau du LCR exerçant un certain effet sur l'activité du promoteur P105 pourraient être à l'origine des différences dans le potentiel oncogénique de ces différentes variantes (Sichero et al., 2005).

À la lumière de ces études, il est évident que le polymorphisme du LCR pourrait permettre d'expliquer, du moins en partie, les différences qui existent au niveau de l'oncogénicité des variantes. Ainsi, le fait d'investiguer le polymorphisme de cette région chez une cohorte importante en termes de nombre de patientes, pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme par lequel une variante d'un type de VPH donné induit une lésion du col et, par conséquent, permettre d'identifier les patientes à risque et d'intervenir avant la progression de l'infection.

#### 4.3.2. Variantes de E6/E7

Le fait d'étudier le polymorphisme des oncogènes E6 et E7 est également d'un grand intérêt. En effet, le niveau de transcription de ces deux oncogènes peut différer selon le potentiel oncogénique des différentes variantes des gènes E6 et E7 et, par conséquent, selon leur interaction avec p53 et pRb. Dans les études investiguant le processus d'infection du VPH ainsi que son rôle dans la genèse du CC, des facteurs comme la fréquence de variantes particulières de VPH constituent un outil intéressant pour élucider le mécanisme d'infectivité du virus.

En 1996, Stoppler et collaborateurs ont avancé que des variantes naturelles de E6 du VPH-16 différaient dans leur habileté à altérer la différenciation des kératinocytes et à induire la dégradation du p53 (Stoppler et *al.*, 1996). En effet, les variantes z84 (R10I) et 512 (Q14H/S138C) possédaient respectivement la plus faible et la plus haute activité dans la dégradation du p53. D'autre part, la même étude soutenait que la variante N29S du gène E7 du même type était 2 fois plus efficace pour coopérer avec la protéine Ras pour la transformation des fibroblastes de rats et que cette variante possédait la même mutation que la variante de E6, z86 (Fujinaga et *al.*, 1994; Stoppler, 1996; Chan et *al.*, 2002).

La même année, une autre équipe (Londesborough et *al.*, 1996) a investigué la variabilité du gène E6 du VPH-16 chez des femmes anglaises et a décrit une mutation non-synonyme au nucléotide 350 où une thymine était remplacée par une guanine au niveau de la séquence nucléotidique, ou au résidu 83 où une leucine était remplacée par une valine (L83V) au niveau de la séquence protéique. Celle-ci était associée avec la persistance du virus et le risque de néoplasie du col. Song et collaborateurs ont également décrit une mutation à la position 647 des nucléotides du gène E7 du VPH-16 qui était plus fréquemment décelée dans les CC chez des patientes coréennes (Song et *al.*, 1997). Zehbe et son équipe ont mené une autre étude dans laquelle ils ont montré que les variantes E6 du VPH-16 étaient plus prévalentes que le prototype dans les CC, plus spécifiquement celles qui contiennent la substitution au résidu 83 (L83V) qui semblent être plus oncogénique que le prototype (Zehbe, 1998), comme il a été observé pour les patientes anglaises.

Van duin et ses collaborateurs ont également rapporté un risque accru pour le développement du CC chez les patientes possédant l'allèle p53 Arg/Arg infectées par le variant 350G (Van duin et *al.*, 2000). Toutefois, cette association n'a pas été observée chez des patientes coréennes (Chan et *al.*, 2002).

En 2000, une équipe a démontré que les variantes NE avaient tendance à persister plus fréquemment que les variantes E par rapport au risque de persistance des VPHs non oncogéniques. En outre, cette étude a également révélé qu'une des 16 variantes caractérisées pour le VPH-16, persistait sur une longue période de temps alors que les autres induisaient une infection transitoire. C'est ainsi qu'il a été mis en évidence que des variations intratypiques du VPH-16 étaient directement reliées à la progression des lésions néoplasiques (Villa et *al.*, 2000).

En 2001, une équipe de San Francisco a établi une association causale entre la variante G131 du gène E6 du VPH-16 et un risque accru de développement de lésions squameuses intraépithéliales anales (Da Costa et *al.*, 2001).

Il a également été rapporté qu'une variation spécifique au niveau de la protéine E6 du VPH-16, isolée des individus HLA-B7 atteints de cancer du col de l'utérus, interférait avec la réponse cellulaire T cytotoxique (Ellis et *al.*, 1995).

Plus récemment, en 2004, l'équipe d'Aho a établi une association entre des variantes du LCR non-prototypiques et la persistance du VPH-52 dans l'infection qu'il induit. La même année, une étude menée chez des patientes en provenance d'Indonésie décrivait une variante du VPH-16 qui partageait les mutations C6826T dans le gène L1, G666A dans la région de E6 et A276G au niveau du gène E7. Cette variante a été retrouvée dans la majorité des cancers du col utérin causés par le VPH-16 en Indonésie, ce qui suggère une association possible entre celle-ci et le développement du CC (de Boer et *al.*, 2004). Avec une telle affirmation, on peut envisager la mise au point d'un test diagnostique qui permettrait de détecter cette variante chez des patientes infectées et de les traiter à temps avant le développement du cancer invasif.

Bien que les résultats de certaines de ces études se contredisent, il n'en demeure pas moins que quelques une d'entre elles démontrent clairement que le polymorphisme des oncogènes viraux des différents types de VPH-HR, peut constituer un biomarqueur prometteur quant au ciblage des femmes plus à risque au développement de lésions cancéreuses. Cela

incite à entreprendre le même type d'études sur des types oncogéniques dont la prévalence est plus faible par rapport au VPH-16, comme c'est le cas pour le VPH-33.

#### 4.3.3. Variantes de E2

La protéine E2 des PVs, dépendamment de sa configuration, possède l'habileté à transactiver ou réprimer les *enhancer* viraux en interagissant avec la séquence ACCGN4CGGT retrouvée au niveau du LCR (Turek et *al.*, 1994; Desaintes et *al.*, 1996). Rappelons que le gène qui l'encode contient trois domaines, dont deux conservés en N-terminal (domaine de transactivation) et C terminal (domaine de liaison à l'ADN et impliqué dans la dimérisation) de la protéine et une région variable et flexible au centre, qui constitue la région charnière ou *hinge* (Giri et *al.*, 1988). Par un mécanisme de changement de cadre de lecture qui se traduit par un glissement du ribosome suite à l'encontre d'une séquence répétitive d'uracile lors de la traduction et qui finit par franchir le codon stop, la région *hinge* du gène E2 chevauche le gène E4, faisant de lui un gène et une protéine à part, avec une séquence d'acides aminés qui lui est propre.

Il est intéressant d'étudier le polymorphisme du gène E2, étant donné que, comme mentionné précédemment, il agit aussi bien au niveau de la réplication du génome viral qu'au niveau de la régulation de l'expression des oncogènes viraux (Smotkin et *al.*, 1986; Bhattacharjee et Sengupta, 2006). Ainsi, des variations au niveau de la séquence nucléotidique ou protéique pourraient altérer l'activité biologique de E2 et avoir des conséquences sur la progression des infections au VPH. L'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire des VPH-16 et -18 se produit fréquemment au niveau de la région charnière de E2 (ou E1, moins fréquemment), ce qui altère sa fonction et qui entraîne la surexpression des oncogènes viraux sachant qu'il agit comme répresseur transcriptionnel des promoteurs P97 et P105 des VPH-16 et -18, respectivement (Matsukura et *al.*, 1986). Il serait donc logique de s'attendre à ce que des mutations au niveau d'un tel gène puissent exercer un impact sur le niveau d'expression de ces gènes et ainsi conférer un potentiel oncogène, plus ou moins altéré, à une variante donnée. Considérant l'interaction de la protéine E2 avec les facteurs cellulaires de

transcription et l'ADN viral lui-même, des mutations au niveau du gène qui l'encode, pourraient également affecter le potentiel transformant des VPHs.

Très peu d'études ont été effectuées au niveau de ce gène, mais des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que des mutations au niveau de la région transactivatrice de E2 confère un potentiel d'immortalisation accru (Romanczuk et *al.*, 1992). Cela étant dit, aucune variante naturelle correspondant à un tel profil de mutations n'a été caractérisée à ce jour. Par contre, le fait de pouvoir introduire des mutations au niveau d'un VPH-HR qui atténue sa virulence, peut constituer un excellent outil pour le développement de vaccins.

D'autres études ont investigué le polymorphisme du gène E2 du VPH-18 et ont décrit une variante avec une mutation significative dans la région charnière, qu'ils ont rapportée comme étant associée avec un risque réduit de néoplasies cervicales (Hecht et *al.*, 1995). En 1999, Eriksson et *al.* ont complété cette étude en analysant le polymorphisme de la région *hinge* de E2, du gène E4 et du gène E5, pour le VPH-16 et ont identifié de nouvelles mutations mais sans association plausible avec les lésions du col (Eriksson et *al.*, 1999). Cela doit probablement être dû au nombre insuffisant de spécimens testés qui ne permet pas l'obtention de données statistiquement significatives.

Terry et *al.*, pour leur part, ont analysé le polymorphisme de E6 et de E2 des VPH-16 et -18 et ont établi que des variantes de E2 des deux types étaient plus fréquemment retrouvées chez les individus possédant les haplotypes HLA de classe II DR/DQ 0401/0301 et 1101/0301. Toutefois, là encore aucune association n'a été mise en évidence entre ces mêmes variantes et les SILs (Giannoudis et Herrington, 2001).

En 2001, une autre équipe de recherche a tenté d'établir une association entre le polymorphisme du domaine de liaison de E2 avec les lésions intraépithéliales squameuses de haut grade du col de l'utérus. La variante T310K avec la mutation 3684C-A étant associée aux lésions de haut grade, il a été suggéré que cette variante pouvait être impliquée dans la progression des néoplasies cervicales (Giannoudis et *al.*, 2001).

En 2004, Sathish et ses collaborateurs ont décrit une méthode d'analyse de polymorphisme à l'aide de la technique de PCR-RFLP qu'ils ont appliquée à la région E2 du VPH-16 chez des femmes originaires de l'Inde sous-continentale. Ils ont ainsi pu identifier des mutations non-synonymes au niveau de la région charnière et du domaine de liaison à l'ADN.



L'identification d'une variante T313- permettait la distinction entre les variantes E et AA. En outre, les variantes P129S, T254N et S261- possédaient des mutations au niveau de la région charnière qui étaient localisées dans deux des épitopes les plus réactifs des cellules B, ce qui suggérait, selon eux, qu'un individu infecté par de telles variantes risquait de voir sa réponse humorale contre le VPH-16 altérée (Sathish *et al.*, 2004).

En 2002, une autre étude descriptive portant sur le polymorphisme de E2 a été investiguée chez des patientes en provenance d'Australie et de la Nouvelle Calédonie, chez qui on a identifié 9 variantes, les AA étant les plus polymorphiques, suivies des AS et des E, qui présentent beaucoup moins de variations (Watts *et al.*, 2002). Il aurait été toutefois intéressant d'examiner s'il y avait une association entre certaines de ces variantes avec les différents types de lésions présentes chez les patientes testées.

Plus récemment, en février 2005, Arias-Pulido *et al.* ont analysé le polymorphisme des régions du LCR, E6 et de la région charnière de E2 du VPH-18 chez des patientes provenant des États-unis. Cependant, aucune association n'a été établie entre chacune des variantes AA, AS ou E avec les lésions squameuses intraépithéliales ou les adénocarcinomes (Arias-Pulido *et al.*, 2005). Un mois plus tard, une étude portant sur l'analyse des variations génétiques des régions de E2, E6 et E7 a démontré que les variantes de E2 co-ségrégeaient avec les variantes de E6/E7 et qu'une séquence minimale au sein de E6 permettait la classification des variantes E2 et E7 (Swan *et al.*, 2005).

Enfin, en 2006, Bhattacharjee *et al.* ont investigué le polymorphisme du LCR et de E2 du VPH-16 chez des femmes indiennes, mais aucune variation de E2 ne semblait être un facteur déterminant de la progression des néoplasies (Bhattacharjee et Sengupta, 2006).

À la lumière de ces études, on constate que la plupart d'entre elles sont descriptives et que de plus amples recherches sur le polymorphisme du gène de E2 sont requises compte tenu du rôle important que joue la protéine E2 dans le cycle de vie du virus et de l'infection. Néanmoins, certaines des études rapportées dans la présente section, suggèrent que de plus amples études devraient être entreprises afin d'examiner l'effet du polymorphisme de E2 sur la progression des lésions cervicales (Romanczuk *et al.*, 1992; Hecht *et al.*, 1995; Giannoudis *et al.*, 2001; Sathish *et al.*, 2004).

#### 4.4. Le virus du papillome humain de type 33

Le prototype VPH-33 a originellement été cloné à partir d'un cancer du col utérin invasif et appartient au groupe des VPH-HR (Beaudenon et *al.*, 1986). Ce type a été retrouvé dans 4 à 10% des CC et dans 50% des cancers des amygdales (Snijders et *al.*, 1992; Walboomers et *al.*, 1999) et sa prévalence est d'environ 3% (**Fig. 13**) (WHO, 1999). Le VPH-33 est phylogénétiquement relié au VPH-16 et fait partie de l'espèce 9, appartenant au genre des Alphapapillomavirus. Son organisation génomique est similaire aux autres PVs (Lizano et *al.*, 1997).

Très peu d'études de polymorphisme ont porté sur ce type, dont une touchait à l'analyse de la région L1 (Luo et Sawadogo, 1996), et une autre au LCR, à E6 et à E7 (Gagnon et *al.*, 2004). Cole et ses collaborateurs ont identifié une duplication de 78 pb dans la région du LCR du VPH-33 qui constituait une propriété unique de ce type de VPH parmi tous les PVs (Cole et Streeck, 1986). Jusqu'à ce jour, le rôle de cette duplication demeure toujours inconnu mais plusieurs hypothèses ont été émises à cet effet. Il a été suggéré que celle-ci pouvait éventuellement jouer un rôle d'activateur de la transcription virale comme on a pu l'observer pour le BK et le SV40 (Seif et *al.*, 1979; Gruss et *al.*, 1981). On a également proposé que cette région en tandem pourrait agir comme un répresseur transcriptionnel via la liaison au site du facteur *c-myb*, comme on l'a remarqué chez HBV (David-Cordonnier et *al.*, 1999).

Dans une étude récente sur le VPH-33, effectuée au sein même de notre laboratoire, Gagnon et *al.* ont rapporté que la perte de la duplication de 78 pb au niveau du LCR résultait en la perte d'un site potentiel de liaison du facteur *c-myb*, et ont suggéré qu'elle pouvait jouer un rôle suppresseur *in vivo*. La même équipe de recherche a associé l'absence de cette duplication et la présence de variations non synonymes au niveau de E7 avec la persistance de l'infection par le VPH-33. Lorsqu'on combinait les données d'analyse du VPH-33 et VPH-35, l'infection par l'un ou l'autre de ces types avec des variations de E7 non synonymes était associée avec la persistance et l'ethnicité. Dans cette étude, en analysant le polymorphisme du VPH-33, onze variantes du LCR ont été caractérisées (33-LCR-1 à 33-LCR-10), incluant le prototype, qui était la variante la plus fréquente suivie de 33-LCR-7. L'absence de la duplication était retrouvée chez sept variantes. En outre, plusieurs variations, incluant la perte

de la duplication, étaient retrouvées chez sept variantes et plusieurs d'entre elles, dont la perte de la duplication de 78 pb associée à la perte du site de liaison au facteur *c-myb*, ont entraîné le gain ou la perte d'un site de liaison potentiel à certains facteurs de transcription cellulaires.

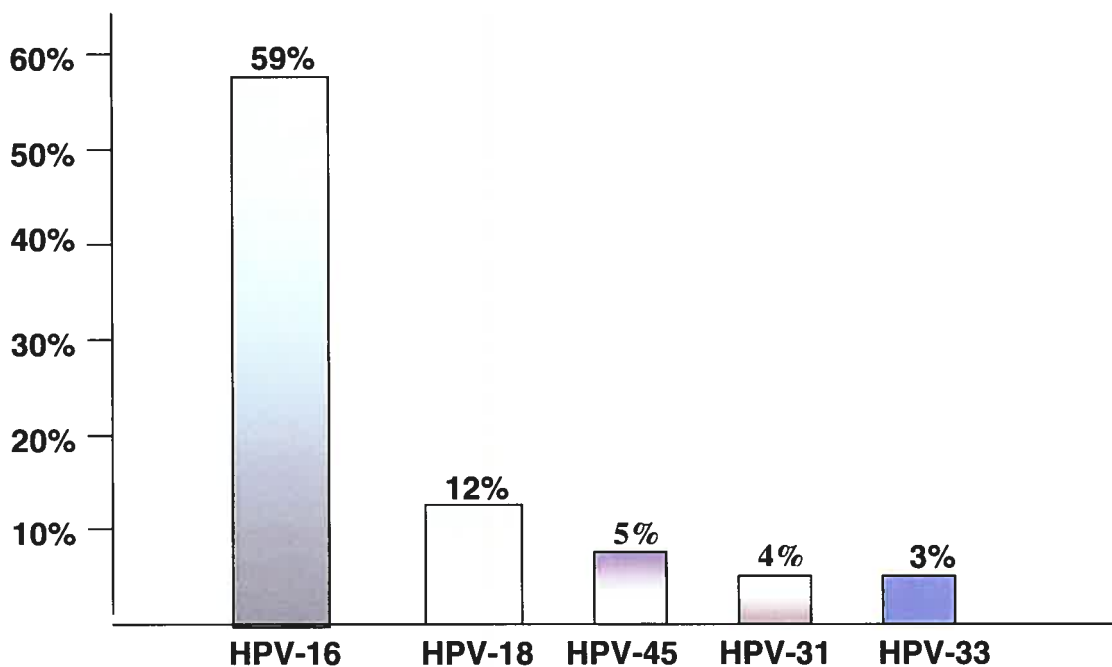


Figure 13 : Distribution des types de VPH les plus prévalents dans les cancers du col de l'utérus. Le VPH-16 est le type le plus fréquemment diagnostiqué dans les cancers suivi des types 18, 45, 31 et 33.

En ce qui a trait au gène E6, dont le polymorphisme a également été décrit lors de cette étude, six variantes ont été caractérisées (33-E6-1 à 33-E6-5), incluant le prototype, qui, là encore, était la variante la plus fréquente. Quelques mutations étaient non-synonymes et enfin, six variantes ont été décrites suite à l'analyse du polymorphisme du gène E7 et encore une fois, le prototype était le plus fréquemment retrouvé chez les patientes testées. De la même façon que pour E6, certaines variations entraînaient un changement au niveau des résidus d'acides aminés de la protéine. Rappelons que cette étude a été menée chez des patientes issues d'une cohorte de 1055 femmes sexuellement actives dont 732 étaient VIH-séropositive. Parmi ces patientes, 37 étaient infectées par le VPH-33 (3,5%) (Gagnon et al., 2004).

## OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Compte tenu du fait que le polymorphisme du VPH-33 est un déterminant de la persistance de l'infection qu'il engendre, la présente étude avait pour objectif fondamental d'investiguer l'association entre les variations de ce type et les lésions du col de haut grade, et d'évaluer la distribution de ces variations chez les femmes avec un col utérin sain, et celles avec une lésion de haut grade (HSIL) ou un cancer.

L'objectif fondamental de cette étude est de décrire le polymorphisme du VPH-33 par la technique du PCR-séquençage chez des femmes avec et sans lésions du col utérin. Les gènes analysés comprennent les cadres de lecture de E6 (484 pb), E7 (324 pb) et E2 (1102 pb), incluant le gène E4 ainsi qu'une partie du gène du LCR comprenant la duplication de 78 pb (507 pb). Il est à souligner qu'aucune étude jusqu'à ce jour n'a porté sur la caractérisation du polymorphisme du gène E2 du VPH-33 de manière aussi exhaustive. Par ailleurs, il était question dans la présente étude d'investiguer l'association entre le polymorphisme des différentes régions citées et la présence de HSILs.

Compte tenu de la proximité phylogénétique du type 33 avec les types 16 et 52, on serait tenté de penser qu'il existe une association entre la présence de variantes du VPH-33 et le développement du cancer du col de l'utérus. De plus, étant donné que, dans cette étude, le nombre de patientes analysées est plus important que celui testé dans la première étude portant sur le polymorphisme du VPH-33 (Gagnon et *al.*, 2004), d'autant plus qu'il s'agit là d'un groupe de femmes hétérogènes et VIH-séronégatives, il est raisonnable de penser que l'on devrait décrire de nouvelles variantes du VPH-33, et retrouver des variantes déjà identifiées dans la première étude. De plus, on s'attend à ce que certaines variantes du LCR, plus particulièrement, celles ayant perdu la duplication de 78 pb soient associées à la présence de HSILs. On pense également retrouver dans les cadres de lecture de E6, E7 et E2, des mutations non synonymes parmi lesquelles certaines pourraient être partagées avec d'autres types comme la variante L83V décrite chez les VPH-16 et -52. Considérant le fait que la séquence nucléotidique du gène E4 chevauche la région charnière de E2, il serait logique de

penser que les variations que l'on décrira au niveau de la séquence protéique seraient différentes de celles qu'on aura caractérisées pour E2. Il est également plausible de décrire de nouveaux sites de variations qui pourraient éventuellement être associés à la perte ou au gain d'un site potentiel de liaison à un FT cellulaire au niveau du LCR, comme il a été rapporté dans la première étude (Gagnon et *al.*, 2004).

**ARTICLE**

**Déclaration de l'étudiant concernant l'article inclus dans ce mémoire :**

*J'ai participé au développement du projet au niveau de la conception des amorces du gène encodant la protéine E2 et à l'optimisation des conditions du PCR. Par ailleurs, j'ai procédé à toutes les manipulations nécessaires à la caractérisation des régions du LCR, E6, E7 et E2, après quoi je me suis investie dans l'analyse et l'interprétation des résultats et enfin j'ai participé à la rédaction de l'article.*

**Human papillomavirus type 33 polymorphism and high-grade lesions of the uterine cervix.**

Soraya Khouadri<sup>1</sup>, Luisa L. Villa<sup>2</sup>, Simon Gagnon<sup>1</sup>, Anita Koushik<sup>3</sup>, Harriet Richardson<sup>3</sup>, S. Ferreira<sup>2</sup>, Pierre Tellier<sup>3</sup>, J. Simao<sup>2</sup>, Greg Matlashewski<sup>3</sup>, Michel Roger<sup>4,5</sup>, Eduardo L. Franco<sup>3</sup>, Francois Coutlée<sup>1,3,4\*</sup>.

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

2- Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil .

3- Division of Cancer Epidemiology, Department of Family Medicine and Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Que., Canada.

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

5- Département de Microbiologie Médicale-Inféctiologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Qué., Canada.

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

e-mail 



**ABSTRACT (word count =250)**

**Background:** The association between genetic polymorphism of human papillomavirus type 33 (HPV-33) and high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) was investigated.

**Methods:** Endocervical cytobrush specimens from 89 of 5385 women screened for HPV infection in the course of 2 case-control and 2 cohort studies tested positive for HPV-33 DNA by consensus L1 PCR. Exfoliated cervical cells from HPV-33-positive women were further analyzed by PCR-sequencing of the LCR, E6, E7 and E2 genes.

**Results:** Overall, 14 HPV-33 LCR, 16 E2, 8 E6 and 8 E7 variants were identified. Of the 89 participants, 64 were normal, 7 had low-grade intraepithelial lesions (LSIL), 15 had HSIL and the diagnosis was unknown for 3. The loss of a 78-bp duplication in the LCR was not associated with HSIL compared to normal women (Odds ratio (OR) 2.4, 95% confidence intervals (CI) 0.7-8.0;  $p=0.18$ ). However, the C7732G variation resulting in the loss of a putative binding site for the cellular upstream stimulatory factor was associated with HSIL, adjusting for age and ethnicity (OR 3.9, 95% CI 1.1-14.80  $p=0.04$ ). E6, E7 and E2 polymorphism was not associated with HSIL. Twelve women had consecutive samples (median of 2, range 2-5) tested at 6-month intervals. The same variant was identified in all specimens collected from the same participant. HPV-33 SK9 variant was detected more frequently in women from Brazil (7 (35%) of 20) than from Canada (1 (1.5%) of 65;  $p=0.001$ ).

**Conclusion:** HPV-33 polymorphism in the LCR was associated with HSIL and geography in opposite to polymorphism in E6, E7 and E2.

## Introduction

Cervical infection with high-risk human papillomavirus (HPV) types is a necessary cause for cancer of the uterine cervix. However, only a minority of HPV-infected women develop persistent HPV infection that could eventually evolve into cervical cancer (16). HPV-related biomarkers are thus being studied to better define women at highest risk for progression. Several studies have reported an association between HPV-16 polymorphism and cervical cancer or persistence of infection (20,48).

HPV-33 is closely related phylogenetically to HPV-16 in species 9 of the alpha-papillomavirus genus (12). In a recent meta-analysis, HPV-33 was the fourth most frequent high-risk genotype in North America in invasive cancer. Considering the prevalence ratio between invasive cancer and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), HPV-33 ranked fourth after types 16, 18 and 45, suggesting a greater propensity to progress towards cancer than most of the other high-risk genotypes (10). In sexually active women at risk or infected with HIV, HPV-33 polymorphism of the long control region (LCR), more specifically the loss of 78 bp duplication, was associated with persistence of HPV infection, a surrogate marker for HSIL (19). Due to the high proportion of mixed HPV infection in that study, it was impossible to investigate the impact of HPV-33 polymorphism on grade of cervical disease.

Most studies on HPV polymorphism focused on the LCR, E6 and E7 open reading frames, regions of the viral genome relevant to viral regulation and transformation. Although the E2 protein is the most important viral factor regulating transcription of HPV oncoproteins E6 and E7, the impact of HPV-33 E2 polymorphism on disease has not been investigated yet.

Since HPV-33 polymorphism is a determinant of persistence of infection, we investigated the association between HPV-33 variations and high-grade cervical lesions. The aim of the current study was to investigate the distribution of variants of HPV-33 in women without cervical cytological abnormalities, low-grade SIL (LSIL) and HSIL or cancer. We present here the polymorphism of the regulatory region, the LCR, of transforming open reading frames encoding E6 and E7 oncoproteins, and of E2 protein, in thousands of Brazilian and Canadian women enrolled in two cohort studies and two case-control studies, enabling the characterization of new molecular variants of HPV-33.

### **Materials and methods**

*Study population and study design.* Cervical cytobrush samples were obtained from 89 (1.7%) women selected from 5344 subjects participating in four epidemiological studies who had tested positive for HPV-33 DNA by consensus L1 PCR: 10 women were from a study of the associations between Herpes simplex virus and cervical lesions (HPV-HSV study), 43 were from a case-control study designated “Biomarker of cervical cancer risk” (BCCR study), 21 were from the Ludwig-McGill cohort study and 15 were from the McGill-Concordia cohort study.

The HPV-HSV study was a cross-sectional study conducted in Montreal, Canada, on 439 women (50 invasive cancers, 65 HSIL, 80 low-grade SIL (LSIL), 244 normal cervixes) on the association between Herpes simplex and HPV co-infections and cervical cancer (46). Participants had a median age of 33 years. HPV was detected in 87.2% and 19.7% of women with cervical lesions and a normal cervix, respectively. The BCCR is an hospital-based case-control study conducted on 1759 women (1263 normal, 60 LSIL, 408

HSIL, 18 cancers and 10 pending results) living in Montreal, Canada to study biomarkers associated with HSIL (28). Participants had a mean age of 32 years. In the BCCR study, 95.8% of cases and 31.2% of controls were HPV-positive (28). In both studies above, controls were women with current and previous normal annual routine Pap smears, while cases had histologically-confirmed cervical intraepithelial neoplasia or invasive cancer. The Ludwig-McGill cohort is conducted in Sao Paulo, Brazil, on 2528 women (median age of 33 years) and The McGill-Concordia cohort was conducted on 621 young women (median age of 21 years) living in Montreal, Canada, to investigate the natural history and persistence of HPV infection (37,41). Nearly 53% and 26.2% of participants had at least one HPV-positive visit in the McGill-Concordia and the Ludwig-McGill cohorts, respectively (37,41). These women were followed prospectively at specified intervals over the course of the studies as described elsewhere (37,41). Women with repeated normal Pap smears were considered as having normal cervixes while the highest grade of SIL on cytology was considered for women with repeated abnormal smears.

Informed consent was obtained from all study participants for HPV analysis and other study procedures. Ethics committees from each participating institution approved procedures and consent forms. For each study, standardized questionnaires were administered. Exfoliated cervical cells were collected with a cytobrush and processed with QIAamp columns (QIAGEN Inc., CA, USA) (37,41) or Master pure procedure (28,46). Samples were considered adequate if  $\beta$ -globin DNA could be amplified with PC04 and GH20 primers. HPV DNA was amplified using MY09-MY11-HMB01 (37) or PGMY (28,41,46) primers and typed with the line blot assay (Roche Molecular systems, CA) (22). One sample from each HPV-33-positive participant in the studies above was

further tested for HPV-33 polymorphism. Consecutive samples were also tested for women participating in the Ludwig-McGill cohort study with persistent HPV-33 infection (n=11) who provided 30 cervical samples (median of 2, mean of  $2.6 \pm 0.8$ , range 2–5).

*Analysis of HPV-33 LCR, E2 E6 and E7 by PCR-sequencing.* For each region of the HPV genome, 2  $\mu$ l of processed specimen was amplified in a 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer, Montreal, Canada). The LCR, E6 and E7 were amplified in a 100- $\mu$ L reaction volume containing 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.5 U of AmpliTaq Gold enzyme (Roche Diagnostic Systems, Laval, Canada), 2.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.5 mmol/L each primer, and 0.25 mmol/L each dCTP, dTTP, dGTP, and dATP. E2 was amplified under the same conditions except for the use of 3.75 U of AmpliTaq Gold and 1.5 mM mmol/L  $MgCl_2$ . A 542-bp segment between nucleotide (nt) positions 7337 and 7878 of the 5' end of LCR was generated with primers HPV-33-LCR-1 and HPV-33-LCR-2, a 562-bp fragment between nt 35 and 596 containing the complete E6 gene was generated with primers HPV-33-E6-1 and HPV-33-E6-2 and a 412-bp fragment between nt 529 and 940 containing the complete E7 gene was generated with primers HPV-33-E7-1 and HPV-33-E7-2, using the amplification protocols described by Gagnon et al. (19). The HPV-33 E6 amplicon contained the complete 483 bp E6 gene. The HPV-33 E7 amplicon contained the complete 324 bp E7 gene. HPV-33 E6 and E7 amplicons overlapped over 68 bp. The complete HPV-33 E2 gene was amplified with primers E2-F (GGACGTGGTGCAAATTAGAT (nt 2701-2720)) and E2-R (TAGCAGCACATATTGGCTTG (nt 3811-3830)) with an initial step for 3.5 min at

95°C; 60 cycles for 30 s at 95°C, 60 s at 60°C and 45 s at 72°C. A final step was performed for 7 min at 72°C to complete the amplification reaction.

*Molecular variant analysis by PCR sequencing.* After gel electrophoresis on 2% agarose gel, PCR-amplified HPV-33 DNA amplicons were purified as described elsewhere (2). Direct double-stranded PCR sequencing was performed for the LCR, E6 and E7 amplicons with the same primers described above using the fluorescent cycle-sequencing method (BigDye terminator ready reaction kit; Perkin-Elmer) on 20 ng of purified amplicons. Two overlapping fragments of E2 were sequenced using the primer pair E2-F/E2-R1 (TCAGCAGTTTCAGTAGTGGA (nt 3361-3380) and primer pair E2-F2 (TGGGTGGTCAGGTAATTGTT (nt 3311-3330))/E2-R. Cycling parameters were 25 cycles for 10 s at 96°C, 5 s at 50°C, and 4 min at 62°C. Sequence analysis was performed on an ABI Prism 3100 genetic-analyzer system of the Service de Séquencage du Centre de Recherche du CHUM. Non-prototypic isolates were sequenced at least twice from the cytobrush samples, to exclude *Taq*-induced errors.

The HPV-33 prototype was the first HPV-33 isolate sequenced by Cole et al. (11). HPV-33 isolates with DNA sequences different from the prototypes were classified as non-prototypic variants. Sequences from non-prototypic variants were aligned for classification by use of CLUSTAL W (version 1.8). A phylogenetic tree was constructed based on the neighbor-joining algorithm by using the Mega version 2.1. To assess the effect of variations in the LCR on putative binding sites for cellular proteins, TFSEARCH software was used.

*Data analysis.* For comparisons of genetic variability between the LCR and HPV genes, the number of variation sites per isolate with adjustment for amplicon length was

compared with the Mann-Whitney *U* test, and the proportions of variable sites were compared via the *z* statistic. Multiple comparisons were taken into account with the Bonferroni correction. The magnitude of the associations between HPV variants with HSIL was assessed by calculating odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (CI). Fisher's exact test was used to assess the significance of the associations between dichotomous variables. Unconditional multiple logistic regression analysis was performed to obtain maximum likelihood estimates of the OR while controlling for the confounding effect of age, ethnicity and study membership. Statistical analyses were performed with STATISTICA version 6 software (StatSoft, Tulsa, OK).

## **Results**

In total, 89 (1.7%) of 5344 participants from four studies provided at least one genital specimen containing HPV-33 DNA. Table 1 provides the distribution of participants according to recruitment study and grade of cervical disease. The median age of HPV-33-infected women from the BCCR was 38.0 years (mean of  $36.7 \pm 10.7$  (95% CI 33.4 to 40.1)), from the Ludwig-McGill cohort study was 26.0 years (mean  $27.4 \pm 8.4$  (95% CI 23.6 to 31.2) years), from the Concordia-McGill cohort was 23.0 years (mean  $23.7 \pm 4.6$  (95% CI 21.2 to 26.3) years) and from the HPV-HSV study was median 28.0 years (mean  $28.9 \pm 10.3$  (95% CI 19.3 to 38.4) years). The median age of all women infected by HPV-33 was 30 years (mean  $31.5 \pm 10.6$  (95% CI 29.5 to 35.1) years; range 18 – 62 years). Seventy-one (79.8%) women were Caucasian, 12 (13.5%) were of African origin, 2 (2.2%) were Asian and 4 (4.5%) were of unknown ethnicity. Sixty-eight were Canadians and 21 were Brazilians.

*Genomic polymorphism of the LCR, E6 and E7 of HPV-33.* A visible band was obtained for sequencing of the LCR, E6 and E7 for 85, 89 and 89 isolates, respectively. Each participant was infected with only one HPV-33 variant. To assert this hypothesis we should have sequenced 10 to 20 variants clones. However, since we performed such experiment with HPV-16, we rarely found 2 variants per HIV-seronegative patient. Therefore, we abandoned this expansive strategy. Figures 1a to 1c display the site, nature and loss or gain in putative cellular transcription factors binding sites of variations in the LCR or change in amino acid sequence in E6 or E7 compared to the HPV-33 prototype. Some of the variants described here are identical to those described in our initial work and are identified by the same abbreviations (19). Ninety-four variations sites over 502 nt (18.7%) defined 14 HPV-33 LCR variants, compared to 13 variation sites (2.7%) over 484 nt ( $p < 0.001$ ) defining 8 HPV-33 E6 variants and 7 variation sites (2.2%) over 324 nt ( $p < 0.001$ ) defining 8 HPV-33 E7 variants. Deletions were found only in the LCR. In addition to the 10 HPV-33 LCR, 5 HPV-33 E6 and 5 HPV-33 E7 variants described elsewhere, we identified here 7, 4, and 4 new variants in the LCR (33-LCR-11 to 33-LCR-17), E6 (33-E6-6 to 33-E6-9) and E7 (33-E7-6 to 33-E7-9), respectively (19). The greatest difference between any two variants was 17.5% (88 variations over 502 nucleotides) between 33-LCR-14 and 33-LCR-8, 2.3% (11 variations over 484 nucleotides) between 33-E6-7 and 33-E6-5 and 1.9% (6 variations over 324 nucleotides) between 33-E7-5 and 33-E7-8.

As shown in Figure 1d, 25 variants (prototype, SK-1 to SK-24) were obtained by combining variations in all three regions of HPV-33 genome. All prototypic LCR variants were also prototypes for E-6 and E7. Only 4 SK variants were encountered in



more than 5 women. The evolutionary relationship among the 24 HPV-33 SK variants was explored by subjecting the sequence data to phylogenetic analysis based on the neighbor-joining method (Figure 2). HPV-33 variants clustered into two major lineages, one comprising the prototype.

*HPV-33 E2 and E4 polymorphism.* Fifteen non-prototypic HPV-33 E2 variants were identified in 81 women (Figure 3). HPV-33 E2 could not be amplified in specimens from 8 women (4 normal, 2 HSIL, 1 LSIL 1 unknown). Although the HPV-33 E2 prototype sequence was not identified in any isolate, 7 HPV-33 E2 variants carried only one variation each compared with the prototype sequence. Twenty-five (2.3%) variations were found over 1102 nt of the E2 gene, a rate of variation similar to that reported for E6 or E7 ( $p>0.10$ ). Although most of these variations were non-synonymous (22 of 25, 88.0%), this rate was not significantly greater than that found in E6 (7 of 12, 58.3%,  $p=0.08$ ) or E7 (4 of 7, 57.1%,  $p=0.10$ ). Variations generating frameshift or premature stop codon were not observed. The most diverse variants (HPV-33 E2-12 and E2-13) had a difference in nucleotide sequences of 1.2% (13 over 1102 nucleotides). Of the 10 variations in the area also coding for E4 in a different reading frame, 7 and 6 were non-synonymous in E2 and E4, respectively.

By aligning HPV-16 and HPV-33 E2 protein, the amino-acid sequence reached 50,8% of homology (data not shown). The domains of activity of E2 protein of HPV-33 were deduced from the mapping of HPV-16 E2 functions on the E2 amino acid (a.a.) sequence (47). There were 14 (6.3%) a.a. variations over the 220 a.a. of the putative transactivation domain (TAD), 3 (7.5%) over the 40 a.a. of putative hinge region and 5 (4.6%) over the 108 a.a. of the putative DNA binding domain ( $p>0.10$  for each

comparison). The twenty-two a.a. substitutions over the 368 a.a. (5.9%; 1 variation each 16.7 a.a.) were not distributed evenly in the E2 protein (Figure 3). Three clusters of variations were identified: one cluster between a.a. 131 and 176 comprising 6 variations over 46 a.a. (13.0%) in the TAD, one cluster between a.a. 206 and 243 comprising 8 variations over 27 a.a. (29.6%) in the TAD and hinge, and one cluster between a.a. 296 and 311 comprising 5 variations over 16 a.a. (31.3%) (Figure 3). The proportion of polymorphic a.a. was significantly greater in the last two clusters than in the complete E2 protein ( $p < 0.001$  for each comparison).

Variability in the four regions of the HPV-33 genome was assessed by comparing the number of nucleotide variation sites per isolate adjusting for the length of amplicon sequenced (502 bp for LCR, 484 bp for E6, 324 bp for E7 and 1102 bp for E2) and considering the 78 bp deletion as one variation. The median number of variation sites was 1 (mean of  $2.5 \pm 3.3$ , 95% CI 1.8-3.2, range 0-8) for the LCR, 0 (mean of  $1.3 \pm 2.3$ , 95% CI 0.8-1.8, range 0-8.3) for E6, 0 (mean of  $1.1 \pm 2.0$ , 95% CI 0.7-1.5, range 0-7.7) for the E7, and 0.5 (mean of  $1.5 \pm 1.7$ , 95% CI 1.2-1.9, range 0.5-5.4) for E2. LCR was more variable than E6 or E7 ( $p < 0.001$  for each comparison), but not E2 ( $p = 0.05$ ), the level of significance for 6 comparisons being  $p = 0.008$ . E6 was not more variable than E7 ( $p = 0.01$ ). E2 was more variable than E6 or E7 ( $p < 0.001$  for each comparison).

*HPV-33 polymorphism and ethnicity.* The HPV-33 prototype was more frequent in Canada (29 of 65, 44.6%) than in Brazil (4 of 20, 20.0%), although the difference did not reach statistical significance ( $p = 0.07$ ). Most variants were detected at a low frequency (Figure 1d). However, HPV-33 SK9 was significantly more frequently found in Brazil (7 (35%) of 20) than in Canada (1 (1.5%) of 65;  $p = 0.001$ ). HPV-33 SK (from the initials of

one author, Soraya Khouadri) or E2 variants were not associated with ethnicity irrespective of country of recruitment (data not shown). The most frequent E2 variant, HPV-33-E2-1, was more frequently detected in Brazil (16 of 21) than Canada (27 of 60; OR of 3.9 (95% CI 1.3-12.1),  $p=0.02$ ). Eleven SK variants segregated with HPV-33 E2-1, including SK9.

*HPV-33 polymorphism and persistence of HPV infection.* From 2 to 5 consecutive samples positive for HPV-33 from 11 women in the Ludwig-McGill cohort study were tested for HPV-33 polymorphism. Samples from the same woman always contained the same HPV-33 variant.

*HPV-33 polymorphism and grade of cervical lesion.* Grades of cervical lesions are provided in Table 1. In the following analyses, not all participants could be included because some specimens could not be sequenced. (see above). Non-prototypic variants considered as a group in the LCR, E6, E7 or E2 were not associated with HSIL ( $p>0.38$ , Table 2). When SK variants were considered individually, only SK7 was associated with HSIL (Table 2). The only variation identified in variant SK7 was at nucleotide position 7732. The variation in the LCR at nt position 7732 was found in 7 (50%) of 14 cases with HSIL in opposite to 12 (19.4%) of 62 women without lesion, a difference that was statistically significant (OR 4.2, 95% CI 1.2 – 14.4,  $p=0.035$ ). The association remained significant when we adjusted for age and study membership (OR 3.6, 95% CI 1.0 – 12.9,  $p=0.049$ ) or for age and ethnicity (OR 3.9, 95% CI 1.1 – 14.8,  $p=0.04$ ). When only Canadian women were considered in the analysis, the association remained significant correcting for age and ethnicity (OR 4.0, 95% CI 1.1 – 17.2,  $p=0.04$ ). This variation resulted in the loss of a putative binding site for upstream stimulatory factor (USF).

Putative binding sites nearby the USF binding site were also identified for transactivating factors such as the Octamer binding factor (Oct-1) and activator protein 1 (AP-1). The loss of the 78-bp duplication in the LCR was detected in 15 (24.2%) of 62 normal women and 6 (42.9%) of 14 women with HSIL ( $p=0.18$ ).

## **Discussion**

In this study, we have analyzed sequence variations in the LCR, E6, E7 and E2 genes from HPV-33 isolates collected from women without cervical lesion, with low- and high-grade SILs in Canada and Brazil. Our data indicates that the LCR but not E6, E7 or E2 polymorphism is associated with high-grade disease. The presence of deletion in the LCR reported here has also been found for other types (2,4,5,18,19). Variability was greater for the LCR followed by E2, E6 and E7. In opposite to HPV-16, there was no strong association between ethnicity and HPV-33 polymorphism, but there were some differences in the detection rates of HPV-33 SK variants between the two countries. HPV-33 E2 sequences could be amplified from most high-grade lesions including 2 specimens from invasive cancer.

Limited data on HPV-33 polymorphism has been published up to now. By including 89 women, with different stages of cervical disease, recruited in different studies and countries, this work represents one of the most comprehensive studies on HPV-33 polymorphism. Nucleotide variations in the L1 gene and E6 genes were first reported in HPV-33 isolates from invasive cervical cancer (43,53). We have also recently reported HPV-33 polymorphism in HIV-seropositive women (19). Considering results from these publications, several new variation sites were found in this work in the LCR

(n=4, nt 7424, 7436, 7536, 7545, 7768), E6 (n=4, nt 191, 213, 364, 480) and E7 (n=2, nt 608, 737). As for other HPV types, variations were not randomly distributed and variation sites were shared by several isolates and variants (2,5,19,24,26,34,54).

As reported for other HPV types, E6 and E7 were less variable than the LCR (2,7,18-20). The non-synonymous variation L83V at nt 355 of HPV-33 has also been described in HPV-16 at nt 350. This HPV-16 variation was associated by some with HSIL, although this remains controversial (8,21,33,55,56). In our studies on HPV-33, L83V variation was not associated with persistence or HSIL (19). The phylogenetic tree generated by combining sequences from the LCR, E6 and E7 was dichotomic as reported for types other than 16 or 18 while trees constructed with HPV-16 variants have several branches (2,4,5,9,17,18,20). HPV-16, 18 and 52 polymorphism is strongly associated with ethnicity (2,4,20). This association was not as clear with HPV-33. Only one HPV-33 variant was detected more frequently in one country. Isolates from several countries should be analyzed to further study the association between ethnicity and HPV-33 variations. Most SK variants in this study were rare and detected only once or twice.

The current work is the first one to investigate HPV-33 E2 polymorphism. The E2 protein is composed of a C-terminal region which binds to LCR and is involved in the dimerization of the protein, a N-terminal transcriptional activation domain and a central hinge region that is often deleted during HPV integration in the host genome. The E2 protein has the ability to either activate or repress transcription from a promoter depending on its configuration (13). The prototype E2 was not found in our participants, but the majority of isolates had only one variation at nt 3759 compared to the prototype, raising the possibility that there may have been a sequencing error in the original

publication (11). We sequenced the HPV-33 plasmid provided kindly by Dr Gérard Orth and the sequence obtained in E2 was identical to that published originally.

The HPV-33 isolates analyzed here carried variations broadly distributed across the E2 gene in all three domains of the protein. The diversity of HPV-33 E2 was significantly greater than E6 or E7, but less than the LCR. Veress et al. reported 30 nt leading to 20 a.a. changes in HPV-16 E2 (47). The proportion of non-synonymous to synonymous changes (21/3) reported here for HPV-33 was greater than for E6 (8/5) or E7 (4/3), as found for HPV-16 (6). The distribution of variations along the E2 protein was similar in types 16 and 33 (6,44,47,51). As also reported for HPV-16, there were clusters of variations, especially at the 3' end of the TAD, and in the hinge domains (6,44,51,51). The area of interaction of HPV-16 E2 with E1 has been localized near the N-terminal in the TAD between residues 18-41 (6,36). This area did not contain non-synonymous E2 variations, suggesting that the binding capacity of E2 to E1 could remain unaltered between variants and that the replication efficiency of E2 could be similar between variants, as reported for HPV-16 (39). Only 5 non-synonymous variations were located in the last 100 amino acids at the COOH extremity of E2 in the areas of the DNA binding helix, nuclear localization signal, and dimerization domains (6).

The complete HPV-33 E2 gene could be amplified from most of the HSIL lesions, including two cervical cancers, in our participants. This implies that HPV-33 may not integrate in the course of progression to higher-grade lesion, may be found as a mixture of episomal and integrated forms or integrates at sites other than E2. It is also possible that multi-copy head-to-tail tandem integration preserves intact the internal copies of E2 (49). Most of invasive cancers caused by HPV-16 also contain E2 genes that can be

amplified, although in up to one third of specimens a portion of E2 can not be amplified (15,21,39,44,45). Small 30 bp deletions in HPV-16 E2 found in HSIL were not detected in our specimens (39). Eight specimens were falsely negative for E2 sequences, in similar proportions between benign and higher-grade lesions. It is possible that E2 could not be amplified because of disruption due to integration (35). HPV-33 genomic polymorphism may also have precluded annealing with primers for E2 amplification or sequencing.

E4 overlaps the hinge area of E2 in a different reading frame. The proportion of non-synonymous variations were similar in E2 (n=7) and E4 (n=6) over that area. Selective pressure thus seems to affect equally E2 and E4 for HPV-33. HPV-16 polymorphism resulted in fewer changes in amino acid in E4 than in the hinge region of E2 (15,47), although these results were not confirmed by others (6).

We did not find in our specimens a mixture of HPV-33 variants. Mixture of variants have been described for types more frequently detected than type 33, in HIV-infected women or in invasive cancer specimens (21,31). As we have previously shown for HPV-16 and other types, all women with consecutive HPV-33-positive specimens were infected by the same variant, indicating true persistence (1,19,31,41). Again, in the population of HIV-seropositive women, some women show a change of variant over time (31,40).

There was no association between HPV-33 E2 variations and HSIL. Although some variations in HPV-16 E2 have increased immortalization capacity in vitro, HPV-16 E2 variants were not associated with HSIL (38,45). Previous work on the functional implications of HPV-16 E2 variations had also measured similar transactivation properties between E2 variants (47) that were not associated with histological type of

cancer (39). HPV-16 or 18 E2 polymorphism was associated with HLADR/DQ alleles that increase the risk of cervical cancer (45). One study suggested that the T310K variation in HPV-16 E2 DNA-binding domain was associated with high-grade histological lesions (21).

A variation at nt 7732 in the LCR resulting in the loss of a putative binding site for USF was associated with HSIL. The association remained even after adjusting for ethnicity, an important potential confounder, or for study membership {4397}. USF, a transcription factor in humans also important for expression of the adenovirus major late promoter, serves as a negative regulator of cellular proliferation (30). The exact effect of USF on HPV promoter has never been investigated. Loosing a binding site for a potential transactivator should not theoretically predispose to have higher-grade lesions. Several putative binding sites for various cellular factors were also located near the putative USF binding site. Loss of a binding site for USF could allow for some of these factors, that could be stronger transactivator of the HPV promoter, could result in less competition between factors to bind the LCR. This variation could also be associated with HSIL because it segregated with another variation elsewhere on the viral genome that could result in changes in the functional or antigenic domains of HPV-33 (20). If this is the case, the non-synonymous variation will be in genes other than E2, E6 or E7. Some have reported that the HPV-33 prototype E6 was more frequently detected in 5 women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN)-3 than 7 women with CIN-1,2 (53). Our results with more women do not confirm this conclusion in our population. The rationale of merging CIN-1 and CIN-2 cases was not justified in the latter publication.



Several studies have demonstrated that some LCR variations were associated with a greater risk of HPV persistence or HPV-induced lesions (20,25,47,52). The transcription of HPV oncogenes is under the control of promoter and enhancer elements in of the LCR that also contains several putative binding sites for cellular transcription factors that can modulate its function positively or negatively (13). HPV-16 Asian-American variants have been shown to have a greater transcriptional activity than European variants due to increased activity of the p97 promoter in the LCR (27,47,50,51). The same has been reported for HPV-18 (29). LCR variations resulting in the loss of YY1 binding sites had enhanced transcriptional activity (14). Most of the increased activity of the LCR maps to its 3' half, the region that we have analyzed for HPV-33 (47). We also reported that a variation in the LCR of HPV-52 increased the risk of persistence in HIV-seropositive women (1). Our results on several types other than HPV-16 are consistent with a role of LCR polymorphism in the outcome of HPV infection {5004,4823}.

HPV-33 LCR polymorphism in the same cohort of women was associated with persistence while that of type 31 was not (18,19). The loss of the 78-bp duplication in the LCR has been associated with persistence of HPV infection, a surrogate marker for HSIL (19). The perfect 78-bp tandem repeats after the putative origin of replication in the LCR is a unique feature to HPV-33 (11). Our work confirmed the presence of the duplication in several isolates but its loss was not associated with HSIL. The 78-bp repeats could act as enhancers of viral transcription (3,11,23,42) or could be repressors as tandem repeats in SV40 (32) by competition between *c-myb* and transactivators. In our isolates, the 78-bp deletion resulted in loss of a putative binding site for *c-myb*. The loss of duplication

could predispose to persistence of infection in immunosuppressed women but does not seem to be involved in the progression to higher-grade lesions. Considering an alpha set at 0.05 and the detection rates obtained here for this variation, we could detect as significant this difference by including 110 normal women and 110 HPV-33-positive women with HSIL, with a power at 80%. This could not be achieved by combining our studies. However, seven women from our cohort studies were classified as having a normal cervix on the basis of repeated normal cytology smears, but had persistent HPV-33 infection on consecutive visits. The inclusion of women infected persistently with HPV-33 who have not yet developed lesions but could in the future because of persistent infection, could have hampered our ability to detect as significant the association between loss of duplication and HSIL. We could not exclude these women from analysis, since no prospective follow-up was done for women recruited in case-control studies. The lack of control for persistence of HPV infection and its potential role in misclassification of participants in case-control studies is a weakness of case-control studies to investigate the association between viral polymorphism and disease. Misclassification could explain in part discrepancies in the literature on the role of viral polymorphism. The number of HPV-33 infected women in our cohorts was too small to investigate the impact of the loss of duplication on viral persistence. Another caveat of our work is the fact that our definition of outcomes was based on cytology, especially for normal women. Most lesions were confirmed by histology. Classification of a woman as being normal was based on several consecutive normal Pap smears, reducing greatly the likelihood of the presence of an underlying lesion.

The role of HPV polymorphism could be variable between populations and between outcomes (persistence versus high-grade lesions). This study confirms the need to evaluate the role of polymorphism as well as viral integration in types other than 16 to better understand the natural history and predisposing factor to high-grade cervical lesions. The association between persistence and lesions found for several HPV types suggest that some variations in the HPV genome increase the oncogenicity of HPV isolates. This study also highlights a limitation of case-control studies in the investigation of the role of viral polymorphism in HSIL or cancer. Polymorphism associated with viral persistence and HSIL may not be properly investigated with this study design because of misclassification of controls. Large-scale prospective studies could help solve the potential misclassification of controls especially for frequent types such as HPV-16. However, the power of these studies will be weaker for rarer types. Common patterns of polymorphism across types will probably not be found. Further investigations of the integration of types other than 16 and polymorphism of E2 should shed some light on steps for progression from low grade to high-grade lesions.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research. F.C. is a chercheur national supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). E.F. holds a Distinguished Scientist Award from the Canadian Institutes for Health Research. M.R. is a chercheur-boursier clinicien junior supported by the FRSQ.

Table 1. Cervical lesion status in 89 HPV-33-positive women from four epidemiologic studies.

Study source (type)	Cervical lesion status (no. of women)				Total
	Normal	LSIL	HSIL	unknown	
BCCR (case-control)	27	3	10 <sup>1</sup>	3	43
Ludwig-McGill (cohort)	18	2	1	0	21
McGill-Concordia (cohort)	14	0	1	0	15
HPV-HSV(cross-sectional)	5	2	3	0	10
Total	64	7	15	3	89

BCCR: Biomarkers of Cervical Cancer risk study; HPV-HSV: HPV-Herpes simplex co-infection cross-sectional study;

1: two women had invasive squamous cell cervical cancer.

HPV-33 variant	Grade of SIL		crude OR (95% CI)
	normal	HSIL	
<u>LCR-E6-E7 variations</u>			
Prototype SK	23	4	reference
SK7	0	2	26.0 (1.1-640)
non-prototype SK	39	10	1.5 (0.4-5.2)
non-prototype LCR	39	10	1.5 (0.4-5.2)
non-prototype E6	20	5	1.1 (0.3-3.7)
non-prototype E7	17	5	1.4 (0.4-4.6)
<u>E2 variations</u>			
Variant E2-1	31	6	reference
Variant other than E2-1	28	7	0.8 (0.2-2.6)

**Table 2. Association of human papillomavirus type 33 polymorphism with high-grade cervical lesions and cancer.** Odds ratio (OR) estimates and 95% confidence intervals (CI) were obtained from logistic regression (crude). Since the prototype E2 was not found in our cohort, the most frequent variant in E2 is shown here.

Figure 1. HPV-33 polymorphism in the LCR, E6 and E7.

1a)

LCR VARIATION AT NUCLEOTIDE POSITION																			
LCR VARIANTS	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	D7596 (78pb)	FRQ
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	7	7		
	0	2	2	2	3	4	4	4	5	8	3	3	3	4	8	3	6		
	4	2	4	5	6	2	3	4	1	5	6	7	5	4	2	8			
reference	t	g	a	c	a	g	c	g	t	g	a	c	g	g	c	a			
mutation	a	t	g	t	g	a	t	a	g	a	g	a	a	a	g	c			
<i>Prototype</i>	T	G	A	C	A	G	C	G	T	G	A	C	G	G	C	A	-	33	
LCR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	10	
LCR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	10	
LCR3	A	T	-	T	-	A	-	A	G	A	-	-	-	-	-	-	-	1	
LCR4	-	T	-	T	-	A	-	A	G	A	-	-	-	-	-	-	1	1	
LCR6	A	T	-	-	-	-	T	A	-	A	-	A	-	-	G	-	1	14	
LCR7	A	T	-	T	-	A	-	A	G	A	-	-	-	-	-	-	1	5	
LCR11	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
LCR12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	2	
LCR13	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	1	
LCR14	A	T	-	-	-	-	-	A	-	A	-	A	-	-	G	-	1	3	
LCR15	-	T	G	-	G	-	-	-	G	-	G	-	-	-	-	C	-	1	
LCR16	-	T	G	-	G	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
LCR17	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
<b>Transcription factor binding site</b>																			
Gain	Tst-1	-	-	-	C/EBP	-	SRY	-	YY1	-	-	-	C/EBPa	-	-	-	-	-	
Loss	-	S	R	Y	-	-	-	C/EBPb	C/EBP	-	-	-	-	-	USF	-	c-Myb		

1b)

E6 VARIATION AT NUCLEOTIDE POSITION														
E6 VARIANTS	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	4	5	5	FRQ
	6	9	1	1	1	2	2	5	6	8	8	2	3	
	1	2	3	4	5	5	7	5	4	7	0	1	4	
reference	c	a	a	c	c	a	t	g	a	a	a	c	c	
mutation	t	g	c	a	t	c	a	t	c	c	t	t	t	
<i>Prototype</i>	C	A	A	C	C	A	T	G	A	A	A	C	C	61
33-E6-2	-	-	-	-	T	C	-	T	-	C	-	T	T	2
33-E6-3	-	-	-	A	T	C	-	T	-	C	-	T	T	4
33-E6-5	T	-	-	A	T	C	-	T	-	C	-	T	T	2
33-E6-6	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
33-E6-7	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	T	-	-	16
33-E6-8	-	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
33-E6-9	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	1
<b>Codon position</b>	18	28	36	36	69	73	73	83	86	93	125	138	142	
<b>Wild-type AA</b>	A	L	K	P	F	I	I	V	N	K	R	A	S	
<b>Mutated AA</b>	V	L	N	T	F	L	I	L	H	N	R	V	S	

1c)

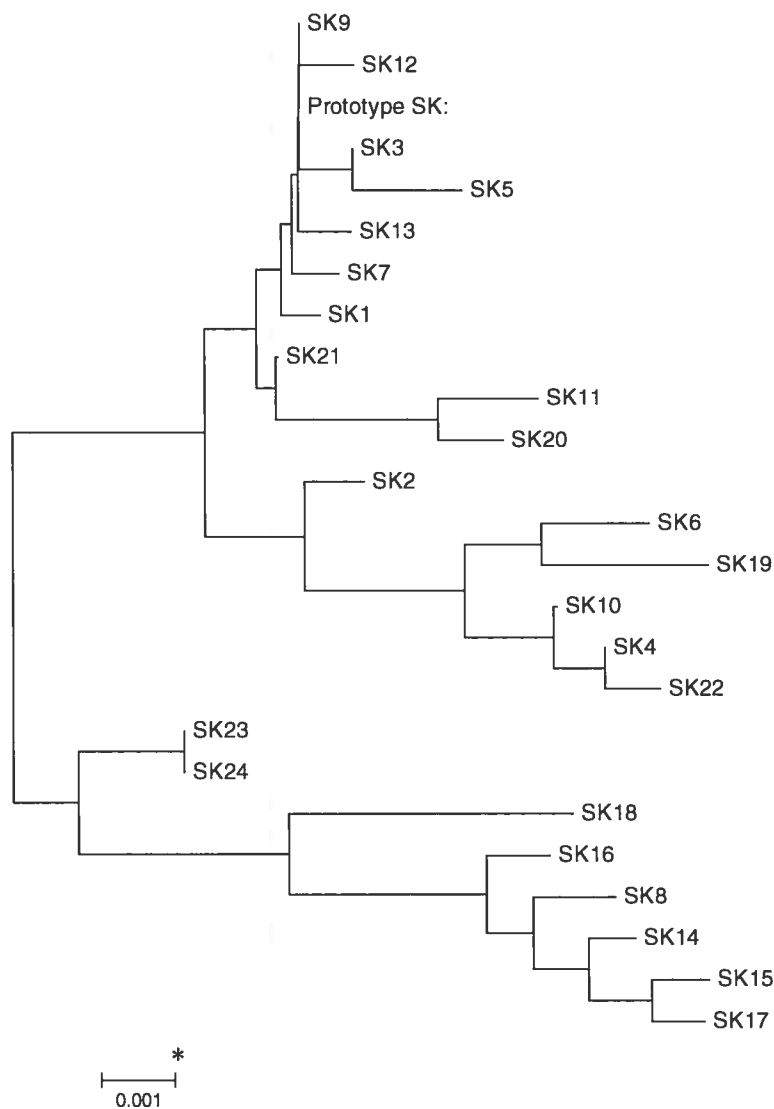
E7 VARIATION AT NUCLEOTIDE POSITION									
E7 VARIANTS	6	6	7	7	8	8	8	8	FRQ
	0	0	2	3	3	5	6	6	
	6	8	2	7	3	0	2		
reference	g	t	t	a	g	c	a		
mutation	a	g	c	g	t	g	t		
<i>Prototype</i>	G	T	T	A	G	C	A	63	
33-E7-2	-	-	-	-	T	G	T	2	
33-E7-4	-	-	C	-	T	G	T	3	
33-E7-5	A	-	C	-	T	G	T	2	
33-E7-6	-	-	-	G	-	-	T	16	
33-E7-7	-	-	-	G	-	G	T	1	
33-E7-8	-	G	-	-	-	-	-	1	
33-E7-9	-	-	-	-	-	-	T	1	
<b>Codon position</b>	12	13	50	55	87	93	97		
<b>Wild-type AA</b>	V	V	A	V	V	T	Q		
<b>Mutated AA</b>	I	V	A	V	V	S	L		

1d)

SK variants	LCR variants	E6 variants	E7 variants	Frequency		
				Total	Brazil	Canada
prototype	Prototype	Prototype	Prototype	33	29	4
SK1	33-LCR-11	Prototype	Prototype	1	1	0
SK2	33-LCR-6	Prototype	Prototype	1	1	0
SK3	33-LCR-2	Prototype	Prototype	8	6	2
SK4	33-LCR-6	33-E6-7	33-E7-6	11	9	2
SK5	33-LCR-2	33-E6-9	33-E7-8	1	1	0
SK6	33-LCR-14	33-E6-7	33-E7-9	1	1	0
SK7	33-LCR-12	Prototype	Prototype	2	2	0
SK8	33-LCR-7	33-E6-3	33-E7-2	1	1	0
SK9	33-LCR-1	Prototype	Prototype	8	1	7
SK10	33-LCR-14	33-E6-7	33-E7-6	2	2	0
SK11	33-LCR-16	Prototype	EE-E7-6	1	0	1
SK12	33LCR-13	Prototype	Prototype	1	0	1
SK13	33LCR-13	33-E6-6	Prototype	1	1	0
SK14	33-LCR-7	33-E6-2	33-E7-5	1	1	0
SK15	33-LCR-7	33-E6-5	33-E7-4	2	2	0
SK16	33-LCR-4	33-E6-2	33-E7-2	1	1	0
SK17	33-LCR-7	33-E6-3	33-E7-5	1	0	1
SK18	33-LCR-3	33-E6-3	33-E7-4	1	1	0
SK19	33-LCR-6	33-E6-8	33-E7-6	1	1	0
SK20	33-LCR-15	Prototype	Prototype	1	1	0
SK21	33-LCR-17	Prototype	Prototype	2	2	0
SK22	33-LCR-6	33-E6-7	33-E7-7	1	1	0
SK23	33-LCR-1	33-E6-3	Prototype	1	0	1
SK24	33-LCR-2	33-E6-3	Prototype	1	0	1

**Figure 1. HPV-33 polymorphism in the LCR, E6 and E7.** Nucleotide positions where variations were detected are written across the top vertically in the LCR (fig. a), E6 (fig. b) and E7 (fig. c). Positions for which no variation was encountered compared to the prototype are marked with a '-', whereas a letter showing the mutated base indicates a variation site for that variant. Designation of variants was arbitrary. Frequency is for the number of isolates identified for each variant. The loss or gain in putative transcription factor binding site is provided under the last variant. D is for deletion. The change in amino acid is provided: Aa is for amino acid.





**Figure 2. Intratype diversity of HPV-33.** A phylogenetic tree of 25 variants defined by analysis of a combination of LCR, E6 and E7 sequences was constructed using the neighbor-joining algorithm. The bar represents 0.001 substitution per 100 bases.

\* This substitution rate is explained by the fact that the variation ratio within DNA viruses is weaker compared with RNA viruses. We did not include an outgroup since the variability between the different variants is too feeble, which would have resulted in a compressed tree that would have been difficult to interpret.

		E2 VARIATION AT NUCLEOTIDE POSITION																									
		2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	FRQ			
E2 VARIANTS		8	9	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	6	6	6	7	7	7		
		7	9	1	3	9	2	2	3	7	6	9	9	0	0	3	3	5	6	7	3	4	5	2	2	5	
		7	6	3	8	9	6	9	8	5	4	7	8	1	7	6	8	8	9	5	4	0	3	4	5	9	
reference		g	g	a	t	a	a	c	g	c	a	g	a	a	c	c	t	c	a	c	t	g	c	g	t	c	
mutation		t	a	g	g	g	g	t	a	t	c	t	c	c	t	t	g	g	c	t	c	a	g	t	c	t	
<i>Prototype</i>	G	G	A	T	A	A	C	G	C	A	G	A	A	C	C	T	C	A	C	T	G	C	G	T	C	0	
33-E2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	42	
33-E2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	T	3	
33-E2-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	T	1	
33-E2-4	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	1	
33-E2-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	T	11	
33-E2-6	T	-	-	-	-	G	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	C	T	-	-	G	T	C	T	3	
33-E2-7	T	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	-	C	-	-	-	-	C	T	-	-	G	T	C	T	11	
33-E2-8	T	-	G	-	G	G	-	-	-	-	-	C	-	-	T	-	G	-	-	-	-	G	T	C	T	1	
33-E2-9	T	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	-	C	T	-	-	-	C	T	-	-	G	T	C	T	1	
33-E2-10	T	A	G	-	G	G	-	-	-	-	-	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	G	T	C	T	1	
33-E2-11	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	1	
33-E2-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	T	1	
33-E2-13	T	-	G	G	G	G	-	-	-	-	-	-	-	T	-	G	-	-	C	-	-	G	T	C	T	1	
33-E2-14	T	-	G	-	G	G	-	-	-	-	-	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	G	T	C	T	1	
33-E2-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	T	1	

Codon Position	43	83	89	131	151	160	161	164	176	206	217	217	218	220	230	230	237	241	243	296	298	302	311	311	337
Wild-type AA	L	S	T	D	K	I	H	E	A	T	D	D	N	P	P	P	A	T	L	Y	E	S	V	V	T
Mutated AA	F	N	A	E	E	V	Y	K	V	P	Y	A	T	L	S	P	G	P	L	Y	K	C	L	A	T

		E4 VARIATION AT NUCLEOTIDE POSITION										
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	FRQ
E4 VARIANTS		3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	
		6	9	9	0	0	3	3	5	6	7	
		4	7	8	1	7	6	8	8	9	5	
reference		a	g	a	a	c	c	t	c	a	c	
mutation		c	t	c	c	t	t	g	g	c	t	
<i>Prototype</i>	A	G	A	A	C	C	T	C	A	C	45	
33-E4-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	3	
33-E4-2	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	11	
33-E4-3	C	-	-	-	C	-	-	-	C	T	3	
33-E4-4	-	-	-	-	C	-	-	-	C	T	11	
33-E4-5	-	-	-	C	-	-	T	-	G	-	1	
33-E4-6	-	-	-	-	C	T	-	-	-	C	T	1
33-E4-7	-	-	-	-	-	-	T	-	G	-	3	
33-E4-8	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	1	
33-E4-9	-	T	-	-	-	-	-	-	C	-	1	

Codon Position	13	24	24	25	27	37	38	45	48	50
Wild-type AA	P	D	D	N	P	D	L	P	L	S
Mutated AA	P	Y	A	T	L	D	R	A	F	S

Figure 3. HPV-33 E2 and E4 polymorphism in 80 isolates. See legend of figure 1.

## References

1. **Aho, J., C. Hankins, C. Tremblay, P. Forest, K. Pourreaux, F. Rouah, The Canadian Women's HIV study Group, and F. Coutlée .** 2004. Genomic polymorphism of Human Papillomavirus type 52 predisposes to persistent infection. *J Inf Dis* **190**:46-52.
2. **Aho, J., C. Hankins, C. Tremblay, F. Lang, P. Forest, K. Pourreaux, F. Rouah, The Canadian Women's HIV study Group, and F. Coutlée.** 2003. Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of HIV-seropositive and seronegative women. *J Inf Dis* **188**:1517-1527.
3. **Benoist, C. and P. Chambon.** 1981. In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region. *Nature* **290**:304-310.
4. **Calleja-Macias, I.E., M. Kalantari, J. Huh, R. Ortiz-Lopez, A. Rojas-Martinez, J.F. Gonzalez-Guerrero, A.L. Williamson, B. Hagmar, D.J. Wiley, L. Villarreal, H.U. Bernard, and H.A. Barrera-Saldana.** 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virol* **319**:315-323.
5. **Calleja-Macias, I.E., L.L. Villa, J.C. Prado, M. Kalantari, B. Allan, A.L. Williamson, L.P. Chung, R.J. Collins, R.E. Zuna, S.T. Dunn, T.Y. Chu, H.A. Cubie, K. Cuschieri, M. von-Knebel-Doeberitz, C.R. Martins, G.I. Sanchez, F.X. Bosch, N. Munoz, and H.U. Bernard.** 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol* **79**:13630-13640.

6. **Casas, L., S.C. Galvan, R.M. Ordonez, N. Lopez, M. Guido, and J. Berumen.** 1999. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* **83**:449-455.
7. **Chan, K.S., C.-W. Lam, T.K. Cheung, W.W.H. Li, K.W.K. Lo, M.Y.M. Chan, J.L.K. Cheung, and A.F. Cheng.** 2002. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**:1249-1253.
8. **Chan, P.K., C.W. Lam, T.H. Cheung, W.W. Li, K.W. Lo, M.Y. Chan, J.L. Cheung, Xu, LY, and A.F. Cheng.** 2002. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Inf Dis* **186**:696-700.
9. **Chan, S.-Y., L. Ho, C.-K. Ong, V. Chow, B. Drescher, M. Durst, J. Ter Meulen, L. Villa, J. Luande, H.N. Mgaya, and H.-U. Bernard.** 1992. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* **66**:2057-2066.
10. **Clifford, G.M., J.S. Smith, T. Aguado, and S. Franceschi.** 2003. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British J Cancer* **89**:101-105.
11. **Cole, S.T. and R.E. Streek.** 1986. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *J Virol* **58**:991-995.
12. **de Villiers, E.M., C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard, and H.H. zur.** 2004. Classification of papillomaviruses. *Virol* **324**:17-27.

13. **Desaintes, C. and C. Demeret.** 1996. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Sem Cancer Biol* 7:339-347.
14. **Dong, X.P., F. Stubenrauch, E. Beyerfinkler, and H. Pfister.** 1994. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer* 58:803-808.
15. **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.
16. **Ferenczy, A. and E.L. Franco.** 2002. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncology* 3:11-16.
17. **Gagnon, S., C. Hankins, C. Tremblay, P. Forest, K. Pourreaux, and F. Coutlee.** 2004. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect.Dis.* 190:1575-1585.
18. **Gagnon, S., C. Hankins, C. Tremblay, K. Pourreaux, P. Forest, F. Rouah, and F. Coutlee.** 2005. Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J Med.Virol* 75:213-221.
19. **Gagnon, S., C. Hankins, C. Tremblay, K. Pourreaux, The Canadian Women's HIV study Group, and F. Coutlée.** 2004. Viral polymorphism of Human papillomavirus types 33 and 35 in the genital tract of women infected by or at high risk of being infected by Human Immunodeficiency virus. *J Inf Dis* 190:1575-1585.
20. **Giannoudis, A. and C.S. Herrington.** 2001. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 193:295-302.

21. **Giannoudis, A., M. van Duin, P.J.F. Snijders, and C.S. Herrington.** 2001. Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *British J Cancer* **84**:1058-1063.
22. **Gravitt, P., C.L. Peyton, T.Q. Alessi, C. Wheeler, F. Coutlée, A. Hildesheim, M. Schiffman, D.R. Scott, and R.J. Apple.** 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* **38**:357-361.
23. **Gruss, P., R. Dhar, and G. Khoury.** 1981. Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:943-947.
24. **Heinzel, P.A., S.Y. Chan, L. Ho, M. O'Connor, P. Balaram, M.S. Campo, K. Fujinaga, N. Kiviat, J. Kuypers, and H. Pfister.** 1995. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* **33**:1746-1754.
25. **Hildesheim, A., M. Schiffman, C. Bromley, S. Wacholder, R. Herrero, A. Rodriguez, M.C. Bratti, M.E. Sherman, U. Scarpidis, Q.Q. Lin, M. Terai, R.L. Bromley, K. Buetow, R.J. Apple, and R.D. Burk.** 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**:315-318.
26. **Ho, L., S.Y. Chan, R.D. Burk, B.C. Das, K. Fujinaga, J.P. Icenogle, T. Kahn, N. Kiviat, W. Lancaster, and P. Mavromara-Nazos.** 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**:6413-6423.
27. **Kammer, C., U. Warthorst, N. Torrez-Martinez, C.M. Wheeler, and H. Pfister.** 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16

- variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* **81**:1975-1981.
28. **Koushik, A., A. Ghosh, E. Duarte-Franco, P. Forest, H. Voyer, G. Matlashewski, F. Coutlee, and E.L. Franco.** 2005. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detection Prevention* **29**:307-316.
29. **Lizano, M., J. Berumen, M.C. Guido, L. Casas, and A. Garcia-Carranca.** 1997. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer [published erratum appears in *J Natl Cancer Inst* 1997 Oct 1;89(19):1460]. *J Natl Cancer Inst* **89**:1227-1231.
30. **Luo, X. and M. Sawadogo.** 1996. Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **93**:1308-1313.
31. **Mayrand, M.H., F. Coutlee, C. Hankins, N. Lapointe, P. Forest, De, M. Ladurantaye, and M. Roger.** 2000. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol* **38**:3388-3393.
32. **Nakagoshi, H., T. Nagase, C. Kanei-Ishii, Y. Ueno, and S. Ishii.** 1990. Binding of the c-myc proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J Biol Chem* **265**:3479-3483.
33. **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**:203-207.

34. **Ong, C.K., S.Y. Chan, M.S. Campo, K. Fujinaga, P. Mavromara-Nazos, Labropoulou, H. Pfister, S.K. Tay, J. Ter Meulen, and L.L. Villa.** 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* **67**:6424-6431.
35. **Peitsaro, P., B. Johansson, and S. Syrjanen .** 2002. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* **40**:886-891.
36. **Piccini, A., A. Storey, P. Massimi, and L. Banks.** 1995. Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify multiple regions of the protein involved in binding to E1. *J Gen.Virol* **76**:2909-2913.
37. **Richardson, H., G. Kelsall, P. Tellier, H. Voyer, M. Abrahamowicz, F. Coutlée, and E. Franco.** 2003. The natural history of type-specific HPV infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biom Prev* **12**:485-490.
38. **Romanczuk, H. and P.M. Howley.** 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:3159-3163.
39. **Sathish, N., P. Abraham, A. Peedicayil, G. Sridharan, R.V. Shaji, and G. Chandy.** 2004. E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. *Gynecol.Oncol.* **95**:363-369.
40. **Schlecht, N.F., R.D. Burk, J.M. Palefsky, H. Minkoff, X. Xue, L.S. Massad, M. Bacon, A.M. Levine, K. Anastos, S.J. Gange, D.H. Watts, M.M. Da-Costa, Z. Chen, J.Y. Bang, M. Fazzari, C. Hall, and H.D. Strickler.** 2005. Variants of human



papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. *J Gen.Virol* **86**:2709-2720.

41. **Schlecht, N.F., S. Kulaga, J. Robitaille, S. Ferreira, M. Santos, R.A. Miyamura, E. Duarte-Franco, T.E. Rohan, A. Ferenczy, L.L. Villa, and E.L. Franco.** 2001. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama: Journal of the American Medical Association* **286**:3106-3114.
42. **Seif, I., G. Khoury, and R. Dhar.** 1979. The genome of human papovavirus BKV. *Cell* **18**:963-977.
43. **Stewart, A.C., A.M. Eriksson, M.M. Manos, N. Munoz, F.X. Bosch, J. Peto, and C.M. Wheeler.** 1996. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* **70**:3127-3136.
44. **Swan, D.C., M. Rajeevan, G. Tortolero-Luna, M. Follen, R.A. Tucker, and E.R. Unger.** 2005. Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol.Oncol.* **96**:695-700.
45. **Terry, G., L. Ho, and J. Cuzick.** 1997. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer* **73**:651-655.
46. **Tran-Thanh, D., D. Provencher, A. Koushik, E. Duarte-Franco, A. Kessous-Elbaz, P. Drouin, C. Wheeler, J. Dubuc-Lissoir, P. Gauthier, G. Allaire, R. Vauclair, J. DiPaolo, P. Gravitt, E.L. Franco, and F. Coutlée.** 2003. Herpes Simplex Virus Type II (HSV-2) is not a Cofactor to Human Papillomavirus in Cancer of the Uterine Cervix. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* (In Press)

47. **Veress, G., K. Szarka, X.P. Dong, L. Gergely, and H. Pfister.** 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* **80**:1035-1043.
48. **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 Pt 12**:2959-2968.
49. **Wagatsuma, M., K. Hashimoto, and T. Matsukura.** 1990. Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol* **64**:813-821.
50. **Watts, K.J., C.H. Thompson, Y.E. Cossart, and B.R. Rose.** 2001. Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia. *J Clin Microbiol* **39**:2009-2014.
51. **Watts, K.J., C.H. Thompson, Y.E. Cossart, and B.R. Rose.** 2002. Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. *Int J Cancer* **97**:868-874.
52. **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 [see comments]. *J Natl Cancer Inst* **89**:796-802.
53. **Xin, C.Y., K. Matsumoto, H. Yoshikawa, T. Yasugi, T. Onda, S. Nakagawa, M. Yamada, S. Nozawa, S. Sekiya, Y. Hirai, K. Shiromizu, T. Fujii, and Y. Taketani.** 2001. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese

women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Letters* **170**:19-24.

54. **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**:2463-2472.
55. **Zehbe, I., G. Voglino, H. Delius, E. Wilander, and M. Tommasino.** 1998. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* **352** :1441-1442.
56. **Zehbe, I., E. Wilander, H. Delius, and M. Tommasino.** 1998. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* **58** :829-833.

## **DISCUSSION**

Jusqu'à ce jour, très peu d'études ont investigué le polymorphisme du VPH de type 33. Parmi ces études, deux avaient pour objectif d'examiner les cadres de lecture E6 et L1 (Stewart *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 1997), et une autre visait à démontrer le rôle que pouvait jouer ce type de VPH dans le cancer de la prostate (Korody *et al.*, 2005). Une troisième étude réalisée plus récemment en 2005, a démontré une association entre les cancers verruqueux du cuir chevelu avec le type 33 (Murao *et al.*, 2005). Une équipe de recherche a même pu associer le VPH-33 au cancer du sein, mais ni le type 16 ni le type 18 n'ont été mis en relation avec ce type de cancer (Yu *et al.*, 2000).

En ce qui a trait à l'analyse du polymorphisme du VPH-33, une seule étude exhaustive a été menée sur ce type, effectuée, d'ailleurs, dans notre laboratoire de recherche. Cette dernière a permis la caractérisation de nouvelles variantes à partir des gènes du LCR, de E6 et E7 et d'établir une association entre le polymorphisme de ces gènes, la perte de la duplication, qui correspond à la présence de la délétion de 78 pb au niveau du LCR, et la persistance de l'infection (Gagnon *et al.*, 2004).

Comme plusieurs études ont associé le polymorphisme de plusieurs types, notamment le VPH-16, avec la persistance et la progression des néoplasies cervicales, il est devenu plausible de considérer que des variations génétiques pourraient déterminer l'évolution de ces lésions.

D'un point de vue clinique, l'intérêt d'identifier de nouvelles variantes possédant un potentiel oncogénique plus ou moins accru chez des femmes sexuellement actives pourrait permettre de cibler les populations à risque et de leur administrer un traitement avant que les lésions du col ne progressent vers un cancer invasif. En effet, le potentiel oncogénique du VPH-33 peut être modifié par des mutations retrouvées au niveau des régions génomiques de E6 ou E7, plus particulièrement si ces variations entraînent un changement dans la séquence d'acides aminés. Cela pourrait résulter en un changement de la conformation de l'une ou l'autre des protéines et plus spécifiquement au niveau des sites de liaison des suppresseurs de tumeurs, p53 et pRb, dont ils inactivent normalement la fonction. De plus, des variations non synonymes au niveau de la séquence du gène E2 pourraient modifier l'effet répressif de E2 sur la transcription des gènes E6 et E7, ce qui entraînerait la surexpression des deux oncoprotéines ou encore diminuerait l'efficacité de réplication du virus.

Rappelons que l'originalité de la présente étude réside dans le fait qu'il s'agit là de la première à analyser des spécimens provenant de quatre études internationales regroupant près de 5400 patientes dont toutes les patientes infectées par le VPH-33 et VIH-séronégatives, ont été analysées dans le cadre de ce projet. Un autre apport important de cette étude est l'analyse du polymorphisme du gène E2, jamais investiguée de manière aussi approfondie auparavant. L'accès à un tel nombre de spécimens permettait de mieux caractériser ce type de VPH plus rare, difficilement accessible à des chercheurs isolés, ce qui réduit le nombre de recherches effectuées sur ce type. Il est également à noter qu'il s'agit là de la première étude portant sur l'analyse du polymorphisme du VPH-33, de manière aussi exhaustive, chez des femmes VIH-séronégatives.

La région régulatrice du LCR constitue également une bonne cible à analyser, dans laquelle des mutations pourraient mener à la perte ou au gain d'un ou plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires qui pourraient transactiver les promoteurs des oncogènes viraux et ainsi augmenter le potentiel immortalisant et transformant du virus. Compte tenu du fait que le LCR contient les promoteurs des gènes viraux, il est intéressant d'examiner son polymorphisme. Des études ont montré que les variations intratypiques au niveau de cette région non codante pouvaient atteindre 5% pour les types 16 et 18 (Chan *et al.*, 1992b). De plus, comme mentionné précédemment, l'analyse du LCR du VPH-52 a permis d'associer le polymorphisme de cette région avec la persistance de l'infection (Aho *et al.*, 2004). Il en est de même pour les onco-protéines E6 et E7, étant donné que des études réalisées pour le type 16 ont clairement démontré leur association avec la progression des lésions intraépithéliales vers un cancer invasif, ce qui laisse supposer que l'on pourrait fort bien observer cette même association chez le type 33.

### **1. Variabilité du LCR :**

Contrairement aux cadres de lecture des gènes E6, E7 et E2 que nous avons analysés sur toute la longueur, seule une partie de la région du LCR a été examinée. Cette région est celle examinée dans la première étude portant sur ce thème (Gagnon *et al.*, 2004), et regroupe

le domaine *enhancer* retrouvé à l'extrémité 3' du LCR. Plusieurs études ont démontré que quelques variations retrouvées au niveau du LCR étaient associées à un risque accru de persistance ou de lésions induites par les VPHs (Lizano *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 1997; Veress *et al.*, 1999; Kammer *et al.*, 2000; Giannoudis *et al.*, 2001; Hildesheim *et al.*, 2001; Watts *et al.*, 2001, 2002). L'intérêt de porter notre attention sur cette région en particulier réside dans le fait qu'elle contient, d'une part, plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires, et d'autre part, la duplication de 78 pb présente chez le prototype VPH-33 mais absente chez certaines variantes décrites dans l'étude préliminaire (Gagnon *et al.*, 2004). Rappelons que ce type est le seul à posséder cette duplication parfaite (Cole et Streek, 1986). Étant donné qu'une duplication similaire de 72 pb, 73 pb et 68 pb avait été décrite chez le virus SV40 (Gruss *et al.*, 1981), le virus murin du sarcome de Moloney et chez le virus BK, respectivement (Dhar *et al.*, 1980), il a été suggéré que cette duplication pouvait jouer un rôle d'activateur en *cis* de la transcription virale (Gagnon *et al.*, 2004).

### *1.1. Polymorphisme du LCR et effets sur la liaison aux FT cellulaires :*

L'analyse de la séquence de chacun de nos isolats nous a permis de confirmer l'existence de mutations déjà caractérisées et de retrouver la plupart des variantes décrites préalablement (Gagnon *et al.*, 2004), mais également d'identifier de nouveaux sites de variations permettant la description de nouvelles variantes du LCR (33-LCR-11/12/13/14/15/16/17). Parmi ces variations, certaines étaient associées au gain de trois nouveaux sites potentiels de liaison à des facteurs de transcription cellulaires, dont un au facteur, SRY, deux à C/EBP, et un autre à la perte d'un site de liaison au facteur de transcription USF qui sera discuté plus en détail dans les prochaines pages.

En outre, on a retrouvé la perte de la duplication chez 4 variantes isolées de 23 patientes, dont 3 étaient déjà décrites dans la première étude portant sur le VPH-33 (Gagnon *et al.*, 2004) et dont une, nouvellement identifiée dans ce projet (33-LCR- 4/6/7/14). Quatre variantes (33-LCR-5/8/9/10) décrites dans la même étude possédaient également la délétion, mais étaient absentes de nos cohortes.

La délétion, correspondant à l'absence de la duplication de 78 pb, a été associée avec la persistance du VPH-33 et comme celle-ci coïncidait avec la perte d'un site de liaison au facteur *c-myb*, on a suggéré que, contrairement à ce que l'on s'attendait à voir, la duplication devait probablement avoir un rôle suppresseur *in vivo* plutôt qu'un rôle d'activateur. La suppression de la transcription virale par *c-myb* a déjà été décrite chez le SV40 (Vousden et Jat, 1989) et le virus de l'Hépatite B (David-Cordonnier *et al.*, 1999), ce qui suggère que la perte de la duplication pourrait prédisposer les femmes immunosupprimées à une infection persistante mais ne semble pas exercer d'impact sur la progression d'une LSIL vers des HSILs.

En termes de variabilité, la région du LCR se traduisait par une variation intratypique de 18.7% par rapport à 20% dans la première étude. Cela s'explique par la présence de deux variations décrites chez deux variantes lors de l'étude réalisée en 2004 et que l'on ne retrouve pas dans la présente étude, à savoir une insertion à la position 7528 de huit nucléotides et une délétion d'un nucléotide. D'autre part, quatre nouveaux sites de variation ont été identifiés dans le cadre de la présente étude, mais cela n'augmentait pas la variabilité du LCR par rapport à ce qui a été publié auparavant. Lorsque l'on se penche sur la distribution générale des mutations, on remarque que la plupart d'entre elles sont partagées entre plusieurs variantes et seules quelques unes des variantes possèdent des mutations uniques comme c'est le cas pour les variantes 33-LCR-1 et 33-LCR-15. Pour ces dernières, nous avons jugé pertinent de reprendre le séquençage au moins deux fois pour confirmer leur patron de mutations et il en est de même pour les variantes nouvellement identifiées dans cette étude. De cette manière, on pouvait éviter les erreurs qui auraient pu être commises par la polymérase Tgo reconnue pour son activité de *proofreading* mais dont le taux d'erreurs durant la réplication peut atteindre  $4.9 \times 10^{-7}$  (Mayrand *et al.*, 2000). Le fait que plusieurs variantes partagent des mutations spécifiques, suggère que celles-ci ne surviennent pas de manière aléatoires et qu'elles suivent un patron de variation génomique précis comme nous avons pu le constater pour les VPH-16, -18 et -52 entre autres (Yamada *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 1993). Sept nouvelles variantes ont été identifiées dans le cadre de la présente étude (33-LCR-11 à 33-LCR-17) et absentes de celle effectuée en 2004, ce qui peut s'expliquer par le nombre de patientes testées dans la présente investigation, nettement plus important que celui analysé précédemment. D'autre



part, quatre variantes préalablement décrites dans la première étude étaient absentes de nos cohortes, ce qui est fort probablement dû à la rareté de trois de ces variantes au sein de la cohorte analysée précédemment. Nous pourrions également attribuer ce phénomène au fait que les patientes étaient infectées par le VIH. En effet, on sait à présent que les femmes VIH-séropositives sont plus fréquemment infectées par les VPHs que les patientes VIH-séronégatives (Kreiss et *al.*, 1992; Marte et *al.*, 1992). L'immunodéficience locale causée par le VIH favorise la persistance des cellules infectées par le VPH et donc le développement des lésions (Ferenczy et Franco, 2002). Le VIH, en infectant un hôte immunocompétent, cause une déplétion des macrophages et des lymphocytes T CD4 (+), ce qui nuit à l'efficacité de la réponse à médiation cellulaire (lymphocytes T CD8(+)) nécessaire au contrôle des infections aux VPHs entre autres. En somme, on peut suggérer que ces variantes, absentes de nos isolats, sont moins aptes à s'évader du système immunitaire si l'on considère que l'immunosuppression des patientes VIH-séropositives favorise l'infection par ces variantes.

Lorsqu'on examine les mutations individuelles décrites dans cette étude par rapport à la précédente (Gagnon et *al.*, 2004), on remarque que cinq nouveaux sites de variation ont été identifiés aux positions 7424, 7436, 7536, 7545 et 7768 dans la région du LCR. Du point de vue de la variabilité génomique, le LCR était la région la plus variable, suivie de E2, E6 et E7, ce dernier constituant le cadre de lecture le moins polymorphique.

### *1.2. Association du FT USF avec les HSILs :*

Parmi les variantes décrites dans notre étude, 33-LCR-12 se caractérisait par un site de variation se trouvant à la position 7732 résultant en la perte d'un site de liaison potentiel au facteur de transcription cellulaire USF et était associé à la présence de HSILs, et ce, même après ajustement pour l'ethnicité qui constitue un important facteur de confusion. USF semble impliqué dans la transactivation du promoteur tardif des adénovirus mais joue un rôle antiprolifératif chez l'humain, en inhibant l'action transformante de *c-myc* et E1A (Luo et Sawadogo, 1996). Il serait surprenant que la perte de liaison à un tel facteur soit associée à des lésions de haut grade. Nous pourrions expliquer ce curieux phénomène par la proximité de ce

facteur à des sites de liaisons potentiels à d'autres facteurs de transcription cellulaires. Ainsi, la perte du site de liaison à USF pourrait permettre à d'autres transactivateurs de se lier plus facilement au LCR du fait de la compétition moindre. Une façon avec laquelle nous pourrions vérifier cette hypothèse serait de cloner le LCR dans un plasmide sous le contrôle d'un promoteur et un gène rapporteur et évaluer son activité en présence des facteurs de transcription. On pourrait également procéder à des études *in vitro* de liaison des facteurs cellulaires avec les séquences d'ADN. La mutation à la position 7732 retrouvée chez la variante 33-LCR-12 pourrait également cosegréger avec un autre site de variation retrouvé au niveau d'un tout autre gène non séquencé dans notre étude et qui pourrait résulter en un changement au niveau d'un domaine fonctionnel ou antigénique du VPH-33 .

## **2. Polymorphisme du gène E6 :**

En ce qui a trait au cadre de lecture du gène E6, il se caractérise par une variation intratypique de 2,7% par rapport à seulement 2,1% dans l'étude menée chez les patientes majoritairement VIH-séropositives (Gagnon et *al.*, 2004). Cela est dû au fait que nous avons identifié 5 nouvelles mutations absentes de la première étude (Gagnon et *al.*, 2004) dont trois mutations aux positions 213, 364 et 480, avaient déjà été décrites dans une autre étude qui visait à analyser le polymorphisme de E6 chez des femmes japonaises VPH-33 positives (Xin et *al.*, 2001). Ces nouvelles mutations ont permis la caractérisation de quatre nouvelles variantes (33-E6-6/7/8/9), dont deux décrites dans l'étude chez les femmes japonaises, soit les variantes 33-E6-6 et 33-E6-7 correspondant respectivement aux variantes K35N et K35N/N86H. 4 mutations décrites chez les patientes japonaises étaient absentes dans nos études (Gagnon et *al.*, 2004), ce qui suggère qu'elles peuvent être typiques des variantes retrouvées chez les femmes japonaises. Le grand nombre de mutations identifiées chez les femmes japonaises, malgré le petit nombre de spécimens analysés, pourrait s'expliquer par le fait que les variantes correspondantes auraient possiblement évolué à partir de variantes européennes, et suivi le mouvement des populations humaines (Xin et *al.*, 2001).

Des études ont démontré que le fait de bloquer le domaine N-terminal de E6 entre les résidus Q3 et R8 avec des anticorps spécifiques au motif de doigt de zinc inhibait la dégradation de p53 (Giovane et *al.*, 1999). Les mutations significatives se trouvaient justement au niveau de ce domaine, ce qui pourrait avoir pour effet une modification de la conformation tridimensionnelle de la protéine E6, et qui par conséquent pourrait augmenter ou altérer son affinité pour le suppresseur de tumeur p53, contribuant ainsi à augmenter ou réduire le potentiel oncogénique des variantes en question. Mais tout cela demeure hypothétique. Le second domaine de liaison au zinc de la protéine E6 du VPH-16 semble également être impliqué dans la liaison au p53, étant donné que des anticorps dirigés contre cette région inhibent leur interaction. Toutefois, aucune des mutations que nous avons décrites n'étaient présentes à ce niveau-ci du gène (Lagrange et *al.*, 2005). Tout comme on l'a retrouvée chez les VPH-16 et -52, nous avons également identifié la mutation à la position 355, qui entraînait le remplacement d'une valine par une leucine (L83V) au résidu 83 de la protéine E6 (variante 350G). Cette mutation a d'ailleurs été associée avec la persistance du VPH-16 et le développement des HSILs, ce qui n'était pas le cas pour le VPH-52 (Zehbe et *al.*, 1998).

D'un point de vue statistique, nous n'avons pas trouvé d'association entre cette variation de VPH-33 et les HSILs ou la persistance. L'étude initiale (Gagnon et *al.*, 2004) avait tenté d'établir une association entre cette variation et la persistance mais aucune relation significative n'a été observée.

Deux variantes préalablement décrites étaient absentes de nos cohortes, à savoir la 33-E6-1 et 33-E6-4, ce qui peut s'expliquer par le fait que ces deux variantes étaient déjà très rares dans la première étude (Gagnon et *al.*, 2004), chacune étant retrouvées chez seulement une seule patiente. Là encore, la plupart des mutations étaient partagées par les différentes variantes mais certaines, bien que rares, étaient uniques à une variante précise.

### 3. Polymorphisme du gène E7 :

En ce qui a trait au gène E7, on y retrouve 2,2% de variabilité génomique par rapport à 1,9% révélée dans l'étude effectuée en 2004. Il est à noter que la protéine qu'il encode contient trois domaines conservés CR1, CR3, et CR2. Deux mutations (nt 606 et 608) ont été retrouvées dans le domaine CR1, impliqué dans la transformation et l'immortalisation indépendamment du pRb. Une étude a démontré ce phénomène, en remplaçant le domaine CR1 du VPH-6b par celui du VPH-16, le rendait capable de transformer les cellules BRK (Heck et *al.*, 1992). Le reste des mutations était retrouvé dans le domaine CR3, un domaine de liaison aux métaux qui semble également contribuer au pouvoir immortalisant de E7 surtout au niveau du motif CXXC entre les acides aminés 91 et 94 du VPH-16 (Jewers et *al.*, 1992). Aucune mutation n'était présente dans le domaine CR2 qui contient un domaine LXCXE responsable de la liaison à la poche peptidique de p105 du pRb. Des études ont clairement démontré que la moindre mutation dans ce domaine abolissait l'interaction avec pRb et réprimait l'activité transformante de E7 (Dyson et *al.*, 1989). Dans le cadre de la présente investigation, cela pourrait expliquer pourquoi le polymorphisme de E7 n'était pas associé aux HSILs, le domaine CR2 étant en grande partie responsable du potentiel transformant de E7. Nous avons pu identifier 4 nouvelles variantes associées à 2 sites de mutations nouvellement identifiés. Curieusement, l'une de ces nouvelles variantes, 33-E7-6, était la plus fréquente après le prototype bien qu'absente chez les patientes VIH-séropositives testées préalablement. On aurait pu expliquer cela par le fait qu'il pouvait s'agir d'une variante typiquement brésilienne, or elle a également été retrouvée chez des patientes canadiennes. Néanmoins, on a constaté que cette variante coségrégait dans 72,2% des cas avec les variantes 33-LCR-6 et 33-E6-7. Cela peut donc être attribué, encore une fois, au nombre plus important de patientes testées dans le cadre de ce projet. Une seule mutation n'était retrouvée qu'une fois chez une seule variante et on a confirmé sa présence en reprenant le séquençage de l'isolat en question.

#### 4. Polymorphisme du gène E2 :

Une étude a décrit deux des mutations retrouvées dans la présente étude au niveau du cadre de lecture de E2 dont l'une des deux était silencieuse (Peitsaro et *al.*, 2002b). Nous avons été capables d'amplifier le segment E2 de la plupart des spécimens dérivés des HSILs incluant deux cancers invasifs chez les patientes testées. Cela élimine l'hypothèse selon laquelle le VPH-33 peut s'intégrer au cours de la progression de lésions bénignes vers des HSILs, et suggère que le virus pourrait se maintenir en partie sous forme épisomale ou qu'il s'intégrerait avec ouverture de l'épisome à un site autre que E2. On peut également supposer que de multiples copies auraient pu s'intégrer en tandem. Huit spécimens n'étaient pas amplifiables dans des proportions similaires pour les différents types de lésions. Cela pourrait probablement être dû à l'interruption du gène E2 suite à son intégration dans l'ADN cellulaire (Peitsaro et *al.*, 2002a), ou encore à des mutations localisées dans des sites empêchant l'hybridation avec les amorces lors de l'amplification ou du séquençage.

Des études ont décrit des délétions de 30 pb au niveau de la protéine E2 du VPH-16 retrouvées chez les variantes isolées à partir de HSILs, mais ce phénomène n'a pas été observé dans notre étude (Sathish et *al.*, 2004). L'analyse du segment E2 nous a révélé qu'il s'agit là d'une région polymorphique et c'est d'ailleurs le cadre de lecture le plus variable (2.3%) par rapport à ceux de E6 et E7 ( $p < 0.001$ ). Les mutations identifiées sont distribuées dans les trois domaines. Pour comparer la variabilité génomique des 4 régions analysées, nous avons procédé à une analyse non paramétrique par la méthode du *Sign Test* compte tenu de la distribution non normale des variations après avoir ajusté pour la longueur des régions en question. Cela nous a révélé que le LCR était significativement plus variable que E6 et E2 ( $p < 0.001$ ) et plus variable, mais à moindre mesure, par rapport à E2 ( $p = 0.002$ ).

En analysant le polymorphisme de E2, nous avons décrit 15 variantes et avons pu observer plusieurs phénomènes curieux comme par exemple, l'absence d'isolats prototypiques dans toutes nos cohortes. Par contre la variante la plus fréquente était un «prototype-like», 33-E2-1, qui ne différait du prototype que par la présence d'une seule mutation synonyme, à la position 3759 et partagée par les 15 variantes décrites pour le gène de E2. Nous avons pensé à une erreur introduite lors du séquençage du prototype dans la publication originale (Cole et

Streek, 1986), mais en séquençant le gène E2 du clone prototypique du VPH-33 fourni par le Dr Orth et en l'alignant avec la séquence du prototype originellement publiée, nous avons retrouvé une homologie parfaite entre les deux. Sachant que le prototype se définit comme étant la toute première variante ayant été clonée pour chacun des types de VPH, on peut supposer que le premier clone du VPH-33 n'était probablement pas le plus fréquent et qu'il s'agissait en fait d'une variante «prototype-like». D'ailleurs, dans une étude qui investiguait la progression de la lignée cellulaire UT-Dec1 durant les passages cellulaires en analysant le statut physique du VPH-33 et les variations au niveau de E2, on retrouvait également une mutation silencieuse au nucléotide se trouvant à la position 3759 (Peitsaro et *al.*, 2002b).

Un autre phénomène que nous avons observé en analysant les variations au niveau de ce gène, est que 87,5% des mutations n'étaient pas synonymes, par rapport aux autres cadres de lecture où la plupart des mutations étaient silencieuses. Cependant, après avoir ajusté pour la longueur, nous avons constaté qu'il n'y avait aucune différence entre la proportion des mutations non synonymes chez E2 et les autres cadres de lectures. La distribution de ces variations était similaire à celle du VPH-16 (Casas et *al.*, 1999; Veress et *al.*, 1999; Watts et *al.*, 2002; Swan et *al.*, 2005) et de la même façon que pour le type 16, nous avons retrouvé un regroupement de variations que l'on appelle *cluster*, de manière plus marquée à l'extrémité 3' du domaine de transactivation de E2, qui contenait le plus grand nombre de mutations. Le site de liaison de la protéine E2 du VPH-16 à la protéine E1 a été rapporté comme se trouvant proche de l'extrémité N-terminale du domaine de transactivation entre les résidus 18 et 41 (Piccini et *al.*, 1995; Casas et *al.*, 1999) mais, dans le cas du VPH-33, aucune variation n'a été identifiée dans cette région, suggérant que la capacité de liaison de E2 à E1 n'aurait pas été altérée et que l'efficacité de réplication entre les différentes variantes est demeurée similaire, comme rapporté pour le type 16 (Sathish et *al.*, 2004).

5 variations non synonymes étaient localisées dans l'extrémité C-terminale de E2, qui constitue le domaine de liaison à l'ADN viral et contient le signal de localisation nucléaire et les domaines de dimérisation (Casas et *al.*, 1999). Ces variations pourraient modifier la conformation tridimensionnelle de E2 diminuant ainsi son affinité en tant que répresseur sur son site de liaison au niveau de la région du LCR. Toutefois, Cela reste à confirmer avec des études de cristallographie sur chacune des variantes pour évaluer l'impact de ces variations sur

la liaison de E2 aux promoteurs des oncogènes viraux, ou sa capacité à dimériser ou à se transloquer dans le noyau.

### **5. Polymorphisme du gène E4 :**

Compte tenu du fait que le gène E4 chevauche la région charnière de E2 par un mécanisme de changement de cadre de lecture du ribosome, les deux protéines encodées avaient des séquences en acides aminés différentes et présentaient ainsi des variations spécifiques à chacune d'entre elles. En comparant celles-ci entre la région charnière E2 et le gène E4, nous avons retrouvé une fréquence de variations non synonymes similaires (7 versus 6 respectivement) alors que l'on a rapporté que le gène E4 du VPH-16 était moins polymorphique que le domaine *hinge* de E2 (Eriksson *et al.*, 1999; Veress *et al.*, 1999). D'un point de vue statistique, aucune association n'a été mise en évidence entre le polymorphisme de E2 du type 33 et les HSILs bien que des études ont démontré que certaines variations au niveau de E2 augmentaient le potentiel d'immortalisation du type 16, comme discuté précédemment (Romanczuk *et al.*, 1992; Terry et Cuzick, 1997).

### **6. Les variantes SK :**

Plusieurs études portant sur des types de VPH plus prévalents que le VPH-33, ont postulé que les femmes VIH-séropositives ou avec un cancer du col invasif, étaient susceptibles d'être infectées par plusieurs variantes à la fois. Cependant, dans notre projet, toutes les patientes de nos cohortes, dont nous avons analysé des spécimens consécutifs, étaient infectées par la même variante, indiquant une persistance de l'infection (Aho *et al.*, 2004; Gagnon *et al.*, 2004). L'absence d'erreur de la polymérase durant le séquençage de nos spécimens s'explique par le fait que d'une part, son taux d'erreur est très faible et d'autre part que la taille des fragments analysés au sein de cette étude était courte. Le même phénomène avait été observé dans d'autres études (Mayrand *et al.*, 2000; Schlecht *et al.*, 2001).

Aucune association n'a été établie entre le polymorphisme des régions de E6, E7 et E2 et la présence de HSILs et cela peut être attribué au fait que nous ne disposions pas d'un nombre suffisant de patientes pour pouvoir trouver une association statistiquement significative, et ce, même lorsqu'on examinait individuellement les mutations d'une part et les variantes d'autre part. Pour remédier à cela, nous avons tout d'abord cherché à investiguer l'association entre les variantes prototypiques et non prototypiques pour chacune des régions analysées et, là encore, aucune association n'a pu être mise en évidence. Nous avons, par ailleurs, tenté d'examiner s'il existait une relation entre les variantes que nous avons nommées SK et qui étaient au nombre de 25 incluant le prototype, et la présence de HSILs. Ces variantes sont en fait, le résultat de la combinaison des différentes variantes prototypiques et non prototypiques de chacune des variantes du LCR, E6 et E7. En regroupant ces dernières, nous avons constaté que toutes les variantes prototypiques de la région du LCR coségrégèrent avec les variantes prototypiques des gènes E6 et E7 et constituaient des variantes SK prototypiques. Cela nous permettait ainsi de classer quelques variantes des gènes analysés à partir d'une variante d'un autre gène. Nous n'avons pas trouvé d'association entre les SK et les SILs sauf pour la variante SK7 qui était associée avec les HSILs. D'autre part, SK9 était plus fréquente au Brésil qu'au Canada, et la variante SK7 associée à la variante LCR 12 semble n'être présente que chez les femmes brésiliennes.

En observant la distribution phylogénétique de chacune des variantes SK, on remarque que l'arbre phylogénétique généré à partir de la séquence combinée des régions du LCR, E6 et E7, possède une forme dichotomique similaire à celle observée pour les types autres que 16 et 18 (Chan et *al.*, 1992; Giannoudis et Herrington, 2001; Chan et *al.*, 2002; Aho et *al.*, 2003; Calleja-Macias et *al.*, 2004; Gagnon et *al.*, 2004; Calleja-Macias et *al.*, 2005). Des études ont rapporté qu'il y'avait une association entre les types 16, 18 et 52 et l'ethnicité mais dans notre cas, seule une variante, SK9 était plus fréquemment détectée chez les femmes brésiliennes que chez les femmes canadiennes. Le prototype SK tendait à être plus prévalent chez les patientes canadiennes que chez les femmes brésiliennes mais ce fait ne s'est pas avéré statistiquement significatif pour nous permettre de confirmer cette théorie. Nonobstant, la variante 33-E2-1 était statistiquement plus prévalente au Brésil qu'au Canada ( $p=0,009$ ).



Afin d'en savoir plus sur la phylogénie du VPH-33 et de pouvoir établir une association claire avec l'ethnicité, il serait intéressant d'entreprendre une étude regroupant des isolats provenant de différentes régions à travers le monde comme des études l'ont fait pour les types plus prévalents.

## CONCLUSION

Très peu d'études de polymorphisme ont été entreprises au niveau des gènes E6, E7 et encore moins au niveau de E2 chez les types de VPH autres que les VPH-16 et -18. La présente étude est la seconde étude exhaustive portant sur l'analyse du polymorphisme du VPH-33, le gène E2 étant, pour la première fois, analysé de manière aussi approfondie pour ce type. Ajoutons à cela que l'analyse des variations génomiques de ce type de VPH a été investiguée chez des femmes exclusivement VIH-séronégatives et que la présente recherche a été menée auprès de patientes provenant de plusieurs études internationales regroupant près de 5400 sujets. Tout comme on l'a observé dans l'étude effectuée en 2004 (Gagnon et *al.*, 2004), nous avons retrouvé la perte de la duplication de 78 pb dans la région du LCR de quatre variantes.

Dans cette étude, nous avons ainsi pu répondre à nos hypothèses de départ en caractérisant de nouvelles variantes, considérant le nombre plus important de spécimens testés, sans compter que nous avons pu retrouver la fameuse mutation à la position 355 présente chez la variante L83V décrite préalablement chez le VPH-16 et -52 à la position 350 du gène E6. Aucune association n'a été établie entre les mutations ou les variantes individuelles de chacune des régions analysées avec la présence des HSILs sauf pour la variante SK7 (formée par la variante 33-LCR-12 et prototypique pour E6 et E7).

Nous avons également pu générer un arbre phylogénétique à partir des nouvelles variantes SK qui résultaient de la combinaison des variantes individuelles des régions du LCR, E6 et E7. Cet arbre avait pour objectif de nous renseigner sur la diversité intratypique du VPH-33 mais ne permettait pas d'établir une association avec l'ethnicité. Cela étant dit, les statistiques ont démontré que la variante SK prototypique tendait à être plus prévalente au Canada qu'au Brésil mais sans association statistiquement significative et que la variante SK9 semblait clairement plus présente au Brésil qu'au Canada.

D'un point de vue de la variabilité génomique, la région du LCR était la plus variable mais en termes de cadre de lecture, le gène E2 était nettement plus polymorphique que les deux autres gènes analysés, E6 et E7.

Enfin, nous avons retrouvé la même variante moléculaire dans les spécimens consécutifs des patientes infectées avec le VPH-33, indiquant une persistance de l'infection par ce type comme démontrée dans l'étude réalisée en 2004 (Gagnon et *al.*, 2004).

L'intérêt de cette étude aura été, dans un premier temps, de fournir de nouveaux éléments relatifs au VPH-33 au niveau duquel très peu d'études ont été effectuées à ce jour, comme l'étude du polymorphisme du gène L1 de la capside, ou une autre étude décrivant de manière plus approfondie la région du LCR, les gènes E6 et E7 au sein même de notre laboratoire en 2004. Cette étude aura également permis de compléter la première investigation en tentant, cette fois, de mettre en évidence des associations entre le polymorphisme de ce type de VPH avec, non pas la persistance, mais la présence de HSILs. Nous avons également confirmé qu'il est essentiel d'examiner le rôle du polymorphisme de types autre que le VPH-16 afin de mieux comprendre l'histoire naturelle et les facteurs prédisposant aux HSILs et au cancer du col de l'utérus.

Pour ce qui concerne la suite des événements, l'étude de l'intégration du VPH-33, qui peut également constituer un marqueur de prédiction de la progression des lésions du col, est actuellement sous investigation dans notre laboratoire chez les mêmes patientes analysées dans la présente étude, et les résultats devraient être publiés sous peu. Ils devraient ainsi pouvoir nous indiquer s'il existe une association entre la charge virale totale ou intégrée du VPH-33 et la présence des HSILs.

# BIBLIOGRAPHIE

## Revues scientifiques

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

Aho, J., Hankins, C., Tremblay C, Forest P, Pourreaux K, Rouah F, Coutlee F; The Canadian Women's HIV Study Group: Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J Infect Dis*. 2004; 190(1):46-52.

Aho J, Hankins C, Tremblay C, Lang F, Forest P, Pourreaux K, Rouah F, Coutlee F; The Canadian Women's HIV Study Group: Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *J Infect Dis*. 2003; 188(10):1517-27.

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

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

- Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB: Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J.* 1993; 12(11):4317-24.
- Baseman, J. G., et Koutsky, L. A., 2005: The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 32(1): 16-24.
- Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G: A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature*.1986; 321(6067):246-9.
- Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Parmenter CA, Jordan SW, Stidley CA, McPherson RS, Dorin MH: Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA*. 1994 ;271(15):1181-8.
- Bellanger S, Demeret C, Goyat S, Thierry F: Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J Virol*. 2001; (16):7244-51.
- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M: The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol*. 1989; 63(10):4317-24.
- Bernard HU: Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends Microbiol* 1994; 2: 140 - 143.
- Bernard HU: The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005;32:1:S1-6.

- Bernard HU, Chan SY, Delius H: Evolution of papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;186:33-54.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM: Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994; 170(5):1077-85. Erratum in: *J Infect Dis* 1996; 173(2):516.
- Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A: Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer.* 1994;56(5):640-5.
- Bhattacharjee B, Sengupta S: HPV16 E2 gene disruption and polymorphisms of E2 and LCR: some significant associations with cervical cancer in Indian women. *Gynecol Oncol.* 2006; 100(2):372-8.
- Bosch FX, de Sanjose S: Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):3-13.
- Bosch FX, de Sanjose S: Human papillomavirus and cervical cancer- burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003:3-13.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-265
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV : Prevalence of human papillomavirus DNA in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.

- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984; 3 (5):1151-7.
- Boyd JT, Doll R: A study of the aetiology of carcinoma of the cervix uteri. *Br J Cancer* 1964;18:419-434.
- Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, et al: Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 130:486-496, 1989.
- Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldana HA: Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology.* 2004 20;319(2):315-23.
- Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Chu TY, Cubie HA, Cuschieri K, von Knebel-Doeberitz M, Martins CR, Sanchez GI, Bosch FX, Munoz N, Bernard HU: Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2005;79(21):13630-40.
- Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J: Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer.* 1999;83(4):449-55.

- Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Xu LY, Cheng AF: Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Infect Dis.* 2002;186(5):696-700.
- Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H: Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol.* 1992 ;66(10):5714-25.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, ter Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, et al: Molecular variants of human papillomavirus-16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J. Virol.* 1992;66:2057-2066
- Chaturvedi AK, Brinkman JA, Gaffga AM, Dumestre J, Clark RA, Braly PS, Dunlap K, Kissinger PJ, Hagensee ME: Distribution of human papillomavirus type 16 variants in human immunodeficiency virus type 1-positive and -negative women. *J Gen Virol.* 2004;85:1237-41.
- Chen SL, Mounts P: Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J Virol.* 1990;64(7):3226-33.
- Christensen ND, Hopfl R, DiAngelo SL, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW: Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol.*;75:2271-6.



- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S: Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 7;89(1):101-5.
- Cohen BD, Lowy DR, Schiller JT: Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J Virol*. 1990;64(7):3226-33.
- Cole ST, Streeck RE: Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *J Virol*. 1986;58(3):991-5.
- Crum CP, Nuovo G, Friedman D, Silverstein SJ: Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *J Virol*. 1988;62(1):84-90.
- Cullen AP, Reid R, Campion M, et al : Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991; 65:606–12.
- Culp, TD., Christensen, ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 2004;319:152-61.
- Cuzick J: Viral load as a surrogate for persistence in cervical human papillomavirus infection. In: Franco E, Monsonego J, eds. *New developments in cervical cancer screening and prevention*. Oxford:Blackwell, 1997. 373–8.
- Cuzick J, Terry G, Ho L, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan I: Association between high-risk HPV types, HLA DRB1\* and DQB1\* alleles and cervical cancer in British women. *Br J Cancer*. 2000;82(7):1348-52.

- Da Costa, M. M., Hogeboom, C. J., Holly, E. A. & Palefsky, J. M: Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J Infect Dis* 2002;185, 1229–1237.
- Daling JR, Madeleine MM, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Ashley R, Schwartz SM, Beckmann AM, Hagensee ME, Mandelson MT, Galloway DA: The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(7):541-8.
- Danos O, Katinka M, Yaniv M: Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: A novel type of genome organization among Ppovaviridae. *EMBO J* 1982;1:231-6.
- Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, et al : Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1992;73:2327–36
- David-Cordonnier MH, Hamdane M, D'Halluin JC: c-Myb protein binds to the EP element of the HBV enhancer and regulates transcription in synergy with NF-M. *Biochim Biophys Acta.* 1999 7;1446(1-2):82-92.
- Deau MC, Favre M, Jablonska S, Rueda LA, Orth G: Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(11):2918-26.
- Deau MC, Favre M, Orth G: Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes. *Virology.* 1991;184(2):492-503.

- de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Kolkman-Uljee S, Fleuren GJ: Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol.* 2004;94(2):488-94.
- De Geest, K., Turyk, ME., Hosken, MI., Hudson, JB., Laimins, LA., Wilbanks, GD: Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 1993;49:303-10.
- Desaintes C, Demeret C: Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol.* 1996;7(6):339-47.
- Desaintes C, Hallez S, Van Alphen P, Burny A: Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1992;66(1):325-33.
- de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, et al. : Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities : results of a 5-year follow-up study. *Gynecol Oncol* 1992; 44:33-39.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004 20;324(1):17-27.
- Dhar R, McClements WL, Enquist LW, Vande Woude GF: Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(7):3937-41.
- Dillner J, Kallings I, Brihmer C, Sikstrom B, Koskela P, Lehtinen M, Schiller JT, Sapp M, Mardh PA: Seropositivities to human papillomavirus types 16, 18, or 33 capsids and

to *Chlamydia trachomatis* are markers of sexual behavior. *J Infect Dis.* 1996;173(6):1394-8.

Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, Pfister H: Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer.* 1994 15;58(6):803-8.

Doorbar, J: The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.

Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford. 1991: Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-827

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(12):3812-5.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989 17;243(4893):934-7.

Egawa, K: Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 2003; 207:251-4.

Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K, Wright TC Jr: Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA.* 2000 23;283(8):1031-7.

Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, et al: The association of an HPV16 oncogene

variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med.* 1995;1(5):464-70.

Eluf-Neto, J.m M. Booth, N. Munoz, F. X. Bosch, C. J. L. M. Meijer, and J. M. M. Walboomers: Human papillomaviruse and invasive cervical cancer in Brazil. *Br. J. Cancer.* 1994; 69:114-119.

Eriksson A, Herron JR, Yamada T, Wheeler CM: Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol.* 1999;80:595-600.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NAJ: Identification of the alpha<sub>6</sub> integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71: 2249 – 2456.

Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Gostout BS, Cheung TH, Chung TK, Fu WY, Smith DI: Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene.* 2003;22(46):7233-42.

Ferenczy A, Franco E: Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002;3(1):11-6.

Fey MC, Beal MW: Role of human papilloma virus testing in cervical cancer prevention. *J Midwifery Womens Health.* 2004;49(1):4-13.

Franco EL, Schlecht NF, Saslow D: The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J.* 2003;9(5):348-59.

- Franco EL, Villa LL, Richardson H, Rohan T, Ferenczy A: Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. In: Franco EL, Monsonégo J, editors. *New developments in cervical cancer screening and prevention*. Oxford (UK): Blackwell Science; 1997. p. 14-22.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M et al: Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180(5):1415-23.
- Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K: Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes*. 1994;(1):85-92.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA: Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997;11(16):2090-100.
- Gagnon, S., C. Hankins, C. Tremblay, K. Pourreaux; The Canadian Women's HIV study Group, and F. Coutlée: Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect Dis*. 2004;190(9):1575-85.
- Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M: Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol*. 1988;62(11):4321-30.
- Garcia-Closas R, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA: The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J Cancer*. 2005 ;117(4):629-37.

- Giannoudis A, Duin M, Snijders PJ, Herrington CS: Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br J Cancer*. 2001;84(8):1058-63.
- Giannoudis A, Herrington CS: Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol*. 2001;193(3):295-302.
- Giovane C, Trav G, Briones A, Lutz Y, Wasylyk B, Weiss E: Targetting of the N-terminal domain of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with monomeric ScFvs blocks the E6-mediated degradation of cellular p53. *J Mol Recognit*. 1999;12(2):141-52.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, RE., Sapp, M: Human papillomavirus infection requires cell surface heparin sulphate. *J Virol* 2001; 75:1565-70.
- Gissmann L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H: Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol*. 1984;83:26s-28s.
- Goldstein DJ, Schlegel R: The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus binds to a 16 kd cellular protein. *EMBO J*. 1990;9(1):137-145
- Goodwin EC, DiMaio D: Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12513-8.
- Gregoire L, Lawrence WD, Kukuruga D, Eisenbrey AB, Lancaster WD: Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. *Int J Cancer*. 1994;57(4):504-7.
- Groopman J: Contagion. *The New Yorker*. 1999:44-49

- Gruss P, Dhar R, Khoury G: Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(2):943-7.
- Hatch EE, Herbst AL, Hoover RN, Noller KL, Adam E, Kaufman RH, Palmer JR, Titus-Ernstoff L, Hyer M, Hartge P, Robboy SJ: Incidence of squamous neoplasia of the cervix and vagina in women exposed prenatally to diethylstilbestrol (United States). *Cancer Causes Control*. 2001;12(9):837-45.
- Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD: Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int J Cancer*. 1995;60(3):369-76.
- Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K: Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4442-6.
- Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H: Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol*. 1995;33(7):1746-1754.
- Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Hutchinson, M., Morales, J., et al: Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(6):464-74.
- Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD: Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(4):315-8.



- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al: The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993;67(11):6413-23.
- Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU: Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol.* 1991;29(9):1765-72.
- Horwitz BH, Burkhardt AL, Schlegel R, DiMaio D: 44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Mol Cell Biol.* 1988;8(10):4071-8.
- Howes LA, Ransom N, Papermaster DF, et al.: Apoptosis of retinoblastoma : Alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Gene Dev* 1994; 8:1300-1310.
- Hughes FJ, Romanos MA: E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(25):5817-23.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM: Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* 1993;13(2):775-84.
- Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, et al : Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer* 1996;77:2275-9.

- Giri I, Yaniv M: Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J.* 1988;7(9):2823-9.
- Jeon S, Lambert PF: Integration of HPV 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6/E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 1654-1658.
- Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCance DJ: Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol.* 1992;66(3):1329-35.
- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllenstein UB: Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000; 355:2189 –93.
- Judson FN. 1992: Interactions between human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections. *Scientific Publications* 119: 199–207.
- Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B: Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol.* 1998;17(2):146-53.
- Kalakun L, Bozzetti MC: Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the state of Rio Grande de Sul, Brazil. *Cas Saude Publica*, 2005 (1):299-309.
- Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H: Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol.* 2000 ;81(Pt 8):1975-81.

- Kanato M, Saranritti K: Early experience of sexual intercourse: a risk factor for cervical cancer requiring specific intervention for teenagers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006. 7(1):151-3
- Khan MJ, Partridge EE, Wang SS, Schiffman M: Socioeconomic status and the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer*. 2005;104(1):61-70.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT: Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):12180-4.
- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT: Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*. 1993;67(12):6929-36.
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M: Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(21):11612-6.
- Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T, Dillner J : Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*. 2000;82(7):1332-8.
- Korodi Z, Dillner J, Jellum E, Lumme S, Hallmans G, Thoresen S, Hakulinen T, Stattin P, Luostarinen T, Lehtinen M, Hakama M: Human papillomavirus 16, 18, and 33 infections and risk of prostate cancer: a Nordic nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(12):2952-5.

- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al: A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327(18):1272-8.
- Kreider JW, Howett MK, Stoler MH, Zaino RJ, Welsh P. Susceptibility of various human tissues to transformation in vivo with human papillomavirus type 11. *Int J Cancer* 1987; 39: 459-465.
- Kreiss JK, Kiviat NB, Plummer FA, Roberts PL, Waiyaki P, Ngugi E, Holmes KK: Human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and cervical intraepithelial neoplasia in Nairobi prostitutes. *Sex Transm Dis.* 1992;19(1):54-9.
- Kurman RJ, Solomon D: *The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnosis.* Springer-Verlag, NY, 1994.
- Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S: Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer.* 2000;36(11):1402-10.
- Lacey JV Jr, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Greene SM, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Silverberg SG, Hildesheim A: Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(12):1079-85.
- Lagrange M, Charbonnier S, Orfanoudakis G, Robinson P, Zanier K, Masson M, Lutz Y, Trave G, Weiss E, Deryckere F: Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 4):1001-7.

- Le Cann, P., P. Coursaget, S. Iochmann, and A. Touzé. 1994: Self-Assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 117:269-274.
- Lee GJ, Chung HW, Lee KH, Ahn HS: Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Korean Med Sci.* 2005;20(2):267-72
- Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, Mei Q, Ke Y : p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China. *Cancer.* 2002;95(12):2571-6.
- Lizano, M., J. Berumen, M.C. Guido, L. Casas, and A. Garcia-Carranca: Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer [published erratum appears in *J Natl Cancer Inst* 1997 Oct 1;89(19):1460]. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1227-1231.
- Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A: Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer.* 1996;69(5):364-8.
- Loo YM, Melendy T: Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol.* 2004;78(4):1605-15.
- Lorincz AT, Reid R, Bennett-Jenson A, *et al.* Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79: 328-37.
- Luo X, Sawadogo M: Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(3):1308-13.

- Luscher-Firzlaff JM, Westendorf JM, Zwicker J, Burkhardt H, Henriksson M, Muller R, Pirollet F, Luscher B: Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene*. 1999;18(41):5620-30.
- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML: Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 (11):1183-91.
- Marte C, Kelly P, Cohen M, Fruchter RG, Sedlis A, Gallo L, Ray V, Webber CA: Papanicolaou smear abnormalities in ambulatory care sites for women infected with the human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(4):1232-7.
- Martin P, Vass WC, Schiller JT, Lowy DR, Velu TJ: The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell*. 1989;59(1):21-32.
- Matsukura T, Kanda T, Furuno A, Yoshikawa H, Kawana T, Yoshiike K: Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J Virol*. 1986 (3):979-82.
- Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, de Ladurantaye M, Roger M: Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin Microbiol*. 2000 (9):3388-93.
- Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E: Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochem J*. 2001;356:247-56.

- McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA: Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol.* 1993;67(6):3142-50.
- Meinke W, Meinke GC: Isolation and characterization of the major capsid protein of bovine 1 papilloma virus type 1. *J Gen Virol.* 1981;52:15-24.
- Middleton, K., Peh, W., Southern, SA., Griffin, HM., Sotlar, K., Nakahara, T., et al: Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003;77:10186-201.
- Moscicke AB et al. 1999: Risk factors for abnormal anal cytology in young heterosexual women. *J Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(2): 173–178.
- Munoz N: Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology* 2000; 19: 1-5.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al: The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992;52(5):743-9.

- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Vergara A, del Moral A, Munoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, et al: Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993;2(5):423-31.
- Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group: Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002;359(9312):1093-101.
- Murao K, Kubo Y, Fukumoto D, Matsumoto K, Arase S: Verrucous carcinoma of the scalp associated with human papillomavirus type 33. *Dermatol Surg.* 2005;31(10):1363-5.
- Myers G, Bernard H-U, Delius H, Favre M, Icenogel J, Van Ranst M, Wheeler C: Human papillomaviruses a compilation of and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. 1<sup>st</sup> ed. Los Alamos, USA: Theoretical Biology and biophysics group T-10, Los Alamos National Laboratory.
- Narechania A, Terai M, Burk RD: Overlapping reading frames in closely related human papillomaviruses result in modular rates of selection within E2. *J Gen Virol.* 2005;86(5):1307-13.
- O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU: represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol.* 1996;70(10):6529-39.
- Orth G, Favre M, Croissant O: Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977;24(1):108-20.
- Pan H, Griep AE: Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev.* 1995;9(17):2157-69.



- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ: The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 1999;18(9):2449-58.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ: Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2000;275(10):6764-9.
- Park TW, Fujiwara H, Wright TC: Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer.* 1995;76:1902-13.
- Peitsaro P, Hietanen S, Johansson B, Lakkala T, Syrjanen S: Single copy heterozygote integration of HPV 33 in chromosomal band 5p14 is found in an epithelial cell clone with selective growth advantage. *Carcinogenesis.* 2002;23(6):1057-64.
- Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S: Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):886-91.
- Penrose KJ, McBride AA: Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol.* 2000;74(13):6031-8.
- Piccini A, Storey A, Massimi P, Banks L: Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify multiple regions of the protein involved in binding to E1. *J Gen Virol.* 1995;76:2909-13.

- Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, Banks L: Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene*. 1994;9(7):1869-76.
- Rebrikov DV, Bogdanova EA, Bulina ME, Lukianov SA: A new planarian extrachromosomal chromosome virus-like element revealed by subtractive Hybridization. *Mol Biol* 2002;36:813-20.
- Reid R: Biology and colposcopic features of human papillomavirus-associated cervical disease. *Obstet Gyn Clin North Am* 1993; 20:123-149.
- Rheinwald JG, Green H: Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 1977;265(5593):421-4.
- Reshkin, S.J, Bellizzi, A., Caldeira, S., Albarani, V. et al : Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J*. 2000;14, 2185-2197.
- Roden RBS, Kirnbauer R, Jensen AB, et al.: Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* 1994;68:7260-7266.
- Romanczuk H, Howley PM: Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):3159-63.
- Romanczuk H, Villa L L, Schlegel R, Howley P M: The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol*. 1991; 65(5): 2739-2744.

- Rose BR, Thompson CH, Zhang J, Stoeter M, Stephen A, Pfister H, Tattersall MH, Cossart YE: Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV 18 isolates from cervical cancers. *Gynecol Oncol.* 1997;66(2):282-9.
- Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ: p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet.* 1998;352(9131):871-2.
- Rousseau MC, Trevisan A, Villa L, Rohan T, Franco E: Viral load as a predictor of HPV infection persistence among women in the Ludwig-McGill cohort study in Sao Paulo, Brazil. In: *Proceedings of the 19th International Papillomavirus Conference, Florianopolis.* 2001.
- Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, John S, Chandy G : Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia. *Mol Diagn.* 2004;8(1):57-64.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, et al: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(12):958-64.
- Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL: Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA.* 2001;286(24):3106-14.
- Shlegel R, Phelps WC, Zhang YL, Barbosa M: Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 1988;7 3181-3187.

- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985;314(6006):111-4.
- Seif I, Khoury G, Dhar R: The genome of human papovavirus BKV. *Cell*. 1979 (4):963-77.
- Sellers JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, et al: Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *Can Med Assoc J* 2000;163(5):503-8.
- Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, Schiffman M: Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 (10):1038-44.
- Shields TS, Brinton LA, Burk RD, Wang SS, Weinstein SJ, Ziegler RG, Studentov YY, McAdams M, Schiffman M: A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(10):1574-82.
- Schmidt M, Kedzia W, Gozdzicka-Jozefiak A: Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol*. 2001;23(1-2):65-77.
- Sichero L, Franco EL, Villa LL: Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis*. 2005;191(5):739-42.

- Smotkin D, Wettstein FO: Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in cervical cancer and a cervical cancer derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4684-9.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Raaphorst PM, Meijer CJ, Walboomers JM: Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6\* transcript species which are terminated at different early region poly(A) sites. *J Virol*. 1992;66(5):3172-8.
- Song S, Liem A, Miller JA, Lambert PF: Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology*. 2000;267(2):141-50.
- Srivatsan ES, Chakrabarti R, Zainabadi K, Pack SD, Benyamini P, Mendonca MS, Yang PK, Kang K, Motamedi D, Sawicki MP, Zhuang Z, Jesudasan RA, Bengtsson U, Sun C, Roe BA, Stanbridge EJ, Wilczynski SP, Redpath JL: Localization of deletion to a 300 Kb interval of chromosome 11q13 in cervical cancer. *Oncogene*. 2002;21(36):5631-42.
- Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM: Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol*. 1996;70(5):3127-36.
- Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J: Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*. 1996;70(10):6987-93.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L: Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998;393(6682):229-34.

- Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER: Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol.* 2005;96(3):695-700.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP: Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):1030-4.
- Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM: The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6439-45.
- Terry G, Ho L, Cuzick J: Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer.* 1997;73(5):651-5.
- Thierry F, Yaniv M: The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* 1987;6(11):3391-7.
- Thomas M, Banks L: Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene.* 1998;17(23):2943-54.
- Tornesello ML, Duraturo ML, Salatiello I, Buonaguro L, Losito S, Botti G, Stellato G, Greggi S, Piccoli R, Pilotti S, Stefanon B, De Palo G, Franceschi S, Buonaguro FM: Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J Med Virol.* 2004;74(1):117-26.
- Turek LP: The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res* 1994;44:305-56.

- Van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM: Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol.* 2000;81:317-25.
- Veress G, Murvai M, Szarka K, Juhasz A, Konya J, Gergely L: Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer.* 2001;37(15):1946-52.
- Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H: Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol.* 1999;80:1035-43.
- Villa LL, Schlegel R: Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology* 1991;181:374-7.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL: Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000;81:2959-68.
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R: Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol.* 2001;75(9):4467-72.
- Vousden KH, Jat PS: Functional similarity between HPV16E7, SV40 large T and adenovirus E1a proteins. *Oncogene.* 1989;4(2):153-8.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.

- Wank R, Thomssen C: High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature*. 1991;352(6337):723-5.
- Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR: Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):2009-14.
- Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR: Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. *Int J Cancer*. 2002 20;97(6):868-74.
- White A, Livanos EM, Tlsty TD: Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994; 8:666-667.
- Woodman, C. B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., et al: Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357(9271):1831-6.
- Wu X, Levine AJ: p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(9):3602-6.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB: Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1997 4;89(11):796-802.
- Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Yamada M, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Shiromizu K, Fujii T, Taketani Y: Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical



intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett.* 2001;170(1):19-24.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM: Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol.* 1997;71(3):2463-72.

Yaniv M, Cereghini S: Structure of transcriptionally active chromatin. *CRC Crit Rev Biochem.* 1986;21(1):1-26.

Yap EH, Ho TH, Chan YC, Thong TW, Ng GC, Ho LC, Singh M: Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patients. *Genitourin Med.* 1995;71(6):402-4.

Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, Adami HO, Gyllensten UB, Melbye M: Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2194-8.

Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI: The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;158(1):27-34.

Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K: Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer.* 2000;7(1):33-6.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M: p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6

genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res.* 2001  
15;61(2):608-11.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M: Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 1998;58(4):829-33.

Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM: Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology* 1999;263:388-94.

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

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

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

### **Mannuels de référence**

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Virology, Third Edition.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

Pathologic basis of disease. Robbin SL, Cotran RS, Kumar V. *5<sup>th</sup> Edition.* Philadelphia: Saunders Company, 1994.

**Sites Internet:**

Agence de Santé Publique du Canada

[http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccsic-dccuac/exec\\_f.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccsic-dccuac/exec_f.html)

American Cancer Society

<http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp>

Organisation Mondiale de la Santé

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

Cancer Research UK

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/specificcancers/cervicalcancer?version=2>

Reproline

[http://www.reproline.jhu.edu/english/3cc/3refman/cxca\\_hpv2.htm](http://www.reproline.jhu.edu/english/3cc/3refman/cxca_hpv2.htm)

International Agency for Research on Cancer

<http://screening.iarc.fr/cervicalindex.php?lang=2>

123bio.net : Biologie et Recherche

<http://www.123bio.net/>

**Autres:**

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomaviruses. Vol. 64. Lyon (France): IARC; 1995.

International Agency for Research on Cancer (IARC),2006. Sous presse.

Papillomavirus Nomenclature Committee. 1995 (14<sup>th</sup> International Papillomavirus Conference, Quebec City, Quebec Canada).

Hiller T, Iftner T: *The human papillomavirus* In: The Health Professional's «HPV Handbook» 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Editors-in-Chief: Prendiville W, Davies P, Taylor&Francis Group, New York, ISBN 1-84214-336-0, 2004.

Radio Canada. Sciences et santé. Cancer du col de l'utérus : Le vaccin préventif autorisé au Canada. 18 juillet 2006. <http://radio-canada.ca/nouvelles/Science-Sante/2006/07/18/001-uterus-vaccin-canada.shtml>