



**HAL**  
open science

# Détection moléculaire des papillomavirus humains dans les tissus sains et tumoraux des cancers de l'oropharynx

Bérangère Dessaigne

► **To cite this version:**

Bérangère Dessaigne. Détection moléculaire des papillomavirus humains dans les tissus sains et tumoraux des cancers de l'oropharynx. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00637303

**HAL Id: dumas-00637303**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00637303v1>**

Submitted on 31 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2011

N°

**Détection moléculaire des papillomavirus humains  
dans les tissus sains et tumoraux des cancers de l'oropharynx.**

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Bérangère DESSAIGNE

Née le 10 juillet 1983

A Clermont-Ferrand

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 20 Octobre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Madame le Professeur Muriel CORNET

Membres : Monsieur le Professeur Patrice MORAND  
Monsieur le Professeur Christian RIGHINI  
Madame le Docteur Claire FAURE

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**  
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

### Année 2010-2011

#### PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
<b>BOUMENDJEL</b>	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>BURMEISTER</b>	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
<b>CORNET</b>	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)- <i>À partir du 1<sup>er</sup> mai</i>
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
<b>DROUET</b>	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
<b>GRILLOT</b>	René	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
<b>LENORMAND</b>	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
<b>MOSSUZ</b>	Pascal	Hématologie (PU-PH) - <i>À partir du 1<sup>er</sup> mai</i>
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>SEVE</b>	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
<b>ROUSSEL</b>	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
<b>WOUESSIDJEW</b>	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

#### ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

<b>BUSSER</b>	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
<b>MONNERET</b>	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

#### ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

<b>COLLE</b>	Pierre Emmanuel	Maître de conférence
<b>FITE</b>	Andrée	Professeur Certifié
<b>GOUBIER</b>	Laurence	professeur Certifié

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Scolarité Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Année 2010-2011

MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
<b>ALLENET</b>	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
<b>BATANDIER</b>	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
<b>BRETON</b>	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
<b>BRIANCON-MARJOLLET</b>	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>BUDAYOVA SPANO</b>	Monika	Biophysique (I.B.S)
<b>CAVAILLES</b>	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>DELETRAZ-DELPORTE</b>	Martine	Droit Pharmaceutique
<b>DEMEILLIERS</b>	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>GERMI</b>	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>GUIEU</b>	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
<b>JOYEUX-FAURE</b>	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
<b>KHALEF</b>	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
<b>MOUHAMADOU</b>	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>MELO DE LIMA</b>	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
<b>PERES</b>	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>PEUCHMAUR</b>	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>PINEL</b>	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
<b>RACHIDI</b>	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>SOUARD</b>	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>TARBOURIECH</b>	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>VILLET</b>	Amick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

**ATER (n= 5)**

<b>DEFENDI Frédérica</b>	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
<b>GRATIA Séverine</b>	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
<b>REGENT Myriam</b>	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
<b>ROSSI Caroline</b>	ATER	Anglais Master ISM (JR)
<b>RUFFIN Emilie</b>	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
<b>SAPIN Emilie</b>	ATER	Physiologie Pharmacologie (HP2)

**MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)**

<b>BOUCHET</b>	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
<b>DUCAROUGE</b>	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>FAVIER</b>	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>GRAS</b>	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
<b>HAUDECOEUR</b>	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
<b>LESART</b>	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
<b>POULAIN</b>	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

**PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)**

<b>BELLET :</b>	Béatrice	Pharmacie Clinique
<b>RIEU</b>	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
<b>TROUILLER</b>	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

## **Remerciements**

### **A Madame le Professeur Muriel Cornet, Présidente de thèse**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que présidente du jury.

### **A Monsieur le Professeur Patrice Morand, Directeur de thèse**

Merci à vous d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié les deux semestres passés au Laboratoire de Virologie, notamment grâce à votre bonne humeur, mais aussi grâce à votre rôle de fournisseur officiel de tablettes de chocolat et grâce à vos petites réflexions toujours très subtiles (ah les bottes bleues !).

### **A Monsieur le Professeur Christian Righini**

Je vous remercie de juger ce travail en tant que clinicien. Merci pour votre aide dans le recueil des données cliniques des patients et pour le temps que vous m'accordez en faisant partie de ce jury.

### **A Madame le Docteur Claire Faure**

Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'avoir pris de votre temps pour la relecture des lames d'anatomo-pathologie.

Je remercie également l'ensemble des biologistes du laboratoire de Virologie : Monique et Christine pour les pauses avec dégustation de thé et les midi-piscine, Raphaële, Anne, Sylvie et Julien.

Je tiens à dire un merci tout particulier à mes collègues de bureau qui m'ont supportée durant de longs mois : Claire pour ses explications cliniques passionnées et pour ses imitations de Margot, Cécile pour le partage de nos questions existentielles (et nous en avons beaucoup...), Gautier pour son humour ravageur et Nicolas solidaire de thèse.

Un énorme merci à l'ensemble des technicien(ne)s du laboratoire : elles (et un peu ils) ont rendu mes deux semestres en virologie inoubliables avec des repas gargantuesques associés à des régimes Dukan, des chansons françaises cultes dans le P2 et surtout une bonne humeur permanente. Un merci particulier à Laurence et Nelly qui m'ont aidé dans mes manip.

Je tiens également à remercier mes co-internes préférés : Julie, Laetitia, Cécile et David avec qui j'ai partagé quatre années de vie grenobloise inoubliables et qui sont devenus de véritables amis : vive les bons petits restos et les soirées vins-fromages.

Merci également à l'ensemble des internes en bio grenoblois : Elodie, Stéphanie, Anne-So, Gui Roux, Gautier, Guillaume S, Saber et Pierre.

Et enfin, un merci plus qu'énorme à Maryse et Michel qui me supportent depuis 28 années et qui continuent...et à Anne (et Jérôme accessoirement !) : vous êtes indispensables.

# SOMMAIRE

<b>Introduction .....</b>	<b>12</b>
<b>Données bibliographiques.....</b>	<b>14</b>
<b>1 Biologie des papillomavirus humains .....</b>	<b>15</b>
1.1 Taxonomie.....	15
1.2 Structure .....	16
1.3 Cycle.....	17
1.4 Les protéines virales : rôle dans la carcinogenèse.....	19
1.4.1 Les protéines oncogènes E6 et E7 .....	19
1.4.2 Résumé du processus de carcinogenèse .....	21
1.5 Pouvoir pathogène .....	22
<b>2 HPV et cancers O.R.L. ....</b>	<b>23</b>
2.1 Epidémiologie des cancers O.R.L. ....	24
2.2 Rôle des HPV dans les cancers O.R.L.....	25
2.2.1 Mode de contamination .....	25
2.2.2 Pourquoi l’oropharynx ?.....	26
2.2.3 Les cancers de l’oropharynx HPV positifs : une entité à part entière .....	27
2.2.4 Particularités des populations HPV positives.....	30
2.2.5 Vaccination.....	34
2.2.6 HPV et cancer O.R.L. : en résumé .....	35
<b>3 Outils diagnostiques moléculaires.....</b>	<b>36</b>
3.1 Détection de l’ADN des papillomavirus humains.....	36
3.1.1 Le test Hybrid Capture 2® (Qiagen/Digene) .....	36
3.1.2 Amplicor HPV Test ® (Roche Diagnostics).....	37
3.2 Génotypage des papillomavirus humains .....	38
3.2.1 PCR et révélation par hybridation inverse.....	38
3.2.2 PCR et puces à ADN .....	39
3.2.3 Technologie Luminex®.....	40
3.3 Quantification de l’ADN HPV .....	41
3.4 Dosage des ARNm E6/E7 .....	41
3.4.1 NucliSENS Easy Q® HPV (Biomérieux) .....	42
3.4.2 Aptima® HPV Assay (GenProbe).....	42
3.5 Application aux cancers du col de l’utérus.....	43
3.6 Application aux cancers de l’oropharynx.....	43



<b>4</b>	<b>Sérologie HPV .....</b>	<b>45</b>
	<b>Objectifs de l'étude.....</b>	<b>47</b>
	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>49</b>
<b>1</b>	<b>Patients et prélèvements.....</b>	<b>50</b>
<b>2</b>	<b>Méthodes .....</b>	<b>51</b>
2.1	Extraction ADN et ARN des tissus .....	51
2.2	Génotypage HPV : technique INNO-LiPA HPV Genotyping <i>Extra</i> ® .....	51
2.3	Analyses statistiques.....	53
	<b>Résultats .....</b>	<b>54</b>
<b>1</b>	<b>Caractéristiques des patients.....</b>	<b>55</b>
1.1	Patients atteints d'un cancer de l'oropharynx .....	55
1.1.1	Âge et sex ratio .....	55
1.1.2	Consommation éthylo-tabagique.....	55
1.1.3	Localisation de la tumeur et stade TNM .....	56
1.2	Population témoin.....	56
<b>2</b>	<b>Fréquence des infections à HPV.....</b>	<b>57</b>
2.1	Patients atteints d'un cancer de l'oropharynx .....	57
2.2	Population témoin.....	57
<b>3</b>	<b>Comparaison des fréquences des infections à HPV au niveau des amygdales ....</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>Association HPV-cancer.....</b>	<b>58</b>
4.1	Odd-Ratio (OR) .....	58
4.2	Sensibilité, spécificité.....	59
<b>5</b>	<b>Distribution des génotypes chez les patients atteints d'un cancer .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Statut HPV et sexe, âge, consommation éthylo-tabagique, stade TNM et localisation.....</b>	<b>63</b>
6.1	Patients atteints d'un cancer de l'oropharynx .....	63
6.2	Population témoin.....	64
	<b>Discussion .....</b>	<b>65</b>
	<b>Conclusion .....</b>	<b>72</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>75</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>84</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Organisation génomique des HPV .....	16
Figure 2 : Représentation des principales étapes du cycle des papillomavirus dans l'épithélium squameux .....	18
Figure 3 : Schéma simplifié de la carcinogénèse induite par les papillomavirus de haut risque .....	21
Figure 4 : Coupe sagittale de l'oropharynx .....	26
Figure 5 : Pourcentages de carcinomes cellulaires squameux de l'oropharynx (A) et de la tête et du cou (B) induits par l'HPV .....	27
Figure 6 : Incidence standardisée sur l'âge des carcinomes cellulaires squameux des amygdales pour 100,000 habitants, Stockholm, Suède, 1970-2006.....	29
Figure 7 : Relation dose-réponse pour le tabac, l'alcool et les partenaires sexuels oraux exprimés en odd-ratios chez les patients atteints d'un cancer de la tête et du cou HPV-16 positif (haut) et HPV-16 négatif (bas) .....	31
Figure 8 : Classification du risque de décès chez des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx en fonction du statut HPV de la tumeur, de la consommation tabagique et du stade TNM. ....	33
Figure 9 : Taux de survie estimé à 5 ans en fonction de la classification par risque de décès. ....	34
Figure 10 : Principales étapes du test Hybrid Capture 2® .....	36
Figure 11 : Représentation de bandelettes INNO-LiPA.....	52
Figure 12 : Exemples de génotypage HPV de tissu sain (TS) et tissu tumoral (TT) chez 3 patients.....	60
Figure 13 : Distribution des génotypes HPV dans les tissus tumoraux et les tissus sains...	62
Figure 14 : Statut HPV et localisations des tumeurs. ....	64

## **TABLEAUX**

Tableau I : Types HPV et pouvoir oncogène .....	15
Tableau II : Principales caractéristiques des tests HPV commercialisés.....	44
Tableau III : Distribution de la population en fonction de la taille de la tumeur .....	56
Tableau IV : Distribution de la population en fonction de la présence et de la taille des adénopathies .....	56
Tableau V : Fréquence des infections à HPV .....	57
Tableau VI : Comparaison des fréquences HPV dans les amygdales .....	58
Tableau VII : Exposition à l'HPV parmi les patients atteints d'un cancer et parmi la population témoin.....	58
Tableau VIII : Distribution et correspondance entre les génotypes HPV dans les tissus tumoraux et sains.....	61
Tableau IX : Caractéristiques des 61 patients inclus dans l'étude en fonction du statut HPV.....	64

## **TABLE DES ABREVIATIONS**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ASCUS : cellules squameuses atypiques de signification indéterminée

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FDA : Food and Drug Administration

HPA : Hybridization Protection Assay

HPV : Human Papillomavirus

HR-HPV : High Risk Human Papillomavirus

IARC : International Agency for Research on Cancer

LCR : Long Control Region

LR-HPV : Low Risk Human Papillomavirus

NASBA : Nucleic Acid Sequence Based Assay

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : odd ratio

O.R.L. : Oto-Rhino-Laryngologie

PA : Paquets-Année

pb : paires de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

POL : Phase Ouverte de Lecture

pRb : protéine du rétinoblastome

RIA : Radio ImmunoAssay

TMA : Transcription Mediated Amplification

TNM : tumeur, node, métastase

VADS : Voies Aérodigestives Supérieures

VLP : Virus Like Particles

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

# **Introduction**

Les papillomavirus humains à haut risque (HR-HPV) sont des virus oncogènes responsables de la quasi-totalité des cancers du col de l'utérus ; ils sont également impliqués dans d'autres cancers de la sphère anogénitale. Leur rôle est suspecté dans des cancers de la sphère O.R.L. et notamment dans les cancers de l'oropharynx.

Les cancers O.R.L. sont fortement liés aux facteurs de risque alcool et tabac. Or, bien que les consommations éthylo-tabagiques diminuent depuis les années 1980 grâce aux stratégies de prévention mises en place, les incidences de certains de ces cancers ne cessent d'augmenter, notamment aux Etats-Unis et dans les pays scandinaves. Les cancers de l'oropharynx et en particulier des amygdales et de la base de la langue semblent être associés à des infections par les papillomavirus humains oncogènes. Ainsi, les infections par HPV pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'incidence de ces cancers.

Dans la première partie de notre étude, nous allons développer les caractéristiques biologiques des papillomavirus humains et notamment l'importance des protéines virales E6 et E7. Puis nous étudierons les spécificités des carcinomes oropharyngés liés aux HPV : l'évolution de l'épidémiologie de ces cancers, les particularités des populations atteintes. Enfin, nous ferons le point sur les techniques diagnostiques dont nous disposons actuellement pour mettre en évidence les infections à papillomavirus humains.

L'objectif de la seconde partie de notre travail est d'étudier la fréquence des infections à papillomavirus humains dans les tissus sains et tumoraux des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx. Cette étude rétrospective porte sur 62 patients hospitalisés dans le service de chirurgie O.R.L. du C.H.U. de Grenoble entre 2003 et 2007.

Le but de notre étude est de mieux comprendre l'association carcinome de l'oropharynx et papillomavirus humain oncogène.

# **Données bibliographiques**

# 1 Biologie des papillomavirus humains

## 1.1 Taxonomie

Les papillomavirus humains (HPV) sont des virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Papillomaviridae* [63]. La classification de cette famille repose sur des identités de séquences nucléotidiques codant la protéine de capsid L1 [5,27]. Actuellement, plus de 100 types de papillomavirus sont identifiés, ils sont séparés en 2 classes principales selon leur tropisme :

- Les HPV à tropisme cutané appartenant essentiellement au genre beta-papillomavirus.
- Les HPV à tropisme muqueux appartenant au genre alpha-papillomavirus.

Au sein des HPV à tropisme muqueux, on distingue, en fonction de leur pouvoir oncogénique les génotypes dits à « haut risque » possédant des propriétés de carcinogénèse (principalement HPV-16 et HPV-18), des génotypes de « bas risque » qui ne sont généralement pas impliqués dans le processus cancéreux (HPV-6, HPV-11).

Groupes	Types HPV	Commentaires
<b>Alpha HPV</b>		
1	16	Pouvoir carcinogène le plus élevé
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Carcinogènes reconnus
2A	68	Carcinogène probable
2B	26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97	Carcinogènes possibles
3	6, 11	
<b>Beta HPV</b>		
2B	5 et 8	Preuves limitées dans les cancers cutanés chez les patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme
3	Autres types beta et gamma	

**Tableau I : Types HPV et pouvoir oncogène.** Groupe 1 : pouvoir carcinogène certain. Groupe 2A : preuves concernant la pathogénicité humaine limitées mais données physiopathologiques fortes. Groupe 2B : analogies phylogénétiques mais pas de preuves de pathogénicité humaine. Groupe 3 : absence de preuves épidémiologiques et de données physiopathologiques en faveur d'un rôle carcinogène. Adapté de Bouvard [8].



## 1.2 Structure

Les papillomavirus sont des petits virus nus à capsidre à symétrie icosaédrique. Ce sont des virus à ADN bicaténaire circulaire d'environ 8000 paires de bases. Leur génome est divisé en 3 régions :

- La région codante E pour Early comporte 6 phases ouvertes de lecture (POL) codant pour les protéines précoces de fonction E1, E2, E4-E7. Ces protéines interviennent dans l'activation de la transcription, de la transformation, de la réplication et dans l'adaptation virale aux différents milieux cellulaires [11].
- La région codante L pour Late comporte 2 POL codant les protéines tardives de capsidre L1 et L2 protéines majeure et mineure de capsidre respectivement qui forment la structure du virion et facilitent l'empaquetage du génome viral et sa maturation [66].
- La région non codante LCR pour Long Control Region comporte les séquences de contrôle de la régulation virale et de la réplication.

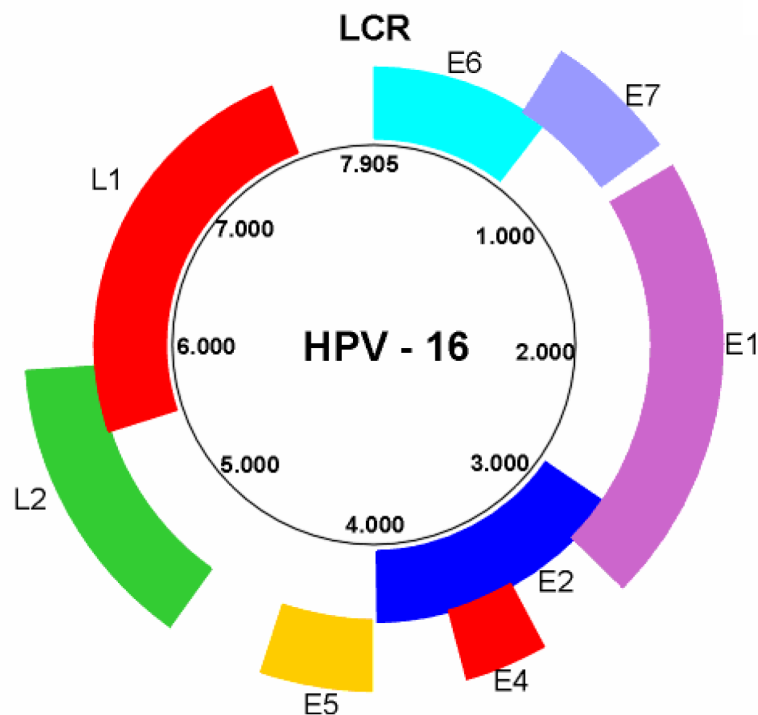


Figure 1 : Organisation génomique des HPV. Exemple de l'HPV 16.

### 1.3 Cycle

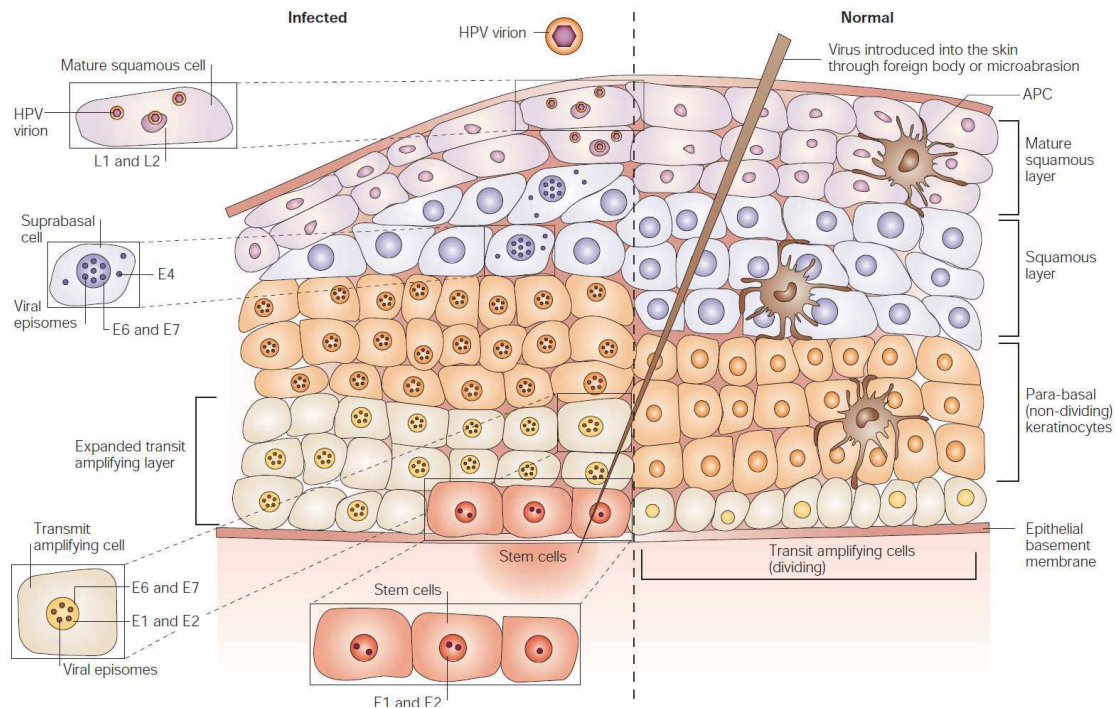
Les HPV infectent les cellules épithéliales des couches basales des muqueuses ou des épidermes [95]. Leur cycle de réplication est lié à la différenciation des kératinocytes.

Les particules virales infectieuses atteignent les cellules souches des couches basales suite à des microlésions de la muqueuse entraînant une rupture de l'épithélium stratifié [30]. Le virus est alors internalisé par endocytose puis décapsidé et l'ADN viral est transloqué au niveau du noyau de la cellule via la protéine mineure de capsid L2 [29]. Le génome viral est ainsi maintenu présent à un taux faible d'une centaine de copies sous forme d'épisomes, sans intégration dans le génome de la cellule hôte, grâce aux protéines précoces E1 et E2.

La réplication du génome viral est liée à la réplication du génome cellulaire : le génome viral se réplique avec l'ADN cellulaire au cours de la phase S [29]. Il s'agit du cycle non productif.

Les cellules filles migrent ensuite vers la couche suprabasale et entament le processus de différenciation. Les cellules suprabasales infectées par l'HPV peuvent à nouveau entrer en cycle, contrairement aux cellules normales, et ainsi permettre la poursuite de la réplication de l'ADN viral [67]. Dans les couches les plus superficielles, les protéines de capsid L1 et L2 permettent l'emballage de l'ADN viral, les virions ainsi formés sont libérés et peuvent infecter de nouvelles cellules. C'est le cycle productif.

Ce cycle est valable aussi bien pour les papillomavirus de haut risque que pour les papillomavirus de bas risque.



**Figure 2 : Représentation des principales étapes du cycle des papillomavirus dans l'épithélium squameux** : en l'absence d'infection, les cellules filles issues des cellules souches épithéliales se divisent le long de la membrane basale et mûrissent verticalement à travers l'épithélium sans division supplémentaire (partie de droite). Après infection des cellules souches basales par l'HPV, les protéines virales précoces sont exprimées, les cellules filles entrent à nouveau en division et se multiplient verticalement (partie de gauche). Dans les couches les plus superficielles, l'expression des protéines tardives structurales permet la formation et la libération des virions. Extrait de Frazer [34].

Sous l'action du système immunitaire, l'infection virale régresse le plus souvent (clairance virale) mais dans certains cas le virus peut persister soit à l'état latent sous forme d'épisomes soit sous forme intégrée au sein du génome cellulaire pour les papillomavirus muqueux de haut risque. La persistance du virus est le facteur de risque principal responsable de l'évolution vers la carcinogenèse.

## 1.4 Les protéines virales : rôle dans la carcinogénèse

### 1.4.1 Les protéines oncogènes E6 et E7

E6 et E7 sont des protéines oncogènes pouvant être surexprimées lors d'une infection par un papillomavirus de haut risque. Cette surexpression est responsable d'une perte de la régulation du cycle cellulaire et d'une immortalisation des cellules.

#### 1.4.1.1 La protéine E7

La protéine E7 des HR-HPV est une oncoprotéine de 100 acides aminés capable de former une liaison de forte affinité avec les protéines du rétinoblastome (pRb).

La protéine pRb est une protéine suppresseur de tumeur active sous forme hypophosphorylée, forme sous laquelle elle est capable de se lier au facteur de transcription E2F et de le séquestrer, elle prévient ainsi l'entrée en phase S des cellules [69] : le complexe E2F/pRb agit comme un répresseur de transcription.

Au cours d'un cycle cellulaire normal, pRb est phosphorylée par les cyclines D1/CDK4 et E/CDK2 ce qui cause la dissociation pRb/E2F, le facteur de transcription E2F est libéré et active la transcription des gènes impliqués dans la poursuite du cycle cellulaire.

Au cours d'une infection par un papillomavirus de haut risque, la protéine E7 des HPV peut se lier à pRb sous sa forme active hypophosphorylée, E7 empêche ainsi l'interaction E2F/pRb et donc l'inhibition du facteur de transcription E2F par pRb, E2F est alors exprimé de manière constitutive, le contrôle de la transition des phases G1/S est perdu et le cycle cellulaire n'est plus contrôlé ce qui aboutit à une prolifération cellulaire aberrante [36].

De plus, E7 stimule la dégradation de pRb via le protéasome ce qui amplifie le phénomène de prolifération cellulaire.

#### 1.4.1.2 La protéine E6

E6 est une protéine oncogène capable, chez les papillomavirus de haut risque, de se lier à la protéine p53 et d'induire sa dégradation [42].

p53 est une protéine suppresseur de tumeur exprimée en réponse à des dommages de l'ADN [7] : au cours d'un processus tumoral, des signaux de stress cellulaire activent cette protéine ce qui a pour conséquence un arrêt de la croissance cellulaire et/ou l'apoptose de la cellule. Lorsque p53 est dégradée via son interaction avec E6, il se produit un emballement du cycle cellulaire se traduisant par une forte instabilité chromosomique ce qui permet l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire.

De plus, E6 interagit avec d'autres protéines telles que :

- Les protéines PDZ des jonctions serrées en induisant leur dégradation ce qui perturbe le contrôle de la prolifération, de la polarité et de l'adhésion cellulaire
- Les télomérases hTERT en restaurant leur activité ce qui inhibe la sénescence et la mort cellulaire.

L'ensemble de ces phénomènes participe à l'immortalisation cellulaire [54].

Ainsi, une infection par un HPV de haut risque se traduit par une prolifération cellulaire accrue et une inhibition de l'apoptose conduisant à un processus d'immortalisation cellulaire. L'ensemble de ces éléments crée une instabilité génomique pouvant aboutir à une cassure du génome de la cellule hôte et ainsi faciliter l'intégration de l'ADN viral au sein de l'ADN de la cellule hôte.

### 1.4.2 Résumé du processus de carcinogénèse

Lors d'une infection persistante par un HPV de haut risque, la protéine E7 se lie aux protéines du rétinoblastome ce qui a pour conséquence une prolifération cellulaire aberrante, cette prolifération entraîne un stress au niveau de la cellule qui se traduit par l'activation de la protéine p53. Or, p53 est dégradée par l'intermédiaire de la protéine E6 des HR-HPV, ainsi, la division cellulaire se poursuit et les dommages dans l'ADN ne sont plus réparés ce qui accentue encore davantage la prolifération cellulaire.

L'instabilité chromosomique engendrée peut entraîner une intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte. La cassure de l'ADN viral se fait au niveau du gène E2 dont un des rôles est de réprimer l'expression des protéines précoces E6 et E7. Ainsi, lors de l'intégration de l'ADN viral d'un papillomavirus de haut risque au sein du génome de la cellule hôte, il se produit une levée d'inhibition des protéines virales oncogènes E6 et E7 ce qui amplifie encore plus le processus d'oncogénèse et peut aboutir à un processus de transformation maligne des cellules.

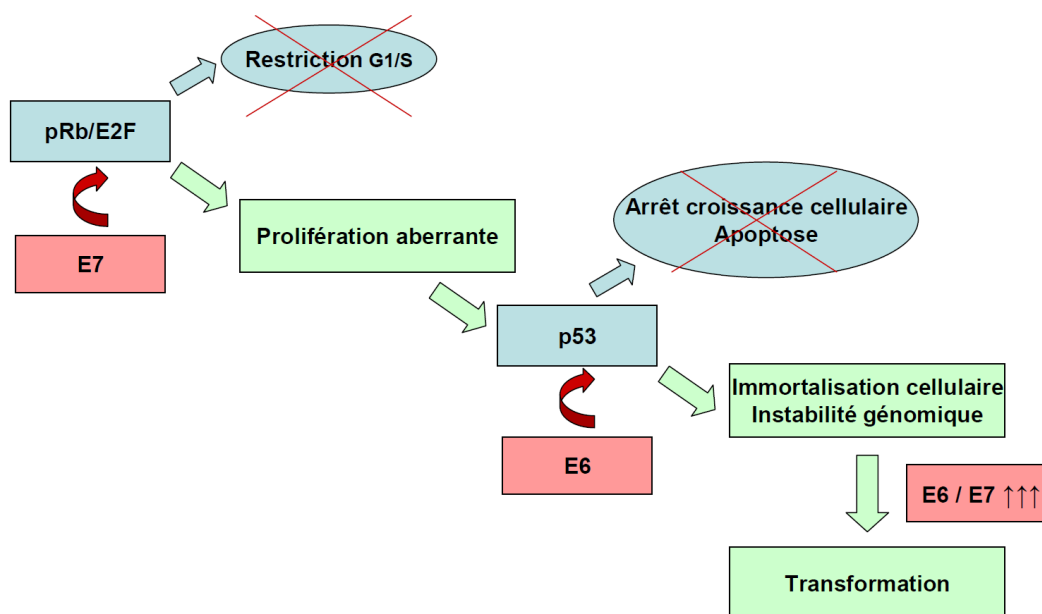


Figure 3 : Schéma simplifié de la carcinogénèse induite par les papillomavirus de haut risque. Adapté de Munger *et al.* [68]

## **1.5 Pouvoir pathogène**

Le pouvoir oncogénique des HPV de haut risque a été mis en évidence au début des années 80 par Harald zur Hausen qui a reçu en 2008 le Prix Nobel de Médecine pour cette découverte [96].

Les papillomavirus de haut risque sont considérés comme responsables de plus de 95% des cancers du col de l'utérus [13] mais il faut savoir que l'infection par le papillomavirus est une cause nécessaire mais non suffisante au cancer, d'autres facteurs interviennent (âge, immunodépression, multiparité, contraceptifs oraux ou tabac) [1,14] qui vont influencer sur la clairance ou la persistance des HPV [28].

Les papillomavirus humains sont également impliqués dans certains cancers de la sphère génitale externe (pénis, vulve, vagin) et dans les cancers de l'anus où, comme dans le cancer du col de l'utérus, les génotypes les plus souvent incriminés sont les HPV oncogènes 16 et 18 [71].

Enfin, une proportion non négligeable de cancers de l'oropharynx est induite par les papillomavirus.

## 2 HPV et cancers O.R.L.

Les cancers de la tête et du cou sont des pathologies fortement associées aux facteurs environnementaux alcool et tabac. Cependant, au cours des dernières années, une certaine proportion de ces cancers survient chez le patient non alcoolique et non fumeur ce qui laisse supposer l'intervention de nouveaux facteurs de risque.

Dès 1983, Syrjänen suggère que l'HPV peut être à l'origine de certains carcinomes cellulaires squameux oraux en mettant en évidence des effets cytopathogènes spécifiques des papillomavirus sur des biopsies de cancers oraux et en montrant la présence d'antigènes d'HPV au niveau des noyaux des cellules de ces mêmes biopsies [87].

A la fin des années 90, dans une revue de la littérature, Franceschi et al. [58] suspectent une association entre les infections par le papillomavirus humain et les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) :

- Il est retrouvé une corrélation entre les taux d'incidence des cancers de la cavité orale et des cancers du col de l'utérus et du pénis.
- Les papillomes laryngés de l'enfant dus à une infection périnatale ressemblent aux lésions génitales bénignes liées à l'HPV du point de vue morphologique, histologique et cytologique.

Au début des années 2000, différentes études mettent en évidence que la présence d'HPV au niveau de la cavité orale est associée à une augmentation du risque de cancer de l'oropharynx :

- Gillison [40] étudie la présence de l'HPV par biologie moléculaire chez 253 patients atteints d'un cancer de la tête et du cou et met en évidence une association forte entre infection par HPV et cancer de l'oropharynx.
- Les patients atteints de cancers de l'oropharynx présentent les mêmes facteurs de risques sexuels que les femmes atteintes de cancer du col de l'utérus, facteurs de risques connus pour être associés à une exposition à l'HPV [19,57].
- Les maris dont les femmes sont atteintes d'un cancer du col de l'utérus ont un risque accru de cancer oral [50], tout comme les femmes ayant un antécédent de cancer cervical [75].



Actuellement, l'infection par les papillomavirus humains est reconnue comme jouant un rôle dans la pathogenèse de certains cancers O.R.L par l'agence internationale de recherche contre le cancer. Les HPV sont impliqués dans les carcinomes cellulaires squameux de l'oropharynx et plus particulièrement dans les carcinomes de la base de la langue et des amygdales [53].

## **2.1 Epidémiologie des cancers O.R.L.**

Les cancers des voies aérodigestives supérieures se situent au 5<sup>ème</sup> rang des cancers les plus fréquents en France (4<sup>ème</sup> rang chez l'homme, 11<sup>ème</sup> rang chez la femme). En 2008, on estime à 16000 nouveaux cas par an de cancers des VADS ce qui correspond à une incidence d'environ 0,3%.

Ces cancers sont essentiellement masculins : 80% des nouveaux cas sont des hommes.

En terme de mortalité en 2005, ces cancers se situent au 5<sup>ème</sup> rang chez l'homme, ils sont responsables de 5000 décès chaque année [100].

En France, les taux d'incidence des cancers des VADS sont en constante diminution chez l'homme mais augmentent considérablement chez la femme en particulier les cancers de l'oropharynx, du palais et de l'hypopharynx [60]. Ces tendances sont fortement associées à la consommation éthylo-tabagique qui est le principal facteur de risque de ces cancers : chez les hommes, les consommations d'alcool et de tabac ont diminué de façon concomitante depuis les années 1960 tandis que la consommation tabagique augmente chez les femmes [4].

Une autre tendance est retrouvée aux Etats-Unis et dans les pays scandinaves où il est observé une augmentation des cancers de l'oropharynx et des amygdales chez les jeunes adultes tandis que les autres cancers des VADS sont en diminution ce qui laisse supposer une origine autre que la consommation éthylo-tabagique pour ces cancers [41,43] : en 1973 aux Etats-Unis, les cancers de l'oropharynx représentent 18% des cancers des VADS contre 31% en 2004 [80]. Cette progression est notamment liée à une augmentation des infections par les papillomavirus humains en rapport avec une évolution des comportements sexuels au cours des dernières années.

Cette tendance n'est pour l'instant pas observée en France : ceci peut s'expliquer par l'impact de la consommation éthylo-tabagique qui est plus élevé par rapport aux autres pays et qui peut ainsi masquer la part jouée par l'HPV dans les cancers de l'oropharynx [60] (consommation annuelle d'alcool pur par habitant en 2005 : 13,7 L en France [99] versus 9,4 L aux Etats-Unis [98]).

## 2.2 Rôle des HPV dans les cancers O.R.L.

### 2.2.1 Mode de contamination

L'infection par le papillomavirus humain est une infection sexuellement transmissible reconnue comme étant responsable de plus de 95% des cancers du col de l'utérus [78].

En réalisant un parallèle entre cancers du col de l'utérus et cancers de la tête et du cou, différentes études ont montré une association entre l'infection par HPV, les comportements sexuels et des localisations spécifiques au sein de ces cancers, une différence oropharynx versus autres localisations est notamment mise en évidence [23,40] :

- âge du premier rapport sexuel plus précoce dans les cancers de l'oropharynx
- nombre de partenaires sexuels plus important
- pratiques sexuelles oro-génitales plus fréquentes.

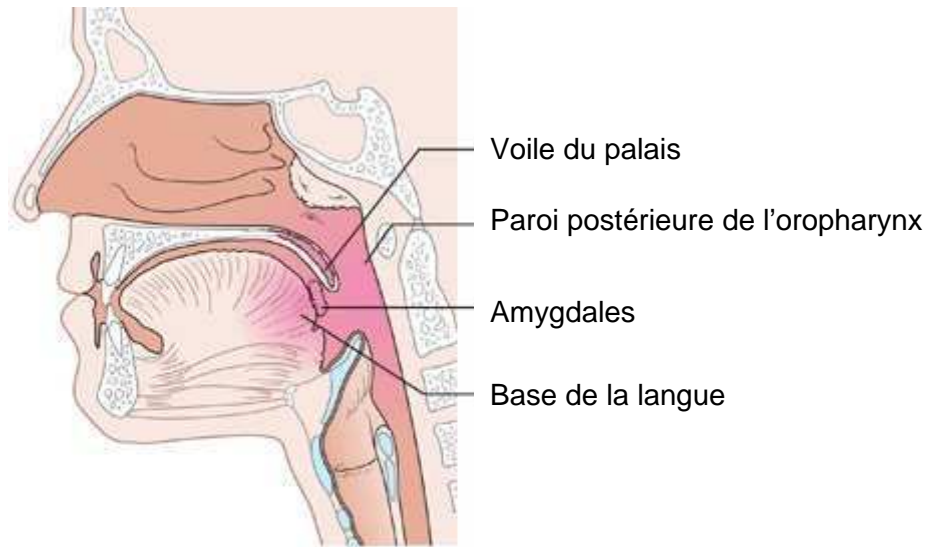
En 2009, Gillison *et al.* comparent les risques de 2 populations atteintes de carcinomes de la tête et du cou HPV-16 positifs et HPV-16 négatifs : les patients positifs pour HPV-16 ont un nombre augmenté de partenaires sexuels génitaux ou oraux et ont plus de partenaires occasionnels par rapport à la population témoin avec des odds ratios respectifs de 6,4 ; 4,3 et 2,9 ; ces différences ne sont pas retrouvées chez les patients négatifs pour HPV-16 [39].

L'infection par les papillomavirus humains au niveau oral est donc probablement acquise par contact sexuel.

### 2.2.2 Pourquoi l'oropharynx ?

L'infection par le papillomavirus humain au niveau de la cavité orale se fait préférentiellement au niveau de l'oropharynx [21,40,81].

L'oropharynx englobe le voile du palais, les amygdales, la base de la langue et les parois pharyngiennes délimitées supérieurement par le nasopharynx et inférieurement par le sillon pharyngo-épiglottique.



**Figure 4 : Coupe sagittale de l'oropharynx**  
<http://www.cancerhelp.org.uk>

La base de la langue est histologiquement reliée à l'amygdale, ces 2 entités appartiennent à une aire lymphoïde appelée anneau de Waldeyer [22] qui fait partie du système immunitaire et intervient dans les phénomènes inflammatoires et infectieux du site. Un épithélium malpighien recouvre ces tissus lymphoïdes et s'invagine pour former des cryptes. Ces cryptes sont bordées par du tissu lymphoïde tandis que la surface luminale de l'amygdale est recouverte d'un épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé et peu infiltré par les lymphocytes. Ainsi, lors de la reconnaissance des antigènes, les lymphocytes peuvent traverser la lumière des cryptes via d'étroits passages entre les cellules épithéliales, créant des zones de fragilité mécanique [72].

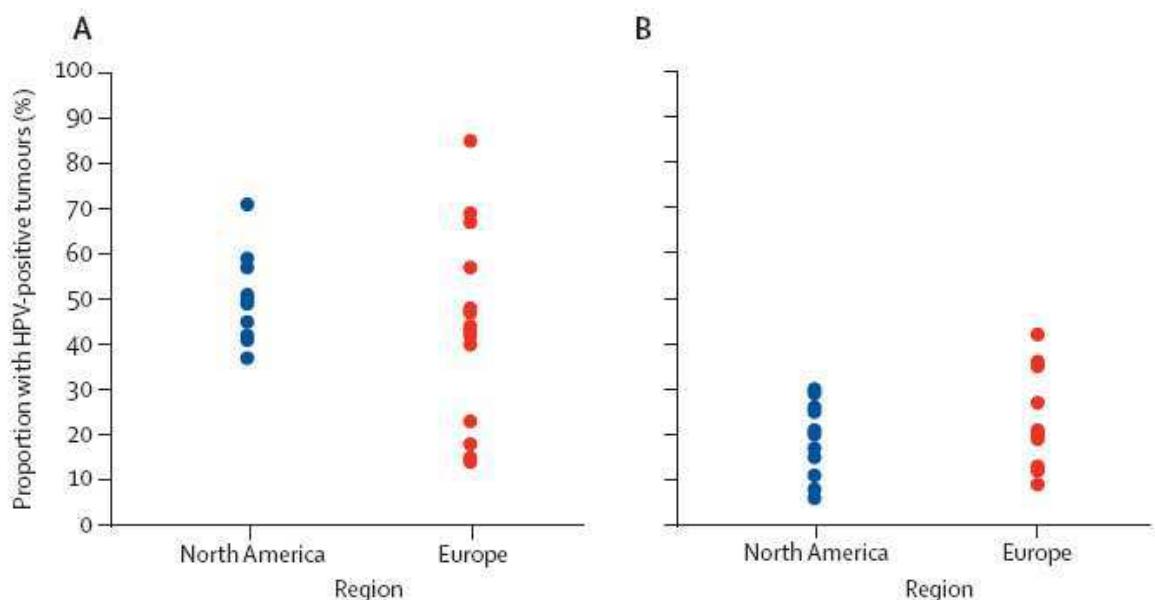
L'association épithélium malpighien - épithélium pavimenteux donne aux amygdales des caractères histologiques proches de ceux du col de l'utérus au niveau de la zone de jonction endocol-exocol qui est elle aussi, une zone de fragilité mécanique. Cette similitude entre col de l'utérus et oropharynx peut expliquer la localisation préférentielle des papillomavirus à ce niveau [79].

De plus, les épithéliums du col utérin et de l'oropharynx dérivent du même feuillet embryonnaire.

### 2.2.3 Les cancers de l'oropharynx HPV positifs : une entité à part entière

#### 2.2.3.1 Epidémiologie

Au sein des cancers O.R.L., selon les publications, l'ADN d'HPV est retrouvé dans 0 à 100% des tumeurs. Ces variations importantes sont liées aux techniques de détection utilisées (hybridation *in situ*, PCR), aux types d'échantillons analysés (biopsies, rinçages oraux, brossages) mais également à la localisation des carcinomes au sein de la sphère O.R.L. car il est désormais connu que la localisation préférentielle des HPV est l'oropharynx, or, de nombreuses études étudient la présence des papillomavirus dans l'ensemble de la sphère O.R.L.



**Figure 5 : Pourcentages de carcinomes cellulaires squameux de l'oropharynx (A) et de la tête et du cou (B) induits par l'HPV.** Aux Etats-Unis, 40 à 80% des cancers de l'oropharynx sont induits par l'HPV, en Europe les taux varient de 90% en Suède à 20% dans les pays où le tabagisme est plus important. D'après Marur *et al.* [64].

En 2005, Kreimer *et al.* [58] réalisent une revue de la littérature qui synthétise les données publiées jusqu'alors sur les cancers O.R.L. pour lesquels la recherche des papillomavirus a été effectuée par PCR, les données concernant 5046 biopsies ont été analysées : la prévalence de biopsies positives pour l'HPV est de 36% pour les carcinomes de l'oropharynx, 24% pour les carcinomes de la cavité orale et du larynx.

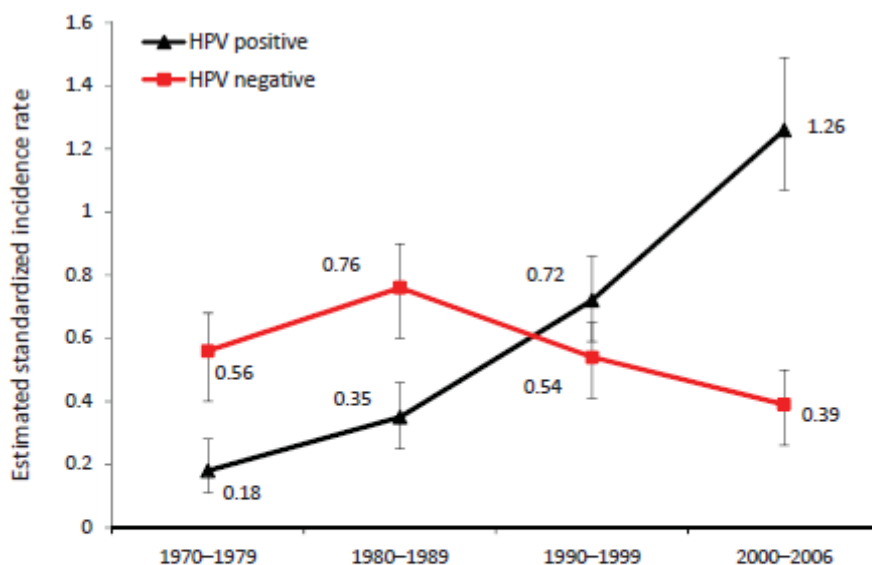
Cette étude montre également des disparités géographiques : en Amérique du Nord et en Asie, 47% des carcinomes de l'oropharynx sont HPV positifs contre seulement 28% en Europe. Ces disparités peuvent s'expliquer par des différences de distribution des facteurs de risque autres que l'infection par HPV selon les pays.

Dans une autre étude parue dans le New England Journal of Medicine en 2010 [2], le statut HPV de 323 patients atteints d'un cancer de l'oropharynx est déterminé par une technique d'hybridation *in situ*, 63,8% des patients sont positifs pour l'HPV dont 96,1% d'HPV oncogène de type 16.

La proportion des cancers de l'oropharynx HPV positifs varie donc considérablement selon les études, ces différences peuvent s'expliquer par l'augmentation récente importante des cas de cancers HPV positifs notamment au cours de la dernière décennie.

Ainsi, en Suède, les pourcentages de cancers des amygdales HPV positifs évoluent de 23% dans les années 70, à 57% dans les années 90 et à 68% entre 2000 et 2002 [44] puis à 77% entre 2003 et 2005 et à 93% entre 2006 et 2007 [70]. L'incidence des cancers des amygdales HPV positifs double chaque décennie depuis les années 70 pendant que celle des HPV négatifs diminue. L'incidence standardisée sur l'âge des cancers des amygdales passe ainsi de 0,74/100000 habitants en 1970 à 1,65/100000 habitants en 2006 en Suède.

Des tendances identiques sont observées dans l'ensemble des pays scandinaves [6] et aux Etats-Unis [41] [16].



**Figure 6 : Incidence standardisée sur l'âge des carcinomes cellulaires squameux des amygdales pour 100,000 habitants, Stockholm, Suède, 1970-2006.** (Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance à 95%). Extrait de Ramqvist *et al.* [73]

En France, l'étude EDITH VI publiée en 2011 réalisée dans 12 centres portant sur 314 biopsies de carcinomes oropharyngés et 209 biopsies de carcinomes de la cavité orale retrouve une prévalence de 46,5% de cancers de l'oropharynx HPV positifs contre 10,5% pour les cancers de la cavité orale ce qui confirme la localisation préférentielle de l'HPV au niveau de l'oropharynx [85].

#### 2.2.3.2 Distribution des génotypes HPV

Comme dans les cancers du col de l'utérus [26], le papillomavirus humain de type 16 est le génotype le plus fréquemment retrouvé dans les cancers de l'oropharynx.

Dans l'étude de Kreimer [58], parmi les biopsies de l'oropharynx positives en HPV, 86,7% sont positives pour l'HPV de type 16 et seulement 6,7% des biopsies sont positives pour des HPV non oncogènes. Les autres HPV oncogènes minoritaires retrouvés sont HPV-33, HPV-18, HPV-35, HPV-45 et HPV-59.

Une étude française portant sur 30 biopsies de tumeurs O.R.L. HPV positives retrouve de l'HPV-16 et de l'HPV-33 dans respectivement 83% et 10% des biopsies [55]. Des infections multiples sont retrouvées dans 7% des cas (association HPV-16/HPV-33).

L'étude EDITH VI [85] retrouve 89,7% des carcinomes oropharyngés positifs pour l'HPV-16. Des infections multiples à HPV sont retrouvées pour 5,5% des biopsies positives avec toujours présence d'au moins un HPV de haut risque et seulement 3% des biopsies positives sont infectées par des virus non oncogènes.

En conclusion, le papillomavirus humain de type 16 est rencontré très majoritairement dans les cancers de l'oropharynx HPV positifs et les co-infections sont possibles mais rares.

## 2.2.4 Particularités des populations HPV positives

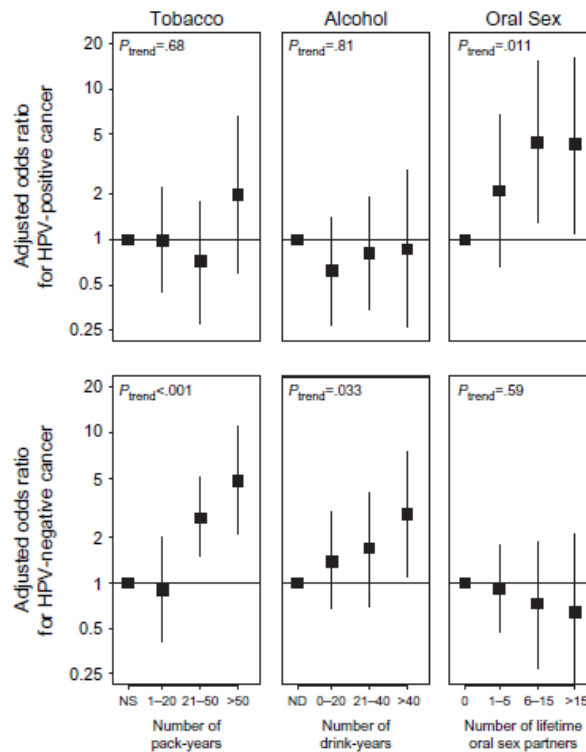
### 2.2.4.1 Facteurs de risque

#### ➤ Tabac et alcool

Les deux principaux facteurs de risque des cancers O.R.L. sont l'alcool et le tabac : le risque de cancer augmente avec le nombre de verres d'alcool consommés par jour ainsi qu'avec le nombre de cigarettes fumées quotidiennement et avec la durée du tabagisme [4] [46,47].

Dans le cas des cancers de l'oropharynx HPV dépendant, ces facteurs de risque ne sont pas retrouvés de façon systématique : les consommations d'alcool et de tabac ne sont pas associées à une augmentation du risque de cancer de l'oropharynx HPV positif excepté en cas de consommation tabagique supérieure à 2 paquets par jour [39]. Dans l'étude de Gillison *et al.*, les consommateurs réguliers de tabac et d'alcool ont un risque augmenté (OR = 4,8) de cancer non HPV dépendant tandis que ce risque n'est pas augmenté pour les cancers O.R.L. dépendants de l'HPV (OR = 0,67).

Il y aurait ainsi deux voies différentes de carcinogénèse : une voie liée à l'instabilité génomique créée par l'HPV, une autre voie liée aux effets carcinogènes propres du tabac et de l'alcool [20].



**Figure 7 : Relation dose-réponse pour le tabac, l'alcool et les partenaires sexuels oraux exprimés en odd-ratios chez les patients atteints d'un cancer de la tête et du cou HPV-16 positif (haut) et HPV-16 négatif (bas) : alcool et tabac n'influencent pas les cancers HPV positifs, contrairement aux cancers négatifs pour l'HPV, les pratiques sexuelles orales augmentent le risque de cancer HPV positif. (Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance à 95%). Extrait de Gillison [39].**

Mais selon les études, des interactions entre HPV et tabac ou HPV et alcool dans les cancers de l'oropharynx peuvent être retrouvées puisque Smith *et al.*, dans une étude cas-témoins, montrent que le risque de cancer de l'oropharynx est augmenté chez les consommateurs réguliers d'alcool et de tabac par rapport aux patients non éthylo-tabagiques aussi bien pour les patients séropositifs pour l'HPV (OR = 7,7) que pour les patients séronégatifs (OR = 8,4) [84].

Ainsi, les cancers de l'oropharynx HPV dépendants sont une classe distincte au sein de l'ensemble des cancers de l'oropharynx : ils sont considérés comme des cancers du patient non éthylo-tabagique, néanmoins, une consommation élevée d'alcool et de tabac reste un facteur de risque supplémentaire.



## ➤ Comportement sexuel

L'hypothèse la plus probable du mode de contamination par le papillomavirus humain au niveau oral est la transmission sexuelle.

Ainsi, le risque de cancer de l'oropharynx HPV dépendant augmente avec certaines tendances sexuelles : le risque augmente notamment avec le nombre de partenaires sexuels, avec le nombre de partenaires oro-génitaux, avec la précocité du premier rapport sexuel, chez les personnes engagées dans des relations temporaires et lorsque l'utilisation des préservatifs n'est pas régulière [20,49].

Ce facteur de risque est donc étroitement lié au mode de contamination.

### 2.2.4.2 Age

Les patients atteints de cancers de l'oropharynx HPV positifs sont en général plus jeunes que ceux atteints de cancers HPV négatifs. Cette tendance est observée dans la plupart des études cas-témoins réalisées : 54 ans vs 58 ans dans l'étude de Gillison [39] pour les patients atteints d'un carcinome de l'oropharynx HPV positif et HPV négatif respectivement, 61 ans vs 64 ans dans l'étude de Chaturvedi [16].

Cette caractéristique est liée aux facteurs de risque : l'imprégnation éthylo-tabagique diminue au cours des dernières décennies et a donc un impact moindre chez les patients plus jeunes tandis que les mœurs sexuelles évoluent : les patients plus jeunes ont des comportements sexuels plus à risque [83]. L'évolution de ces facteurs de risque peut en partie expliquer le fait que le cancer de l'oropharynx HPV positif est une pathologie du sujet jeune.

### 2.2.4.3 Caractéristiques des tumeurs

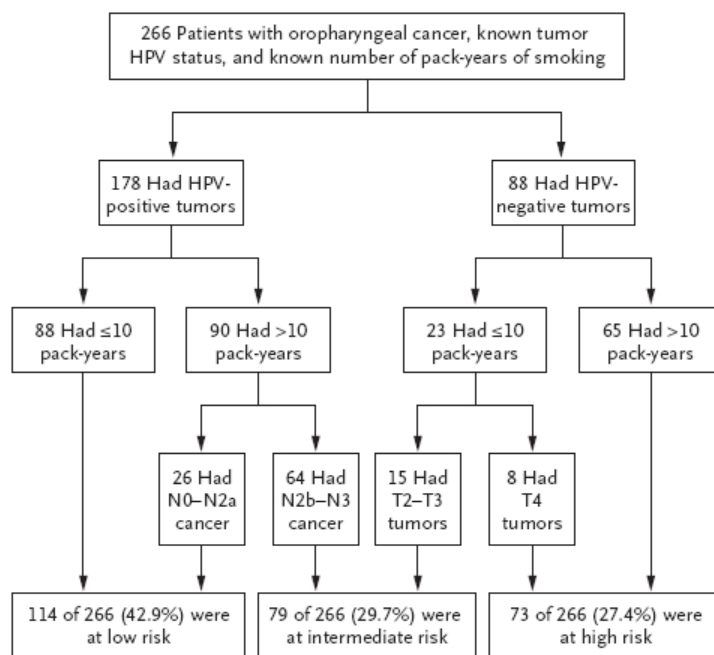
Une méta-analyse réalisée en 2010 par Dayyani [25] met en évidence des particularités pour les tumeurs HPV positives :

- Les cancers positifs pour l'HPV sont en général diagnostiqués à un stade plus avancé : 73% des cancers HPV+ sont classés T3 ou T4 selon la classification TNM contre 57% des cancers HPV-.
- Ils sont plus fréquemment associés à la présence d'adénopathies (67% contre 54%).
- Les tumeurs HPV positives sont associées à l'expression de la protéine p16 [2] (protéine surexprimée suite à l'inactivation de pRb par la protéine oncogène E7, p16 est le reflet d'une infection active par un HPV).
- Elles présentent moins de mutations de la protéine p53.

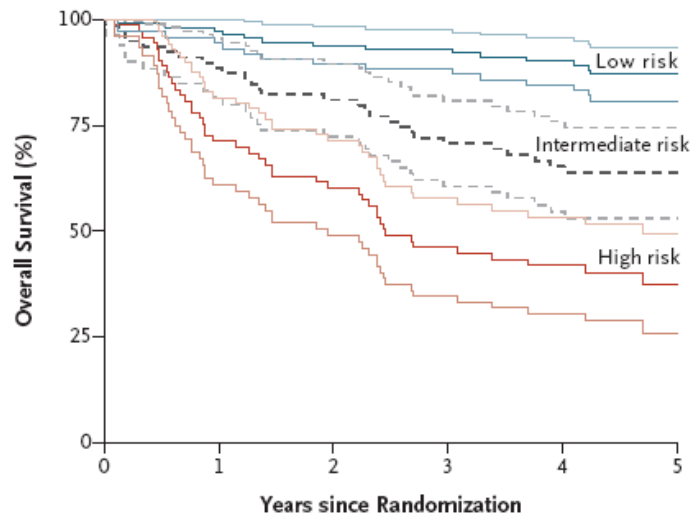
#### 2.2.4.4 Réponse au traitement et survie

Les cancers de l'oropharynx HPV positifs semblent avoir une meilleure réponse au traitement que les cancers HPV négatifs aussi bien lors de l'utilisation de la chirurgie ou lors de l'utilisation de chimiothérapie d'induction [33], de radio-chimiothérapie [92] ou de radiothérapie seule [62]. Fakhry *et al.* étudient la réponse au traitement chez 96 patients atteints d'un cancer de l'oropharynx : les patients HPV positifs ont un taux de réponse plus élevé que les patients HPV négatifs après chimiothérapie d'induction (82% vs 55%) et après radio-chimiothérapie (84% vs 57%).

Ang *et al.* proposent même de classer les risques de décès des patients en prenant en compte leur statut HPV, leur consommation tabagique et le statut TNM de la tumeur et ainsi de mettre en place des traitements moins invasifs pour les patients ayant un risque faible de décès. Les patients HPV positifs ont un taux de survie à 5 ans plus élevé que les patients HPV négatifs.



**Figure 8 : Classification du risque de décès chez des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx en fonction du statut HPV de la tumeur, de la consommation tabagique et du stade TNM.** Les patients HPV positifs non fumeurs ont le risque de décès le plus faible. Extrait de Ang [2].



**Figure 9 : Taux de survie estimé à 5 ans en fonction de la classification par risque de décès.** Le taux de survie à 3 ans est de 93% pour le groupe à faible risque, 71% pour le groupe à risque intermédiaire et 46% pour le groupe à risque élevé de décès. Extrait de Ang [2].

### 2.2.5 Vaccination

En France, deux vaccins anti-HPV existent et sont recommandés pour la prévention du cancer du col de l'utérus chez les jeunes filles âgées de 14 ans et en rattrapage jusqu'à 23 ans : Gardasil® (anti-HPV 6, 11, 16 et 18) et Cervarix® (anti HPV 16 et 18).

Ces 2 vaccins sont constitués de protéines de la protéine majeure de capsid L1 assemblées sous forme de pseudo-particules virales (VLP : virus like particles) et capables d'induire la production d'anticorps neutralisants protecteurs.

Aux Etats-Unis, la FDA a élargi les recommandations du Gardasil® aux jeunes hommes de 9 à 26 ans en prévention des verrues génitales et à l'ensemble de la population âgée de 9 à 26 ans pour la prévention des cancers de la région anale.

Certaines études médico-économiques suggèrent que la vaccination des hommes n'est pas nécessaire si le taux de couverture vaccinal atteint au moins 80% chez les femmes [9].

La mise en évidence du rôle des HPV dans les cancers de l'oropharynx soulève la problématique de la vaccination de l'ensemble de la population. Actuellement, aucune étude concernant l'efficacité de la vaccination dans les cancers de l'oropharynx HPV dépendants n'a été publiée.

### 2.2.6 HPV et cancer O.R.L. : en résumé

Au sein des cancers O.R.L., les cancers HPV dépendants sont une entité à part entière :

- Ils sont localisés préférentiellement au niveau de l'oropharynx (amygdales et base de la langue).
- Leur incidence est en augmentation constante.
- Ils sont de meilleur pronostic.

Par opposition aux patients atteints de cancers non HPV induits, les patients ayant un cancer de l'oropharynx HPV dépendant sont :

- Plus jeunes
- Non éthylo-tabagiques
- Ont des conduites sexuelles associées à une contamination oro-génitale par l'HPV.

### 3 Outils diagnostiques moléculaires

Les papillomavirus humains sont des virus non cultivables, ainsi, le diagnostic des infections à HPV repose sur les techniques de biologie moléculaire.

Certaines techniques permettent la simple détection de l'ADN des HPV, d'autres permettent de génotyper le papillomavirus responsable de l'infection, d'autres encore permettent de quantifier l'ADN des papillomavirus de haut risque ou de mettre en évidence les ARNm des protéines oncogènes du virus. Nous allons détailler ci-dessous les principes et les intérêts de chacune de ces techniques.

#### 3.1 Détection de l'ADN des papillomavirus humains

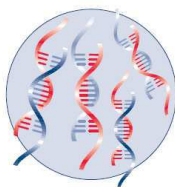
Il existe de nombreuses techniques de détection de l'ADN des HPV dans des frottis cervico-vaginaux ou dans des biopsies tissulaires, ces tests sont basés sur la détection de l'ADN viral au moyen d'un ensemble de sondes spécifiques soit par des techniques d'hybridation en phase liquide soit par des techniques de PCR.

##### 3.1.1 Le test Hybrid Capture 2® (Qiagen/Digene)

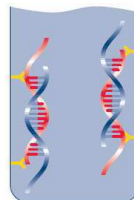
Le test Hybrid Capture 2 repose sur une technique d'hybridation en phase liquide ; il s'agit du plus ancien test validé par la FDA.

Ce test ne nécessite pas l'extraction de l'ADN des HPV.

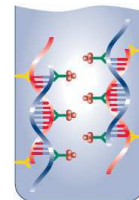
Il est basé sur la formation d'hybrides ADN/ARN capturés en microplaque avec amplification de signal par chimio-luminescence permettant une détection semi-quantitative de l'ADN d'HPV dans les prélèvements cervicaux. Il permet la mise en évidence de 13 types d'HPV de haut risque. Un autre panel de sondes est disponible pour mettre en évidence des infections par HPV de bas risque.



1. Hybridation de la sonde ARN avec l'ADN cible. L'ADN cible s'hybride avec les sondes ARN complémentaires spécifiques pour former des hybrides ADN/ARN.



2. Capture des hybrides. Les hybrides ADN/ARN sont capturés sur une phase solide format microplaque recouverte d'anticorps spécifiques anti hybrides ADN/ARN.



3. Amplification de signal. Les hybrides ADN/ARN capturés sont détectés par une multitude d'anticorps couplés à la phosphatase alcaline. Le signal obtenu peut être amplifié au moins 3000 fois. La lecture et l'interprétation sont faites après la réaction de chimiluminescence.

**Figure 10 : Principales étapes du test Hybrid Capture 2®**  
<http://www.qiagen.com/hpv/hc2technology>

Ce test est rapide et applicable à de grandes séries mais il ne permet pas d'identifier les différents génotypes, un résultat positif témoigne donc de la présence d'un ou plusieurs HPV de haut risque (jusqu'à 13) sans distinction. [17,93]

### 3.1.2 Amplicor HPV Test ® (Roche Diagnostics)

Il s'agit d'une technique de PCR classique avec des amorces consensus PGMY09/11 ciblant la région virale L1. Il s'agit de la première trousse HPV commercialisée en Europe en 2004 basée sur une technique de PCR. Elle détecte les mêmes 13 génotypes à haut risque que le test Hybrid Capture 2 et possède un contrôle interne, le gène cellulaire de la  $\beta$ -globine, qui est amplifié par les mêmes amorces.

Ce test se déroule en 4 étapes : extraction de l'ADN, amplification des séquences cibles par des amorces biotinylées formant des amplifiats de 165 pb, dénaturation et hybridation des amplicons formés avec des sondes spécifiques sur microplaques puis révélation colorimétrique. La présence du contrôle interne permet de valider l'ensemble de ces étapes pour chaque échantillon.

La sensibilité et la spécificité évaluées par le fabricant sont respectivement de 93% et 95%.

Cette technique donne des résultats qualitatifs uniquement et ne permet pas de mettre en évidence des infections multiples à HPV.

Des études comparatives montrent une concordance des résultats entre le test Hybrid Capture® et le test Amplicor® avec une sensibilité augmentée pour le test Amplicor® (sensibilité analytique à 500 copies/mL contre 5000 copies/mL pour Hybrid Capture®) [77].

Ces 2 techniques de détection de l'ADN des HPV sont très utilisées pour le dépistage des infections génitales à papillomavirus humain. Cependant, elles ne permettent pas d'identifier les génotypes mis en cause.

## 3.2 Génométypage des papillomavirus humains

Le principal avantage du génotypage est qu'il permet de différencier les infections par les papillomavirus de bas risque des infections par des papillomavirus de haut risque.

Dans les cancers du col de l'utérus, au sein des HPV de haut risque, certains génotypes sont reconnus comme ayant un pouvoir oncogénique supérieur et notamment le papillomavirus de type 16, ce qui démontre l'importance du génotypage des infections à HPV [15].

De plus, le génotypage permet de mettre en évidence les infections multiples.

Il est également essentiel dans les études épidémiologiques des infections à papillomavirus humains.

### 3.2.1 PCR et révélation par hybridation inverse

De nombreux kits de génotypage sont commercialisés : leur principe repose sur une amplification de l'ADN des HPV préalablement extrait par PCR suivi d'une étape de révélation des amplicons.

La majorité des techniques de PCR utilisées pour la détection des HPV font appel à des amorces consensus dirigées contre une région hautement conservée du gène *L1*, région relativement éloignée de E2 qui est la zone de cassure en cas d'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule hôte. 3 couples d'amorces sont couramment utilisés : PGMY09/11, GP5+/6+ et SPF10 [32].

Les deux tests commerciaux les plus utilisés sont le test Linear Array Genotyping Test® (Roche Diagnostics) et le test INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Innogenetics).

Linear Array® est un test qualitatif qui permet d'identifier 37 génotypes d'HPV : 15 HPV de haut risque, 3 HPV potentiellement à haut risque et 19 HPV de bas risque.

Ce test consiste en une amplification de l'ADN préalablement extrait par PCR avec les amorces consensus biotinylées PGMY09/11. Cette PCR permet l'obtention d'amplicons biotinylés de 450 pb qui vont ensuite être dénaturés puis hybridés avec des sondes spécifiques de types immobilisées sur bandelettes. Les hybridats formés vont être révélés par ajout de streptavidine couplée à une peroxydase : la streptavidine se lie aux amplicons biotinylés hybridés et l'ajout du substrat de la peroxydase entraîne la formation d'un précipité bleu sous forme de bande. Par comparaison à la bandelette de référence, il est ainsi possible d'identifier le ou les génotypes HPV présents.

Le test INNO-LiPA® est basé sur le même principe : l'ADN extrait est amplifié par PCR avec des amorces consensus SPF10 biotinylées, les amplicons de 65 pb obtenus sont révélés sur bandelettes. Les génotypes identifiés sont déterminés par comparaison avec la bandelette de référence. Ce test détecte 28 génotypes HPV : 18 HPV de haut risque, 7 HPV de bas risque et 3 HPV non classés (cf « matériel et méthodes »).

Dans chacun des 2 tests, il existe un contrôle ADN humain : la  $\beta$ -globine pour Linear Array® et HLA-DBP1 pour INNO-LiPA®. Ces contrôles valident les étapes d'extraction, d'amplification et d'hybridation-révélation pour chaque échantillon testé.

Les études comparatives ne montrent pas de différence significative entre ces deux tests en terme de sensibilité et spécificité [35].

### 3.2.2 PCR et puces à ADN

Au cours des dernières années, la technologie des puces à ADN a été développée pour le génotypage des infections à HPV.

Le kit PapilloCheck® (Greiner Bio One) permet la détection et le génotypage de 24 papillomavirus : 17 HR-HPV et 7 LR-HPV. Le principe de ce test repose sur une PCR avec des amorces consensus ciblant une zone de 350 pb de la région E1 du virus; cette PCR est suivie par une hybridation des amplicons obtenus avec des sondes spécifiques immobilisées sur des puces : chaque type d'HPV est détecté par une sonde spécifique présente en 5 exemplaires sur chaque puce. L'ADN fixé est ensuite marqué par une molécule fluorescente qui est excitée à une longueur d'onde donnée.

Un témoin interne est inclus pour éviter les faux négatifs : il cible un gène de ménage *ADATI* qui est amplifié et marqué avec un fluorophore spécifique puis hybridé avec des sondes spécifiques sur la puce à ADN.

Un autre kit de puce à ADN : Clart® HPV2 (Genomica) est commercialisé : il permet la détection et le génotypage de 35 HPV : 18 HR-HPV et 17 LR-HPV. Il consiste en une PCR d'un fragment de 450 pb de la région L1 du virus suivie d'une hybridation des produits amplifiés biotinylés avec des sondes spécifiques présentes sur des puces situées au fond de tubes individualisés. Après ajout d'un conjugué streptavidine/peroxydase puis du substrat, il se forme un précipité. Un lecteur automatisé identifie les génotypes présents.



Les avantages du génotypage avec puces à ADN sont l'analyse de grandes séries d'échantillons et une lecture facilitée par rapport aux tests utilisant les bandelettes. De plus ces tests sont plus rapides à réaliser que les tests sur bandelettes : 3 heures après extraction de l'ADN sont nécessaires pour obtenir les résultats avec le test PapilloCheck® contre 8 heures avec le test INNO-LiPA®.

### 3.2.3 Technologie Luminex®

Il s'agit d'une technologie d'array en suspension, xMAP®, le principe repose sur l'utilisation de microbilles de polystyrène couplées à des sondes oligonucléotidiques spécifiques : après amplification de l'ADN HPV avec des amorces fluorescentes, les amplicons sont dénaturés puis hybridés sur des microsphères colorées marquées avec des fluorophores spécifiques de chaque génotype d'HPV, l'analyse est réalisée par cytométrie de flux à deux lasers, un laser détecte le fluorophore témoin de la présence d'un amplicon HPV, un autre laser détecte la couleur de la microsphère et donc le génotype HPV.

Un test de génotypage par la technologie Luminex® est commercialisé : HPV Genotyping LQ (Digene®), il permet la détection et le génotypage de 18 HPV de haut risque. Il présente des sensibilités et spécificités élevées (94% et 96% respectivement) [37,38]. Ce test est recommandé en complémentarité du kit Hybrid Capture 2 car il utilise les produits de PCR obtenus avec ce kit, il est indiqué chez une femme présentant un résultat positif au test Hybrid Capture 2® HR-HPV.

### **3.3 Quantification de l'ADN HPV**

La présence d'ADN de papillomavirus humains dans des frottis cervico-utérins ou dans des biopsies ne suffit pas à associer HPV et cancer car les infections transitoires à HPV sont fréquentes, il est estimé que plus de 70% des femmes sont à un moment donné de leur vie infectées par un HPV qui sera éliminé par l'hôte dans la grande majorité des cas [78].

Les données concernant la signification de la charge virale sont controversées : certaines études suggèrent que la charge virale HPV est le reflet de la persistance de l'infection par le papillomavirus [65] et que des charges virales élevées sont associées à un risque plus important d'évolution vers la carcinogenèse, d'autres études ne retrouvent pas d'association, d'autres encore trouvent des charges virales plus élevées à un stade peu avancé du cancer [48,61]. L'évolution et la cinétique des charges virales semblent plus prédictives de la persistance et de l'évolution de l'infection ou de sa clairance qu'une mesure ponctuelle de la charge virale [24,65].

Ces études portent sur les infections du col de l'utérus, peu d'informations sont disponibles sur la pertinence de la mesure de la charge virale HPV dans les cancers de l'oropharynx.

Actuellement, aucun kit de PCR n'est commercialisé. Les kits utilisés pour évaluer les charges virales sont des kits « maison » de PCR en temps réel ou de RT-PCR spécifiques de génotypes.

### **3.4 Dosage des ARNm E6/E7**

Le rôle des protéines oncogènes E6 et E7 est clairement démontré dans la carcinogenèse induite par les papillomavirus : suite à l'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule hôte, les protéines E6 et E7 sont surexprimées, cette surexpression est nécessaire pour la transformation maligne des cancers HPV dépendants. La détection des ARN messagers E6/E7 permettrait de distinguer les infections transitoires (faible expression des ARNm) des infections évoluant vers une pathologie cancéreuse (expression forte). Les ARNm sont le reflet d'une infection active à papillomavirus humain oncogène.

### 3.4.1 NucliSENS Easy Q® HPV (Biomérieux)

NucliSENS Easy Q® HPV, anciennement commercialisé sous le nom PreTect HPV Proofer® par Norchip, permet la détection qualitative des ARNm E6/E7 de 5 papillomavirus de haut risque séparément : HPV 16, 18, 31, 33 et 45. Ce kit utilise la technologie NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Assay) dont le principe repose sur une amplification isotherme utilisant l'action simultanée de trois enzymes (transcriptase inverse, ARN polymérase et RNase) : après extraction de l'ARN, les ARNm sont amplifiés par la technique NASBA et détectés en temps réel grâce à des sondes fluorescentes spécifiques de type Beacon. Un contrôle interne ciblant l'ARN humain U1A valide la technique. Ce test permet à la fois le génotypage des 5 HR-HPV les plus fréquents et la recherche des ARNm correspondants.

### 3.4.2 Aptima® HPV Assay (GenProbe)

Le test Aptima® HPV Assay permet la détection des ARNm de 14 HPV à haut risque oncogène sans les génotyper.

Ce test basé sur la technique d'amplification TMA (Transcription Mediated Amplification) se déroule en 3 étapes après extraction de l'ARN :

- Capture des ARNm en utilisant des oligomères spécifiques de la cible liés à des microparticules magnétiques
- Amplification des ARNm par TMA utilisant deux enzymes (transcriptase inverse et ARN polymérase)
- Détection des amplicons par la technique HPA (Hybridization Protection Assay) qui utilise une sonde ADN spécifique marquée avec un détecteur moléculaire émettant un signal chimioluminescent : l'ester d'acridinium.

Un contrôle interne permet de valider chaque étape de la technique.

L'avantage de ces deux techniques est que toutes les étapes sont réalisées dans un même tube ce qui limite le risque de contamination.

Le test Nuclisens EasyQ® présente une meilleure spécificité que le test Aptima® mais une moins bonne sensibilité, ceci peut être expliqué par le panel de papillomavirus détectés qui est plus restreint pour le test Nuclisens EasyQ® [10].

L'expression des oncoprotéines virales E6 et E7 initie le processus de cancer en affectant le contrôle du cycle cellulaire. La détection des ARNm E6/E7, attestant d'une activité transcriptionnelle de ces oncogènes, est un marqueur pertinent d'évolution vers des lésions précancéreuses et vers le cancer ; ces tests ont donc leur place dans le diagnostic des infections à HPV.

### **3.5 Application aux cancers du col de l'utérus**

En France, le dépistage du cancer du col de l'utérus est une démarche de prévention secondaire. Les recommandations actuelles reposent sur le frottis cervico-utérin (FCU) : le rythme de réalisation est triennal après 2 FCU normaux à 1 an d'intervalle chez les femmes âgées de 25 ans à 65 ans ayant une activité sexuelle. Le génotypage HPV est indiqué en seconde intention en cas de frottis ASCUS c'est-à-dire en cas d'atypie des cellules malpighiennes de signification indéterminée selon la classification Bethesda et en surveillance après traitement d'une lésion de haut grade [97].

La place du test HPV en tant que dépistage primaire est actuellement étudiée [74,94] : le test HPV présente une meilleure sensibilité que le test cytologique mais une moins bonne spécificité. Son efficacité pour la détection des lésions précancéreuses est démontrée en utilisation seule chez les femmes de plus de 35 ans mais pas chez les femmes plus jeunes compte tenu de la fréquence d'infections transitoires dans cette population [59].

### **3.6 Application aux cancers de l'oropharynx**

Les techniques de détection et de typage des HPV sont actuellement en plein développement. La place de ces techniques dans les stratégies diagnostiques des cancers de l'oropharynx reste à définir : il est nécessaire de réaliser des études supplémentaires notamment pour définir la prévalence de l'infection à HPV au niveau oral dans la population saine, pour définir le type de prélèvement à analyser (brossage oral, biopsie) et les techniques à mettre en place : génotypage pour identifier les papillomavirus présents ou recherche des ARNm pour mettre en évidence une infection active.

De plus, la plupart des tests développés sont indiqués uniquement dans le dépistage des cancers du col de l'utérus.

Type de test		Détection par un mélange de sondes		Génotypage				ARNm E6/E7		
Nom		Hybrid Capture 2®	Amplicor HPV Test ®	Linear Array Genotyping Test®	INNO-LiPA Genotyping Extra®	PapilloCheck®	Clart® HPV2	HPV Genotyping LQ®	NucliSENS Easy Q® HPV	Aptima® HPV Assay
Fabricant		Digene	Roche Diagnostics	Roche Diagnostics	Innogenetics	Greiner Bio One	Genomica	Digene	Biomérieux	Gen Probe
Technique	Amplification	-	PCR avec amorces PGMY09/11	PCR avec amorces PGMY09/11	PCR avec amorces SPF10	PCR	PCR	PCR	NASBA	TMA
	Hybridation	en phase liquide avec sondes ARN	sur microplaque	inverse sur bandelettes	inverse sur bandelettes	sur lame de plastique	sur fond de tube	sur microbilles de polystyrène		
	Détection	Chimio-luminescence	Colorimétrique	Colorimétrique	Colorimétrique	Fluorescence	Colorimétrique	Fluorescence	Sondes fluorescentes de type Beacon	HPA sondes chimio-luminescentes
Région cible		Génome entier	L1	L1	L1	E1	L1	L1	E6/E7	E6/E7
HPV détectés		13 HPV de haut risque 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68  ou 5 HPV de bas risque 6, 11, 42-44	13 HPV de haut risque 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68	15 HPV de haut risque 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82  3 HPV à haut risque potentiel 26, 53 et 66  19 HPV de bas risque 6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69-72, 81, 83, 84, IS39 et 89	18 HPV de haut risque 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82  7 HPV de bas risque 6, 11, 40, 43, 44, 54 et 70  3 HPV non classés 69, 71 et 74	17 HPV de haut risque 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82  7 HPV de bas risque 6, 11, 40, 42-44, 70	18 HPV de haut risque 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82  17 HPV de bas risque 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70-72, 81, 83-85, 89	18 HPV de haut risque 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82	5 HPV de haut risque 16, 18, 31, 33, 45	14 HPV de haut risque 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

Tableau II : Principales caractéristiques des tests HPV commercialisés.

## 4 Sérologie HPV

Le rôle de l'immunité dans la clairance des HPV est mal défini. Contrairement à ce qui est observé avec d'autres virus, la présence d'anticorps anti-HPV ne protégerait pas contre les réinfections [91].

Lors d'une infection naturelle par un papillomavirus humain :

- Les anticorps anti-HPV apparaissent en 6 à 12 mois ; ils peuvent donc être détectés après la clairance du virus.
- Ils sont présents à des taux faibles du fait de l'absence de virémie au cours de l'infection.
- Ils sont détectés chez seulement 50% des personnes infectées environ [12,18].

De nombreuses techniques sérologiques ont été développées pour la recherche d'anticorps dirigés contre les papillomavirus humains (ELISA ou RIA). Ces techniques ciblent majoritairement deux types d'anticorps : les anticorps dirigés contre la protéine majeure de capsid L1 (anticorps anti-VLP) et les anticorps dirigés contre les protéines précoces E6 et E7.

Les anticorps anti-capsid sont les marqueurs d'expositions cumulées aux HPV tandis que les anticorps dirigés contre les protéines oncogènes sont les marqueurs des cancers associés à l'HPV.

L'apport de la recherche des anticorps anti-capsid dans le diagnostic des infections à HPV reste limité, mais ils pourraient avoir un intérêt en tant que marqueur d'une infection passée ou pour refléter des expositions cumulées aux papillomavirus. La séroconversion HPV survient plus fréquemment lorsqu'une infection est persistante par rapport à une infection transitoire ; elle est également associée à des charges virales élevées [52].

Peu d'études comparent les sérologies recherchant les anticorps anti-capside par rapport aux anticorps dirigés contre les protéines oncogènes E6/E7. Une étude réalisée en 2006 [82] porte sur les cancers de l'oropharynx : la prévalence des anticorps anti-VLP est de 56% chez les patients atteints d'un cancer de l'oropharynx contre 40% dans la population témoin indemne de pathologie cancéreuse, la prévalence des anticorps anti-E6/E7 est de 65% contre 1% respectivement.

Une seconde étude réalisée pour l'IARC (International Agency for Research on Cancer) retrouve une prévalence plus faible [51] : les anticorps anti-capside sont présents chez 13% des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx contre 6% des patients sains ; les anticorps E6/E7 sont présents chez 12% des patients atteints d'un cancer contre 0,1% des patients sains.

Malgré des prévalences relativement basses et variables d'une étude à l'autre, la sérologie E6/E7 est un meilleur marqueur de cancer que la sérologie ciblant les protéines de capside.

Les sérologies HPV ont des sensibilités et spécificités relativement faibles, mais contrairement à la détection de l'ADN HPV, la sérologie permet de mettre en évidence les infections au niveau de plusieurs sites anatomiques et non au niveau de l'échantillon prélevé uniquement.

Actuellement, aucune technique sérologique de détection des anticorps anti-capside ou anti-E6/E7 n'est commercialisée.

# **Objectifs de l'étude**



Les papillomavirus humains oncogènes, principalement l'HPV de type 16, sont associés à certains cancers O.R.L. et notamment aux cancers de l'oropharynx.

La fréquence exacte de cette association est mal connue et la répartition du génome viral dans les tissus sains et tumoraux chez des patients atteints de ces cancers a rarement été étudiée.

Nous avons réalisé une étude rétrospective chez 62 patients atteints d'un cancer localisé spécifiquement au niveau de l'oropharynx : base de la langue et amygdales en particulier.

Les objectifs de cette étude sont :

- Définir la proportion des infections à HPV.
- Comparer la fréquence de détection par PCR de 28 génotypes HPV dans les tissus sains et tumoraux de ces patients.
- Etudier la distribution des génotypes HPV dans ces cancers.

# **Matériel et méthodes**

## **1 Patients et prélèvements**

Cette étude rétrospective porte sur 62 patients hospitalisés dans le service d'oto-rhino-laryngologie (O.R.L.) du pôle Tête et Cou et Chirurgie Réparatrice du CHU de Grenoble, entre 2003 et 2007, pour prise en charge d'un cancer de l'oropharynx (cancers de la base de la langue et de l'amygdale principalement). Le critère d'inclusion des patients dans cette étude était la localisation oropharyngée de la tumeur.

Pour chaque patient, une biopsie du tissu tumoral et une biopsie du tissu sain (c'est-à-dire situé à au moins 3 cm de la tumeur) ont été prélevées. Ces biopsies ont ensuite été stockées directement à -80°C au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Grenoble.

Les biopsies ont été contrôlées morphologiquement après coloration Giemsa pour s'assurer du caractère sain ou tumoral des 124 prélèvements.

Des données épidémiologiques (sexe, âge, consommation éthylo-tabagique, stade TNM de la tumeur) sont disponibles pour la majorité des patients inclus dans l'étude.

La consommation tabagique est exprimée en paquets-année (PA) : un paquet-année correspond à la consommation d'un paquet de vingt cigarettes par jour pendant un an.

La consommation alcoolique est exprimée en grammes d'alcool pur consommé quotidiennement, sachant que 10 grammes d'alcool pur correspondent à une unité d'alcool.

Une population de 19 patients « sains », c'est-à-dire indemnes de pathologie cancéreuse, opérés pour amygdalite chronique ou phlegmon amygdalien a également été incluse comme population témoin.

## 2 Méthodes

### 2.1 Extraction ADN et ARN des tissus

Les coupes des tissus sains et tumoraux congelés sont réalisées au cryostat (20 à 30 copeaux de 10µm selon la taille initiale de la biopsie) puis mises en présence de tampon RLT/β-mercaptoéthanol dont le rôle est de faciliter la lyse des membranes cellulaires et d'inhiber les RNases. Les biopsies sont ensuite broyées mécaniquement.

Les extractions ADN et ARN sont réalisées à partir du broyat avec le kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit® (Qiagen®, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Les ADN sont élués dans un volume final de 50µl, les ARN dans un volume final de 60µl.

Les concentrations et puretés des ADN et ARN extraits ont été mesurées au spectrophotomètre NanoDrop (ThermoScientific®, Wilmington, Etats-Unis).

La qualité des ARN extraits a été contrôlée sur automate Bioanalyseur 2100 Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) : appareil de microélectrophorèse capillaire sur puce permettant de déterminer l'intégrité des ARN.

Au total, 143 échantillons ont été extraits en ADN et ARN :

- 62 tissus tumoraux (TT) des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx
- 62 tissus sains (TS) correspondants aux mêmes patients atteints d'un cancer de l'oropharynx
- 19 tissus amygdaliens de la population témoin indemne de pathologie cancéreuse.

### 2.2 Génotypage HPV : technique INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*®

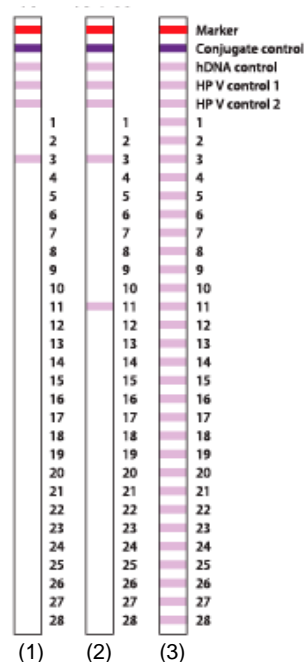
Nous avons réalisé une recherche et un génotypage des HPV dans les biopsies des tissus sains et des tissus tumoraux des 62 patients inclus dans notre étude et dans les biopsies amygdaliennes des 19 patients témoins.

La technique utilisée est la technique INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*® (Innogenetics®, Gent, Belgique). Cette technique repose sur une amplification par PCR du génome des HPV suivie d'une révélation par hybridation inverse de type LiPA (linear probe array). Elle permet, à partir d'1 µg d'ADN extrait, d'identifier 28 génotypes d'HPV :

- 18 HPV de haut risque : HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82
- 7 HPV de bas risque : HPV 6, 11, 40, 43, 44, 54 et 70
- 3 HPV non classés : HPV 69, 71 et 74.

Le test a été réalisé selon les recommandations du fabricant : un fragment de 65 pb situé au sein de la région L1 du génome HPV est amplifié par PCR en utilisant les amorces consensus SPF<sub>10</sub> biotinylées [45], les amplicons obtenus sont dénaturés puis hybridés avec des sondes marquées spécifiques de type immobilisées sur des bandelettes de nitrocellulose.

Après incubation avec le conjugué streptavidine/phosphatase alcaline, les bandelettes sont révélées par ajout du chromogène BCIP/NBT qui forme un précipité violet sous forme de bande s'il y a eu hybridation préalable des sondes. Les bandes apparues sont lues manuellement et permettent d'identifier le génotype HPV présent dans la biopsie par comparaison avec la bandelette de référence.



**Figure 11 : Représentation de bandelettes INNO-LiPA.** (1) : infection par HPV-16 (une bande en position 3) ; (2) : co-infection HPV-16 et 35 (une bande en position 3 (HPV-16) et une en position 11 (HPV-35)) ; (3) : bandelette de référence.

Un gène humain *HLA DPBI* est également amplifié par des amorces spécifiques, il permet de valider la technique (extraction, amplification et révélation).

Un témoin positif (HPV-6) et un témoin négatif (eau) passés en parallèle avec les échantillons testés valident chaque série.

Seuls les échantillons positifs soit pour l'HPV soit pour le gène *HLA DPBI* ont été inclus dans l'analyse.

### **2.3 Analyses statistiques**

La fréquence des infections à HPV et la distribution des génotypes ont été étudiées en fonction du sexe, de l'âge, de la consommation éthylo-tabagique et du stade TNM de la tumeur.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statview en utilisant des tests non paramétriques : le test du Chi<sup>2</sup> ou le test de probabilité exacte de Fisher quand nécessaire.

# **Résultats**

Sur les 62 patients atteints d'un cancer de l'oropharynx inclus dans l'étude, ni l'ADN cellulaire du gène *HLA DBP1* ni l'ADN HPV du tissu tumoral d'un patient n'ont pu être amplifiés, les résultats de tissu sain et de tissu tumoral de ce patient ont donc été exclus de l'étude.

Parmi la population témoin, 2 patients sont exclus pour la même raison.

L'étude compte donc 61 patients atteints de cancers de l'oropharynx et 17 patients témoins.

## **1 Caractéristiques des patients**

### **1.1 Patients atteints d'un cancer de l'oropharynx**

#### 1.1.1 Âge et sex-ratio

La moyenne d'âge des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx au moment du prélèvement est de 57 ans, les âges s'étalant de 39 à 76 ans.

Les patients sont majoritairement des hommes : 55 hommes et 6 femmes soit un sex ratio H/F à 9/1.

#### 1.1.2 Consommation éthylo-tabagique

Les informations sur la consommation éthylo-tabagique sont disponibles pour 58 patients :

- 100% des patients sont ou ont été fumeurs : 42 sont fumeurs actifs (72%), 16 patients sont sevrés au moment de l'étude (28%).
- 81% des patients sont ou ont été alcooliques : 39 patients sont alcooliques chroniques (67%), 8 patients sont alcooliques sevrés (14%).

La consommation tabagique moyenne est de 42 PA (6-85 PA) (données disponibles pour 41 patients).

La consommation alcoolique moyenne est de 173 grammes d'alcool pur (60-240g) (données disponibles pour 30 patients).



### 1.1.3 Localisation de la tumeur et stade TNM

L'ensemble des patients inclus dans l'étude présentent des cancers localisés au niveau de l'oropharynx :

- 34% amygdales
- 33% base de la langue
- 12% oropharynx
- 21% autres localisations (vallécule, voile du palais, commissure intermaxillaire).

Le stade TNM des tumeurs repose sur la taille de la tumeur (T), la présence éventuelle d'adénopathies (N) et la présence de métastases (M). Les données TNM, disponibles pour 60 patients, sont représentées ci-dessous. Aucun patient ne présente de métastases.

Taille de la tumeur	Pourcentages de la population
T1 (< 2 cm)	8%
T2 (2 à 4 cm)	42%
T3 (≥ 4 cm limitée à l'oropharynx)	28%
T4 (non limitée à l'oropharynx)	22%

**Tableau III : Distribution de la population en fonction de la taille de la tumeur**

Adénopathies	Pourcentages de la population
N0 (absence d'adénopathie)	63%
N1 (adénopathie homolatérale unique < 3 cm)	13%
N2a (adénopathie homolatérale unique 3 à 6 cm)	7%
N2b (adénopathies homolatérales multiples < 6 cm)	12%
N2c (adénopathies controlatérales ou bilatérales < 6 cm)	3%
N3 (adénopathie ≥ 6 cm)	2%

**Tableau IV : Distribution de la population en fonction de la présence et de la taille des adénopathies**

## 1.2 Population témoin

Les patients inclus dans la population témoin sont indemnes de pathologie cancéreuse, ils ont subi une amygdalectomie pour cause de phlegmon amygdalien ou pour amygdalite chronique.

Le sex ratio H/F de cette population est de 2/1. Leur moyenne d'âge est de 27 ans, les âges s'étalant de 14 à 53 ans.

## 2 Fréquence des infections à HPV

### 2.1 Patients atteints d'un cancer de l'oropharynx

48 patients (78,7%) sont positifs en HPV c'est-à-dire que l'ADN d'au moins un HPV est présent au niveau de l'oropharynx : soit uniquement au niveau de la tumeur (22,9%), soit uniquement dans le tissu sain (43,8%), soit dans les deux (33,3%). Seuls 13 patients (21,3%) ne présentent pas de papillomavirus humain au niveau de l'oropharynx.

	Nombre de patients HPV + (%)	Nombre de patients HPV – (%)
Tissu tumoral	27 (44,3)	34 (55,7)
Tissu sain	37 (60,7)	24 (39,3)
Tissus tumoraux et/ou sains	<b>48 (78,7)</b>	13 (21,3)

**Tableau V : Fréquence des infections à HPV** dans les tissus tumoraux, les tissus sains et lorsque les résultats dans les deux tissus sont cumulés.

L'ADN HPV est retrouvé dans les biopsies tumorales de 27 patients soit une fréquence HPV dans les tumeurs de 44,3%.

37 tissus sains sont positifs en HPV soit une fréquence dans les tissus sains de 60,7%.

La fréquence de l'infection à HPV est donc plus élevée dans les tissus sains que dans les tissus tumoraux des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx.

### 2.2 Population témoin

Au sein de la population témoin, 8 patients sont positifs en HPV soit une fréquence de l'infection de 47% dans cette population.

Un seul génotype est mis en évidence : le papillomavirus oncogène de type 16.

### 3 Comparaison des fréquences des infections à HPV au niveau des amygdales

Sur les 61 patients inclus dans l'étude, 21 patients ont un cancer localisé au niveau des amygdales. Nous avons comparé les fréquences des infections HPV dans les tissus tumoraux amygdaliens chez ces patients et chez les 17 patients indemnes de pathologie cancéreuse.

	Nombre de patients atteints d'un cancer de l'amygdale (%)	Nombre de patients indemnes de pathologie cancéreuse (%)
HPV +	7 (33%)	8 (47%)
HPV -	14 (67%)	9 (53%)

**Tableau VI : Comparaison des fréquences HPV dans les amygdales :** parmi les patients ayant des tumeurs localisées au niveau des amygdales et parmi la population témoin.

La fréquence des infections à HPV au niveau des amygdales est de 33% dans la population atteinte d'un cancer contre 47% dans la population témoin.

Le statut HPV au niveau des amygdales ne diffère pas de façon statistiquement significative entre les patients ayant une tumeur amygdalienne et les patients témoins opérés pour amygdalite chronique ( $p = 0.60$ ).

### 4 Association HPV-cancer

#### 4.1 Odd-Ratio (OR)

Le but de notre étude est de déterminer si le statut HPV positif est un facteur de risque pour le développement d'un cancer de l'oropharynx.

		Cancer de l'oropharynx	
		Oui (n = 61)	Non (n = 17)
Détection ADN HPV positive	Oui	48	8
	Non	13	9

**Tableau VII : Exposition à l'HPV parmi les patients atteints d'un cancer et parmi la population témoin.**

Pour cela, nous avons calculé un odd-ratio en prenant comme population malade l'ensemble des patients ayant un cancer de l'oropharynx ( $n = 61$ ) et comme population non malade les témoins opérés pour amygdalite chronique ( $n = 17$ ). Le critère d'exposition est la détection de l'ADN HPV. L'odd ratio obtenu est de 4,15 [1,34 – 12,88]. Ainsi, l'exposition à l'HPV est un facteur de risque cliniquement pertinent dans les cancers de l'oropharynx.

## **4.2 Sensibilité, spécificité**

Les résultats de la détection de l'ADN HPV peuvent être comparés chez les patients atteints d'un cancer de l'oropharynx et chez les patients indemnes de pathologie cancéreuse ; ainsi, nous pouvons estimer la sensibilité et la spécificité de notre test.

La sensibilité obtenue est de 78,7% ce qui signifie que la probabilité d'avoir un test de détection de l'ADN HPV positif chez un patient atteint d'un cancer de l'oropharynx est de 78,7%.

La spécificité représente la probabilité que ce test soit négatif chez un patient non malade. La spécificité est estimée à 52,9%.

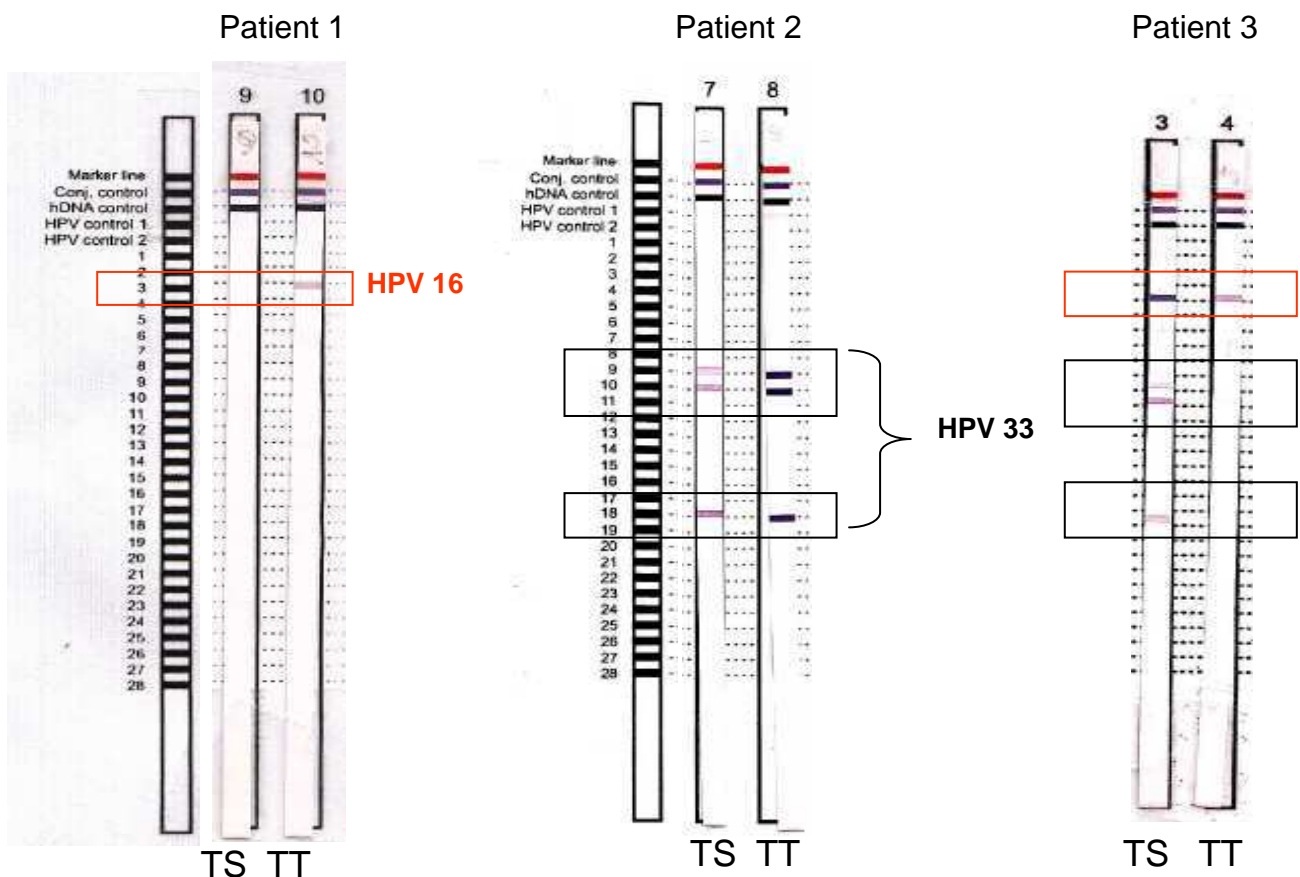
## 5 Distribution des géotypes chez les patients atteints d'un cancer

3 géotypes HPV différents sont retrouvés parmi les 48 patients positifs : HPV-16, HPV-33 et HPV-52.

Ces 3 géotypes correspondent à des papillomavirus de haut risque ayant un pouvoir oncogène.

Le papillomavirus de type 16 est le géotype le plus fréquemment rencontré, il est présent dans 83% des biopsies positives.

Le papillomavirus de type 33 est retrouvé dans 39% des biopsies positives et enfin l'HPV 52 est retrouvé chez 2 patients soit 3% des biopsies positives.



**Figure 12 : Exemples de géotypage HPV de tissu sain (TS) et tissu tumoral (TT) chez 3 patients**

**Patient 1 : Infection par HPV-16 dans le tissu tumoral :** tissu sain : négatif en HPV, présence de la bande contrôle ADN humain uniquement ; tissu tumoral : présence d'une bande en position 3 correspondant au papillomavirus humain de type 16.

**Patient 2 : Infection par HPV-33 dans le tissu tumoral et le tissu sain :** présence de 3 bandes en position 9, 10 et 18, cette combinaison de bandes correspond au géotype 33. Une co-infection avec le géotype 52 et/ou avec le géotype 54 ne peut être exclue car ces géotypes correspondent à une positivité en 18 et en 9 respectivement.

**Patient 3 : Co-infection 16-33 dans le tissu sain, infection par HPV-16 dans le tissu tumoral :** tissu sain : présence d'une bande en position 3 correspondant à HPV-16 et de 3 bandes (9, 10, 18) correspond à HPV-33 +/- HPV 52 +/- HPV 54 ; tissu tumoral : une bande en position 3 correspondant à HPV-16.

Une infection par l'HPV-33 est mise en évidence par l'association de 3 bandes : les bandes 9, 10 et 18 ; une infection par l'HPV-54 (LR-HPV) se traduit par la présence d'une bande unique en position 9, une infection par l'HPV-52 par une bande unique en position 18 ; ainsi, avec la technique INNO-LiPA, en présence d'ADN HPV-33, une co-infection avec un HPV-52 et/ou un HPV-54 ne peut être exclue.

Nombre de patients HPV positifs (%)	Génotype HPV du tissu tumoral	Génotype HPV du tissu sain
6 (12,5)	HPV-16	HPV-16
2 (4,2)	HPV-33 <sup>a</sup>	HPV-33 <sup>a</sup>
1 (2,1)	HPV-16 et 33 <sup>a</sup>	HPV-16 et 33 <sup>a</sup>
5 (10,4)	HPV-16	HPV-16 et 33 <sup>a</sup>
1 (2,1)	HPV-16 et 33 <sup>a</sup>	HPV-16
1 (2,1)	HPV-52	HPV-16
7 (14,6)	HPV-16	Négatif
11 (22,9)	Négatif	HPV-16
1 (2,1)	HPV-33 <sup>a</sup>	Négatif
5 (10,4)	Négatif	HPV-33 <sup>a</sup>
3 (6,3)	HPV-16 et 33 <sup>a</sup>	Négatif
4 (8,3)	Négatif	HPV-16 et 33 <sup>a</sup>
1 (2,1)	Négatif	HPV-16 et 52

**Tableau VIII : Distribution et correspondance entre les génotypes HPV dans les tissus tumoraux et sains** : 3 génotypes sont retrouvés : HPV-16, 33 et 52. <sup>a</sup> : en présence d'un génotype 33, la présence concomitante d'un génotype 52 ou 54 ne peut être exclue.

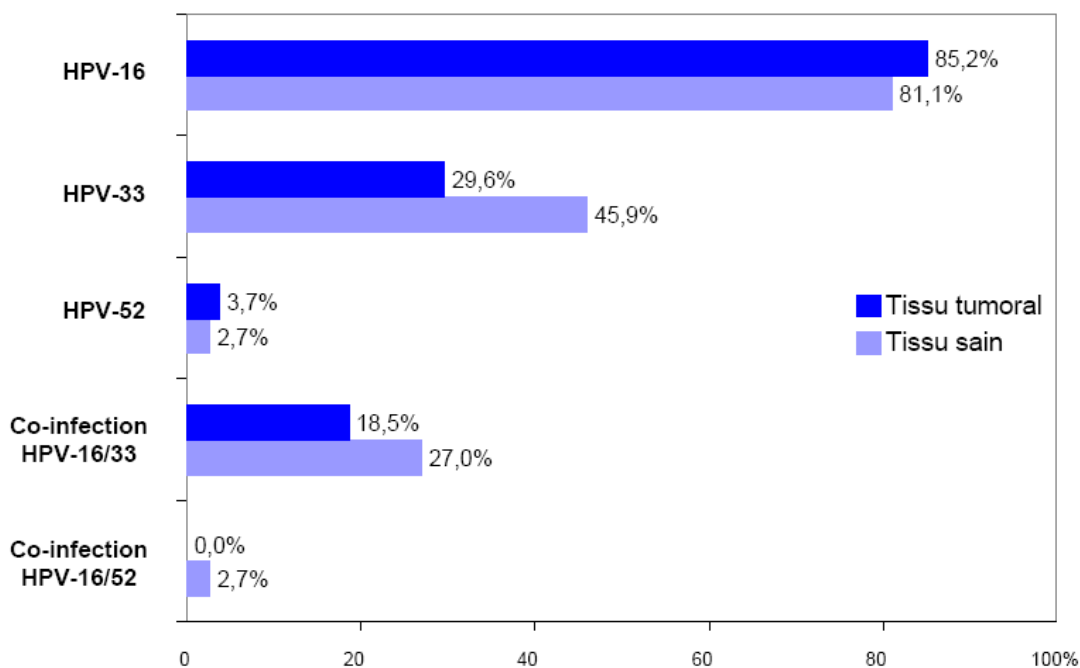
16 patients (33%) sont positifs dans les deux tissus. Le papillomavirus de type 16 est présent à la fois dans le tissu tumoral et le tissu sain pour 13 patients parmi ces 16, soit 81%.

Une concordance totale entre tissus tumoraux et tissus sains, c'est-à-dire la présence des mêmes génotypes exactement dans les deux types de tissus, est retrouvée chez uniquement 19% des patients.

Un nombre important de co-infections est mis en évidence : 15 patients sont co-infectés par au moins deux génotypes différents soit 31% des patients positifs.

La co-infection la plus fréquemment retrouvée est la co-infection HPV-16 / HPV-33, un seul patient présente une co-infection différente HPV-16 / HPV-52.

30% des tissus sains sont co-infectés contre 19% des tissus tumoraux. Cette différence de proportions n'est pas statistiquement significative. La distribution des co-infections ne diffère pas entre tissus sains et tissus tumoraux.



**Figure 13 : Distribution des génotypes HPV dans les tissus tumoraux et les tissus sains.**

La distribution des génotypes HPV ne diffère pas significativement dans les tissus sains et les tissus tumoraux ( $p = 0,32$ ). Les pourcentages donnés correspondent au nombre de génotypes positifs seuls ou en co-infections par rapport au nombre total de tissus positifs ( $n = 27$  pour les tissus tumoraux,  $n = 37$  pour les tissus sains).

En conclusion :

- 79% des patients sont positifs en HPV au niveau de l'oropharynx.
- 3 génotypes différents sont retrouvés : HPV-16, HPV-33 et HPV-52. Ces 3 génotypes sont oncogènes. Aucun génotype non oncogène potentiellement détecté par la technique INNO-LiPA HPV® n'est retrouvé.
- Le génotype le plus fréquemment retrouvé est le papillomavirus humain de type 16 : 83% des biopsies positives.
- 31% des patients sont co-infectés avec une majorité de co-infections HPV-16/33.
- Plus de patients sont positifs en HPV sur tissu sain que sur tissu tumoral (61% vs 44%).

## **6 Statut HPV et sexe, âge, consommation éthylo-tabagique, stade TNM et localisation**

### **6.1 Patients atteints d'un cancer de l'oropharynx**

Les analyses statistiques suivantes ont été réalisées en prenant en compte le statut HPV du tissu tumoral seul, du tissu sain seul ou de l'association tissu tumoral – tissu sain représentant la présence globale d'HPV au niveau de l'oropharynx. Les données présentées ci-dessous sont celles obtenues en cumulant les résultats HPV des tissus tumoraux et sains. Les analyses réalisées avec les statuts HPV des tissus tumoraux seuls ou sains seuls montrent des résultats équivalents, les résultats statistiques sont présentés en annexes.

La fréquence des infections à HPV ne diffère pas significativement en fonction du sexe des patients (sex-ratio 9/1 pour population HPV+ et HPV-) mais cette analyse doit être modérée du fait que 6 femmes uniquement font partie de cette étude.

La moyenne d'âge est de 57 ans pour les patients HPV positifs et HPV négatifs.

Lorsque l'on étudie la consommation tabagique des patients en fonction de leur statut HPV :

- Tous les patients de la cohorte sont fumeurs.
- Aucune différence de statut HPV n'est observée entre les patients tabagiques chroniques et les patients sevrés ( $p = 0,77$ ).
- La consommation tabagique en paquets-année ne diffère pas entre les patients positifs et négatifs pour l'HPV ( $p = 0,11$ ) mais une tendance non statistiquement significative est retrouvée : les consommations tabagiques moyennes sont plus faibles chez les patients positifs pour l'HPV (40 PA vs 52 PA).

Des résultats identiques sont observés pour la consommation alcoolique : le statut HPV ne diffère pas de façon significative entre les alcooliques chroniques, les patients sevrés et les non buveurs ; cependant, une tendance non statistiquement significative ( $p = 0,189$ ) est observée : la consommation d'alcool moyenne est plus faible chez les patients positifs pour l'HPV (168 g vs 210 g).

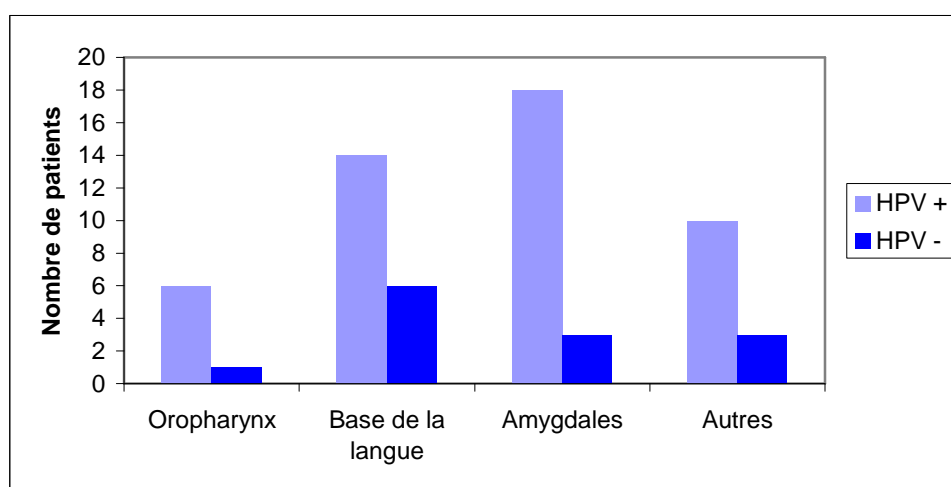
Le statut HPV n'est pas associé avec le stade TNM des tumeurs, il n'est pas observé de différences selon la taille de la tumeur ou selon la présence ou non d'adénopathies.



	Total (n = 61)	HPV + (n = 48)	HPV - (n = 13)	p obtenu
<b>Age</b> Range	57 ± 10 39 – 76	57 ± 10 39 – 76	57 ± 9 44 – 74	1
<b>Genre</b> Homme Femme	55 (90%) 6 (10%)	43 (90%) 5 (10%)	12 (92%) 1 (8%)	0,77
<b>Consommation de tabac</b> (n = 58) Non Oui Paquets-année (n = 41)	0 58 (100%) 41,6	0 48 (100%) 39,9	0 13 (100%) 51,7	0,77 0,11
<b>Consommation d'alcool</b> (n = 58) Non Oui Grammes/jour (n = 30)	11 (19,0%) 47 (81,0%) 173	7 (15,6%) 38 (84,4%) 168	4 (30,8%) 9 (69,2%) 210	0,43 0,19
<b>pT</b> (n = 60) T1 – T2 T3 – T4	30 (50%) 30 (50%)	21 (44,7%) 26 (55,3%)	9 (69,2) 4 (30,8)	0,12
<b>pN</b> (n = 60) N0 N1 à N3	38 (63,3%) 22 (36,7%)	28 (59,6%) 19 (40,4%)	10 (76,9%) 3 (23,1%)	0,29

**Tableau IX : Caractéristiques des 61 patients inclus dans l'étude en fonction du statut HPV.**

Au sein des cancers de l'oropharynx, le statut HPV ne diffère pas avec la localisation des tumeurs ( $p = 0,82$ ).



**Figure 14 : Statut HPV et localisations des tumeurs.** Le statut ne diffère pas selon les localisations : oropharynx (86% HPV+ vs 14% HPV-), base de la langue (70% vs 30%), amygdales (86% vs 14%) et autres correspondant à vallécule, voile du palais, commissure intermaxillaire (77% vs 23%).

## 6.2 Population témoin

La moyenne d'âge des patients HPV+ est de 26 ans (18-53 ans) contre 28 ans pour les patients HPV négatifs (14-43 ans) ( $p = 0.69$ ).

Le sex-ratio H/F est de 2/1 dans les deux populations.

# **Discussion**

L'implication des papillomavirus humains dans certains cancers de l'oropharynx est désormais bien établie [86,89]. L'infection par HPV est un facteur de risque indépendant de la consommation de tabac et d'alcool.

À notre connaissance, aucune étude ne compare la présence des papillomavirus humains dans les tissus sains et dans les tissus tumoraux de patients atteints de ces cancers.

Nous avons donc cherché à déterminer la fréquence des infections à HPV dans ces tissus chez 61 patients atteints d'un cancer de l'oropharynx dans le but d'éclaircir les données de la littérature actuelles.

Nous retrouvons une fréquence des infections à HPV dans les tissus tumoraux de 44,3%. Dans la littérature, l'étude française EDITH VI [85] retrouve une fréquence équivalente de 46,5% dans les tumeurs oropharyngées ; des distributions plus élevées sont observées aux Etats-Unis ou dans les pays scandinaves (64% des tumeurs de l'oropharynx sont positives pour l'HPV dans l'étude américaine de Ang [2], 75% dans l'étude suédoise d'Attner [3]).

En France, les incidences des cancers oropharyngés liés aux facteurs de risque tabac et alcool sont élevées par rapport aux autres pays européens et notamment aux pays nordiques où les incidences sont plus faibles [64], ce qui peut expliquer les fréquences inférieures retrouvées dans notre étude dans les biopsies tumorales puisque la part importante de la consommation éthylo-tabagique diminue l'impact de l'infection HPV dans les cancers oropharyngés.

La fréquence retrouvée dans les tissus sains des patients atteints d'un carcinome oropharyngé est de 60,7%. Cette fréquence est supérieure à celle des infections HPV dans les tissus tumoraux. Dans la littérature, à notre connaissance, aucune publication n'étudie la fréquence des infections HPV dans les tissus sains situés en périphérie des tumeurs oropharyngées.

La différence entre les fréquences d'infections à HPV dans les tissus tumoraux et sains peut être expliquée par l'hypothèse selon laquelle l'ADN viral présent dans le tissu tumoral est altéré par le processus de carcinogenèse, en particulier en cas d'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule hôte, il pourrait notamment y avoir clivage au niveau du gène *L1* qui est le gène amplifié avec la technique INNO-LiPA, ce qui peut se traduire par une sous-estimation du taux d'infection dans les tissus tumoraux. Ainsi, il pourrait être intéressant de génotyper les HPV avec une technique ciblant un autre gène, comme par exemple la technique Papillocheck® (Greiner Bio One) qui est une PCR dirigée contre le gène *E1*.

De plus, comme au niveau du col de l'utérus, les infections HPV au niveau de l'oropharynx peuvent être transitoires et la présence de l'ADN HPV dans des tissus sains ne doit pas être associée systématiquement à une évolution vers la carcinogenèse.

Ainsi, la quantification de l'ADN des HPV et la recherche des transcrits E6/E7 pourraient apporter des éclaircissements notamment sur la persistance du virus par l'intermédiaire de la charge virale et sur l'activité du virus au sein du tissu infecté grâce aux ARNm E6/E7 qui sont le témoin d'une infection active.

Lorsque la présence de papillomavirus est prise en compte à la fois dans le tissu tumoral et le tissu sain, 48 patients sur les 61 inclus dans l'étude sont HPV positifs soit une fréquence de 79%. Le cumul des infections dans les deux tissus montre donc une fréquence élevée : elle est le reflet de la présence globale des papillomavirus au niveau de l'oropharynx et non pas au niveau de la tumeur uniquement.

La fréquence de l'infection à HPV dans les amygdales de la population témoin indemne de pathologie cancéreuse est de 47%. Les 8 patients témoins HPV positifs le sont pour le génotype 16. Dans la littérature, peu d'études recherchent la présence d'HPV dans la population générale : en 2011, Duray *et al.* retrouvent une prévalence d'infection à HPV de 28% dans les amygdales d'une population saine avec 50% d'infections par des HR-HPV (HPV-16, 18 et 31) [31].

La sensibilité et la spécificité de la technique INNO-LiPA pour la détection de l'ADN HPV dans notre étude sont respectivement de 78,7% et de 52,9%.

Chez les patients atteints d'un cancer de l'oropharynx, la probabilité d'avoir un test HPV positif est donc relativement élevée.

Par opposition, un test HPV négatif a une faible signification puisque la probabilité que la détection d'ADN HPV soit négative chez un patient non atteint par un cancer de l'oropharynx est seulement de 52,9%. Cette faible spécificité soulève le problème de la prédictivité de notre test : la probabilité d'avoir un test HPV positif chez un patient non malade n'est pas négligeable.

En conclusion, la détection de l'ADN HPV est intéressante chez les patients dont le cancer de l'oropharynx est déjà connu : l'association HPV - cancer de l'oropharynx est confirmée par le calcul de l'odd ratio (OR = 4,15). La détection de l'ADN HPV ne peut être utilisée en dépistage dans ces cancers du fait de la faible spécificité obtenue.

3 génotypes différents ont été retrouvés dans notre étude : HPV-16, 33 et 52 ; tous sont des génotypes de haut risque et ont donc un pouvoir oncogène.

Dans la littérature, 80 à 90% des cancers de l'oropharynx HPV positifs en Europe sont associés à l'HPV-16 [44,70]. Les génotypes 33 et 52 sont beaucoup moins fréquents : dans l'étude EDITH VI [85], 2,7% et 3,4% des carcinomes oropharyngés HPV positifs le sont pour les HPV 33 et 52 respectivement.

Dans notre étude, le génotype 16 est le plus fréquent, il est présent dans 83% des prélèvements positifs ce qui est concordant avec les données de la littérature. L'étude d'Attner portant sur 71 biopsies positives en HPV retrouve 86% de biopsies positives pour le type 16 et 10% positives pour le type 33 [3], une revue de la littérature de Syrjänen met en évidence 84% d'HPV-16 sur 216 biopsies positives et 6% d'HPV-33 [88].

Le second génotype le plus fréquemment retrouvé dans notre étude est le génotype 33, il est présent dans 39% des biopsies positives, seul (40%) ou en co-infection avec l'HPV-16 (60%). Cette proportion est plus élevée que celle retrouvée classiquement ; mais de nombreuses études recherchent uniquement le papillomavirus de type 16 par des PCR spécifiques de type ou recherchent les autres génotypes uniquement en cas de négativité de la première PCR dirigée contre HPV-16 [2,21] ce qui diminue les pourcentages en cas de co-infections ; la part des infections avec le génotype 33 peut ainsi être sous-estimée. Néanmoins, ce facteur ne peut pas expliquer une telle différence de distribution du génotype 33 par rapport à la littérature, la suspicion d'une contamination avec les amplicons lors de la réalisation des PCR peut être soulevée bien que ce risque ait été théoriquement éliminé par l'utilisation d'un contrôle négatif lors de la réalisation de chaque série de manipulations ; une hybridation non spécifique des amplicons peut également être envisagée mais semble peu probable car le papillomavirus 33 est mis en évidence par l'association de trois bandes d'hybridation avec la technique INNO-LiPA.

Les bandelettes INNO-LiPA utilisées ne permettent pas, en cas de positivité pour l'HPV-33, de distinguer une mono-infection à HPV-33 d'une co-infection HPV-33 et 52 ou d'une co-infection HPV-33, 52, 54. Ainsi, une sous-estimation des infections par HPV-52 ou HPV-54 ne peut être exclue dans notre étude tout comme une sous-estimation des infections multiples à HPV.

Nous retrouvons un taux élevé de co-infections, 31% des patients HPV positifs sont co-infectés, par les HPV-16 et 33 dans la majorité des cas. Ce taux élevé de co-infections est peu retrouvé dans la littérature, une étude finlandaise portant sur 61 patients atteints d'un cancer de l'oropharynx et utilisant la même technique INNO-LiPA met en évidence 22% d'infections multiples avec une prédominance d'infections 16-33 [56] ; l'étude EDITH VI retrouve 3% d'infections multiples, la majorité des études ne retrouvent aucune co-infection. Comme pour la fréquence d'infection avec le génotype 33, cette différence par rapport à la littérature peut être expliquée par le fait que peu d'études utilisent des techniques permettant de mettre en évidence les infections multiples.

Les populations présentant des carcinomes oropharyngés liés à l'HPV sont généralement plus jeunes et ont des consommations d'alcool et de tabac inférieures aux populations souffrant de carcinomes oropharyngés non HPV dépendants [2,20,39].

Dans notre étude, aucune différence significative n'est observée concernant l'âge (âge moyen de 57 ans dans les deux populations) et les habitudes de consommations éthylo-tabagiques entre les populations HPV positives et HPV négatives. Mais l'ensemble de la population est ou a été fumeur et 81% des patients sont ou ont été alcooliques, le poids de ces deux facteurs de risque peut ainsi expliquer les discordances observées par rapport à la littérature. De plus, aucune différence statistiquement significative n'est observée mais une tendance est visible : les populations HPV positives ont une consommation de tabac et d'alcool globalement plus faible que les populations négatives pour l'HPV : -12PA et -42g d'alcool pur en moyenne.

Ces données ne correspondent donc pas complètement à celles retrouvées dans la littérature selon lesquelles la population atteinte de cancers oropharyngés HPV positifs est une population non éthylo-tabagique, ce qui peut être expliqué par l'imprégnation éthylo-tabagique forte de la population étudiée.

Le sex-ratio ne diffère pas entre les populations positives et négatives pour l'HPV (sex-ratio de 9/1) mais ces données doivent être modérées car uniquement six femmes font partie de notre étude. Les données de la littérature concordent avec nos résultats [64].

Concernant l'association entre la localisation des cancers et le statut HPV, plusieurs études montrent que les cancers positifs pour l'HPV sont localisés essentiellement au niveau des amygdales et de la base de la langue [76]. Dans notre étude, la répartition des cancers positifs pour l'HPV ne diffère pas par rapport aux cancers HPV négatifs concernant la localisation au sein de la sphère oropharyngée. Cette différence peut s'expliquer par le fait que dans la littérature, les études comparent le plus souvent amygdales et base de la langue au reste de la cavité orale tandis que nous avons sélectionné des localisations spécifiquement oropharyngées et peu d'études regardent la prévalence des infections HPV dans les différentes localisations au niveau de l'oropharynx.

Différentes études montrent que le stade TNM des tumeurs varie selon l'association ou non au papillomavirus [3,25]. Ainsi, les tumeurs HPV positives semblent être plus souvent associées à la présence d'adénopathies et semblent être diagnostiquées à des stades plus tardifs. Nos résultats ne montrent pas de différence significative entre le statut HPV et la taille de la tumeur ou la présence d'adénopathies mais nos résultats ne concernent que des petits groupes de patients, aussi, il est difficile de réaliser des comparaisons statistiques au sein de ces populations.

L'ensemble de ces résultats montre que les HPV jouent une part non négligeable dans les cancers de l'oropharynx avec une incidence en constante augmentation ces dernières années. Les cancers associés aux HPV sont de meilleur pronostic avec un taux de survie supérieur aux cancers non induits par les HPV, la recherche des HPV dans les cancers de l'oropharynx serait donc intéressante puisque certains auteurs suggèrent d'adapter le traitement en fonction du statut HPV et notamment de mettre en place des traitements moins lourds et moins invasifs chez les patients HPV positifs [90].

La part importante des HPV dans les cancers de l'oropharynx soulève également le problème de la vaccination de l'ensemble de la population.

Enfin, le rôle de la détection de ces virus en pratique clinique dans les cancers de l'oropharynx reste à définir. Notre étude montre que la détection de l'ADN des HPV seule n'est pas suffisamment prédictive puisqu'une proportion importante des tissus sains sont HPV positifs. Des techniques complémentaires sont nécessaires, notamment pour améliorer la prédictivité : la quantification des HPV pourrait donner une idée du risque de persistance du virus ; le dosage des ARNm E6/E7 qui sont le reflet de l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire ou le dosage de la protéine p16 dont l'élévation est le marqueur de l'inactivation du contrôle du cycle cellulaire médiée par les HR-HPV [2] pourraient également apporter des éclaircissements.

La quantification du génome viral des HPV-16 et la détection des ARNm E6 sont en cours de réalisation au laboratoire de Biologie Cellulaire du Pr. Jean-Luc Prétet de la Faculté de Médecine/Pharmacie de Besançon.



# **Conclusion**

**Thèse soutenue par** : Bérangère Dessaigne

**Titre** : Détection moléculaire des papillomavirus humains dans les tissus sains et tumoraux des cancers de l'oropharynx.

Les Papillomavirus humains oncogènes (HPV), principalement l'HPV de type 16 sont associés à certains cancers de l'oropharynx. La fréquence exacte de cette association est mal connue et la répartition du génome viral dans les tissus sains et tumoraux chez des patients atteints de ces cancers a rarement été étudiée.

L'objectif de cette étude était de comparer la fréquence de détection par PCR INNO-LiPA® (Innogenetics) de 28 HPV dans les tissus sains et tumoraux de 61 patients atteints de cancers de l'oropharynx. La présence du papillomavirus a été corrélée avec le sexe, l'âge, la consommation éthylo-tabagique et le stade TNM de la tumeur.

Une population témoin de 17 patients (opérés pour amygdalite chronique) a été étudiée en parallèle.

Un HPV oncogène a été détecté chez 79% des patients atteints de cancer : soit uniquement dans le tissu sain (44%), soit uniquement dans le tissu tumoral (23%), soit dans les deux tissus (33%). La fréquence des infections à HPV est donc plus élevée dans les tissus sains que dans les tissus tumoraux (61% vs 44%).

47% des patients témoins indemnes de pathologie cancéreuse ont de l'HPV au niveau des amygdales, uniquement de l'HPV-16.

Concernant les patients atteints d'un cancer :

- Les 3 génotypes oncogènes détectés sont : HPV-16, 33 et 52 avec une majorité d'HPV-16 (83%). 31% des patients sont co-infectés avec une majorité de co-infections 16-33. Aucun HPV non oncogène n'a été mis en évidence.
- La présence ou l'absence des HPV n'est pas corrélée avec l'âge, le sexe, le stade TNM de la tumeur mais il existe une tendance (non statistiquement significative) à une détection des HPV plus fréquente chez les gens avec une faible consommation d'alcool ou de tabac.

La détection de l'ADN HPV seule ne permet pas d'éclaircir totalement l'association HPV - cancer de l'oropharynx. Une étude de la charge virale HPV-16 et des ARNm oncogènes E6/E7 dans les tissus sains et tumoraux devrait permettre de mieux comprendre cette association.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 29 septembre 2011

LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT



LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Muriel CORNET

A blue ink signature of Muriel CORNET, consisting of a stylized, flowing line.

# **Références bibliographiques**

1. Almonte M., Albero G., Molano M., Carcamo C., Garcia P. J. et Perez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008, **26 Suppl 11**:L16-36.
2. Ang K. K., Harris J., Wheeler R., Weber R., Rosenthal D. I., Nguyen-Tan P. F., et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010, **363**:24-35.
3. Attner P., Du J., Nasman A., Hammarstedt L., Ramqvist T., Lindholm J., et al. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer*. 2010, **126**:2879-84.
4. Auperin A. et Hill C. [Epidemiology of head and neck carcinomas]. *Cancer Radiother*. 2005, **9**:1-7.
5. Bernard H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005, **32 Suppl 1**:S1-6.
6. Blomberg M., Nielsen A., Munk C. et Kjaer S. K. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*. 2010, **129**:733-41.
7. Boulet G., Horvath C., Vanden Broeck D., Sahebali S. et Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007, **39**:2006-11.
8. Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009, **10**:321-2.
9. Brisson M., Van de Velde N. et Boily M. C. Economic evaluation of human papillomavirus vaccination in developed countries. *Public Health Genomics*. 2009, **12**:343-51.
10. Burger E. A., Kornor H., Klemp M., Lauvrak V. et Kristiansen I. S. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2010, **120**:430-8.
11. Burk R. D., Chen Z. et Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009, **12**:281-90.
12. Carter J. J., Koutsky L. A., Hughes J. P., Lee S. K., Kuypers J., Kiviat N., et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000, **181**:1911-9.
13. Castellsague X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008, **110**:S4-7.
14. Castellsague X., Bosch F. X. et Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002, **89**:191-9.

15. Castle P. E., Solomon D., Schiffman M. et Wheeler C. M. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005, **97**:1066-71.
16. Chaturvedi A. K., Engels E. A., Anderson W. F. et Gillison M. L. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008, **26**:612-9.
17. Clavel C., Masure M., Bory J. P., Putaud I., Mangeonjean C., Lorenzato M., et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer.* 2001, **84**:1616-23.
18. Clifford G. M., Shin H. R., Oh J. K., Waterboer T., Ju Y. H., Vaccarella S., et al. Serologic response to oncogenic human papillomavirus types in male and female university students in Busan, South Korea. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007, **16**:1874-9.
19. Coutlee F., Trottier A. M., Ghattas G., Leduc R., Toma E., Sanche G., et al. Risk factors for oral human papillomavirus in adults infected and not infected with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis.* 1997, **24**:23-31.
20. D'Souza G., Kreimer A. R., Viscidi R., Pawlita M., Fakhry C., Koch W. M., et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007, **356**:1944-56.
21. D'Souza G., Zhang H. H., D'Souza W. D., Meyer R. R. et Gillison M. L. Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV16-positive and HPV16-negative head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2010, **46**:100-4.
22. Dahlgren L., Dahlstrand H. M., Lindquist D., Hogmo A., Bjornestal L., Lindholm J., et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer.* 2004, **112**:1015-9.
23. Dahlstrom K. R., Li G., Tortolero-Luna G., Wei Q. et Sturgis E. M. Differences in history of sexual behavior between patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and patients with squamous cell carcinoma at other head and neck sites. *Head Neck.* 2010, **33**:847-55.
24. Dalstein V., Riethmuller D., Pretet J. L., Le Bail Carval K., Sautiere J. L., Carbillet J. P., et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer.* 2003, **106**:396-403.
25. Dayyani F., Etzel C. J., Liu M., Ho C. H., Lippman S. M. et Tsao A. S. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2010, **2**:15.

26. de Sanjose S., Quint W. G., Alemany L., Geraets D. T., Klaustermeier J. E., Lloveras B., et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010, **11**:1048-56.
27. de Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U. et zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004, **324**:17-27.
28. Denis F., Hanz S. et Alain S. [Clearance, persistence and recurrence of HPV infection]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2008, **36**:430-40.
29. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006, **110**:525-41.
30. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005, **32 Suppl 1**:S7-15.
31. Duray A., Descamps G., Bettonville M., Sirtaine N., Ernoux-Neufcoeur P., Guenin S., et al. High Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus in Palatine Tonsils from Healthy Children and Adults. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011.
32. Eklund C., Zhou T. et Dillner J. Global proficiency study of human papillomavirus genotyping. *J Clin Microbiol.* 2010, **48**:4147-55.
33. Fakhry C., Westra W. H., Li S., Cmelak A., Ridge J. A., Pinto H., et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008, **100**:261-9.
34. Frazer I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004, **4**:46-54.
35. Galan-Sanchez F. et Rodriguez-Iglesias M. A. Comparison of human papillomavirus genotyping using commercial assays based on PCR and reverse hybridization methods. *Apmis.* 2009, **117**:708-15.
36. Ganguly N. et Parihar S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 2009, **34**:113-23.
37. Geraets D. T., Heideman D. A., de Koning M. N., Snijders P. J., van Alewijk D. C., Meijer C. J., et al. High-throughput genotyping of high-risk HPV by the digene HPV Genotyping LQ Test using GP5+/6+-PCR and xMAP technology. *J Clin Virol.* 2009, **46 Suppl 3**:S21-6.
38. Geraets D. T., Lenselink C. H., Bekkers R. L., van Doorn L. J., Quint W. G. et Melchers W. J. Universal human papillomavirus genotyping by the digene HPV Genotyping RH and LQ Tests. *J Clin Virol.* 2011, **50**:276-80.
39. Gillison M. L., D'Souza G., Westra W., Sugar E., Xiao W., Begum S., et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008, **100**:407-20.

40. Gillison M. L., Koch W. M., Capone R. B., Spafford M., Westra W. H., Wu L., et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000, **92**:709-20.
41. Golas S. M. Trends in palatine tonsillar cancer incidence and mortality rates in the United States. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007, **35**:98-108.
42. Hamid N. A., Brown C. et Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2009, **66**:1700-17.
43. Hammarstedt L., Dahlstrand H., Lindquist D., Onelov L., Ryott M., Luo J., et al. The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Otolaryngol.* 2007, **127**:988-92.
44. Hammarstedt L., Lindquist D., Dahlstrand H., Romanitan M., Dahlgren L. O., Joneberg J., et al. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer.* 2006, **119**:2620-3.
45. Hantz S., Goudard M., Marczuk V., Renaudie J., Dussartre C., Bakeland D., et al. [HPV detection and typing by INNO-LiPA assay on liquid cytology media Easyfix Labonord after extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen and Nuclisens easyMAG Biomerieux]. *Pathol Biol (Paris).* 2010, **58**:179-83.
46. Hashibe M., Brennan P., Benhamou S., Castellsague X., Chen C., Curado M. P., et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007, **99**:777-89.
47. Hashibe M., Brennan P., Chuang S. C., Boccia S., Castellsague X., Chen C., et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009, **18**:541-50.
48. Heard I., Tassie J. M., Schmitz V., Mandelbrot L., Kazatchkine M. D. et Orth G. Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load(1). *Obstet Gynecol.* 2000, **96**:403-9.
49. Heck J. E., Berthiller J., Vaccarella S., Winn D. M., Smith E. M., Shan'gina O., et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol.* 2010, **39**:166-81.
50. Hemminki K. et Dong C. Cancer in husbands of cervical cancer patients. *Epidemiology.* 2000, **11**:347-9.
51. Herrero R., Castellsague X., Pawlita M., Lissowska J., Kee F., Balaram P., et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003, **95**:1772-83.



52. Ho G. Y., Studentsov Y. Y., Bierman R. et Burk R. D. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004, **13**:110-6.
53. Hobbs C. G., Sterne J. A., Bailey M., Heyderman R. S., Birchall M. A. et Thomas S. J. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol.* 2006, **31**:259-66.
54. Howie H. L., Katzenellenbogen R. A. et Galloway D. A. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009, **384**:324-34.
55. Jung A. C., Briolat J., Millon R., de Reynies A., Rickman D., Thomas E., et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010, **126**:1882-94.
56. Koskinen W. J., Chen R. W., Leivo I., Makitie A., Back L., Kontio R., et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 2003, **107**:401-6.
57. Kreimer A. R., Alberg A. J., Daniel R., Gravitt P. E., Viscidi R., Garrett E. S., et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004, **189**:686-98.
58. Kreimer A. R., Clifford G. M., Boyle P. et Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, **14**:467-75.
59. Leinonen M., Nieminen P., Kotaniemi-Talonen L., Malila N., Tarkkanen J., Laurila P., et al. Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. *J Natl Cancer Inst.* 2009, **101**:1612-23.
60. Ligier K., Belot A., Launoy G., Velten M., Bossard N., Iwaz J., et al. Descriptive epidemiology of upper aerodigestive tract cancers in France: incidence over 1980-2005 and projection to 2010. *Oral Oncol.* 2011, **47**:302-7.
61. Lillo F. B., Lodini S., Ferrari D., Stayton C., Taccagni G., Galli L., et al. Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. *Clin Infect Dis.* 2005, **40**:451-7.
62. Lindel K., Beer K. T., Laissue J., Greiner R. H. et Aebbersold D. M. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001, **92**:805-13.
63. Lizano M., Berumen J. et Garcia-Carranca A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res.* 2009, **40**:428-34.

64. Marur S., D'Souza G., Westra W. H. et Forastiere A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010, **11**:781-9.
65. Monnier-Benoit S., Dalstein V., Riethmuller D., Lalaoui N., Mougin C. et Pretet J. L. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol.* 2006, **35**:270-7.
66. Mougin C., Bourgault-Villada I. et Coursaget P. [HPV immunization for the prevention of cervical cancer]. *Presse Med.* 2009, **38**:1750-68.
67. Mougin C., Nicolier M. et Decrion-Barthod A.-Z. HPV et cancers : mécanismes de l'oncogénèse. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2008, **2008**:35-42.
68. Munger K., Baldwin A., Edwards K. M., Hayakawa H., Nguyen C. L., Owens M., et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004, **78**:11451-60.
69. Munger K. et Howley P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002, **89**:213-28.
70. Nasman A., Attner P., Hammarstedt L., Du J., Eriksson M., Giraud G., et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer.* 2009, **125**:362-6.
71. Parkin D. M. et Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006, **24 Suppl 3**:S3/11-25.
72. Perry M. et Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today.* 1998, **19**:414-21.
73. Ramqvist T. et Dalianis T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerg Infect Dis.* 2010, **16**:1671-7.
74. Ronco G., Giorgi-Rossi P., Carozzi F., Confortini M., Dalla Palma P., Del Mistro A., et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010, **11**:249-57.
75. Rose Ragin C. C. et Taioli E. Second primary head and neck tumor risk in patients with cervical cancer--SEER data analysis. *Head Neck.* 2008, **30**:58-66.
76. Ryerson A. B., Peters E. S., Coughlin S. S., Chen V. W., Gillison M. L., Reichman M. E., et al. Burden of potentially human papillomavirus-associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US, 1998-2003. *Cancer.* 2008, **113**:2901-9.
77. Sandri M. T., Lentati P., Benini E., Dell'Orto P., Zorzino L., Carozzi F. M., et al. Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Clin Microbiol.* 2006, **44**:2141-6.

78. Schiffman M., Castle P. E., Jeronimo J., Rodriguez A. C. et Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007, **370**:890-907.
79. Schlecht N. F. Prognostic value of human papillomavirus in the survival of head and neck cancer patients: an overview of the evidence. *Oncol Rep*. 2005, **14**:1239-47.
80. Shiboski C. H., Schmidt B. L. et Jordan R. C. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer*. 2005, **103**:1843-9.
81. Singhi A. D. et Westra W. H. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*. 2010, **116**:2166-73.
82. Smith E. M., Ritchie J. M., Pawlita M., Rubenstein L. M., Haugen T. H., Turek L. P., et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2007, **120**:825-32.
83. Smith E. M., Ritchie J. M., Summersgill K. F., Klussmann J. P., Lee J. H., Wang D., et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004, **108**:766-72.
84. Smith E. M., Rubenstein L. M., Haugen T. H., Hamsikova E. et Turek L. P. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control*. 2010, **21**:1369-78.
85. St Guily J. L., Jacquard A. C., Pretet J. L., Haesebaert J., Beby-Defaux A., Clavel C., et al. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France--The EDiTH VI study. *J Clin Virol*. 2011, **51**:100-4.
86. Sudhoff H. H., Schwarze H. P., Winder D., Steinstraesser L., Gorner M., Stanley M., et al. Evidence for a causal association for HPV in head and neck cancers. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011.
87. Syrjanen K., Syrjanen S., Lamberg M., Pyrhonen S. et Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983, **12**:418-24.
88. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*. 2004, **57**:449-55.
89. Syrjanen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol*. 2010, **21 Suppl 7**:vii243-5.
90. Tribius S., Ihloff A. S., Rieckmann T., Petersen C. et Hoffmann M. Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. *Cancer Lett*. 2011, **304**:71-9.

91. Viscidi R. P., Schiffman M., Hildesheim A., Herrero R., Castle P. E., Bratti M. C., et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004, **13**:324-7.
92. Worden F. P., Kumar B., Lee J. S., Wolf G. T., Cordell K. G., Taylor J. M., et al. Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J Clin Oncol.* 2008, **26**:3138-46.
93. Wright T. C., Jr., Schiffman M., Solomon D., Cox J. T., Garcia F., Goldie S., et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* 2004, **103**:304-9.
94. Zhao F. H., Lin M. J., Chen F., Hu S. Y., Zhang R., Belinson J. L., et al. Performance of high-risk human papillomavirus DNA testing as a primary screen for cervical cancer: a pooled analysis of individual patient data from 17 population-based studies from China. *Lancet Oncol.* 2010, **11**:1160-71.
95. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002, **2**:342-50.
96. zur Hausen H. Similarities of papillomavirus infections with tumor promoters. *Princess Takamatsu Symp.* 1983, **14**:147-52.
97. État des lieux et recommandations pour le dépistage du cancer du col de l'utérus en France. 2010. HAS web site. Disponible sur: [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-11/synthese\\_recommandations\\_depistage\\_cancer\\_du\\_col\\_de\\_luterus.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-11/synthese_recommandations_depistage_cancer_du_col_de_luterus.pdf) - Consulté le 16/08/11.
98. Consommation annuelle d'alcool pur par habitant aux Etats-Unis. 2005. WHO web site. Disponible sur: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/msbgsramro.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsramro.pdf) - Consulté le 16/08/11.
99. Consommation annuelle d'alcool pur par habitant en France. 2005. WHO web site. Disponible sur: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/msbgsreur.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsreur.pdf) - Consulté le 16/08/11.
100. Bélot A., Velten M., Grosclaude P., Bossard N., Launoy G., Remontet L., et al. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005. Saint-Maurice (Fra): Institut de veille sanitaire; 2008. p. 132 p.

# **Annexes**

	HPV + (n = 37)	HPV – (n = 24)	p obtenu
<b>Age</b> Range	57 ± 10 39 – 75	58 ± 9 44 – 76	0,61
<b>Genre</b> Homme Femme	33 (89,2%) 4 (10,8%)	22 (91,7%) 2 (8,3%)	0,75
<b>Consommation de tabac</b> (n = 58) Non Oui	0 35 (100%)	0 23 (100%)	0,84
Paquets-année (n = 41)	39	48	0,14
<b>Consommation d'alcool</b> (n = 58) Non Oui	7 (20%) 28 (80%)	4 (17,4%) 19 (82,6%)	0,95
Grammes/jour (n = 30)	167	186	0,42
<b>pT</b> (n = 60) T1 – T2 T3 – T4	16 (44,4%) 20 (55,6%)	14 (58,3%) 10 (41,7%)	0,29
<b>pN</b> (n = 60) N0 N1 à N3	19 (52,8%) 17 (47,2%)	19 (79,2%) 5 (20,8%)	0,05

**Annexe 1 : Caractéristiques des 61 patients inclus dans l'étude en fonction du statut HPV HPV des tissus sains**

	HPV + (n = 27)	HPV – (n = 34)	p obtenu
<b>Age</b> Range	60 ± 9 47 – 76	55 ± 10 39 – 75	0,06
<b>Genre</b> Homme Femme	25 (92,6%) 2 (7,4%)	30 (88,2%) 4 (11,8%)	0,57
<b>Consommation de tabac</b> (n = 58) Non Oui	0 26 (100%)	0 32 (100%)	0,49
Paquets-année (n = 41)	38	45	0,19
<b>Consommation d'alcool</b> (n = 58) Non Oui	3 (11,5%) 23 (88,5%)	8 (25%) 24 (75%)	0,14
Grammes/jour (n = 30)	156	189	0,13
<b>pT</b> (n = 60) T1 – T2 T3 – T4	14 (51,9%) 13 (48,1%)	16 (48,5%) 17 (51,5%)	0,80
<b>pN</b> (n = 60) N0 N1 à N3	19 (70,4%) 8 (29,6%)	19 (57,6%) 14 (42,4%)	0,22

**Annexe 2 : Caractéristiques des 61 patients inclus dans l'étude en fonction du statut HPV des tissus tumoraux**

*Faculté de Pharmacie,  
Université Joseph Fourier Grenoble I.*



# Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :



D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.



D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.



De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.



Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».



**Bérangère DESSAIGNE**

## **Détection moléculaire des papillomavirus humains dans les tissus sains et tumoraux des cancers de l'oropharynx.**

### **Résumé**

Les Papillomavirus humains oncogènes (HPV), principalement l'HPV de type 16 sont associés à certains cancers de l'oropharynx. La fréquence exacte de cette association est mal connue et la répartition du génome viral dans les tissus sains et tumoraux chez des patients atteints de ces cancers a rarement été étudiée. L'objectif de cette étude était de comparer la fréquence de détection par PCR INNO-LiPA® (Innogenetics) de 28 HPV dans les tissus sains et tumoraux de 61 patients atteints de cancers de l'oropharynx. Une population témoin de 17 patients a été étudiée en parallèle.

La présence du papillomavirus a été corrélée avec le sexe, l'âge, la consommation éthylo-tabagique et le stade TNM de la tumeur.

79% des patients soit 48 patients ont un HPV : soit uniquement dans le tissu sain (44%), soit uniquement dans le tissu tumoral (23%), soit dans les deux tissus (33%). La fréquence des infections à HPV est donc plus élevée dans les tissus sains que dans les tissus tumoraux.

47% des patients témoins indemnes de pathologie cancéreuse ont de l'HPV au niveau des amygdales, uniquement de l'HPV-16.

Concernant les patients atteints d'un cancer : 3 génotypes sont détectés : HPV-16, 33 et 52 avec une majorité d'HPV-16 (83%). Tous sont oncogènes. 31% des patients sont co-infectés avec une majorité de co-infections 16-33.

La présence ou l'absence des HPV n'est pas corrélée avec l'âge, le sexe, le stade TNM de la tumeur mais il existe une tendance (non statistiquement significative) à une détection des HPV plus fréquente chez les gens avec une faible consommation d'alcool ou de tabac.

La détection de l'ADN HPV seule ne permet pas d'éclaircir totalement l'association HPV - cancer de l'oropharynx. Une étude de la charge virale HPV-16 et des ARNm oncogènes E6/E7 dans les tissus sains et tumoraux devrait permettre de mieux comprendre cette association.

**Mots clés :** Papillomavirus humain, Oropharynx, Tissus sains et tumoraux, PCR.

**Jury :** Madame le Professeur Muriel CORNET Présidente du jury

Monsieur le Professeur Patrice MORAND

Monsieur le Professeur Christian RIGHINI

Madame le Docteur Claire FAURE

**Adresse :** 7 lotissement le Serpanoux 63270 Vic-le-Comte

berangere.dessaigue@gmail.com