



**HAL**  
open science

# Identification de facteurs prédictifs de sévérité des papillomatoses respiratoires récurrentes juvéniles : à propos d'une série de 48 patients

Charles Lépine

► **To cite this version:**

Charles Lépine. Identification de facteurs prédictifs de sévérité des papillomatoses respiratoires récurrentes juvéniles : à propos d'une série de 48 patients. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02292966

**HAL Id: dumas-02292966**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02292966v1>

Submitted on 20 Sep 2019

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4*

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10*

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2018

N° 209

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE**  
**DOCTEUR EN MÉDECINE**

Identification de facteurs prédictifs de sévérité des  
papillomatoses respiratoires récurrentes juvéniles :  
à propos d'une série de 48 patients

Présentée et soutenue publiquement  
le 8 octobre 2018

Par

***Charles LÉPINE***

Né le 25 juillet 1989 à Levallois-Perret (92)

Dirigée par Mme Le Docteur Louise Galmiche-Rolland, PH

Jury :

Mme Le Professeur Cécile Badoual, PU-PH ..... Président

Mme Le Professeur Dominique Berrebi, PU-PH

M. Le Professeur Nicolas Leboulanger, PU-PH

Mme Le Docteur Hélène Péré, MCU-PH



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Louise Galmiche-Rolland et le professeur Cécile Badoual de m'avoir proposé ce travail. J'attends avec impatience nos nouvelles collaborations.

Merci à Louise de m'avoir consacré autant de temps pour m'encadrer, me soutenir et d'avoir répondu à mes nombreuses questions.

Merci à Cécile de m'avoir pris sous son aile pour mon projet de spécialisation en pathologie ORL, je vous suis très reconnaissant de toute l'énergie que vous m'accordez au quotidien depuis un an.

Merci au Professeur Dominique Berrebi de me faire l'honneur de juger mon travail, de m'avoir permis d'avoir accès aux prélèvements de l'hôpital Robert Debré et d'avoir proposé que Louis m'aide dans le recueil de donnée.

Merci au Professeur Nicolas Leboulanger de me faire l'honneur de juger mon travail et d'avoir pris le temps de répondre à mes interrogations cliniques.

Merci au Docteur Hélène Péré de me faire l'honneur de juger mon travail et pour le temps consacré aux typages HPV.

Un grand merci au Lions Club de Tulle et à Madame le Professeur Nicole Brousse pour le financement de l'achat du matériel pour le RNAscope qui a été essentiel pour la réalisation de ce travail.

Merci à l'équipe 10 et plus particulièrement à Marion Mandavit et Marine de m'avoir encadré pendant mes manip' et de m'avoir dépanné dans les moments de rush.

Je tiens à remercier également Thibault Voron pour le précieux temps qu'il m'a accordé pour m'expliquer et m'aider à faire les analyses statistiques.

Merci à Louis Tournier d'avoir commencé le recueil de données à l'hôpital Robert Debré.

Merci à tous mes maîtres d'internat qui m'ont transmis leur passion, leur rigueur, leur bonne humeur, leurs connaissances et leur vision de la médecine d'aujourd'hui et de demain.

A mes « anapotes » et co-internes Rémi, Lucie, Marine, Magali, Jérémy, Sébastien et beaucoup d'autres, avec lesquels j'ai passé 5 années de folie et plein de souvenirs en salle de garde.

A Charlotte, Clémence, Laurent, Margaux et Sandrine : mes best medical friends merci d'avoir fait de ces études une période inoubliable!

A Alexandre, Alexis, Paul, Quentin, Raphaël, Sébastien : merci d'être venu m'écouter, tant de moments partagés et encore tant d'autres à partager !

A mes parents qui m'ont toujours soutenu et enveloppé d'amour depuis le début de ces longues études. Merci, je suis ici grâce à vous.

A celle qui partage ma vie et qui m'a soutenu jusqu'au bout du bout : je te remercie du fond du cœur. Comme dirait Antoine de Saint-Exupéry : « *Aimer, ce n'est pas se regarder l'un l'autre, c'est regarder ensemble dans la même direction.* »

Tendres pensées à mon Ruby parti pendant ce travail.

## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>8</b>
<b>PREMIERE PARTIE : GENERALITES.....</b>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE 1 : PAPILOMAVIRUS HUMAIN.....</b>	<b>9</b>
1.1 PRESENTATION.....	9
1.2 CLASSIFICATION DES PAPILOMAVIRUS.....	10
1.3 EPIDEMIOLOGIE.....	12
1.4 TRANSMISSION.....	14
1.5 CYCLE VIRAL.....	14
1.6 POTENTIEL ONCOGENE.....	16
1.6.1 ROLE ONCOGENE DES PROTEINES E6 ET E7.....	16
1.6.1.1 PROTEINE E6.....	16
1.6.1.2 PROTEINE E7.....	17
1.6.2 MECANISMES D’ECHAPPEMENT IMMUNITAIRE LORS D’UNE INFECTION A HPV.....	18
1.6.3 HISTOIRE NATURELLE DES LESIONS CARCINOMATEUSES.....	19
1.7 PROTEINES E6 ET E7 DANS LES HPV A BAS RISQUE.....	20
1.7.1 PROTEINE E6.....	20
1.7.2 PROTEINE E7.....	20
1.8 METHODES DE DETECTION D’HPV.....	20
1.8.1 TECHNIQUES BASEES SUR LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR).....	21
1.8.2 RT-PCR.....	21
1.8.3 SEROLOGIE HPV.....	22
1.8.4 HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DE L’ADN VIRAL.....	22
1.8.5 HYBRIDATION <i>IN SITU</i> DE L’ARN VIRAL (RNASCOPE).....	23
1.8.6 IMMUNOHISTOCHEMIE DIRIGEE CONTRE LA PROTEINE P16.....	23
1.9 VACCINATION PROPHYLACTIQUE.....	24
<b>CHAPITRE 2 : PAPILOMATOSE RESPIRATOIRE RECURRENTE.....</b>	<b>26</b>
2.1 DEFINITION.....	26
2.2 ETIOLOGIE.....	27
2.3 MODE DE TRANSMISSION.....	27
2.4 SUSCEPTIBILITE GENETIQUE ET MICRO-ENVIRONNEMENT TUMORAL.....	29
2.5 EPIDEMIOLOGIE.....	31
2.6 ASPECTS CLINIQUES.....	32
2.6.1 SYMPTOMATOLOGIE.....	32
2.6.2 ASPECT MACROSCOPIQUE.....	32
2.6.3 ASPECTS MICROSCOPIQUES.....	33
2.6.4 EVOLUTION.....	34
2.7 FACTEURS DE RISQUES DE SEVERITE.....	35
2.8 TRAITEMENTS.....	36
2.8.1 CHIRURGIE D’EXERESE.....	36
2.8.2 TRAITEMENTS ADJUVANTS.....	37
2.8.2.1 INTERFERON A.....	37
2.8.2.2 CIDOFOVIR.....	38
2.8.2.3 BEVACIZUMAB.....	38
2.8.2.4 CELECOXIB.....	39

2.8.2.5	IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-PD-1/PD-L1 .....	39
2.8.2.6	VACCINATION CONTRE L'HPV .....	40
2.8.3	TRAITEMENTS PROPHYLACTIQUES .....	40
2.9	ASPECTS ECONOMIQUES.....	41
<b>CHAPITRE 3 : ACTEURS DE L'HOMEOSTASIE CELLULAIRE.....</b>		<b>42</b>
3.1	LA PROTEINE P53 .....	42
3.1.1	PRESENTATION .....	42
3.1.2	FONCTIONS PRINCIPALES .....	42
3.1.3	UTILISATION EN ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES .....	44
3.2	LA PROTEINE P63 .....	45
3.2.1	PRESENTATION .....	45
3.2.2	FONCTIONS PRINCIPALES.....	45
3.2.3	UTILISATION EN ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES .....	46

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES .....** **48**

1.	POPULATION.....	48
1.1	DONNEES CLINIQUES.....	48
1.2	TYPAGE HPV .....	49
2	TECHNIQUES REALISEES .....	49
2.1	IMMUNOHISTOCHEMIE.....	49
2.2	ANALYSES D'IMAGE.....	50
2.3	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> AVEC UNE SONDE ARN HPV 6/11 .....	54
3.	CRITERES DE JUGEMENTS .....	57
3.1	DEFINITION DE LA SEVERITE DE LA MALADIE .....	57
3.2	CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL.....	57
3.3	CRITERE DE JUGEMENT SECONDAIRE .....	57
4.	ANALYSES STATISTIQUES .....	57

## **TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....** **58**

1.	POPULATION.....	58
1.1.	STATUT HPV .....	58
1.2.	LOCALISATION DES ATTEINTES .....	59
1.3.	TRAITEMENTS .....	59
1.4.	DONNEES ENDOSCOPIQUES .....	60
1.5.	COMPLICATIONS .....	60
1.6.	RESULTATS DES MARQUAGES IMMUNOHISTOCHEMIQUES .....	61
1.7.	RESULTATS DES MARQUAGES EN HYBRIDATION <i>IN SITU</i> AVEC LES SONDES A ARN .....	62
2.	EVALUATION DE FACTEURS PREDICTIFS DE LA SEVERITE DE LA MALADIE.....	62
2.1.	ANALYSE DES DONNEES CLINIQUES .....	63
3.	COMPARAISON DES POPULATIONS DE SCORE RNASCOPE 1+ ET 2+.....	68
4.	PRISE EN COMPTE DE L'INJECTION DE CIDOFOVIR AVANT LE PRELEVEMENT .....	69
5.	RESULTATS SUPPLEMENTAIRES .....	71
5.1.	ANALYSE MULTIVARIEE .....	71
5.2.	PATIENTE PRESENTANT UN PAPILLOME MALPIGHIEN LARYNGE LIE A HPV16 .....	71

## **QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....** **72**

1.	POPULATION.....	72
2.	VALIDATION DES TECHNIQUES DU RNASCOPE ET DE L'ANALYSE D'IMAGE .....	73
3.	COMPARAISON ENTRE LES PATIENTS PRESENTANT UNE MALADIE SEVERE ET PEU SEVERE ...	74

<b>4. COMPARAISON DES POPULATIONS EN FONCTION DES RESULTATS DU RNASCOPE .....</b>	<b>77</b>
<b><u>CONCLUSION.....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE .....</u></b>	<b><u>80</u></b>
<b><u>ANNEXE 1 .....</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>ANNEXE 2 .....</u></b>	<b><u>91</u></b>
<b><u>ANNEXE 3 .....</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b>1.1 PRINCIPE DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE .....</b>	<b>92</b>
<b>1.1.1 ANTICORPS .....</b>	<b>92</b>
<b>1.1.2 PREPARATION DES ECHANTILLONS .....</b>	<b>93</b>
<b>1.1.3 REVELATION .....</b>	<b>93</b>
<b>1.1.4 ALTERATIONS DES EPITOPES DANS LES TISSUS FFPE.....</b>	<b>94</b>
<b><u>ANNEXE 4 .....</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b><u>ANNEXE 5 .....</u></b>	<b><u>96</u></b>

# Abréviations

---

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AG : Anesthésie Générale

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ASC-US : Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (Cellules malpighiennes atypiques de signification indéterminée)

CEVADS : Carcinomes Epidermoïdes des Voies Aéro-Digestives Supérieures

CISH : Chromogenic *In Situ* Hybridation (hybridation *in situ* chromogénique)

CMH: Complexe Majeur d'Histo-compatibilité

DapB : Dihydrodipicolinatereductase B

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (récepteur au facteur de croissance épidermique)

FFPE: Formalin Fixed and Paraffin Embedded (coupes fixées en formol et incluses en paraffine)

HIS: Hybridation *In Situ*

HPV : Human PapillomaVirus (papillomavirus humain)

HSIL : High grade Squamous Intraepithelial Lesion (lésion intra-épithéliale malpighienne de haut grade)

INCA: Institut National du Cancer

JORRP: Juvénile-Onset recurrent respiratory papillomatosis

KIR: Killer cell Ig-like Receptor (récepteur des cellules NK)

KO: Knockout

LCR: Long Control Region

LSIL : Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (lésion intra-épithéliale de bas grade)

NK : Natural Killer

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : open reading frame (cadre de lecture ouvert)

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PaRR: Pattern Recognition Receptors

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD1 : Programmed Death 1

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1

PDZ: Le domaine PDZ a été nommé d'après les protéines dans lesquelles il a été initialement trouvé : PSD-95, Dlg et ZO-1

PMSI : Programme de médicalisation des systèmes d'information

PPIB : Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B

PRR : papillomatose respiratoire récurrente

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

Rb: protéine du rétinoblastome

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

VADS : Voies Aéro-Digestives Supérieures

VEGF-A : Vascular endothelial growth factor A (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A)

# Introduction

---

La papillomatose respiratoire récurrente (PRR) dans sa forme juvénile est une maladie rare qui survient en général avant l'âge de 5 ans. Cependant, elle est la pathologie laryngée tumorale bénigne la plus fréquente chez l'enfant. Elle est caractérisée par l'apparition récurrente de tumeurs bénignes malpighiennes exophytiques se développant aux dépens des muqueuses des voies aériennes, principalement supérieures. Ces lésions sont liées au papillomavirus humain (HPV), aux génotypes 6 et 11 dans la très grande majorité des cas.

Bien que ces tumeurs soient bénignes, le pronostic vital peut être engagé du fait, d'une part de la possible obstruction des voies aériennes et d'autre part d'une possible transformation maligne. L'évolutivité de la maladie reste totalement imprévisible, qu'il s'agisse de la fréquence des récives ou de l'évolution de la maladie vers une aggravation ou une guérison parfois spontanée. Ceci contraint tous les patients à un suivi rapproché.

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif : la prise en charge vise à maintenir les voies aériennes perméables en réséquant chirurgicalement ces papillomes laryngés. Les interventions chirurgicales répétées sous anesthésie générale participent à la morbidité de la PRR. Plusieurs traitements adjuvants ont été utilisés pour limiter la croissance des papillomes et le nombre d'interventions en cas d'atteinte sévère. Toutefois, nombre de ces traitements n'ont pas fait la preuve de leur efficacité.

L'objectif de ce travail de thèse est l'identification de critères histologiques prédictifs de la sévérité de la PRR juvénile. Il a été mené sur une série de 48 enfants suivis à l'hôpital Necker-Enfants Malades et à l'hôpital Robert Debré. Une analyse immunohistochimique des papillomes avec les anticorps anti-p16, p53 et p63 a été combinée à une étude d'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) reconnaissant les ARNm des protéines E6 et E7 des HPV 6 et 11.

# Première partie : Généralités

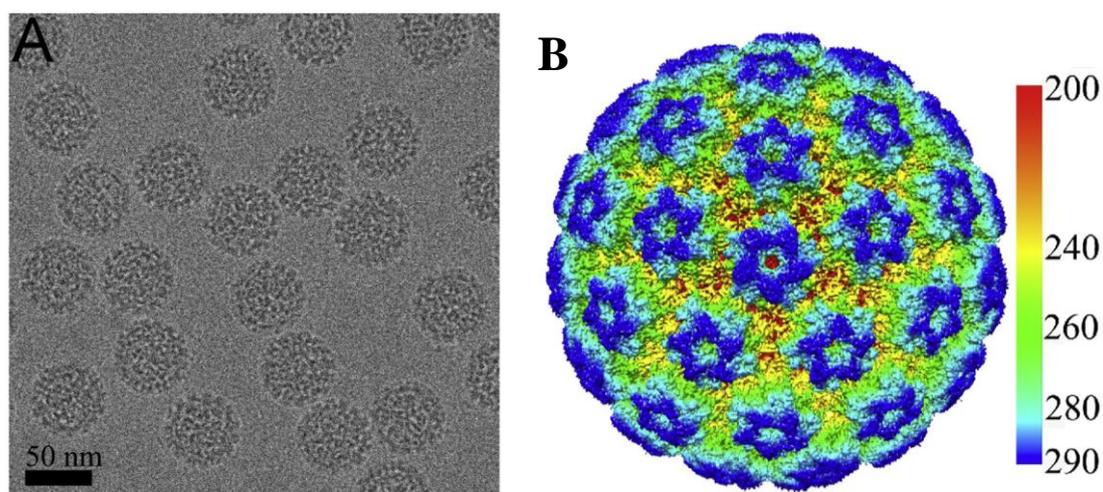
---

## Chapitre 1 : Papillomavirus humain

L'agent viral causal de la PRR est le papillomavirus humain (HPV), plus particulièrement les types 6 et 11 à bas risque oncogène. Ce chapitre permet de poser les bases épidémiologiques et physiopathologiques des infections à HPV pour pouvoir aborder ensuite de façon plus approfondie son rôle dans la PRR. La majorité des connaissances sur l'HPV provient d'études menées sur les HPV à haut risque oncogène, notamment l'HPV 16, dans les lésions anogénitales liées à l'HPV. Il nous semble donc primordial de traiter ce chapitre également sous l'angle des infections aux HPV à haut risque du fait de certaines similarités avec les infections à HPV à bas risque oncogène.

### 1.1 Présentation

L'HPV est un petit virus à ADN, de 55 nm de diamètre (figure 1). Il fait partie de la famille des Papillomaviridae, virus que l'on retrouve également chez les mammifères, les reptiles, les oiseaux et les poissons. Il est dit nu car il ne possède pas d'enveloppe. Il présente une capsidre icosaédrique qui protège son ADN bicaténaire et circulaire, le rendant ainsi très résistant aux différentes agressions du milieu extérieur, y compris à certains désinfectants [1].



**Figure 1 : A) Photo en microscopie électronique de particules virales d'HPV16.  
B) Reconstitution 3D de la surface d'une particule virale d'HPV16 colorée en fonction de la distance par rapport au centre (d'après J. Guan et al.[2])**

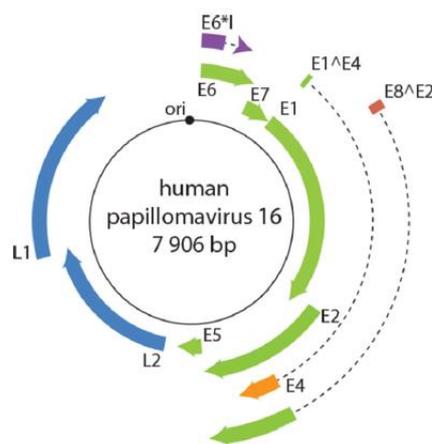
Il est responsable d'une grande variété de lésions, muqueuses ou cutanées, comme par exemple les verrues vulgaires, les condylomes et les papillomes malpighiens. Par ailleurs, certains types d'HPV présentent un potentiel oncogène. Ils sont en effet à l'origine de nombreux cancers des muqueuses comme par exemple le carcinome épidermoïde du col de l'utérus (localisation où l'HPV a été le plus étudié), ou de façon beaucoup plus rare, dans certains cancers cutanés.

Enfin, son génome d'environ 8000 paires de bases (pb) est composé de trois régions (figure 2):

- une région non codante, appelée région de contrôle du locus (LCR : *long control region*) d'environ 1 000 pb. Le LCR contrôle la transcription des gènes précoces et tardifs.

- une région d'environ 4 000 pb codant les protéines précoces E1, E2, E3, E4, E5, E6 et E7. Elles sont impliquées dans la réplication virale. Ces protéines sont traduites à partir d'ARN messagers (ARNm) possédant différentes phases ouvertes de lecture (ORF : *open reading frame*).

- une région codant les protéines tardives L1 et L2 d'environ 3 000 pb. Il s'agit des protéines de la capsid, requises dans la phase tardive du cycle viral d'encapsidation du virus.



**Figure 2 : Diagramme du génome d'HPV 16. Les flèches extérieures représentent les phases ouvertes de lecture codant les protéines. Les pointillés représentent les séquences introniques. Le cercle noir correspond au site d'origine de la réplication virale (ori). D'après Van Doorslaer *et al.* [3].**

## 1.2 Classification des papillomavirus

La classification des papillomavirus est basée sur la séquence nucléotidique du gène *L1*. Actuellement il est décrit 2 sous familles, incluant plus de 50 genres et plus de 130 espèces [3]. Pour qu'un nouveau type d'HPV soit reconnu, il faut que le génome complet du virus ait été séquencé et que sa séquence *L1* présente une divergence de plus de 10 % avec la séquence *L1* du type connu le plus proche génétiquement. Une différence de 2 à 10 % définit l'appartenance

à un sous-type et une différence de moins de 2 % définit un variant. Les différents types de papillomavirus sont regroupés en espèces qui sont désignées par un numéro. Une espèce regroupe les types présentant une homologie de 60 % à 70% de séquence *L1*. Les différentes espèces sont regroupées en genres. L'appartenance à un même genre est définie par une homologie de séquence *L1* supérieure à 60 % [4]. Les HPV se répartissent dans les genres  $\alpha$ -papillomavirus,  $\beta$ -papillomavirus,  $\gamma$ -papillomavirus,  $\mu$ -papillomavirus et  $\nu$ -papillomavirus. Par ailleurs, les différents types d'HPV se caractérisent par leur tropisme tissulaire, cutanés pour certains, muqueux ou mixtes pour d'autres. Les HPV muqueux ( $\alpha$ -papillomavirus) sont différenciés également selon leur potentiel oncogène. On distingue ainsi les types d'HPV à faible risque oncogène de ceux à fort risque oncogène. Les localisations les plus fréquentes et leur potentiel oncogène sont détaillés dans le tableau 1 en fonction du genre, de l'espèce et du type [4]. Généralement, les HPV à bas risque sont associés à des lésions bénignes alors que les HPV à haut risque peuvent entraîner le développement de cancers.

Genre	Espèce	Type principal	Autre types	Commentaires	Genre	Espèce	Type principal	Autre types	Commentaires				
Alpha-papillomavirus	1	HPV 32	HPV 42	Bas risque, lésions orales ou génitales	Beta-papillomavirus	1	HPV 5	HPV 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25, 36, 47, 93	Lésions cutanées, généralement bénignes. Lésions parfois malignes: épidermodysplasie verruciforme, immunodéprimés				
	2	HPV 10	HPV 3, 28, 29, 78, 94	Bas risque, lésions cutanées, parfois muqueuses									
	3	HPV 61	HPV 62, 72, 81, 83, 84, 86, 87, 89	Bas risque, lésions muqueuses									
	4	HPV 2	HPV 27, 57	Verrues vulgaires									
	5	HPV 26	HPV 51, 69, 82	Haut risque, lésions muqueuses									
	6	HPV 53	HPV 30, 56, 66	Haut risque, lésions muqueuses	Gamma-papillomavirus	2	HPV 9	HPV 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80	Lésions cutanées, généralement bénignes. Lésions parfois malignes: épidermodysplasie verruciforme, immunodéprimés				
	7	HPV 18	HPV 39, 45, 59, 68, 70, 85	Haut risque, lésions muqueuses									
	8	HPV 7	HPV 40, 43, 91	Bas risque lésions cutanées et muqueuses									
	9	HPV 16	HPV 31, 33, 35, 52, 58, 67	Haut risque, lésions muqueuses									
	10	HPV 6	HPV 11, 13, 44, 74	Bas risque, condylo-mes acuminés, papillomatose laryngée									
	11	HPV 34	HPV 73	Haut risque, lésions muqueuses	Mu-papillomavirus	3	HPV 49	HPV 75, 76	Lésions cutanées bénignes				
	12	RhPV 1		Papillomavirus singe Rhésus									
	13	HPV 54		Bas risque, lésions muqueuses									
	14	HPV 90		Bas risque, lésions muqueuses	Nu-papillomavirus	4	HPV 92		Lésions cutanées pré-cancéreuses et cancéreuses				
	15	HPV 71		Bas risque, lésions muqueuses									
					Mu-papillomavirus	5	HPV 96		Lésions cutanées pré-cancéreuses et cancéreuses				
				Gamma-papillomavirus						1	HPV 4	HPV 65, 95	Lésions cutanées
				Mu-papillomavirus	2	HPV 63			Verrues vulgaires, plantaires				
				Nu-papillomavirus	1	HPV 41			Lésions cutanées, retrouvé dans carcinomes cutanés				

**Tableau 1 : Classification des HPV en fonction du genre, de l'espèce et du type d'après de Villiers et al [5].**

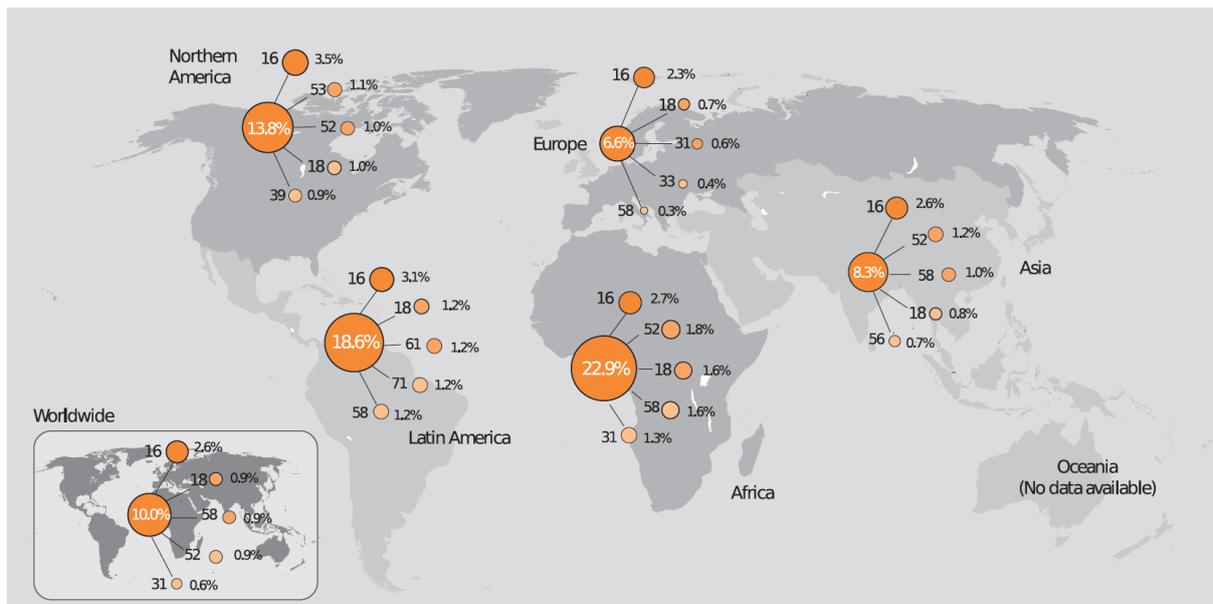
Les HPV 6 et 11 font partie du genre  $\alpha$ -papillomavirus et de l'espèce 10. Il a été décrit pour l'HPV 11 deux sous-types A et B. Le sous type A est divisé en variants A1, A2, A3 et A4, le principal dans le monde étant A2 [6]. Pour l'HPV 6, il a également été décrit deux-sous types A et B. Le sous-type B est divisé en variants B1, B2, B3, B4 et B5. Le sous-type A prédomine

en Asie, le sous type B3 en Afrique et le sous type B1 en Europe, en Amérique du Nord et du Sud [7].

### 1.3 Epidémiologie

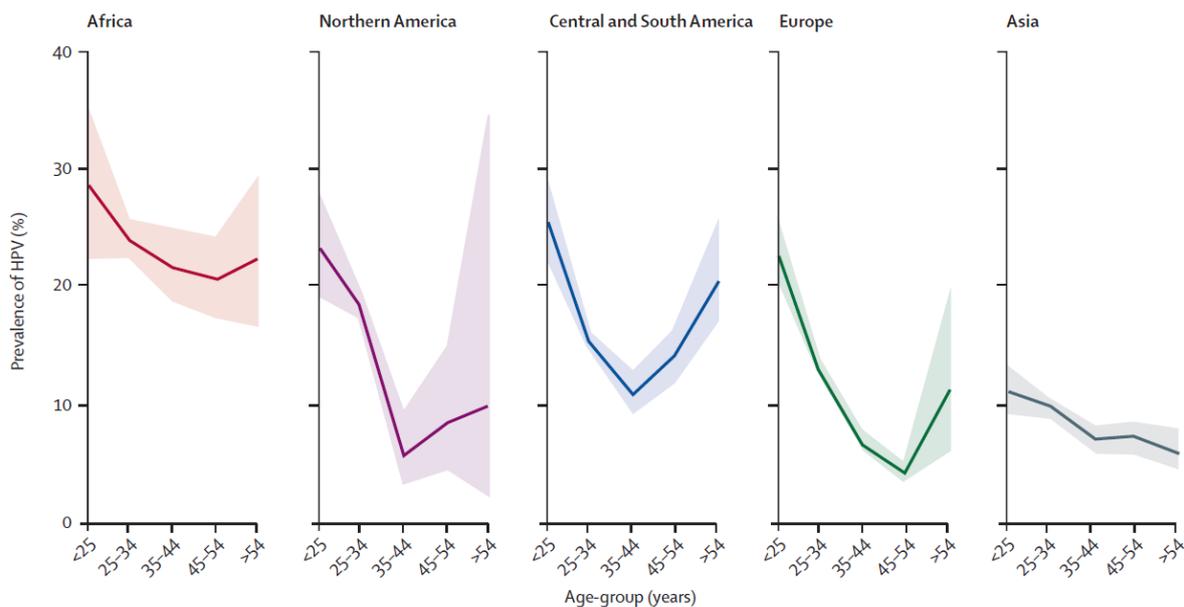
L'épidémiologie de l'infection par l'HPV a initialement été étudiée dans la sphère génitale chez la femme. Ces travaux ont conduit à la mise en évidence du lien entre l'infection par l'HPV et le développement du cancer du col utérin par Harald zur Hausen, travaux récompensés par le prix Nobel de médecine en 2008.

Il est admis que la plupart des individus sexuellement actifs vont être infectés par au moins un type d'HPV anogénital durant leur vie. D'après une méta-analyse incluant plus de 150 000 femmes à travers le monde, la prévalence de l'ADN d'HPV dans les frottis cervico-utérins est estimée à 10% [8]. Les prévalences des 8 génotypes d'HPV à haut risque oncogène les plus fréquents sont représentés dans la figure 3 en fonction de la zone géographique.



**Figure 3 : Prévalence des 8 génotypes d'HPV à haut risque oncogène les plus fréquents chez les femmes présentant un frottis normal selon les zones géographiques d'après l'IARC[9].**

Chez les femmes, on observe un pic de prévalence jusqu'à l'âge de 25 ans, puis une diminution progressive de celle-ci jusqu'à l'âge de 35 à 44 ans. Il existe ensuite un second pic chez les femmes de plus de 45 ans, sauf en Asie où la prévalence continue à diminuer (figure 4) [8].



**Figure 4 : Prévalence de l'infection par l'HPV en fonction de l'âge chez les femmes ayant un frottis cervical normal selon les continents d'après de Sanjosé [8].**

Enfin, 80% des femmes présentant une infection à HPV guérissent de leur infection dans les 48 mois suivant la contamination [10], le système immunitaire assurant une clairance virale complète en 1 à 2 ans.

La persistance d'une infection à HPV est nécessaire au développement d'une lésion précancéreuse puis d'une tumeur maligne invasive. L'HPV était ainsi responsable en 2008 de 610 000 cancers dans le monde dont la vaste majorité était des cancers du col utérin [11].

Au niveau des voies aéro-digestives supérieures (VADS), l'épidémiologie de l'infection par l'HPV est de mieux en mieux appréhendée. Une récente méta-analyse regroupant 3762 personnes montre une prévalence de 7,5% de l'infection de la cavité buccale par l'HPV dans la population générale [12]. Dans les VADS également, l'infection par l'HPV non guérie peut conduire au développement de cancers à type de carcinome épidermoïde. Il est ainsi estimé qu'environ 25% des carcinomes épidermoïdes des VADS sont liés à une infection par l'HPV. Selon les séries, cette proportion varie de 25% à 70% dans les localisations oropharyngées, en particulier les localisations dites lymphoépithéliales comme les amygdales et la base de langue [13]–[15]. Ainsi, la classification de l'OMS distingue maintenant les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx liés à l'HPV de ceux non liés à l'HPV, justifiant la recherche directe ou indirecte d'HPV dans ces cancers. Les particularités de ces carcinomes oropharyngés HPV+ ont justifié la mise en place d'une classification TNM spécifique [16].

## 1.4 Transmission

Le virus est transmis via un contact direct entre l'épithélium malpighien du sujet soit avec une peau ou une muqueuse infectée produisant des virions soit avec une surface contaminée par des particules virales. La grande majorité des infections à HPV du genre  $\alpha$ -papillomavirus se transmettent sexuellement, l'atteinte pouvant être ano-génitale et orale. Leur principal facteur de risque est la multiplicité des partenaires sexuels [17].

## 1.5 Cycle viral

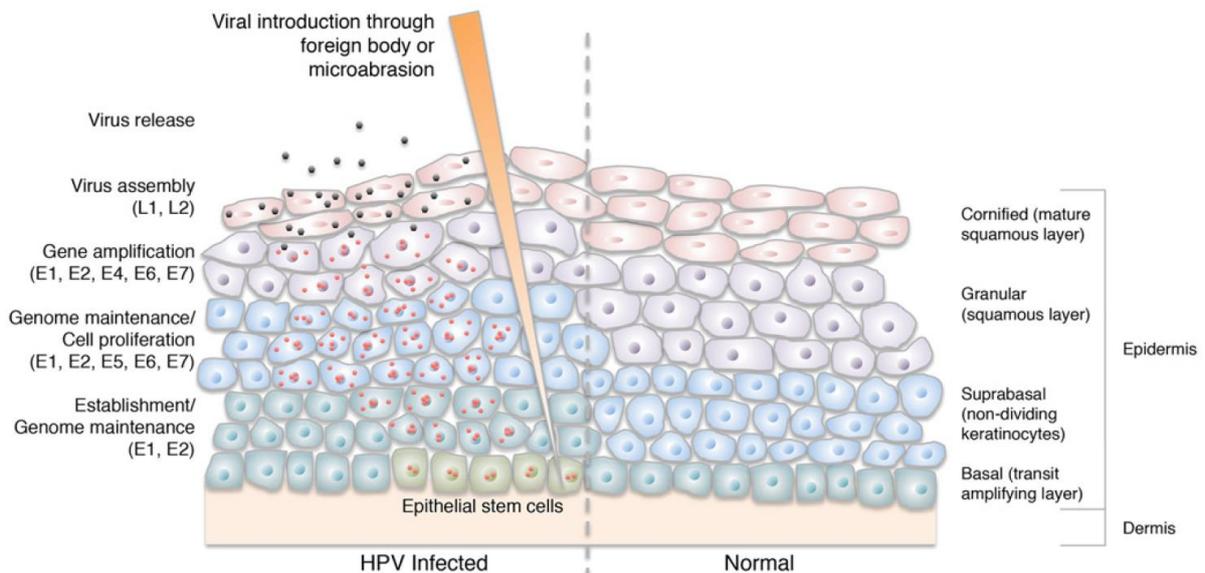
L'HPV est épithéliotrope et son cycle viral se déroule au sein d'épithéliums malpighiens qu'ils soient ou non kératinisants. Ils présentent la particularité d'être pluristratifiés avec, en profondeur, une couche de cellules basales ayant un potentiel prolifératif permettant le renouvellement des couches supérieures. Ces dernières sont constituées de cellules cohésives, bien différenciées, de plus grande taille jouant un rôle de protection par rapport au milieu extérieur. La cellule cible du virus est la cellule basale. Pour que l'infection soit possible il faut que la particule virale puisse pénétrer jusqu'aux couches basales, grâce à une micro-lésion. Les récepteurs permettant l'entrée d'HPV dans la cellule basale sont encore inconnus mais l'interaction avec la laminine et l'héparane sulphate semblent nécessaires à la pénétration du virus [18], [19]. Il semble également nécessaire que la cellule présente une activité mitotique [20]. Une fois internalisé par endocytose, le virion est transporté vers le noyau. La protéine L2 va permettre l'entrée dans le noyau de la cellule de l'ADN viral alors que la protéine L1 va être retenue dans l'endosome qui sera ensuite éliminée par dégradation lysosomale [21]. Il s'en suit 3 différentes étapes de répllication de l'ADN [22] :

- Une première étape dite d' « Establishment » : L'ADN viral va être répliqué dans le noyau grâce aux protéines E1 et E2 qui sont des hélicases permettant à l'ADN de se désenrouler, rendant accessible l'origine virale de la répllication aux protéines de la répllication de la cellule hôte. Un faible nombre de copies de l'ADN viral sont ainsi répliquées.
- La deuxième étape dite de « Maintenance de la répllication » permet au génome viral de se maintenir sous forme épisomale à un faible taux de copies dans les cellules basales infectées. Les protéines E6 et E7 permettent de stimuler la cellule pour qu'elle entre dans le cycle cellulaire. L'épisome est répliqué de façon synchrone avec l'ADN de la cellule hôte durant la phase S et réparti dans chaque cellule fille, notamment grâce à la

protéine E2 qui permet aux épisomes de se lier aux chromosomes lors de la mitose. Cette étape permet au virus de rester plusieurs années dans les cellules basales.

- La troisième étape dite de « Réplication végétative » intervient seulement dans les couches superficielles de l'épithélium, c'est-à-dire dans les cellules filles des cellules basales infectées qui se sont différenciées et mûrissent vers la surface. L'expression des protéines E6 et E7 permet de maintenir un état cellulaire similaire à la Phase S rendant disponible la machinerie cellulaire pour la réplication virale. Cette étape permet une production de nombreuses copies du génome destinées à être encapsidées puis relarguées dans le milieu extérieur.

Après la réplication, la production des protéines de la capsid L1 et L2 est mise en place grâce à un changement de site d'épissage, stoppant ainsi la réplication, engendrée par une forte expression de la protéine E2. Le génome est ensuite encapsidé dans le noyau de la cellule hôte. Cette dernière étape avant la libération des virions intervient dans les cellules les plus superficielles et donc mourantes. Elles présentent un environnement oxydatif nécessaire à la création de ponts disulfures entre les protéines L1, rendant la capsid très stable [23]. Enfin la protéine E4 jouerait un rôle dans la libération des virions car son accumulation dans le cytoplasme perturberait la structure de la kératine et donc la formation de la couche cornée [24]. Le cycle viral d'HPV au sein d'un épithélium malpighien est schématisé dans la figure 5.



**Figure 5 : Représentation schématique du cycle viral d'HPV en fonction des différentes couches de l'épithélium malpighien, d'après J.S. Horton [25].**

## 1.6 Potentiel oncogène

Les mécanismes intervenant dans la transformation carcinomateuse ont majoritairement été décrits dans les carcinomes épidermoïdes du col utérin et ils concernent le plus souvent les HPV à haut risque oncogène.

Histologiquement, cette transformation correspond à l'évolution d'une lésion intra-épithéliale malpighienne de bas grade (LSIL ou ex-CIN1) vers une lésion intra-épithéliale malpighienne de haut grade (HSIL, divisé avant en 2 groupes en fonction de l'extension de la dysplasie au sein de l'épithélium en CIN2 et CIN3) pour ensuite aboutir à un carcinome épidermoïde infiltrant. A chaque étape de l'infection par l'HPV, l'élimination du virus est potentiellement possible par le système immunitaire avant la survenue d'un carcinome épidermoïde. Il a ainsi été décrit que 60% des LSIL régressent, que 10% vont progresser en HSIL (dans le sous-groupe CIN3) et que 1% de ceux-ci vont progresser en lésion infiltrante [26].

### 1.6.1 Rôle oncogène des protéines E6 et E7

#### 1.6.1.1 Protéine E6

Le gène *E6* code pour plusieurs transcrits codant pour plusieurs isoformes cependant pour simplifier les propos ils seront abordés sans distinction sous le terme protéine E6.

L'une des fonctions les mieux connues de la protéine E6 est la formation d'un complexe avec la protéine p53, inhibant sa voie de signalisation et entraînant une dégradation dépendante de l'ubiquitine [27]. p53 permet notamment de détecter les dommages de l'ADN dans la cellule entraînant soit leur réparation, soit la mort cellulaire si les dégâts sont trop importants. Dans les cellules infectées par l'HPV, l'inhibition et la dégradation de p53 va permettre aux cellules infectées d'échapper à l'apoptose malgré l'accumulation de dommages de l'ADN.

La protéine E6 permet également une immortalisation des cellules infectées grâce à l'activation de la télomérase. Cette dernière permet de conserver la longueur du chromosome lors des divisions cellulaires en ajoutant une séquence répétée aux extrémités des chromosomes appelés télomères. En effet, E6 entraîne l'induction de la transcription du gène *hTERT* codant pour une sous-unité de la télomérase [28].

Par ailleurs E6 interagit avec des protéines ayant un domaine PDZ dont beaucoup sont impliquées dans la régulation des voies de signalisation cellulaire et dans la prolifération cellulaire.

Enfin la différenciation des cellules malpighiennes est également modulée par E6, permettant la création d'un environnement cellulaire propice à la réplication. Il a en effet été démontré expérimentalement qu'elle inhibe la différenciation cellulaire normalement induite par le calcium et le sérum. En effet à l'état normal l'exposition des cellules basales à un milieu de culture présentant une concentration élevée de calcium et de sérum entraîne leur différenciation [29].

### 1.6.1.2 Protéine E7

Le principal rôle de la protéine E7 est l'interaction avec les protéines de la famille du rétinoblastome (pRb, p107 et p130). Les protéines de la famille du rétinoblastome exercent un contrôle négatif sur le cycle cellulaire en bloquant le cycle cellulaire en phase G1 via la séquestration du facteur de transcription E2F. Lorsque la cellule veut rentrer dans le cycle cellulaire, elle induit la phosphorylation de pRb qui va libérer E2F.

L'interaction de E7 avec pRb a un effet comparable à la phosphorylation de pRb et entraîne la libération de E2F. Ceci induit l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et la synthèse d'ADN (figure 6) [30]. Les cellules infectées entrent donc constamment dans le cycle cellulaire d'où une prolifération cellulaire incontrôlée. Ceci a pour effet d'activer, de façon permanente, l'expression de la protéine p16, normalement impliquée dans le rétrocontrôle négatif du cycle cellulaire. En effet, dans une cellule normale, p16 inhibe la phosphorylation de pRb et permet ainsi un rétrocontrôle négatif sur la progression du cycle cellulaire. Dans les cellules infectées par l'HPV, on observe donc une surexpression de p16 sans effet sur le cycle cellulaire, la liaison de E2F à pRb étant inhibée par la liaison de E7 à pRb [31].

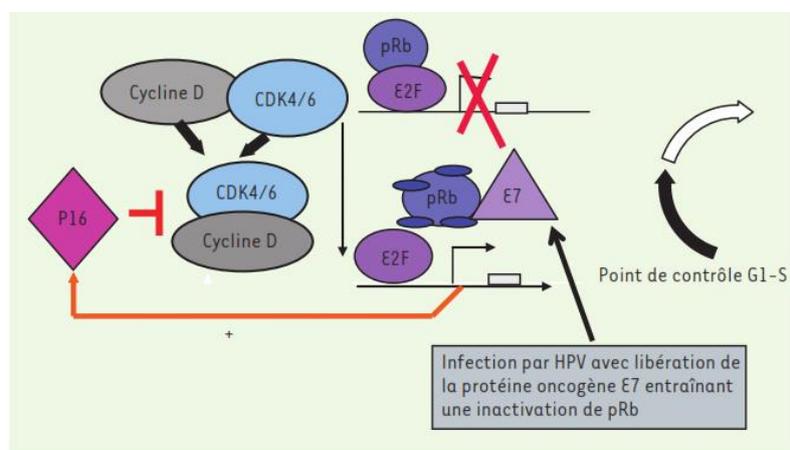


Figure 6 : Action de l'oncoprotéine virale E7 sur les acteurs du cycle cellulaire, d'après Badoual *et al* [32].

## 1.6.2 Mécanismes d'échappement immunitaire lors d'une infection à HPV

L'échappement de l'HPV au système immunitaire joue un rôle crucial dans la cancérogénèse car sans persistance de l'infection, l'apparition d'une lésion carcinomateuse n'est pas possible. L'une des forces du virus est qu'il minimise les interactions avec le système immunitaire. En effet, l'infection reste localisée à l'épithélium et ne passe jamais par une phase de virémie. Par ailleurs, une infection par l'HPV n'entraîne pas de lyse cellulaire et donc pas de libération de signaux pro-inflammatoires qui pourraient stimuler les cellules de Langerhans (cellules présentatrices d'antigènes résidentes des épithéliums malpighiens). Enfin, les protéines de la capside, hautement immunogènes, ne sont produites que dans les couches superficielles des épithéliums, échappant ainsi aux cellules de Langerhans.

Une infection virale engendre généralement une réponse immunitaire liée à la libération d'interférons de type 1. En effet, les cellules de notre organisme possèdent des récepteurs de l'immunité innée appelés « pattern recognition receptors » (PaRR) permettant la reconnaissance des motifs viraux conservés appelés « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPS). Ceci induit la production d'interférons de type 1 qui agissent de façon autocrine et paracrine, sur la cellule infectée et sur les cellules du système immunitaire pour induire une réponse immunitaire et lutter contre l'infection [33]. La présence d'ADN d'HPV dans les kératinocytes, pourtant reconnu par le PaRR de type Toll-Like Receptor 9 (TLR9), n'entraîne pas l'activation de la voie de signalisation des interférons de type 1. En effet, les protéines E6 et E7 inhibent la production de TLR9 et les voies de signalisation des récepteurs aux interférons de type 1 [34], [35].

L'immunité adaptative est également modifiée. Les infections virales, dont les infections par l'HPV, induisent une réponse de type Th1 (cellulaire). Cette réponse adaptée permet la production de lymphocytes T CD8+ capables de lyser les cellules infectées. Cette lyse se fait suite à la reconnaissance de l'expression d'antigènes viraux par le CMH de classe I. La réponse immunitaire de type Th2 (humorale) n'est pas adaptée pour lutter contre une infection virale. Or, dans les lésions pré-cancéreuses de haut grade associées à l'HPV, on observe un profil cytokinique Th2 inadapté avec une baisse d'expression des cytokines Th1. La protéine E5 d'HPV semble également inhiber l'expression du CMH de classe I [91]. Les mécanismes qui engendrent chez certains patients une mauvaise orientation de la réponse adaptative ne sont actuellement pas compris.

Lorsque la réponse immunitaire est adaptée, la régression des lésions est associée chez la plupart des individus à la production d'anticorps dirigés majoritairement contre la protéine L1

de la capsid, permettant ainsi d'empêcher la particule virale d'infecter les cellules cibles. Les vaccins prophylactiques bivalents ou quadrivalents sont basés sur un mécanisme d'action identique en induisant des anticorps contre L1 (de HPV16 et 18 pour le bivalent, HPV6/11/16 et 18 pour le quadrivalent) [37].

### 1.6.3 Histoire naturelle des lésions carcinomateuses

La première étape vers la transformation carcinomateuse est l'expression des protéines E6 et E7 lors de la phase de maintenance de la réplication du cycle viral, induisant une prolifération des cellules basales et parabasales. Ceci se traduit par l'apparition de lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade. Dans ces lésions, l'expression des protéines E6 et E7 reste modérée permettant au virus de terminer son cycle viral dans les cellules différenciées de la surface de l'épithélium [38].

La deuxième étape est la dérégulation de l'expression des protéines E6 et E7 dans les cellules infectées, entraînant une prolifération et un blocage de la différenciation de l'épithélium au niveau des couches superficielles. Ceci entraîne également l'accumulation d'anomalies génétiques via l'inhibition de p53. Cette étape correspond aux lésions malpighiennes intra-épithéliales de haut grade qui peuvent ensuite aboutir à l'accumulation de mutations et à la transformation carcinomateuse.

La dernière étape est l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule infectée. La persistance de l'infection à HPV entraîne un plus grand risque d'intégration du génome viral. Celui-ci n'est pas intégré de façon récurrente au même endroit et il peut s'intégrer à côté d'un proto-oncogène [39]. Le retentissement sur le site de l'intégration est encore mal décrit, mais plusieurs études sur de petites cohortes ont permis de démontrer que l'intégration dans un gène, ou à proximité d'un gène cible confère à la cellule un avantage sélectif. Par exemple l'intégration au sein d'un gène suppresseur de tumeur comme *RAD51B* va entraîner une perte de fonction de ce dernier. Ou encore l'intégration juste à côté d'un gène proto-oncogène comme *NR4A2* peut entraîner une surexpression de ce dernier. Il a également été décrit des réarrangements chromosomiques à côté du site d'intégration [40]. Enfin le gène *E2*, impliqué dans la régulation de *E6* et *E7*, est le plus souvent coupé lors de l'intégration, augmentant encore l'expression de ces deux gènes. Par ailleurs la perte d'expression de *E2*, qui dans le cycle viral normal inhibe l'expression de *hTERT*, entraîne une potentialisation de l'expression de *hTERT* et donc une immortalisation des cellules [41]. L'intégration du génome permet donc d'augmenter le pouvoir oncogène des protéines E6 et E7. Cette étape n'est pas exclusivement

nécessaire à l'apparition d'un cancer puisque l'on ne retrouve pas d'intégration du génome viral dans 30% des cancers du col de l'utérus liés à l'HPV 16 [39].

## **1.7 Protéines E6 et E7 dans les HPV à bas risque.**

Les protéines E6 et E7 des HPV bas risque, dont l'HPV 6 et 11 font partie, ne présentent pas les mêmes propriétés que celles des HPV à haut risque. Ainsi, leur potentiel oncogène est dit à bas risque car ces HPV ne sont liés que très rarement à des cancers ou des lésions précancéreuses.

### **1.7.1 Protéine E6**

Dans les HPV à bas risque, un transcrit alternatif du gène *E6* n'est pas codé par rapport aux HPV à haut risque.

Il a été démontré que, dans les HPV bas risque, E6 n'a pas d'interaction avec les protéines à domaine PDZ. Elle présente également une plus faible affinité pour p53, n'induisant pas de dégradation de celle-ci mais conserve une activité inhibitrice de l'activité transcriptionnelle de p53 nécessaire à la réplication du génome viral. Par ailleurs, les cellules infectées par un HPV bas risque conservent l'induction par p53 de l'apoptose en cas de fort dommage de l'ADN. Enfin, E6 n'induit pas la transcription du gène *hTERT*, empêchant les cellules infectées de s'immortaliser grâce à la télomérase [42].

### **1.7.2 Protéine E7**

La protéine E7 dans les HPV bas risque a une affinité diminuée pour les protéines de la famille de pRb et a la capacité de dégrader seulement p130. Ainsi, E7 permet également aux HPV de bas risque d'induire une entrée dans le cycle cellulaire. Ceci conduit à l'induction de la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication du génome viral. Cependant il n'est pas observé de prolifération incontrôlée des cellules infectées [42].

## **1.8 Méthodes de détection d'HPV**

Compte tenu du rôle d'HPV dans l'oncogenèse de certains cancers et l'importante variété des types d'HPV, de multiples techniques fiables et reproductibles ont été développées pour détecter la présence d'HPV. Ces techniques détectent pour certaines directement la présence d'HPV dans les prélèvements (PCR, RT-PCR, hybridation *in situ*). D'autres détectent

indirectement l'infection par l'HPV, comme l'immunohistochimie avec un anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> ou la sérologie HPV.

Elles sont utilisées en routine dans de nombreux domaines. Ainsi, dans les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx, la recherche de surexpression de la p16 en immunohistochimie permet d'orienter vers un cancer HPV induit. Dans le dépistage du col de l'utérus, d'après l'INCA, il est également recommandé de réaliser un typage HPV avec une PCR à la recherche d'HPV haut risque dans les frottis ASC-US pour orienter la prise en charge.

Devant l'importante variété des techniques de détection directes ou indirectes d'HPV, ce chapitre sera traité sous l'angle des tumeurs des voies aérodigestives supérieures.

### **1.8.1 Techniques basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

La réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR) est le test de référence utilisé en routine. Elle permet d'amplifier l'ADN du virus, ce qui permet sa détection même en très faible quantité dans l'échantillon. Cette technique est réalisable sur des prélèvements fixés en formol et inclus en paraffine (FFPE) ou congelés. La PCR permet de détecter l'ADN épisomal ou intégré et de préciser les types d'HPV grâce à des amorces spécifiques.

La principale limite de la PCR est qu'elle ne permet pas de distinguer si l'ADN viral détecté présente une activité transcriptionnelle ou non, et donc son implication potentielle dans la carcinogénèse. D'autre part, le résultat peut être faussement négatif si l'ADN viral intégré présente une rupture sur un des sites cible des amorces. Enfin, la PCR étant très sensible à la contamination, le risque de faux positif peut-être très élevé si le test n'est pas réalisé dans de bonnes conditions.

Il a également été développé des techniques permettant de quantifier l'ADN (PCR quantitative ou qPCR).

### **1.8.2 RT-PCR**

La Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) reste le gold standard dans les travaux de recherche sur l'HPV. La RT-PCR détecte les transcrits des gènes *E6* et *E7*, permettant d'attester d'une activité virale oncogénique. Elle est à l'heure actuelle peu utilisée en routine pour des raisons techniques et financières mais présente un grand intérêt dans la recherche sur les tumeurs viro-induites.

Ainsi, une étude portant sur 24 carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures (CEVADS) liés à l'HPV retrouve une différence de survie statistiquement significative entre le groupe présentant une RT-PCR négative contre le groupe présentant une RT-PCR positive, ces derniers ayant une meilleure survie ( $p=0,045$ ) [43]. Ainsi la présence d'une activité transcriptionnelle des oncoprotéines E6 et E7 pourrait être de meilleur pronostic dans les CEVADS HPV induits.

### **1.8.3 Sérologie HPV**

Cette technique détecte la présence d'anticorps anti-L1 d'HPV dans le sérum. Cependant, elle n'a pas une sensibilité (53% dans l'oropharynx [44]) suffisante pour permettre le diagnostic de tumeur viro-induite, de nombreux patients n'ayant pas de séroconversion malgré la persistance de l'infection à HPV [45]. De plus, elle est peu spécifique d'un type particulier de cancer viro-induit (57% dans l'oropharynx [44]) car une immunisation contre l'HPV peut être ancienne, ou liée à un autre cancer induit par l'HPV, en particulier ano-génital.

La sérologie HPV 16 E6 semble plus prometteuse. Une étude récente sur 66 carcinomes épidermoïdes oropharyngés liés à HPV16 retrouve pour la sérologie HPV 16 E6 une sensibilité de 96% et une spécificité de 98%, cependant ces chiffres tombent à 50% de sensibilité lorsque les auteurs ne considèrent que les carcinomes épidermoïdes de la sphère ORL autre que oropharyngés (représentant 6 cas) [44]. Par ailleurs il semblerait que la sérologie HPV 16 E6 et E7 soit un bon marqueur pronostic, en effet la positivité de celles-ci serait liée à une meilleure survie ( $p=0,001$ ) dans les CEVADS [46]. Des études sur de plus grandes cohortes sont nécessaires pour éclaircir ces résultats.

### **1.8.4 Hybridation *in situ* de l'ADN viral**

Les techniques *in situ* permettent de localiser la séquence génomique ciblée grâce à une sonde à ADN, sur prélèvements FFPE ou congelés. Cependant l'hybridation *in situ* (HIS) de l'ADN viral peut être négative si l'ADN est présent en trop faible quantité, et, comme pour la PCR, la présence d'un ADN viral dans les cellules ne permet pas de prouver son implication dans la cancérogénèse. La technique reste coûteuse et difficile d'interprétation, mais est utilisée en routine dans certains laboratoires d'anatomo-pathologie.

### **1.8.5 Hybridation *in situ* de l'ARN viral (RNAscope)**

Cette technique a le double avantage de détecter la réelle activité oncogénique virale par hybridation, grâce à une sonde spécifique, des ARN messagers d'E6 et E7 des HPV, et de réaliser cette détection *in situ*, sur tissu FFPE. Elle permet ainsi de localiser et de quantifier l'expression des gènes d'intérêts. Cette technique est simple et reproductible. Une automatisation de la réalisation et de la lecture est possible dans un futur proche et cette technique pourrait donc être réalisée en routine dans les laboratoires d'anatomie et de cytologie pathologiques.

Différentes études ont montré sa grande précision diagnostique dans les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx : par exemple comparée à la RT-PCR les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative de l'hybridation *in situ* ont été évaluées respectivement à 93%, 94%, 96% et 88% [47]. Une autre étude montre l'intérêt de l'hybridation *in situ* de l'ARNm de E6 et E7 par rapport à l'hybridation *in situ* de l'ADN : sur 25 cas ayant une expression de P16 en immunohistochimie et une HIS ADN négative, 21 étaient positifs pour l'HIS ARN, permettant ainsi de rattraper le diagnostic de tumeur viro-induite dans 84% de ces cas discordants [48].

L'hybridation *in situ* de l'ARN viral représente non seulement un outil diagnostique mais potentiellement pronostique. Ainsi, dans les CEVADS liés à l'HPV, une différence significative de pronostic a été mise en évidence entre ceux exprimant fortement les ARNm E6 et E7 d'HPV (survie globale à 3 ans de 64%) et ceux les exprimant faiblement (survie globale à 3 ans de 94%) [49]. Ces études soulignent la fiabilité et l'importance de cette technique dans le diagnostic et le pronostic des CEVADS liés à l'HPV. Le principe de la technique du RNAscope est détaillé en annexe 1.

### **1.8.6 Immunohistochimie dirigée contre la protéine p16**

La protéine p16 est un témoin indirect de l'activité de l'oncoprotéine E7 reflétant la multiplication incontrôlée des cellules mais son expression peut être modifiée par d'autres facteurs, comme des modifications du gène lui-même.

La détection de la protéine p16 par immunohistochimie est simple et très sensible, mais insuffisamment spécifique. Une méta-analyse de 2017 compilant les résultats de 24 études de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx montre une sensibilité de 94% (IC 91-97%) et une spécificité de 83% (IC 78-88%) de l'immunohistochimie avec l'anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> [50].

L'analyse du statut p16 en immunohistochimie présente également un intérêt pronostique. Ainsi les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx présentant une expression immunohistochimique de p16 ont un meilleur pronostic que les carcinomes p16 négatifs, indépendamment du statut HPV de la tumeur [51]. La classification OMS des tumeurs ORL distingue désormais les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx liés à l'HPV, entité définie par la positivité de l'anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> en immunohistochimie [52].

## 1.9 Vaccination prophylactique

Les HPV étant responsables d'un nombre conséquent de cas de cancers dans le monde et majoritairement du col de l'utérus, il a été développé deux vaccins prophylactiques. Ils ont été développés en prévention primaire du cancer du col de l'utérus mais permettent également de prévenir les cancers liés aux HPV 16 et 18 du vagin, de la vulve, du pénis, de l'anus et de l'oropharynx. Il existe un vaccin bivalent contre les HPV 16 et 18, qui sont responsables de 70% des cancers du col de l'utérus, du vagin et de l'anus en Europe [53]. L'autre vaccin quadrivalent concerne ces mêmes HPV à haut risque combinés aux HPV 6 et 11 à bas risque, responsable notamment de la PRR et des condylomes ano-génitaux. Ces vaccins prophylactiques, injectables par voie intramusculaire, sont constitués de pseudo-particules virales de la capsid. Il s'agit d'un autoassemblage de la protéine L1 obtenue par clonage du gène, qui sont antigéniquement identiques aux virions naturels. Ils ne contiennent pas d'ADN et ne sont donc pas infectieux. La vaccination prophylactique aboutit à une immunisation et donc à la production d'anticorps sériques anti-L1 spécifiques de chaque type de virus. Ces anticorps ont la capacité de transsuder à travers la muqueuse et donc de neutraliser les particules virales qui pourraient entrer en contact avec les cellules malpighiennes et les infecter. Ainsi, certains pays ont rapidement mis en place des recommandations de vaccination contre l'HPV. Aux Etats-Unis, la recommandation de vaccination intéresse les enfants de 11-12 ans de sexe féminin depuis 2006 et de sexe féminin et masculin depuis 2011. Le Canada a, peu de temps après, suivi ces recommandations. L'Australie a également mis en place en 2007 un programme de vaccination nationale contre l'HPV avec une vaccination contre les HPV 6, 11, 16 et 18 à l'école pour les filles de 12-13 ans avec rattrapage jusqu'à 26 ans et extension en 2013 aux garçons de 12-13 ans avec rattrapage à 14-15 ans. Cette campagne de vaccination a permis d'atteindre actuellement un niveau de couverture vaccinale d'environ 80% des filles de 14 à 15 ans et de 70% des garçons de la même tranche d'âge [54]. En France, les recommandations ne concernent que les filles entre 11 et 14 ans avec un rattrapage jusqu'à 19 ans inclus, les jeunes

hommes homosexuels jusqu'à 26 ans et les patients immunodéprimés jusqu'à 19 ans [55], [56]. Cependant le taux de couverture vaccinal est actuellement de moins de 20% chez les jeunes filles de 15 à 17 ans dans l'hexagone [57]. Ceci peut être expliqué par la réticence au sein de la population française envers la vaccination, notamment à cause de la crainte infondée d'effets secondaires. En effet l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) a mené une étude prospective sur une cohorte de près de 2 millions de jeunes filles nées entre 1992 et 1996 et suivies sur une période allant de 2008 à 2012 [58]. Elle a permis de comparer 842 120 jeunes filles vaccinées à 1 410 000 non vaccinées. Le taux d'hospitalisation pour des maladies auto-immunes (données du Programme de médicalisation des systèmes d'information [PMSI]) est similaire chez les jeunes filles vaccinées (2,01 pour 10 000 patients/année) et chez les jeunes filles non vaccinées (2,09 pour 10 000 patients/année). Cependant, cette étude montre une association probable avec le syndrome de Guillain-Barré (HR ajusté = 4 ; IC : 1,84-8,69 ;  $p < 0,001$ , soit 1 à 2 cas supplémentaires pour 100 000 jeunes filles). Cet effet indésirable n'a pas été confirmé dans une autre série anglaise comportant une population pour laquelle 10,4 millions de doses avaient été administrées sur une période de 8 ans [59].

## Chapitre 2 : Papillomatose Respiratoire Récurrente

Ce deuxième chapitre traite plus particulièrement des aspects épidémiologiques, physiopathologiques, cliniques et thérapeutiques de la PRR. Sont en particulier traitées les problématiques de prise en charge et de suivi rendant nécessaire une meilleure connaissance de cette maladie et de son histoire naturelle.

### 2.1 Définition

La papillomatose respiratoire récurrente est caractérisée par l'apparition récurrente de multiples tumeurs malpighiennes polypoïdes contiguës au niveau de l'arbre respiratoire qui sont liées à une infection par l'HPV [52]. Ces papillomes se répartissent majoritairement au niveau des zones de jonction entre un épithélium respiratoire et un épithélium malpighien dans tout le tractus respiratoire des fosses nasales jusqu'aux bronches (figure 7). D'après une méta-analyse regroupant 400 patients, le principal site atteint est le larynx (97,9%), suivi de la trachée (10,9%) et du voile du palais (10,3%), les patients pouvant avoir plusieurs localisations [60].

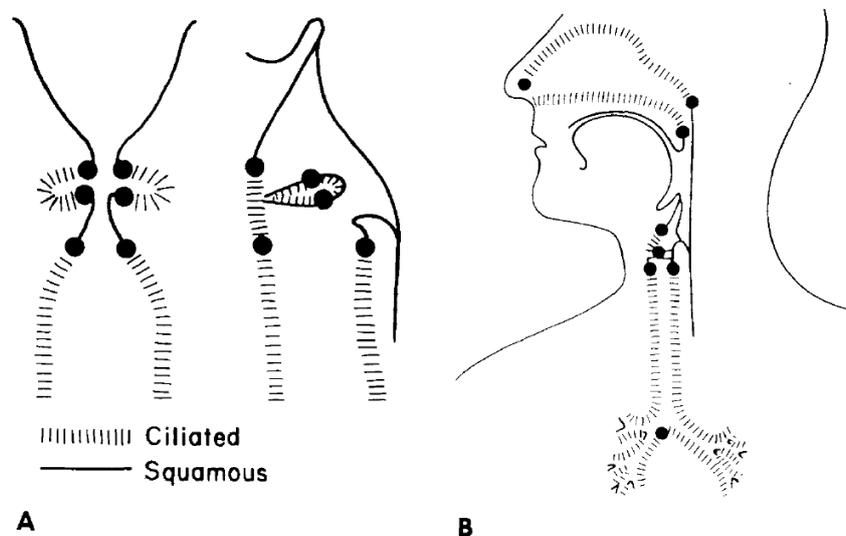


Figure 7 : Localisations des papillomes dans la PRR d'après Kashima [60]. A : Larynx B : Voies aériennes

On observe deux pics d'âge d'apparition de la PRR avec un premier, correspondant à la forme juvénile, chez l'enfant de moins de 5 ans et un second chez des patients âgés de 20 à 40 ans, correspondant à la forme adulte [52]. Il ne sera traité dans ce travail de thèse que de la forme juvénile. Les anglophones utilisent le terme de Juvénile-Onset recurrent respiratory papillomatosis (JoRRP).

## 2.2 Étiologie

C'est en 1923 qu'Ullmann met en évidence que la PRR est liée à un agent infectieux en s'injectant un extrait de PRR sur son bras, engendrant ainsi la formation d'un papillome cutané au point d'injection [61]. Les études plus récentes retrouvent, dans presque 100% des cas, une infection par l'HPV et dont la très vaste majorité sont des génotypes 6 et 11 dits de bas risque oncogénique [62]. La prévalence de ces différents virus varie d'une étude à l'autre, mais on retrouve des résultats comparables sur les grandes séries :

- Aux États-Unis, dans une cohorte de 58 enfants, 53,5% des PRR sont liées à une infection par l'HPV 6, 39,7% par l'HPV 11 et 6,9% par une co-infection des HPV 6 et 11 [63].
- En Australie, dans une cohorte de 47 enfants, la répartition est de 55% d'infection par l'HPV 11, 43% par l'HPV 6 et 2% de co-infection par les HPV 6 et 11 [64].
- En Bulgarie, sur une cohorte de 23 enfants, la répartition est de 61,9% d'HPV11, 23,8% d'HPV6 et 14% de co-infection des HPV 6 et 11 [65].

Il a également été rapporté dans la littérature quelques cas d'infection par des HPV de haut risque oncogène comme les HPV 16, 31, 33, 35 et 39 [66], [67].

## 2.3 Mode de transmission

Les types 6 et 11 d'HPV étant aussi impliqués dans les condylomes ano-génitaux [68], il a été rapidement suspecté que l'infection est transmise de la mère à l'enfant lors de l'accouchement. Une cohorte de 3033 patientes danoises ayant eu des condylomes génitaux durant leur grossesse a été comparée à un groupe contrôle de 7902 femmes n'ayant pas de condylomes. Il a été mis en évidence que le risque de développer une PRR chez un enfant né d'une mère ayant des condylomes génitaux est 231,4 fois plus élevé (95% IC 135.3, 395.9) que chez un enfant né d'une mère sans lésion [69]. Cependant, dans des séries d'enfants atteints de PRR documentant la présence de lésions génitales chez la mère pendant la grossesse, seul un tiers des mères ont une histoire de condylome [63], [70], [71]. Ceci est probablement expliqué par le fait que les condylomes ne représentent qu'une partie du spectre des lésions induites par l'HPV. En effet, une étude portant sur 25 mères d'enfants atteints de PRR ayant toutes subi une biopsie du col utérin ciblée sur des zones anormales, après révélation à l'acide acétique, a mis en évidence des aspects histologiques d'infection par l'HPV chez 71,4% de ces femmes [71]. Enfin, pour confirmer l'hypothèse d'une transmission de l'HPV de la mère à l'enfant lors de

l'accouchement, quelques études se sont attachées à comparer l'ADN viral dans des prélèvements provenant de la mère (le plus souvent par écouvillonnage cervical) et de l'enfant (écouvillonnage ou rinçage de la cavité orale). Le principal biais est que, pour la plupart des études, le prélèvement chez l'enfant est réalisé juste après l'accouchement, cette approche ne permettant pas de distinguer une contamination d'une vraie infection. Pour éviter ce biais, une étude américaine intéressant 333 mères et leur enfant a porté sur des écouvillonnages cervicaux et des rinçages oraux chez la mère immédiatement avant l'accouchement, et sur des écouvillonnages oraux et génitaux chez le nouveau-né au moins 24h après l'accouchement (avec une médiane de 42h). De l'ADN viral était présent dans 30% de tous les prélèvements maternels, dont 27% dans les écouvillonnages cervicaux et 3% dans les liquides de rinçage oraux ; seuls 1,5% des prélèvements chez les nouveau-nés présentaient de l'ADN viral (0,6% dans les écouvillonnages génitaux et 0,9% dans les écouvillonnages oraux). Au sein des trois couples mère/enfant qui présentent un prélèvement positif pour l'ADN viral d'HPV à la fois chez la mère et le nouveau-né, il est retrouvé une discordance de type d'HPV entre la mère et l'enfant dans les prélèvements chez 2 couples. Il est également intéressant de noter que 2 nouveau-nés HPV+ étaient nés de mères HPV- [72]. On peut donc penser que la transmission lors de l'accouchement n'est pas le seul mode de transmission et qu'il existe également une transmission orale de l'HPV via l'environnement du nouveau-né. Les données d'une étude espagnole portant sur 143 couples mères/enfants confortent cette hypothèse. Un écouvillonnage cervical a été réalisé chez les mères lors d'une visite prénatale (médiane de 31 semaine d'aménorrhée) et lors d'une visite post-partum (6 semaines après l'accouchement). Chez l'enfant, un écouvillonnage oral et anogénital a été réalisé tout de suite après l'accouchement et 6 semaines puis 3, 6, 12 et 24 mois après l'accouchement. A la visite prénatale, 46% des femmes présentaient un prélèvement positif pour l'HPV et 21% lors de la visite post-partum. Pour les enfants, 6% avaient un prélèvement positif pour l'HPV tout de suite après l'accouchement et 12,7% 6 semaines après l'accouchement. Tous prélèvements confondus 16,9% des enfants nés d'une mère HPV- étaient HPV+ [73]. D'autre part, dans cette même étude, les HPV 6 et 11 représentent 23% des types d'HPV retrouvés chez les enfants alors que ces génotypes n'ont été retrouvés que chez 15% des mères. Ces taux relativement élevés d'infection par l'HPV des nouveau-nés et les chiffres de prévalence d'HPV 6 et 11 chez la femme enceinte (respectivement 2,45% et 1,76% d'après une méta-analyse incluant un total de 13 640 femmes enceintes [74]) tranchent avec la faible prévalence de la PRR. L'infection par l'HPV n'est donc pas suffisante pour expliquer l'apparition de la maladie. Des susceptibilités

généétiques et des facteurs immunologiques entrent probablement en jeu pour expliquer le développement de la maladie.

## **2.4 Susceptibilité génétique et micro-environnement tumoral**

Dans l'hypothèse de facteurs prédisposants au développement, il a d'abord été recherché dans le sang périphérique une anomalie quantitative des populations immunitaires impliquées dans les infections virales. Une étude comparant des échantillons sanguins de patients atteints de PRR avec des contrôles sains n'a pas montré d'anomalies quantitatives des lymphocytes T CD4 et CD8 et des cellules NK. Les patients atteints de PRR présentaient également des valeurs d'activité de cytotoxicité et de réponse proliférative de ces cellules comparables aux témoins [75]. En revanche, plusieurs études ont démontré que les enfants atteints de PRR présentent des réponses immunitaires innées et adaptatives non efficaces.

Ainsi au niveau génétique, une étude a mis en évidence une sous-représentation de deux gènes codant pour le récepteur KIR des cellules NK (*3DSI* et *2DSI*) chez les patients atteints de PRR plus sévères [76]. Les récepteurs KIR permettent une activation des cellules NK contre leurs cellules cibles et donc la libération de molécules cytotoxiques et la sécrétion d'IFN $\gamma$ . L'IFN $\gamma$  est nécessaire à une bonne réponse immunitaire anti-tumorale en stimulant la présentation d'antigène par les cellules et en stimulant les effecteurs de la réponse Th1. La réponse immunitaire innée des patients atteints de PRR ne serait donc pas capable de contrôler précocement l'infection à HPV.

Plusieurs allèles des gènes *DQ* et *DR* du CMH de classe II ont été mis en évidence comme facteur de susceptibilité à la PRR (*DRB1\*0102/0301*, *DQB1\*0201/0202*) [77], [78]. Les récepteurs CMH de classe II sont exprimés exclusivement sur les cellules présentatrices d'antigènes et permettent à celles-ci d'engendrer une réponse immune spécifique à l'antigène présenté. Ils sont donc indispensables à la réponse immunitaire adaptative. Les patients présentant un allèle de susceptibilité des gènes *DQ* et *DR* présentent plus souvent une sous-représentation du gène des récepteurs KIR *3DSI* et *2DSI* par rapport à un groupe contrôle [76]. Il a été démontré que les jeunes patients atteints de PRR présentent une réponse immunitaire adaptative locale orientée Th2 [79], [80] ne leur permettant donc pas d'activer les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques nécessaires à la destruction des cellules infectées par le virus. Actuellement les mécanismes exacts responsables de cette polarisation Th2 sont inconnus.

Le virus HPV pourrait échapper au système immunitaire en diminuant l'expression des antigènes viraux par le CMH de classe I des cellules infectées. En effet, une étude a retrouvé

une diminution de l'expression du CMH de classe I et de la protéine TAP-1 dans les cellules des papillomes malpighiens des PRR. Cette protéine permet le transport des antigènes du cytosol vers le réticulum endoplasmique où ils se lient au CMH de classe I. Par ailleurs les auteurs mettent en évidence une association significative entre la sévérité de la maladie et la diminution de l'expression de la protéine TAP-1 [81].

Les patients atteints de PRR présentent également un taux élevé de lymphocytes T régulateurs (FoxP3+) au sein de la tumeur [80]. Ces cellules inhibent la réaction immunitaire contre la tumeur en produisant des cytokines immunosuppressives et des signaux de co-inhibition comme des « checkpoint » immunitaires tel PD-L1. Ces signaux de co-inhibition entraînent notamment une anergie des lymphocytes T CD8+, qui ne sont plus capables d'entraîner une immunité efficace.

Au final, la PRR semble liée à une inefficacité, totale ou partielle, du système immunitaire inné et adaptatif à lutter contre l'infection par l'HPV. Ceci est lié à des dysfonctionnements survenant à différentes étapes de la réponse immunitaire et résumé dans le modèle proposé par Bonagura (figure 8). Il est intéressant de noter que l'environnement immunitaire local du larynx joue probablement un rôle particulier puisqu'il n'est pas mis en évidence chez ces patients d'associations particulières avec d'autres tumeurs liées à l'HPV.

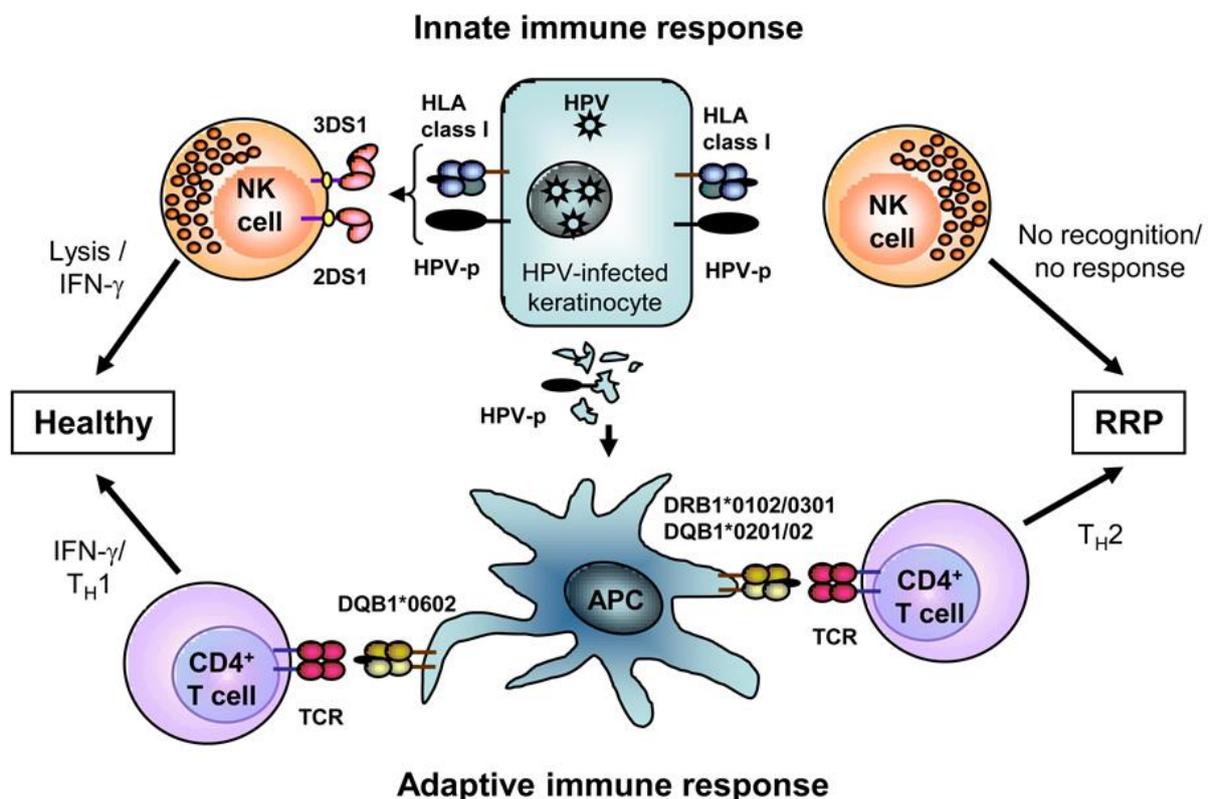


Figure 8: Modèle de l'échappement de l'infection HPV à la réponse immunitaire dans la PRR d'après Bonagura [76].

## 2.5 Épidémiologie

La PRR est une maladie rare. Elle représente cependant la pathologie tumorale bénigne laryngée la plus fréquente chez l'enfant. A ce jour, il n'existe pas de données épidémiologiques en France. Au Canada, grâce à la mise en place d'une base de données nationale rétrospective, il a été calculé que l'incidence entre 1994 et 2007 était de 0,24 cas par an pour 100 000 enfants âgés de 14 ans et moins et que la prévalence était de 1,11 pour 100 000 enfants. L'âge médian au diagnostic était de 4,4 ans avec un sex ratio proche de 1:1 [82]. Ces chiffres sont similaires à une étude portant sur l'année 1996 sur une population de PRR de Seattle et Atlanta [83]. En Europe, une étude portant sur 50% de la population danoise entre 1969 et 1984 retrouve une incidence de 3,6 cas par an pour 100 000 habitants âgés de moins de 20 ans [84].

Plus récemment, il a été décrit l'incidence et la prévalence de la PRR aux Etats-Unis pour l'année 2006 grâce à deux bases de données provenant d'assurances privées (The Optum Clinformatics) et d'assurances publiques d'états (Truven Marketscan Medicaid). De façon intéressante, l'incidence et la prévalence sont plus élevées dans la population assurée par les états que dans la population assurée par des assurances privées (incidence respective de 1,03 pour 100 000 personnes et 0,51 pour 100 000 personnes, prévalence respective de 2,93 pour 100 000 et 1,45 pour 100 000) [85]. On peut donc se demander si les populations avec un niveau socio-économique bas ne seraient pas plus à risque de développer la maladie. En effet, aux États-Unis, les assurances publiques d'états (Medicaid) sont fournies aux familles dont les revenus ne leur permettent pas d'avoir une assurance privée. Il serait intéressant de connaître les facteurs de comorbidité et en particulier les immunosuppressions maternelles et/ou fœtales dans les populations étudiées.

Ces données épidémiologiques vont probablement évoluer avec l'apparition de la vaccination HPV quadrivalente (HPV 16, 18, 6 et 11), notamment dans les pays où la vaccination HPV est recommandée de façon systématique. Pour la première fois, une étude Australienne publiée en 2018 met en évidence, après la mise en place en 2007 du programme de vaccination national contre l'HPV, une diminution de l'incidence de la PRR chez les enfants de moins de 14 ans [54]. En France, une diminution de l'incidence de la PRR ne peut actuellement être attendue au vu du faible taux de couverture vaccinale.

## **2.6 Aspects cliniques**

Le diagnostic est évoqué devant la symptomatologie et l'examen clinique puis à l'aspect endoscopique. Ce diagnostic est confirmé par l'examen anatomo-pathologique d'une biopsie ou d'une résection réalisée lors d'une endoscopie laryngo-trachéale sous anesthésie générale (AG). L'endoscopie permet de faire un bilan précis de l'atteinte du tractus respiratoire dans le même temps que l'exérèse des lésions. Un score clinique a été développé par les Dr Derkay et Wiatrack prenant en compte la symptomatologie, l'aspect des lésions et leur localisation [86]. Ce score figure en annexe 2.

### **2.6.1 Symptomatologie**

La PRR touchant principalement le larynx, tous les symptômes d'atteinte laryngée peuvent être révélateurs : bruit respiratoire (stridor ou wheezing), toux chronique, dysphonie, dyspnée pouvant aller jusqu'à une détresse respiratoire aiguë. Ces symptômes n'étant pas spécifiques, le diagnostic initialement évoqué chez ces patients est souvent un asthme, une laryngite aiguë, une bronchite ou un reflux gastro-œsophagien. Ainsi, le diagnostic est fait en moyenne 1 an après l'apparition des premiers symptômes [70]. Le diagnostic de PRR est alors porté devant l'inefficacité des traitements et la visualisation en consultation au miroir laryngé ou à la nasofibroskopie de lésions des voies aéro-digestives supérieures.

### **2.6.2 Aspect macroscopique**

À l'endoscopie, on visualise, au niveau de la muqueuse, une prolifération tumorale exophytique, sessile ou pédiculée avec une surface mamelonnée. Il s'agit souvent de masse friable, saignant facilement au contact (figure 9).

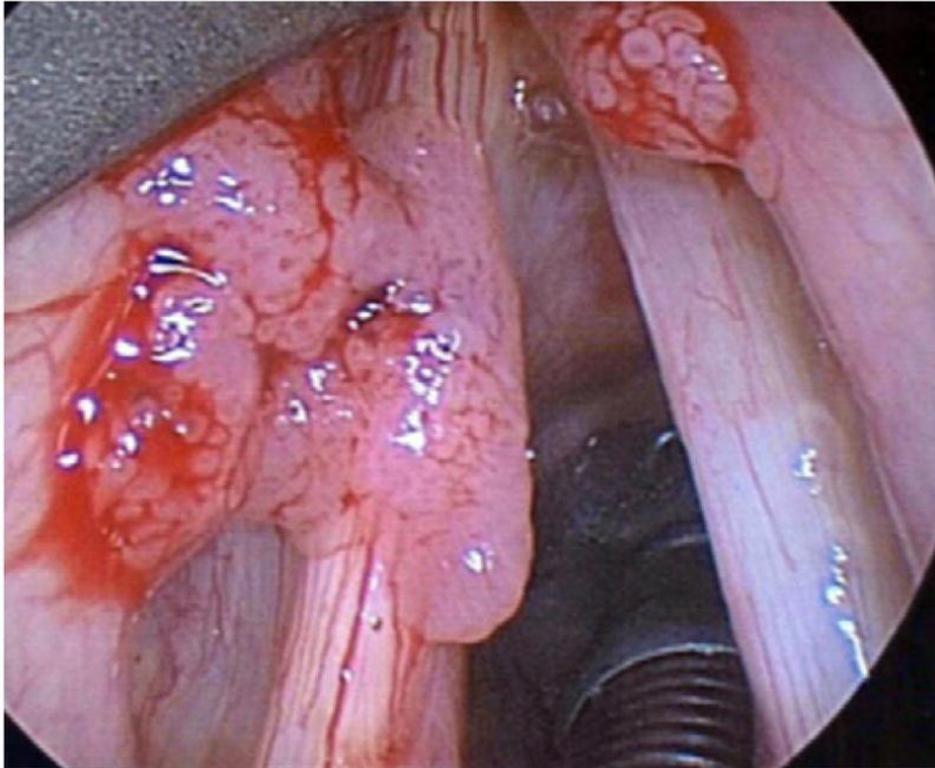


Figure 9 : Vue endoscopique d'une PRR d'après Venkatesan *et al* [87].

### 2.6.3 Aspects microscopiques

La lésion anatomopathologique microscopique de la PRR est le papillome malpighien. Il s'agit d'une prolifération tumorale bénigne d'architecture papillaire, composée d'une arborescence d'axes fibro-vasculaires bordés par un épithélium malpighien. Il s'y associe, le plus souvent, des signes d'infection à HPV : les cellules présentent des caractéristiques de koilocytes (halo clair périnucléaire, noyau augmenté de taille, hyperchromatique et irrégulier, binucléation). On peut également observer une hyperplasie des cellules parabasales au niveau de la moitié inférieure de l'épithélium. Des mitoses peuvent être observées le long de la couche basale et n'ont pas de caractère péjoratif. Il peut exister une kératinisation en surface, le plus souvent à type de parakératose. Enfin, on peut rarement observer des lésions de dysplasie épithéliale malpighienne [52].

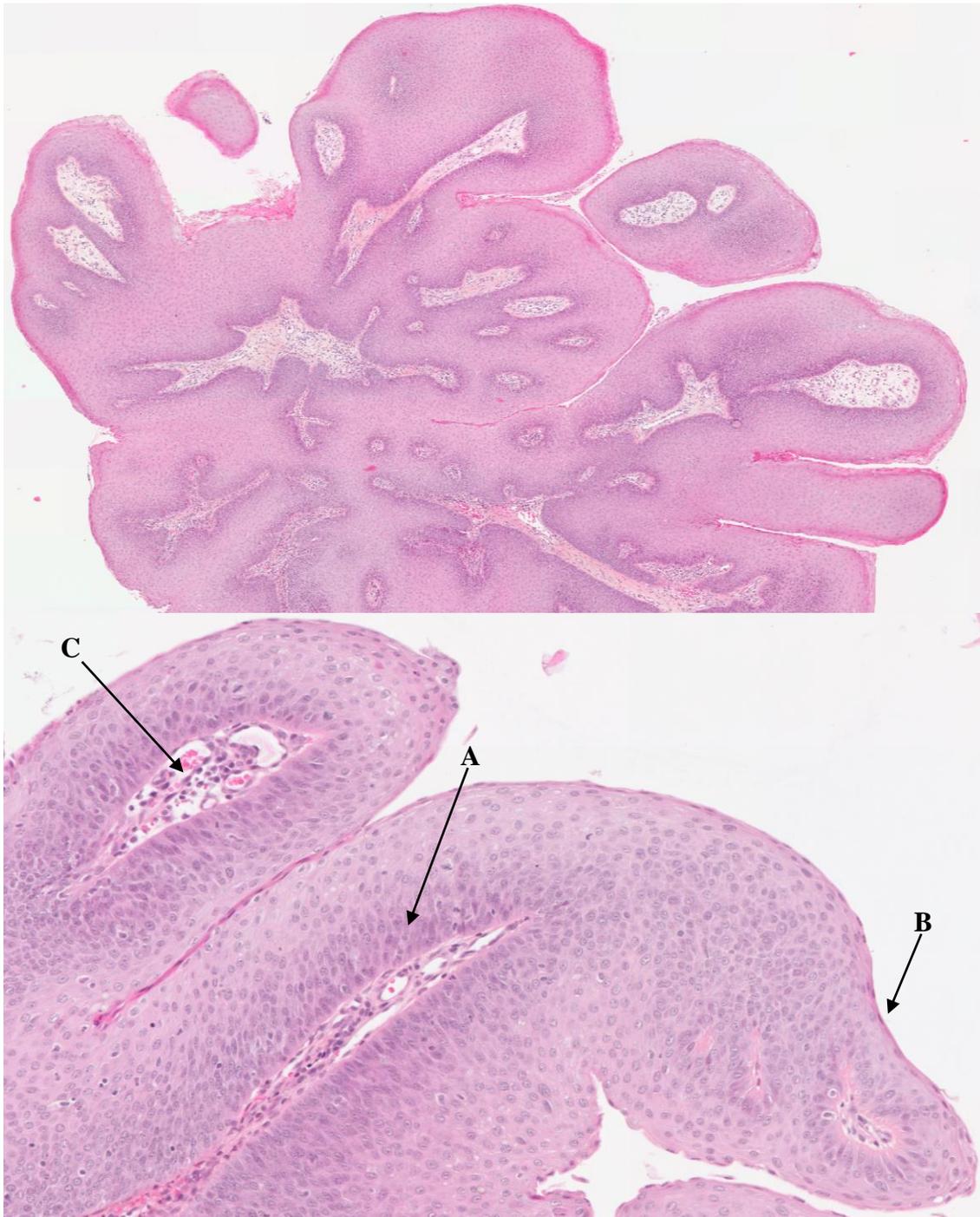


Figure 10 : Image microscopique de PRR. Haut : Lésion malpighienne d'architecture papillaire (HES x5). Bas : Le revêtement malpighien comporte une hyperplasie des cellules basales (A) et une couche de parakératose en surface (B). L'axe des papilles est richement vascularisé (C) (HES x20).

#### 2.6.4 Evolution

L'évolution clinique des PRR juvéniles est variable et imprévisible. Certains patients présentent une maladie rapidement progressive nécessitant des exérèses endoscopiques sous anesthésie

générale rapprochées pour maintenir la perméabilité des voies aériennes, voire la réalisation en urgence d'une trachéotomie. Au contraire, d'autres patients présentent une maladie évoluant lentement avec, parfois, une rémission spontanée [88]. Dans une série américaine publiée en 2003 portant sur 603 patients, une régression des lésions était observée dans 20 % des cas [89]. Une dissémination pulmonaire de la maladie est parfois associée, ceci pouvant provoquer une insuffisance respiratoire sévère. Par ailleurs, de très rares cas de transformation des papillomes malpighiens, dans un contexte de PRR, en carcinome épidermoïde *in situ* et/ou invasif ont été décrits, majoritairement au niveau pulmonaire et de façon plus rare au niveau laryngé [90]–[92]. Dans les grandes cohortes nord-américaines, la transformation carcinomateuse est observée chez environ 1% des patients atteints de PRR [82], [92]. Plusieurs études mettent en évidence une association entre l'atteinte pulmonaire dans la PRR et la transformation carcinomateuse [92], [93]. Ainsi, dans une méta-analyse regroupant 1666 enfants atteints de PRR, 16% des patients présentant une atteinte pulmonaire ont développé un carcinome épidermoïde broncho-pulmonaire [92]. L'infection par l'HPV11 est également suspectée comme étant associée à un plus grand risque de transformation carcinomateuse par rapport à l'infection par l'HPV 6. Deux études rapportent une infection exclusive par l'HPV11 chez les patients présentant une transformation maligne [91], [94]. Cependant, au vu du très faible effectif de patients étudiés, l'étude de plus grandes cohortes est nécessaire pour confirmer ces données.

Enfin, l'évolution est également marquée par l'apparition de possibles séquelles post-opératoires liées à la récurrence des chirurgies d'exérèse et à l'étendue des lésions. Elles peuvent aller de la simple bride à la sténose laryngo-trachéale et entraîner un handicap vocal. La stratégie de suivi de ces patients est donc un vrai défi car il n'existe pas actuellement de marqueurs fiables de l'évolution de la maladie.

## **2.7 Facteurs de risques de sévérité**

De nombreuses études ont tenté de trouver des facteurs de risques de sévérité pour prédire l'évolution de la maladie chez les patients. Dans une revue systématique de la littérature incluant 32 articles représentant 2200 patients atteints de PRR, les auteurs concluent que les principaux facteurs de risques de sévérité sont l'âge précoce au diagnostic et l'infection par l'HPV 11 [95].

L'âge précoce au diagnostic n'est pas défini par les auteurs car les différentes études ont défini un âge précoce différent, allant de moins de 2 ans à moins de 5 ans. Néanmoins, bien que le

seuil ne soit pas défini avec certitude, l'âge précoce demeure le seul facteur de risque de sévérité largement reconnu.

Concernant le génotype d'HPV, il convient de rester prudent dans l'interprétation des résultats. En effet, dans les études retrouvant une corrélation entre la sévérité clinique (en dehors de toute transformation carcinomateuse) et l'infection par l'HPV 11, il est parfois retrouvé un âge au diagnostic plus précoce chez les patients infectés par l'HPV 11 [63], [64], [96], [97], constituant un facteur confondant.

## 2.8 Traitements

Les traitements actuels se divisent en deux groupes principaux :

- Les traitements symptomatiques visant l'exérèse des papillomes, représentés par la chirurgie.
- Les traitements étiologiques visant à lutter contre l'infection par l'HPV, la prolifération tumorale et donc limiter la récurrence des lésions.

Il sera également abordé la prévention de l'infection par l'HPV. En effet les premiers bénéfices de la mise en place des politiques de vaccination avec le vaccin quadrivalent contre les HPV de types 6, 11, 16 et 18 commencent à être observés.

### 2.8.1 Chirurgie d'exérèse

La chirurgie d'exérèse est le traitement standard permettant l'ablation des papillomes, son objectif est de préserver une bonne fonction vocale et la perméabilité des voies aériennes. Elle est réalisée lors d'une endoscopie laryngo-trachéale sous AG avec laryngoscopie en suspension (figure 11).

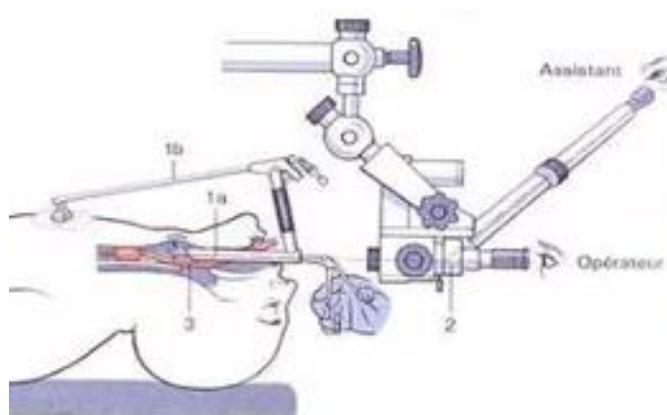


Figure 11 : Schéma d'une laryngoscopie en suspension

Le chirurgien peut utiliser lors de l'intervention des instruments froids, différents types de lasers ou encore des microdébrideurs (ustensile chirurgical permettant de faire tourner une lame froide). Les lasers ont des propriétés hémostatiques et ont une distance de travail plus profonde que les instruments froids [98]. Les microdébrideurs permettent de diminuer le temps opératoire notamment lorsque le patient présente des lésions de grande taille [99].

## **2.8.2 Traitements adjuvants**

Devant la difficulté de la chirurgie à contrôler la maladie chez une partie des patients, il a été développé des traitements adjuvants. Ils ciblent notamment le système immunitaire, la réplication de l'HPV, la prolifération des cellules tumorales. Selon une étude datant de 2004, 22% des patients atteints de PRR sont traités avec une thérapie adjuvante aux Etats-Unis [100]. Actuellement, il n'existe pas de recommandation précise quant à leur emploi. Ces traitements ne sont pas considérés comme curatifs et permettent en théorie une diminution de la sévérité de la maladie. Certains n'ont été évalués que sur de petits groupes de patients, ne permettant pas d'avoir une puissance nécessaire pour prouver leur efficacité dans le traitement de la PRR.

### **2.8.2.1 Interféron $\alpha$**

C'est le premier traitement adjuvant à avoir été utilisé dans la PRR, permettant une modulation de la réponse immunitaire du patient. L'interféron  $\alpha$  est un interféron de type 1 qui est produit naturellement par les cellules lorsqu'elles détectent une infection intracellulaire, notamment virale. L'interféron  $\alpha$ , qui agit à la fois de façon autocrine et paracrine, va permettre de déclencher une réponse antivirale de la cellule infectée et du système immunitaire grâce à l'induction de la transcription de centaines de gènes.

Son efficacité clinique dans la PRR est controversée. Ainsi une étude portant sur 160 patients rapporte une réponse complète ou partielle chez 73,1% des patients traités avec de l'interféron- $\alpha$ -2b [101]. Une autre équipe a prouvé que la diminution du taux de croissance des papillomes observée dans les 6 premiers mois n'était pas durable [102]. Par ailleurs il induit chez la plupart des patients des effets secondaires systémiques comme de la fièvre, des nausées, des arthralgies ou des céphalées, ce qui limite son utilisation. Il a donc été supplanté par les traitements adjuvants intralésionnels.

### **2.8.2.2 Cidofovir**

Le Cidofovir est un analogue nucléotidique qui bloque la réplication de l'ADN des virus en inhibant leur ADN polymérase [103]. Il est administré localement par des injections intralésionnelles, limitant ainsi la toxicité systémique. En administration intraveineuse il est néphrotoxique, hépatotoxique et peut entraîner des troubles de l'hématopoïèse [104]. Plusieurs études réalisées sur de petites cohortes semblent prouver son efficacité : une étude d'une cohorte lyonnaise de 16 enfants atteints de PRR rapporte un taux de rémission stable de 75% sur un suivi moyen de 33,6 mois [105]. Cependant une étude randomisée contrôlée, en double aveugle sur 19 patients ne montre pas de différence significative entre le groupe placebo et le groupe Cidofovir [106] soulignant la nécessité de réaliser des études randomisées et contrôlées sur des cohortes de grande taille. D'après Derkay *et al.*, le traitement par Cidofovir doit être débuté si une intervention chirurgicale est nécessaire tous les 2 à 3 mois avec une dose maximale de 3mg/kg [104].

Enfin, certains auteurs rapportent des cas d'apparition de lésion de dysplasie épithéliale malpighienne de haut grade chez des patients avec PRR traités par injections de Cidofovir [107]. Cependant, dans une méta-analyse regroupant 188 patients atteints de PRR et traités par Cidofovir, il n'était pas retrouvé de corrélation entre le traitement par Cidofovir et l'apparition de lésions de dysplasie [108] : le pourcentage observé de dysplasie (2,7%) y était comparable à celui du registre national canadien de la PRR [82]. Par ailleurs, une étude rétrospective européenne portant sur 635 patients atteints de PRR a comparé le taux de transformation chez 275 patients traités ou non par Cidofovir : il n'était pas noté de différence de taux de survenue de carcinome épidermoïde des voies aéro-digestives supérieures ou de la trachée entre les patients traités ou non par Cidofovir [109].

### **2.8.2.3 Bevacizumab**

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé anti-angiogénique. Il est dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A) et permet donc d'inhiber la liaison de celui-ci avec ses récepteurs situés sur les cellules endothéliales. Il empêche donc la formation de néovaisseaux nécessaire à la croissance tumorale. Il est utilisé depuis 2004 comme traitement adjuvant à la chimiothérapie dans les cancers métastatiques [110]. Le rationnel de son utilisation dans la PRR provient d'une étude qui rapporte une forte expression, par rapport à des témoins sains, de l'ARNm du VEGF-A par les cellules épithéliales de 12 patients atteints

de PRR, ainsi qu'une forte expression de ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux des papillomes [111]. Par la suite, des études ont prouvé l'efficacité du bevacizumab chez l'enfant et l'adulte dans la PRR sur de petites cohortes. Dans une cohorte de 10 enfants atteints de PRR sévère (plus de 4 chirurgies par an) traités par 3 injections intralésionnelles de bevacizumab à 2,5mg/mL à un intervalle de 2 à 3 semaines, les auteurs rapportent une diminution significative du délai médian entre les chirurgies, du nombre d'interventions par an et du score de Derkay-Wiatrack [112]. Des résultats comparables ont été rapportés sur une autre cohorte de 9 enfants [113]. Par ailleurs, son utilisation semble avoir peu d'effets indésirables.

#### **2.8.2.4 Celecoxib**

Le Celecoxib est un anti-inflammatoire non stéroïdien spécifique de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Il est utilisé dans le traitement des douleurs d'origine inflammatoire notamment dans la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante. Dans la PRR, il a été observé une augmentation de l'expression de COX-2 liée à la surexpression et à l'activation de la voie de signalisation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) [114]. L'hypothèse de l'efficacité du celecoxib a été émise et le cas d'un patient atteint de PRR, non répondeur aux autres traitements adjuvants, a été rapporté du fait d'une rémission complète pendant 2 ans après traitement par Celecoxib associé à l'erlotinib [115]. Une étude randomisée en double aveugle avec groupe contrôle ayant pour but de déterminer l'efficacité du celecoxib dans les PRR a été lancée et s'est récemment achevée (NCT 00571701). L'étude comporte 50 patients et les résultats ne semblent pas montrer de différence entre le placebo et le Celecoxib. On peut penser que la rémission observée dans le cas rapporté est plutôt liée à l'erlotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, inhibant donc l'EGFR. Par ailleurs, un autre cas rapporté d'utilisation d'un autre inhibiteur de tyrosine kinase, le gefitinib, chez un patient atteint d'une PRR sévère, réfractaire aux autres traitements adjuvants et surexprimant l'EGFR, a prouvé son efficacité en réduisant les interventions chirurgicales de 15 pour 3 mois à 5 pour 3 mois [116]. Ces observations ouvrent une nouvelle voie thérapeutique en seconde ligne après échec des traitements adjuvants habituels.

#### **2.8.2.5 Immunothérapie anti-PD-1/PD-L1**

Le récepteur de surface « Programmed cell death 1 » (PD-1) est exprimé notamment par les lymphocytes T CD8+. Son activation par un de ses ligands (PD-L1 ou PD-L2), déclenche un

signal inhibiteur pour le lymphocyte T CD8+. A l'état normal, il permet d'éviter les réactions auto-immunes. Lors du processus tumoral, les cellules malignes arrivent à échapper au système immunitaire via différents mécanismes dont l'un est l'expression de PD-L1. Ceci permet à la tumeur d'inhiber les lymphocytes T CD8+ dirigés contre elle. Des anticorps ont ainsi été développés empêchant la liaison entre PD-1 et PD-L1, bloquant ainsi l'activation du signal inhibiteur et permettant donc à nouveau aux lymphocytes T CD8+ de détruire les cellules tumorales. Une étude récente a évalué, sur une cohorte de 39 patients atteints de PRR, l'expression de PD-1 et PD-L1 en immunohistochimie par rapport à des cas contrôles sains (muqueuse des cordes vocales). Les auteurs rapportent que l'anticorps anti-PD-L1 marque les cellules tumorales dans 68% des papillomes et marque les cellules immunitaires infiltrant la tumeur dans 76% des cas. Ils retrouvent également un nombre de cellules PD-1+ significativement plus élevé dans les papillomes que dans les contrôles (respectivement 24 versus 4 en moyenne) [117]. Ces données laissent penser que ce « checkpoint » immunitaire joue un rôle dans l'échappement tumoral des PRR et sont un argument fort pour tester l'efficacité des immunothérapies anti PD-1/PD-L1 dans les PRR. Un essai de phase 2 est actuellement en cours aux Etats-Unis sur l'efficacité et la sécurité du Pembrolizumab (ciblant PD-1) dans les PRR (NCT02632344). Les premiers résultats sont attendus pour octobre 2019.

### **2.8.2.6 Vaccination contre l'HPV**

Il existe sur le marché un vaccin quadrivalent prophylactique contre les génotypes 6, 11, 16 et 18 d'HPV (Gardasil®). Etant donné que les HPV 6 et 11 représentent la vaste majorité des infections par l'HPV dans la PRR, plusieurs études ont étudié l'efficacité de ce vaccin de façon thérapeutique, sur le contrôle de la maladie. Elles retrouvent toutes une diminution des scores de sévérité de la maladie chez les patients atteints de PRR, traités avec cette vaccination quadrivalente [118]–[121]. Cependant, ces études portent sur de petites cohortes : des études multicentriques contrôlées et randomisées seront nécessaires pour conclure définitivement sur l'efficacité du vaccin quadrivalent Gardasil® comme traitement adjuvant dans la PRR.

### **2.8.3 Traitements prophylactiques**

Le mode de transmission de l'HPV dans la PRR demeurant mal expliqué, il n'existe pas à l'heure actuelle de recommandations d'hygiène ou de traitements prophylactiques adaptés spécifiquement à la PRR.

Cependant, les premiers résultats de l'impact des campagnes de vaccination contre l'HPV avec le vaccin quadrivalent (HPV 6, 11, 18, 16) sur la prévention de la PRR sont très encourageants : une étude Australienne publiée en 2018 met en évidence, pour la première fois, une diminution de l'incidence de la PRR chez les enfants de moins de 14 ans après la mise en place en 2007 du programme de vaccination nationale contre l'HPV. L'étude a regroupé 1500 professionnels de santé à travers le pays ayant potentiellement en charge des enfants atteints de PRR. Ils ont transmis mensuellement leurs cas de PRR de septembre 2011 à décembre 2016. Ainsi l'incidence a diminué, passant de 0,16 cas pour 100 000 enfants âgés de moins de 14 ans en 2012 à 0,02 cas pour 100 000 en 2016 ( $p=0,034$ ) [54]. De plus, tous les cas de PRR sont survenus chez des enfants dont les mères n'avaient pas été vaccinées avant l'accouchement.

## **2.9 Aspects économiques**

Du fait du caractère récidivant de la maladie entraînant des endoscopies à répétition et du prix élevé de certains traitements, les coûts de prise en charge des malades sont importants.

En France il n'existe pas de données publiées. Aux Etats-Unis, pour traiter un patient pendant toute la durée de sa maladie, il faut entre 60 000 et 470 000 dollars [122]. Il est ainsi estimé que, chaque année, le coût global est de 150 millions de dollars [123].

## **Chapitre 3 : Acteurs de l'homéostasie cellulaire**

La PRR demeure une entité mal connue, avec un caractère potentiellement proliférant des lésions papillomateuses. Il paraît intéressant d'approcher la biologie de la PRR de façon complémentaire avec l'approche virologique. L'étude anatomopathologique peut contribuer à cette exploration grâce à l'immunohistochimie ciblée sur des protéines de l'homéostasie cellulaire.

Nous nous sommes intéressés, parmi ces acteurs, aux protéines p53 et p63. Ce chapitre replace ainsi, dans un contexte plus général, l'utilisation des anticorps dirigés contre ces protéines, notamment dans les études portant sur la PRR.

Les principes généraux de la technique d'immunohistochimie sont par ailleurs exposés en annexe 3.

### **3.1 La protéine p53**

#### **3.1.1 Présentation**

La protéine p53 est étudiée de façon approfondie depuis sa découverte en 1979 devant son rôle crucial dans la carcinogénèse. En effet l'inactivation de la p53 est retrouvée dans environ la moitié des cancers, et les souris KO pour le gène *TP53* développent dans 100% des cas des tumeurs [124]. Devant la complexité de ses mécanismes d'action, les connaissances sur ses fonctions sont encore incomplètes. Le gène *TP53* codant pour la protéine p53 se situe sur le chromosome 17 et présente 11 exons. Il est actuellement décrit 12 isoformes dont certains ont des propriétés antagonistes par rapport à la protéine entière [125].

#### **3.1.2 Fonctions principales**

Le principal rôle de la p53 et des protéines de sa famille est de permettre à la cellule de survivre face aux différents stress qu'elle peut subir (figure 12).

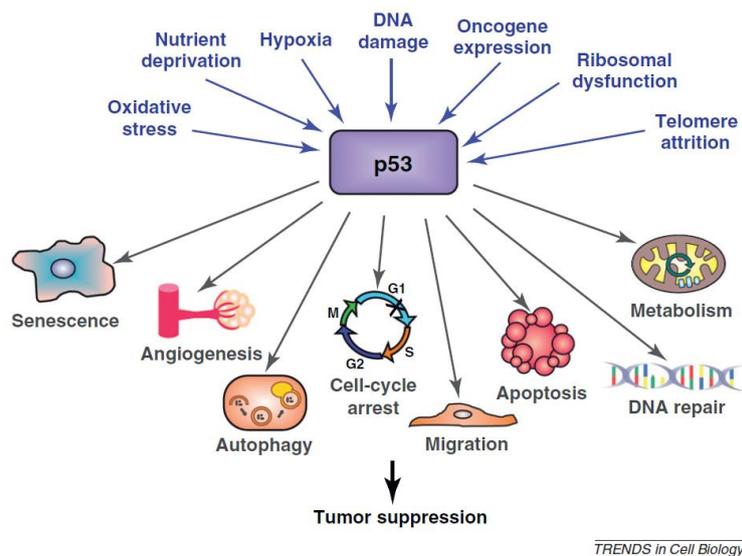


Figure 12 : Schématisation des stimuli induisant la p53 et ses rôles d'après Kathryn *et al* [124].

*TP53* est un gène suppresseur de tumeur : c'est donc sa perte de fonction qui va entraîner le développement de tumeur. La protéine p53 a un rôle de facteur de transcription permettant de réguler l'expression de très nombreux gènes impliqués notamment dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la réparation de l'ADN, le métabolisme cellulaire, la migration et l'angiogénèse. Ses fonctions sont donc très finement régulées via d'autres protéines qui vont entraîner son inactivation et sa dégradation dans le protéasome après ubiquitinylation. La principale protéine de régulation de p53 est MDM2 qui, à l'état normal, se lie à p53 et entraîne son inactivation et sa dégradation. Du fait d'un stress, comme des dommages de l'ADN, la cellule va induire la libération de p53 sous l'action de la protéine MDM2. Ainsi p53 va migrer dans le noyau et induire l'expression de ses gènes cibles, entraînant par exemple l'expression de protéines induisant l'apoptose.

Par ailleurs, p53 peut également agir directement sur d'autres protéines dans le cytosol. Il a en effet été prouvé que p53 pouvait activer des protéines pro-apoptotiques en interagissant directement avec elles dans le cytosol [125].

Enfin, p53 semble jouer également un rôle crucial dans l'induction de la différenciation des cellules souches, limitant ainsi la proportion des cellules souches pluripotentes [125].

En cancérogénèse, les mutations du gène *TP53* entraînent une perte de fonction de la protéine, principalement du fait d'altérations de son site de fixation à l'ADN qui ne permet donc plus d'induire l'expression de ses gènes cibles [126].

### 3.1.3 Utilisation en anatomie et cytologie pathologiques

Le marquage positif avec l'anticorps dirigé contre la p53 est de topographie nucléaire. A l'état normal, les épithéliums présentent un marquage faible et hétérogène dit « wild-type ». Le marquage est reconnu comme significatif lorsque la majorité des cellules présentent un marquage intense ou que le marquage est perdu par toutes les cellules.

Il est utilisé comme aide au diagnostic et comme facteur pronostique. En effet, il est utilisé notamment pour distinguer des épithéliums dysplasiques, exprimant la p53, des épithéliums présentant des modifications réactionnelles, présentant un marquage de type « wild-type ». Ainsi, dans la vessie, on peut l'utiliser pour distinguer un épithélium dit réactionnel d'un carcinome urothélial *in situ* [127] (figure 13). De même, l'expression anormale de la p53 dans des biopsies intestinales au cours de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin permet différencier des glandes réactionnelles de glandes dysplasiques [128].

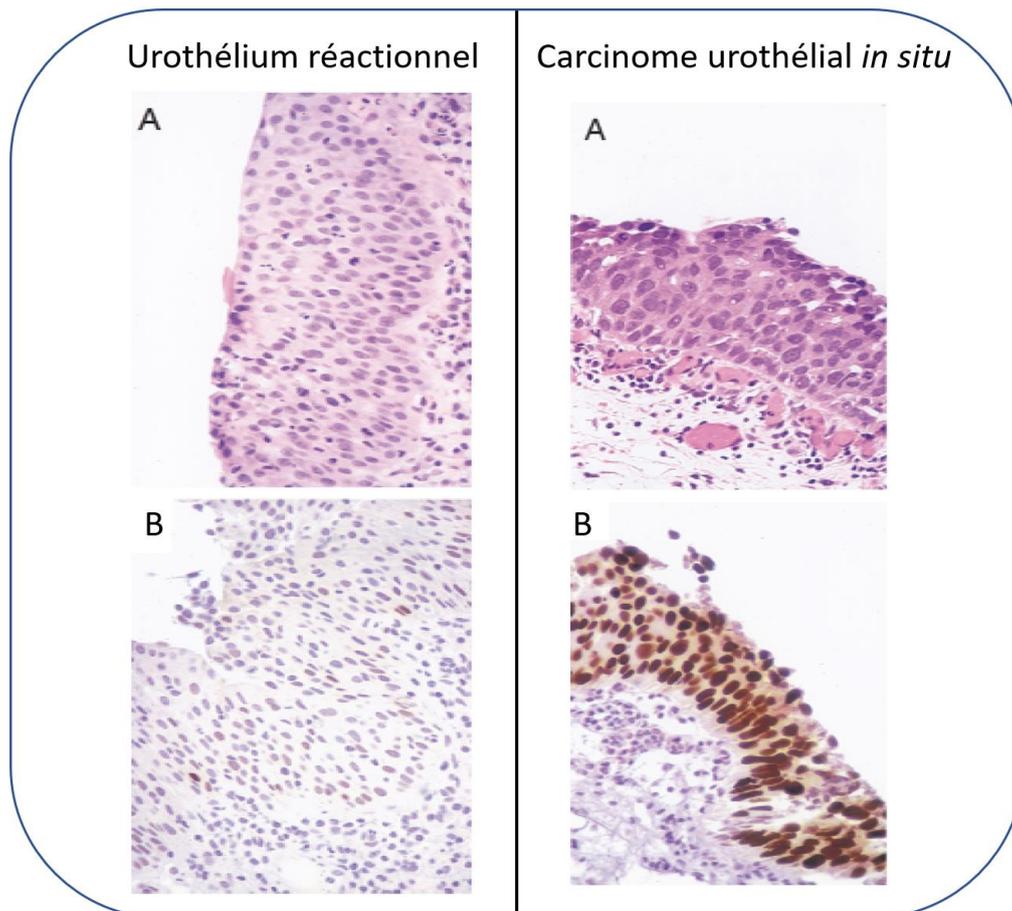


Figure 13 : illustration d'aide au diagnostic de l'anticorps anti-p53 entre un épithélium réactionnel de la vessie (bénin) et un carcinome urothélial *in situ* (lésion pré-cancéreuse) d'après McKenney et al [127] :

A : coloration HES

B : Immunohistochimie avec l'anticorps anti-p53.

Par ailleurs, d'un point de vue pronostique, la surexpression de la protéine p53 dans les ostéosarcomes a été décrite comme corrélée à une diminution de la survie à 3 ans des patients [129], comme dans les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage où la surexpression de p53 est statistiquement liée à une diminution de la survie globale des patients [130].

Enfin, dans la PRR, une étude portant sur 12 patients retrouve une tendance à une association entre un nombre plus important de cellules marquées par l'anticorps anti-p53 et une plus grande activité de la maladie (définie par plus de 3 interventions par an) ; cependant cette association n'est pas significative statistiquement ( $p = 0,1$ ) [131].

## **3.2 La protéine p63**

### **3.2.1 Présentation**

La protéine p63 est un facteur de transcription faisant partie de la même famille que la protéine p53. Elles présentent des similarités structurales et fonctionnelles. Le gène *TP63* est composé de 15 exons et se trouve sur le chromosome 3. Il existe deux isoformes, TAp63 et  $\Delta$ Np63, qui régulent un grand nombre de gènes avec des fonctions parfois opposées [132].

### **3.2.2 Fonctions principales**

La protéine p63 semble jouer un rôle important dans le développement des épithéliums malpighiens. Dans un modèle expérimental avec des souris inactivées pour le gène *TP63*, les souris meurent à la naissance, dépourvues de peau et d'annexes. Par ailleurs il a été réalisé des coupes histologiques des fœtus juste avant la naissance, pour éviter le traumatisme de l'épiderme lors de l'accouchement, retrouvant des fragments d'épiderme peu développés et partiellement désagrégés mais présentant des signes de maturation malpighienne. Or p63 est exprimée à l'état normal dans les cellules basales des épithéliums malpighiens. Il est donc fortement suspecté que p63 joue un rôle dans le maintien du pool des cellules basales des épithéliums malpighiens. Par ailleurs les souris *TP63<sup>-/-</sup>* ne présentent pas de cellules myoépithéliales. D'autres expériences ont prouvé l'importance de p63, notamment  $\Delta$ Np63, dans la survie et le renouvellement des cellules basales de l'épithélium malpighien [133].

L'isoforme TAp63 serait quant à lui impliqué dans l'apoptose des cellules germinales présentant des altérations de l'ADN et dans la sénescence des cellules malpighiennes [132]. Enfin TAp63 est impliquée également dans le métabolisme à différents niveaux permettant notamment aux cellules de résister au manque de nutriments.

### 3.2.3 Utilisation en anatomie et cytologie pathologiques

L'anticorps dirigé contre la protéine p63 utilisé en routine reconnaît les deux isoformes sans distinction. Le marquage est de localisation nucléaire. Dans les tissus normaux, la p63 est exprimée fortement dans les cellules basales des épithéliums malpighiens avec un gradient de marquage diminuant vers la surface, les cellules les plus superficielles étant le plus souvent négatives. Dans les épithéliums transitionnels, comme dans le tractus urinaire, toutes les cellules sont marquées à l'exception des cellules en raquettes de la vessie. Par ailleurs les cellules myoépithéliales bordant les glandes expriment également la p63 [134].

En ce qui concerne les lésions tumorales, l'expression de la p63 est retrouvée dans les carcinomes épidermoïdes, les carcinomes urothéliaux et les zones de métaplasie malpighienne au sein d'adénocarcinomes. En ce qui concerne les lymphomes, les cellules tumorales des lymphomes folliculaires, des lymphomes B diffus à grandes cellules et des lymphomes T anaplasiques peuvent présenter, dans environ un quart des cas, un marquage par l'anticorps anti-p63 [135]. Enfin, ne sont pas marqués par l'anticorps anti-p63 : les adénocarcinomes, les mélanomes, les tumeurs neuroendocrines, et la majorité des sarcomes [134], [136].

L'expression de la p63 peut représenter une aide au diagnostic, par exemple devant une tumeur peu différenciée pour identifier l'origine de la prolifération,

L'expression de la p63 a également été étudiée comme facteur pronostique, en particulier dans les cancers des VADS. Une expression marquée de la p63 (plus de 50% des cellules tumorales) dans les CEVADS est ainsi associée à des tumeurs plus agressives et à un mauvais pronostic [137]. Par ailleurs, dans les carcinomes adénoïdes kystiques des glandes salivaires, un taux de mortalité plus élevé semble associé à une expression forte de la p63 (plus de 35% des cellules tumorales marquées) [138]. Enfin, dans la PRR, il n'existe pas de publication concernant son utilisation comme facteur pronostique ou de sévérité.

Au total, la PRR juvénile est liée à une infection par les HPV à bas risque oncogène (génotypes 6 et 11 le plus souvent). Ces tumeurs sont bénignes mais récidivent généralement, rendant nécessaires de multiples résections chirurgicales. La transformation maligne est également possible bien que très rare. L'évolution de la maladie reste totalement imprévisible, entraînant un suivi rapproché des patients.

La biologie des lésions liées à des HPV à bas risque oncogène demeure moins bien connue et explorée que les pathologies liées à des HPV à haut risque oncogène. Le caractère proliférant des papillomes dans la PRR nous a incités à nous intéresser aux acteurs de l'homéostasie cellulaire conjointement à l'activité transcriptionnelle virale.

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail de thèse est l'identification de critères histologiques prédictifs de la sévérité de la PRR juvénile. Il a été mené sur une série de 48 enfants. Une analyse immunohistochimique des papillomes avec les anticorps anti-p16, p53 et p63 a été combinée à une CISH reconnaissant les ARNm des protéines E6 et E7 des HPV 6 et 11.

# Deuxième partie : Matériel et Méthodes

---

## 1. Population

Les patients ont été sélectionnés dans deux Centres Hospitalo-Universitaires (CHU) pédiatriques de Paris, prenant en charge la PRR : l'hôpital Necker-Enfants Malades et l'hôpital Robert Debré. Une partie des enfants suivis à l'hôpital Necker-Enfants Malades étaient préalablement inclus dans une cohorte colligée par le Dr Mathilde Carlevan et le Pr Leboulanger. Cette cohorte a été complétée en interrogeant la base de données, via le logiciel de gestion de laboratoire Diamic, pour des prélèvements réalisés entre l'année 2008 et l'année 2017 avec les codes ADICAP suivant : A0P3, E0D0, E0H0, E0D9 correspondant respectivement aux diagnostics en clair : papillomatose juvénile, papillome viral (SAI), papillome malpighien, papillomatose virale. Un seul prélèvement par patient était sélectionné le plus souvent le plus récent, permettant ainsi d'avoir la meilleure qualité d'ARN possible. En effet, les ARN ne présentent plus une qualité suffisante pour réaliser une hybridation *in situ* après un stockage prolongé des tissus FFPE, généralement après 10 ans.

Les critères d'inclusions étaient :

- Diagnostic pour le prélèvement de papillome malpighien des VADS.
- Présence pour chaque patient d'au moins un prélèvement positif pour une sonde d'hybridation *in situ* à ADN d'HPV ou d'un typage HPV positif.

### 1.1 Données cliniques

Les données cliniques ont été recueillies rétrospectivement en mars 2018 dans les dossiers informatisés ou papiers des deux CHU. Il a été recueilli pour chaque patient :

- Le sexe
- L'âge au diagnostic
- Les dates de chaque endoscopie sous AG réalisés dans les deux CHU
- Le nombre d'endoscopie sous AG total connu
- Le nombre d'injections de Cidofovir reçues
- La réalisation d'une trachéotomie en rapport avec la maladie

- La présence de séquelles chirurgicales définies comme l'apparition de synéchies à l'étage glottique voir de sténose
- La localisation des papillomes au niveau des trois étages du larynx et de la trachée, lors d'au moins une endoscopie sous AG.
- La présence d'une atteinte pulmonaire prouvée au minimum par une atteinte pulmonaire au scanner thoracique
- La présence d'une lésion lors de la dernière endoscopie sous AG ou lors de la dernière nasofibroskopie de contrôle en consultation
- La transformation carcinomateuse des lésions de PRR
- Le décès lié à la maladie
- Les dates d'injection de Cidofovir pour savoir si le prélèvement étudié avait été réalisé avant ou après un traitement par Cidofovir

A partir des dates des endoscopies, il a été calculé un intervalle moyen en jours entre chaque endoscopie sous AG pour chaque patient. Le nombre d'endoscopies sous AG par an a été calculé en divisant le nombre total d'endoscopies sous AG par la durée en année entre la 1<sup>ère</sup> endoscopie et la dernière.

## **1.2 Typage HPV**

Quand le type d'HPV n'était pas déjà connu, des copeaux de prélèvement FFPE de papillome du patient ont été envoyés à l'Hôpital Européen Georges Pompidou dans le service de Virologie où il a été réalisé des PCR de typage avec le kit INNO-LiPA® de Innogenetics permettant de rechercher 28 génotypes d'HPV dont le 6 et le 11.

Pour les patients de l'hôpital Necker-Enfants Malades, la majorité avaient eu un typage HPV. Cependant, pour 1 patient, seule une HIS à ADN dirigée contre les HPV 6 et 11 avait été réalisée et il ne restait plus assez de matériel pour faire une PCR.

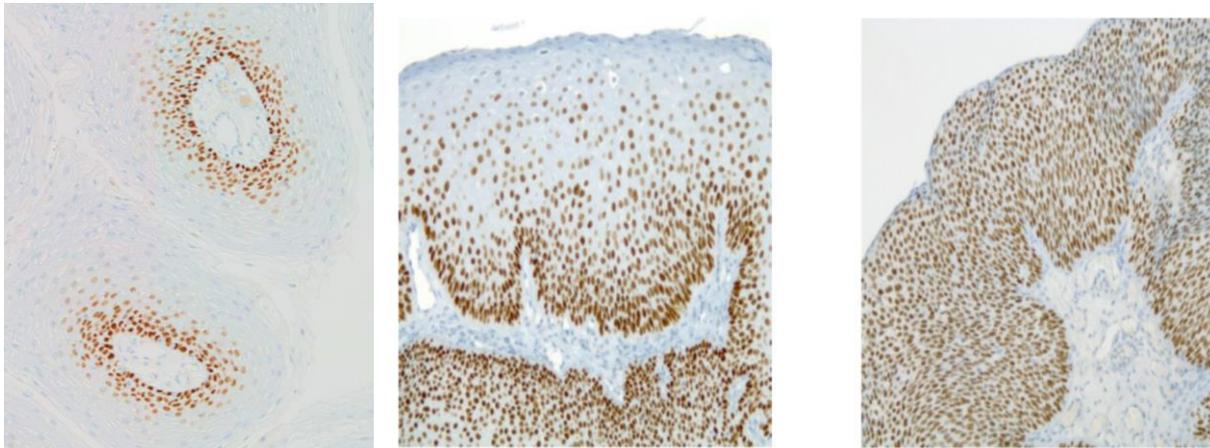
## **2 Techniques réalisées**

### **2.1 Immunohistochimie**

Il a été réalisé sur tous les patients inclus, une immunohistochimie sur le même prélèvement de papillome FFPE avec les anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> (clone E6H4), anti-p53 (clone DO-7) et anti-p63 (clone 4A4) réalisé sur des automates Leica™ Bond III® selon les protocoles employés en routine du service d'ACP de l'hôpital Necker-Enfants Malades. Les dilutions employées et les

fabricants sont en annexe 4. Les lames d'immunohistochimie avec les anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> et anti-p63 ont ensuite été lues par deux anatomo-pathologistes, ayant comme domaine de compétence la pathologie ORL, de deux hôpitaux différents (Necker-Enfants Malades et HEGP).

L'immunohistochimie anti-p16<sup>INK4a</sup> a été cotée en positive (marquage franc et homogène de plus de 70% des cellules) ou en négative (marquage hétérogène ou complètement négatif). L'immunohistochimie anti-p63 a été cotée en fonction de l'étendue du marquage, par tiers marqué de l'épithélium de surface (1/3 basal, 2/3 basal et médian, marquage pan-épithélial comme expliqué dans la figure14). Les marquages avec les anticorps anti-p53 et anti-p63 ont fait l'objet d'une analyse informatisée d'image pour compter le nombre de noyaux marqués.

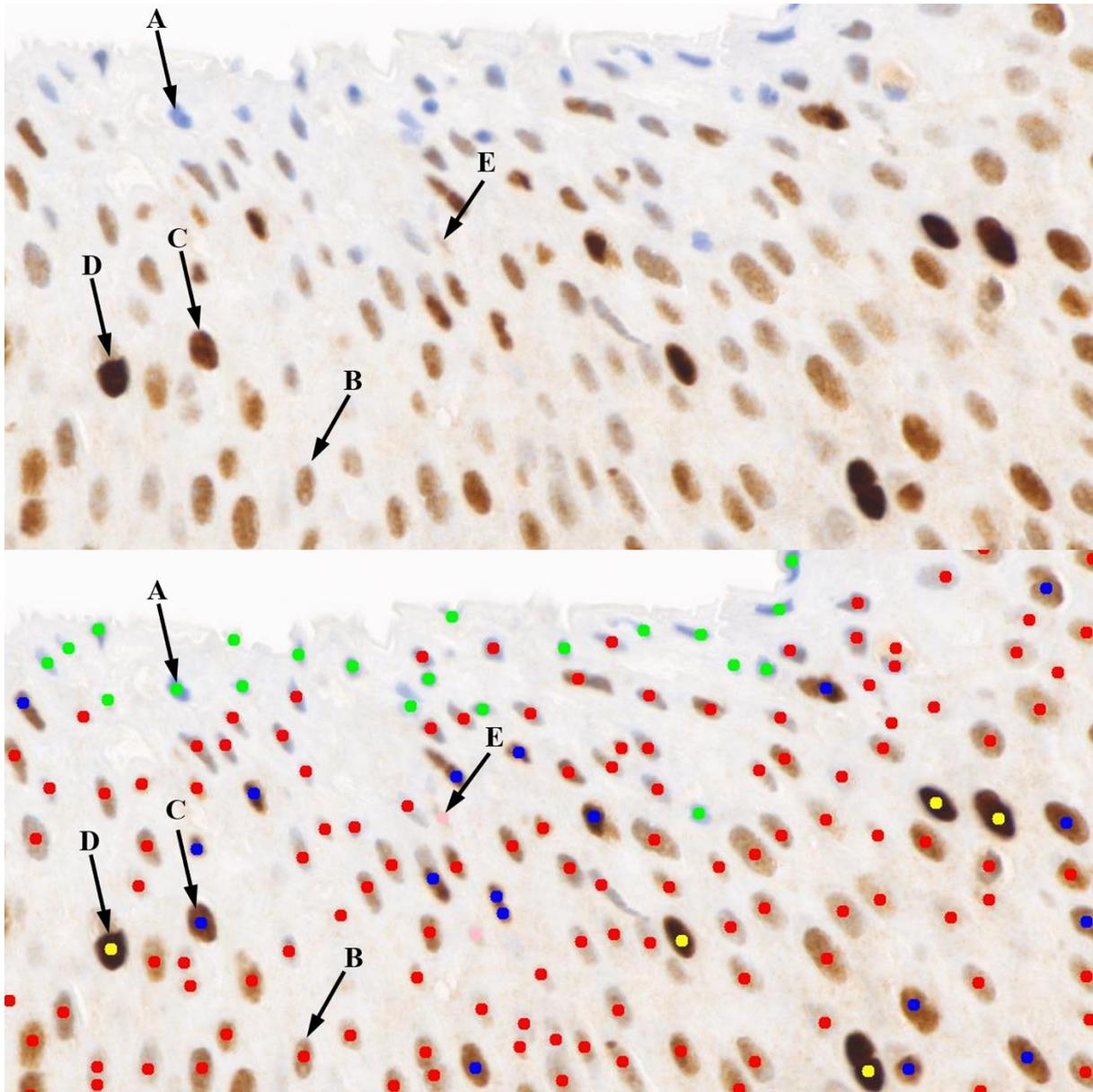


**Figure 14 : Marquages immunohistochimiques avec l'anticorps anti-p63 (x20), de gauche à droite : marquages du 1/3 basal, des 2/3 basal et médian, et pan-épithélial.**

## **2.2 Analyses d'image**

Chaque lame d'immunohistochimie dirigée contre la p53 et la p63 a été scannée avec un scanner de lame Vectra Polaris® du fabricant PerkinElmer™. Sur chaque lame virtuelle, il a été sélectionné au moins 8 champs d'intérêts à analyser, le plus souvent 10, représentatifs de l'immunomarquage de l'épithélium de surface des tumeurs. C'est à dire au mieux l'intégralité de la surface de l'épithélium de la couche basale jusqu'à la dernière couche superficielle avec le moins de chorion possible. Ces champs d'intérêts ont ensuite été analysés par le logiciel Inform® du même fabricant que le scanner de lame. Le logiciel Inform® avant l'analyse avait été entraîné avec une sélection de 10 champs d'intérêts provenant de lames virtuelles d'immunohistochimie dirigées contre la p53 et la p63 permettant ainsi d'avoir un algorithme spécifique reconnaissant les noyaux des cellules marquées avec une différenciation de

l'intensité de marquage en trois niveaux d'intensité nommées +, ++ et +++ comme indiqué dans la figure 15.



**Figure 15 : Correspondance entre l'intensité de marquage à l'immunohistochimie (image en haut) et la reconnaissance par l'algorithme du logiciel Inform de l'intensité de ce marquage (image en bas).**

**A : Noyau non marqué (point vert)**

**B : Noyau dont l'intensité de marquage immunohistochimique est de + (point rouge)**

**C : Noyau dont l'intensité de marquage immunohistochimique est de ++ (point bleu)**

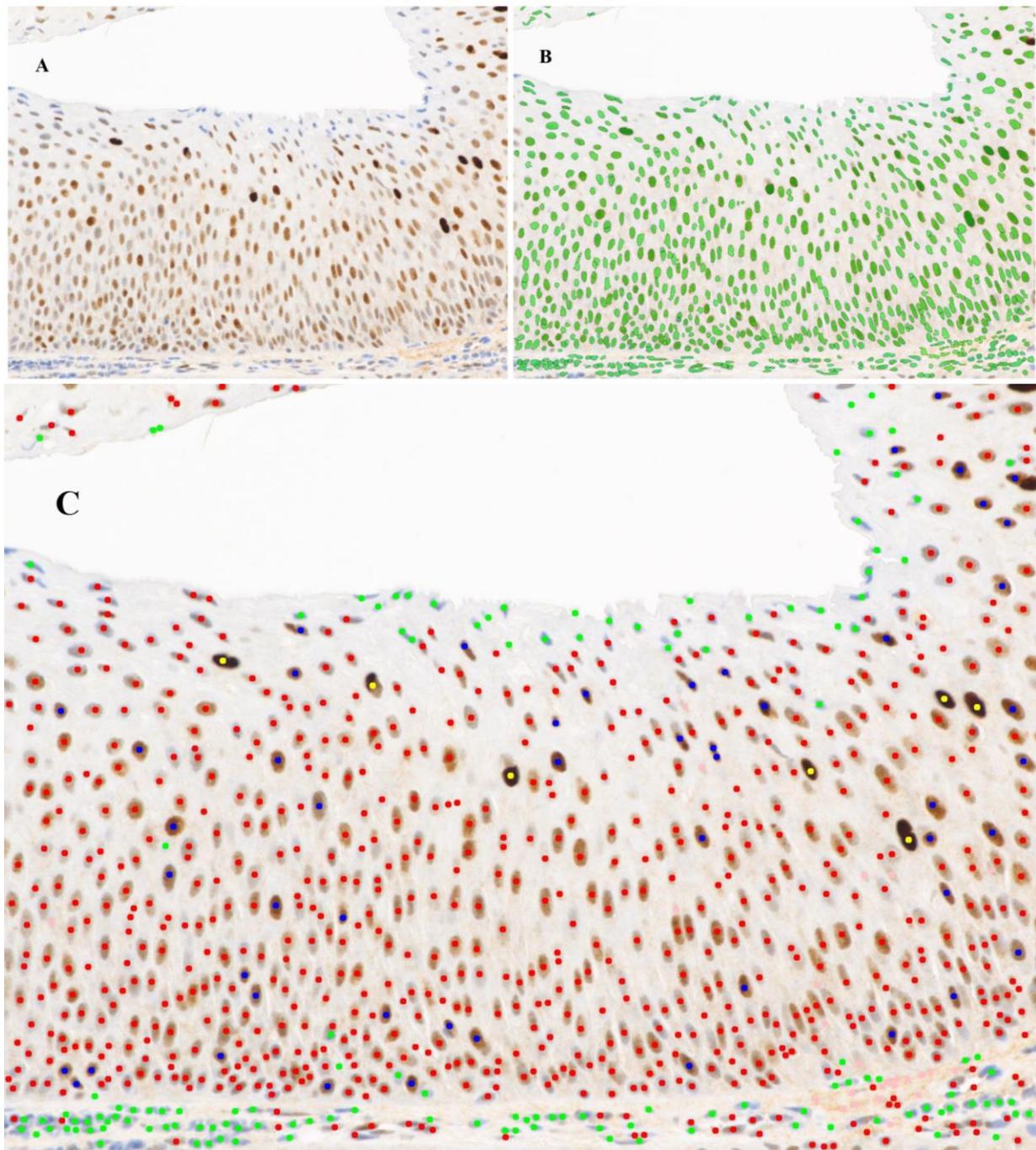
**D : Noyau dont l'intensité de marquage immunohistochimique est de +++ (point jaune)**

**E : Zone de segmentation ne correspondant pas à des noyaux (point rose)**

L'apprentissage du logiciel est décomposé en plusieurs étapes comme illustré dans la figure 16 :

- La segmentation : le logiciel entoure des zones de l'image qu'il considère comme des noyaux, à cette étape on peut modifier simplement la forme et la taille des zones segmentées pour que le logiciel segmente au mieux les noyaux.
- Le « teaching » : on attribue, pour environ 50 zones segmentées, un attribut. Pour ce travail, il a été utilisé comme dénomination pour les noyaux marqués en fonction de leur intensité de la plus faible à la plus élevée +, ++ et +++, les noyaux non marqués ont été appelés noyaux – et enfin toutes les zones qui ne correspondaient pas à ces dénominations ont été appelées autres.
- Vérification de l'algorithme et correction : on teste ensuite l'algorithme que va créer le logiciel à partir de la phase de teaching sur les 10 images sélectionnées et on vérifie que les noyaux sont marqués correctement. Pour ceux qui sont mal marqués, on leur réattribue la bonne dénomination pour que l'algorithme se réadapte. Au total dans mon travail, 530 zones de segmentation ont été ainsi enseignées au logiciel.

Une fois l'apprentissage terminé, les champs d'intérêts de tous les patients ont été analysés par le logiciel. Les données ont été extraites avec le logiciel R permettant d'avoir un tableau Excel avec le compte du nombre d'objet de chaque catégorie, permettant ainsi de calculer le pourcentage de noyaux marqués.



**Figure 16 : Illustration des différentes étapes d'analyse d'image.**

**A. Image d'un immunomarquage p53 sur un des cas de PRR correspondant à un champ d'intérêt sélectionné.**

**B. Résultats de segmentation des noyaux sur ce même champ, le logiciel considère comme un noyau chaque zone entourée en vert.**

**C. Résultat final de l'analyse d'image après « teaching » du logiciel sur le même champ. Les noyaux non marqués, les noyaux dont l'intensité de marquage est +, ++ et +++ ainsi que les zones ne correspondant à rien sont indiqués respectivement par des points verts, rouges, bleues, jaunes et roses.**

### 2.3 Hybridation *in situ* avec une sonde ARN HPV 6/11

J'ai réalisé avec des kits RNAscope® du fabricant ACD™ sur des coupes FFPE des mêmes prélèvements de papillomes que pour les études immunohistochimiques :

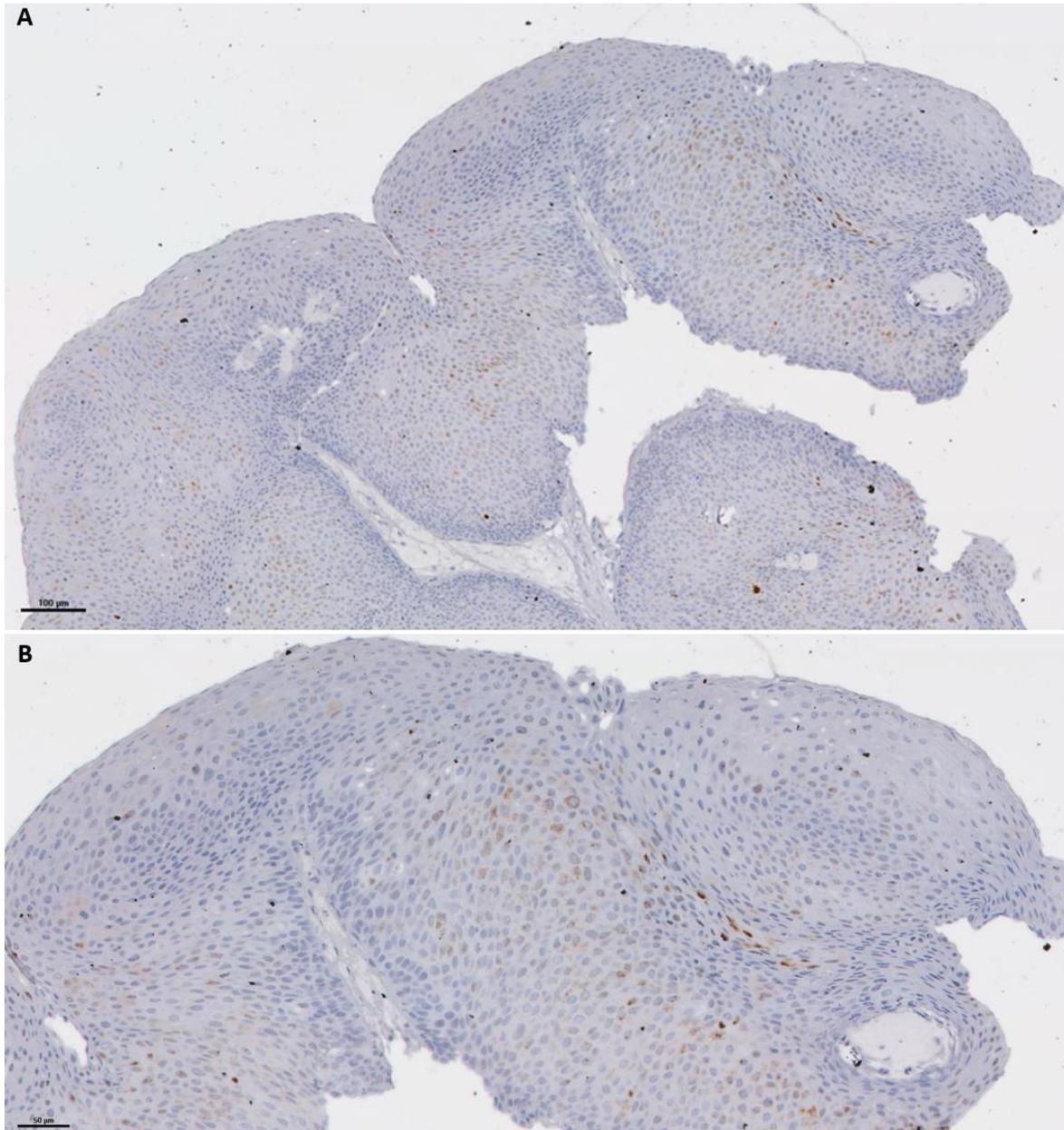
- Une hybridation *in situ* avec une sonde dirigée contre l'ARNm des protéines E6 et E7 des HPV 6 et 11 ou HPV16 dans un cas,
- Un témoin négatif avec une sonde d'hybridation *in situ* (nommée DaPB) dirigée contre l'ARN du gène bactérien *DaPB*
- Un témoin positif avec une sonde d'hybridation *in situ* (nommée PPIB) dirigée contre l'ARN du gène de ménage cellulaire ubiquitaire *PPIB*. Cette sonde permet d'appréhender la qualité de l'ARN dans le prélèvement.

Les coupes FFPE ont été stockées dans un réfrigérateur à 4°C avant la réalisation de la technique. Les hybridations ont été réalisées sous la surveillance de l'ingénieur Marion Mandavit dans l'équipe 10 de l'Unité de Recherche Mixte 970 de l'INSERM au PARCC de l'HEGP. Le protocole utilisé, mis au point dans le laboratoire, est en annexe 5. Pour chaque lot de CISH avec la sonde à ARN des HPV6 et 11, il a été réalisé un témoin positif connu pour exprimer l'ARNm des protéines E6 et E7 des HPV 6 et 11 ou 16.

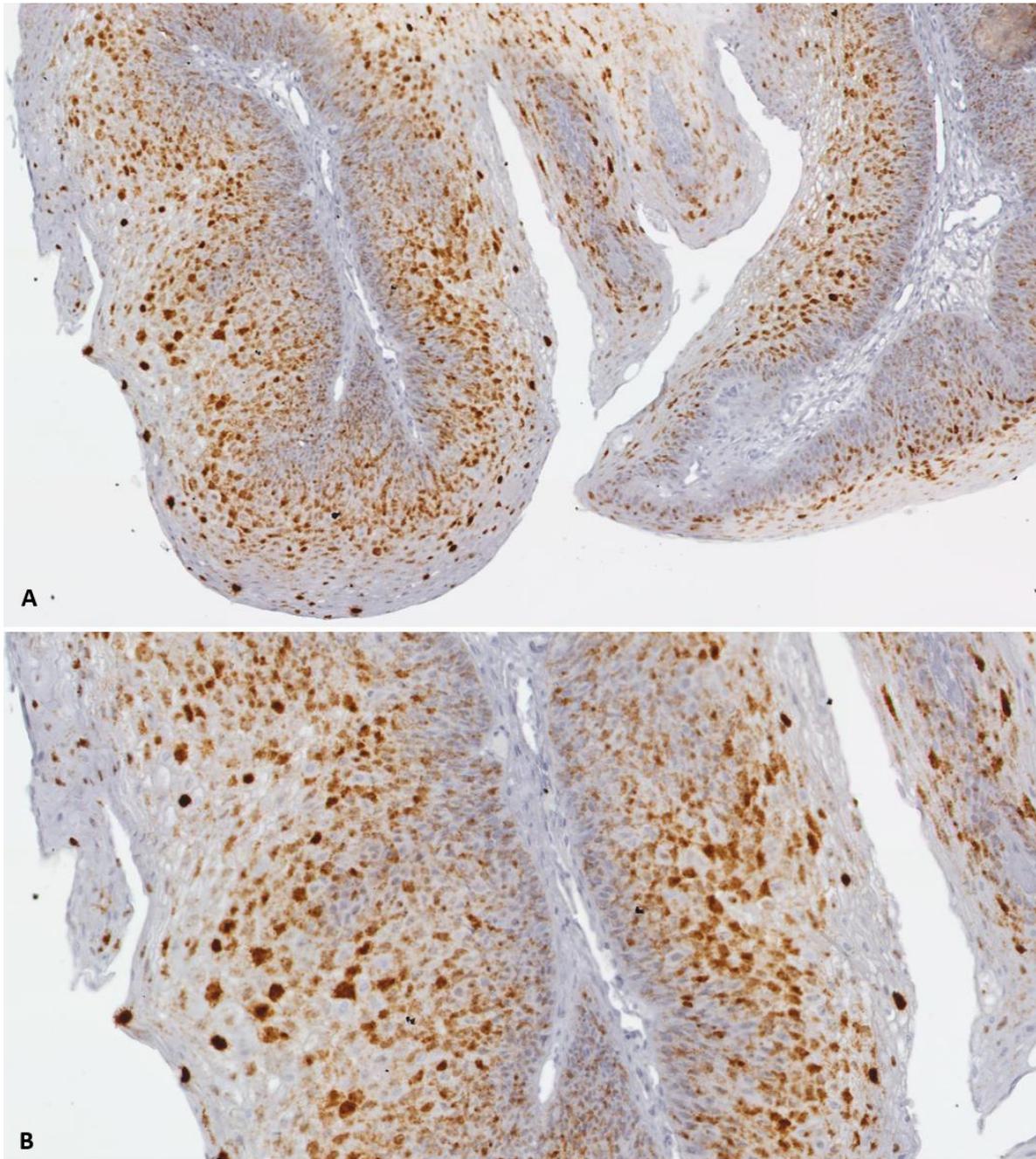
Chaque lame a ensuite été lue par les mêmes anatomopathologistes que pour l'immunohistochimie et il a été attribué pour chaque lame un score 0, 1+ ou 2+ :

- Score 0 : absence de marquage
- Score 1+ : marquage inférieur ou égal à 50% des cellules, ou marquage de plus de 80% de la surface des cellules dans moins de 30% des cellules tumorales à l'objectif x20
- Score 2+ : marquage de plus de 50% des cellules, ou marquage de plus de 80% de la surface des cellules dans au moins 30% des cellules tumorales à l'objectif x20

Des exemples de marquages sont exposés dans les figures 17 et 18.



**Figure 17 : Exemple de résultats RNAscope avec la sonde HPV6/11 avec un score 1+.**  
**A. Champs au grossissement x10 d'une CISH d'un papillome de PRR**  
**B. Champs au grossissement x20 d'une CISH d'un papillome de PRR**



**Figure 18 : Exemple de résultats RNAscope avec la sonde HPV6/11 avec un score 2+.**

**A. Champs au grossissement x10 d'une CISH d'un papillome de PRR**

**B. Champs au grossissement x20 d'une CISH d'un papillome de PRR**

### **3. Critères de jugements**

#### **3.1 Définition de la sévérité de la maladie**

Les patients ont été classés dans deux groupes : pathologie sévère et peu sévère. La sévérité est définie par au moins un des critères suivants :

- Un nombre d'endoscopies sous AG par an supérieur ou égal à 5
- Décès lié à la PRR
- Localisation pulmonaire de la PRR prouvée au minimum par un scanner thoracique
- Transformation carcinomateuse d'une localisation de la PRR

#### **3.2 Critère de jugement principal**

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence des facteurs histo-pronostiques permettant de prédire la sévérité de la PRR. Le critère de jugement principal est donc la comparaison des marquages immunohistochimiques avec les anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup>/p53/p63 et de la sonde à ARN dirigé contre les HPV6/11 du RNAscope entre le groupe de patient ayant une maladie sévère et le groupe de patients ayant une maladie peu sévère.

#### **3.3 Critère de jugement secondaire**

Le critère de jugement secondaire est la comparaison des données cliniques des patients entre les groupes de malades ayant une expression des ARNm HPV6/11 en CISH avec un score 1+ avec ceux ayant une expression avec un score 2+.

### **4. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS<sup>®</sup> d'IBM<sup>™</sup>. Les variables qualitatives ont été analysées avec un test du Chi<sup>2</sup> ou un test de Fisher en fonction des effectifs. Les analyses univariées avec les données quantitatives ont été réalisées avec un test non paramétrique de Mann-Withney. Pour l'analyse multivariée, il a été pris comme co-variables les variables ayant un  $p < 0,150$  en analyse univariée. Enfin, tous les tests étaient bilatéraux et un  $p < 0,05$  était considéré comme significatif.

# Troisième partie : Résultats

---

## 1. Population

Au total 53 patients correspondaient aux critères d'inclusions, 28 à l'hôpital Robert Debré et 25 à l'hôpital Necker-Enfants Malades. Sur ces patients, 5 de l'hôpital Necker-Enfants Malades ont été exclus :

- 3 patients dont les blocs n'ont pas été retrouvés.
- 1 patiente présentant un papillome malpighien, de la corde vocale droite, lié uniquement à HPV16, de haut risque, qui n'a jamais récidivé après exérèse.
- 1 patiente suivie en Polynésie Française pour sa PRR, qui n'avait eu qu'une endoscopie à l'hôpital Necker-Enfants Malades et dont les données de suivi n'ont pu être récupérées.

Au final, 48 patients atteints de PRR ont été inclus. La répartition du sexe était équilibrée comme rapporté dans le tableau 2.

		Nombre de patients (Pourcentage)
Sexe	Garçons	22 (45,8%)
	Filles	26 (54,2%)

Tableau 2 : répartition du sexe dans notre cohorte de PRR.

L'âge au diagnostic était en moyenne de 3,8 ans avec une médiane à 2 ans comme exposé dans le tableau 3.

	Mini	Maxi	Médiane	Moyenne	Ecart-type
Age au diagnostic (ans)	0,5	13	2	3,8	3,3

Tableau 3 : Données de l'âge au diagnostic dans notre cohorte de PRR.

### 1.1. Statut HPV

Les données du typage HPV sont présentées dans le tableau 4. 27% des patients présentaient une infection par l'HPV 11, 65% une infection par l'HPV 6 et 6% une co-infection par les HPV 6 et 11. Par ailleurs, pour un patients le typage n'était pas connu, seule une HIS positive pour l'ADN viral d'HPV6 et 11 était disponible.

		Nombre de patients (Pourcentage)
Typage HPV	Co-inf HPV6 et 11	3 (6,3%)
	HPV11	13 (27,1%)
	HPV6	31 (64,6%)

Tableau 4 : Données des typages HPV de notre cohorte de PRR.

## 1.2. Localisation des atteintes

La localisation anatomique des atteintes de la PRR dans notre cohorte est détaillée dans le tableau 5. Tous les patients présentaient une atteinte de l'étage glottique. 73% des malades avaient une atteinte sus-glottique, 68,7% une atteinte sous-glottique, 25% une atteinte trachéale et 8% une atteinte pulmonaire. Les patients avec atteinte trachéale ou pulmonaire avaient tous une atteinte sous glottique associée.

Localisation de l'atteinte	Nombre de patients (Pourcentage)
Etage glottique	48 (100%)
Etage sus-glottique	35 (73%)
Etage sous-glottique	33 (68,7%)
Trachéale	12 (25%)
Pulmonaire	4 (8,3%)

Tableau 5 : Localisation des atteintes de la PRR dans notre cohorte.

## 1.3. Traitements

Tous les patients ont été traités par au moins deux résections chirurgicales endoscopiques sous AG. Le tableau 6 présente les données concernant les traitements reçus, en lien avec la PRR, chez les patients de notre cohorte. 73% des patients ont reçu au moins une injection de Cidofovir. Les patients ont reçu en moyenne 7,1 injections de Cidofovir avec une médiane de 3,5 injections. Six patients (12,5%) ont reçu du Cidofovir lors d'une endoscopie précédant la réalisation du prélèvement étudié. Par ailleurs, 17% des patients ont subi une trachéotomie.

	Nombre (Pourcentage)		
Trachéotomie	8 (16,7%)		
Patients ayant eu une injection de Cidofovir	35 (72,9%)		
Injection de Cidofovir avant le prélèvement	6 (12,5%)		
	Médiane	Moyenne	Ecart-type
Nombre d'injections de Cidofovir par patient	3,5	7,1	11,7

Tableau 6 : Données concernant les traitements reçus par les patients de notre cohorte de PRR

## 1.4. Données endoscopiques

Le délai entre la 1<sup>ère</sup> et la dernière endoscopie sous AG était en moyenne de 3,6 ans et la médiane était de 2 ans (tableau 7), on peut assimiler ces données à la durée de l'évolution de la maladie ce qui nous donne une approximation du suivi. Quatre items reflétant l'activité de la maladie ont été pris en compte et détaillés dans le tableau 7. Leurs médianes étaient de :

- 8,5 pour le nombre total d'endoscopies sous AG
- 4,8 pour le nombre d'endoscopies par an
- 4 pour le nombre d'endoscopies la première année
- 92 jours pour l'intervalle moyen entre chaque endoscopie

Par ailleurs 71% des patients présentaient une lésion lors du dernier contrôle que ce soit par endoscopie sous AG ou par examen au nasofibroscope (tableau 7).

	Mini	Maxi	Médiane	Moyenne	Ecart-type
<b>Délai entre la 1ère et dernière endoscopie (année)</b>	0,1	21,2	1,9	3,6	4,9
<b>Nombre total d'endoscopies</b>	2	132	8,5	14,8	21,6
<b>Nombre d'endoscopies/an</b>	0,5	43,9	4,8	8,4	9,6
<b>Nombre d'endoscopies la 1ère année</b>	1,0	17,0	4,0	4,9	3,5
<b>Intervalle entre chaque endoscopie (jours)</b>	11,7	797,2	92,1	161,7	164,8
	<b>Nombre de patients (pourcentage)</b>				
<b>Lésion lors du dernier contrôle</b>	34 (70,8%)				

Tableau 7 : Données endoscopiques concernant les patients de notre cohorte de PRR.

## 1.5. Complications

Le tableau 8 expose les données concernant les complications présentées par les patients de notre cohorte. 21% des patients ont présenté une morbidité post-opératoire (dont huit des synéchies au niveau de la commissure antérieure et deux une sténose cicatricielle de 80% de la lumière laryngée).

Par ailleurs une jeune patiente est décédée à l'âge de 18 ans de la transformation maligne d'une localisation pulmonaire de sa PRR en carcinome épidermoïde broncho-pulmonaire. Sa PRR a évolué pendant 17 ans : 132 endoscopies sous AG ont été réalisées au total, avec un intervalle moyen entre chaque endoscopie de 47 jours. Il lui a également été administré 67 injections de Cidofovir.

	Nombre de patients (Pourcentage)
Transformation maligne	1 (2,1%)
Décès	1 (2,1%)
Morbidité post-opératoire	10(20,8%)

Tableau 8 : Données concernant les complications qu'on présentés les patients de notre cohorte de PRR.

## 1.6.Résultats des marquages immunohistochimiques

Dans tous les prélèvements, l'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> n'a pas montré d'expression significative de la protéine (tous les patients avaient un marquage hétérogène de la p16<sup>INK4a</sup> à l'exception d'un patient pour lequel la p16<sup>INK4a</sup> était négative).

En ce qui concerne l'immunohistochimie avec l'anticorps anti-p63, 20 patients (42%) présentaient un marquage sur toute la hauteur de l'épithélium, 22 patients (46%) présentaient un marquage des 2/3 basal et médian et 6 patients (12%) un marquage seulement au niveau du tiers basal.

Les résultats des analyses d'images sont résumés dans le tableau 9. Pour l'anticorps anti-p53 l'analyse a été réalisée en moyenne sur 10192 noyaux avec une médiane à 10176. En ce qui concerne l'anticorps anti-p63, 8874 noyaux ont été analysés en moyenne avec une médiane à 8280. Les marquages d'intensité ++ et +++ sont également présentés groupés car ils correspondent tous 2 à un marquage interprété comme positif en lecture non automatisée ou manuelle. La médiane de l'intensité de marquage avec l'anticorps anti-p53 était de 3,7% pour un marquage d'intensité ++ et +++, elle était de 32,3% pour le marquage avec l'anticorps anti-p63.

	Intensité de marquage	Minimum	Maximum	Médiane	Moyenne	Ecart-type
Marquage immunohistochimique avec l'ac anti-p53 (% de noyaux marqués)	+	2,7	79,8	57,8	55,1	16,3
	++	0,0	33,2	3,6	4,5	5,2
	+++	0,0	0,8	0,1	0,1	0,2
	Total des intensités	2,7	86,8	62,5	59,8	18,9
	++ et +++	0,1	34,0	3,7	4,7	5,4
Marquage immunohistochimique avec l'ac anti-p63 (% de noyaux marqués)	+	26,0	76,9	51,6	51,2	12,7
	++	4,7	54,7	32,1	29,5	13,2
	+++	0,0	14,1	0,2	2,2	3,6
	Total des intensités	61,0	90,6	83,1	82,9	5,8
	++ et +++	4,7	63,1	32,3	31,7	15,8

Tableau 9 : Résultats de l'analyse d'image des immunomarquage avec les anticorps anti-p53 et anti-p63 (en % de cellules marquées).

Enfin, il existait une corrélation entre la topographie et le pourcentage de noyaux marqués en immunohistochimie avec l'anticorps anti-p63. Pour les intensités de marquage ++ et +++ combinés, les prélèvements avec un marquage de localisation pan-épithéliale présentaient significativement plus de noyaux marqués que ceux avec un marquage des 2/3 inférieurs de l'épithélium (médianes égales à 38% et 27% respectivement,  $p=0,025$ ). Il n'a pas été observé d'association entre les autres topographies d'immunomarquages et les autres intensités de marquage ( $p>0,005$  pour tous les autres items).

### 1.7. Résultats des marquages en hybridation *in situ* avec les sondes à ARN

Pour le marquage avec la technique de RNAscope, le témoin négatif (sonde DaPB) était bien négatif pour tous les patients. Trente-sept patients ont présenté un témoin positif (sonde PPIB) de score 2+ et les onze autres un score 1+.

En ce qui concerne l'hybridation *in situ* avec la sonde à ARN HPV6/11, 29 patients avaient un score 2+ et 19 un score 1+. Parmi les 6 patients ayant reçu au moins une injection de Cidofovir lors d'une endoscopie antérieure au prélèvement, 4 patients avaient un score 2+ et 2 patients un score 1+.

Par ailleurs, il n'y avait pas de corrélation statistiquement significative entre le score des sondes HPV6/11 et le score des sondes des témoins positifs (PPIB) ( $p=0,085$ ) comme exposé dans le tableau 10.

		Sonde HPV6/11		Total
		Score 1+	Score 2+	
Sonde PPIB	Score 1+	7	4	11
	Score 2+	12	25	37
Total		19	29	48

**Tableau 10 : Tableau de contingence des résultats de marquages en CISH des sondes HPV6/11 et PPIB. Selon le test exact de Fischer :  $p=0,085$ .**

## 2. Evaluation de facteurs prédictifs de la sévérité de la maladie

La cohorte a été divisée en deux groupes de même effectif : 24. Pour rappel la sévérité de la maladie a été définie par la présence d'au moins un des critères suivants :

- Un nombre moyen d'endoscopies sous AG par an supérieur ou égal à 5

- Le décès lié à la PRR
- Localisation pulmonaire
- La transformation carcinomateuse d'une localisation de la PRR

## 2.1. Analyse des données cliniques

Les deux populations étaient comparables. Elles ne présentaient pas de différence statistiquement significative sur le plan clinique qu'il s'agisse du sexe des patients ou du sous type d'HPV retrouvé dans la lésion (tableau 11).

		Peu sévère : 24 (Fréquence)	Sévère : 24 (Fréquence)	p
Sexe	Garçons	11 (46%)	11 (46%)	1
	Filles	13 (54%)	13 (54%)	1
Type HPV	Co-inf HPV6 et 11	3 (12%)	0 (0%)	0,234
	HPV11	4 (17%)	9 (38%)	0,194
	HPV6	17 (71%)	14 (58%)	0,546
Trachéotomie		1 (4%)	7 (29%)	<b>0,048</b>
Atteinte sous-glottique		14 (58%)	19 (79%)	0,119
Atteinte trachéale		5 (21%)	7 (29%)	0,505
Morbidity post-opératoire		5 (21%)	5 (21%)	1
Lésion lors du dernier contrôle		15 (63%)	19 (79%)	0,204
Injection de Cidofovir avant le prélèvement		0 (0%)	6 (25%)	<b>0,022</b>

Tableau 11 : Comparaison des données cliniques entre la population avec une maladie sévère et celle avec une maladie peu sévère (test du Chi<sup>2</sup> et test exact de Fisher).

Les comparaisons des données cliniques des deux groupes sont présentées dans les tableaux 11 et 12. Les deux populations ne présentaient pas de différence statistiquement significative pour les données cliniques concernant :

- L'âge au diagnostic
- Le nombre total d'endoscopies
- Le nombre d'endoscopies la première année
- Le nombre d'injection de Cidofovir
- Les différents niveaux d'extension de l'atteinte de la PRR
- La présence de morbidité post-chirurgicale

Par ailleurs il existait un déséquilibre entre les deux populations concernant le délai entre la 1<sup>ère</sup> et la dernière endoscopie : la médiane était de 1 an dans le groupe pathologie sévère contre 2,7 ans dans le groupe peu sévère (p=0,001). Il en allait de même pour la présence d'une injection

de Cidofovir avant la réalisation du prélèvement où ont été appliquées les techniques d'immunohistochimie et du RNAscope : les 6 patients concernés présentaient tous une maladie sévère (p=0,022).

La population avec une maladie sévère présentait également une médiane des intervalles moyens entre chaque endoscopie sous AG de 51 jours, bien inférieure à la médiane de ceux avec une maladie peu sévère (médiane de 213 jours), ces deux populations étant significativement différentes sur ce critère (p<0,0001). Enfin les patients avec une PRR sévère présentaient significativement plus de trachéotomies que les patients avec une PRR peu sévère (p=0,048).

	Peu sévère (24)	Sévère (24)	p
Age au diagnostic (ans)	3	2	0,180
Délai entre la 1ère et la dernière endoscopie (ans)	2,7	1	<b>0,001</b>
Nombre total d'endoscopies	8	9,5	0,193
Nombre d'endoscopies la 1ère année	3,5	5	0,054
Intervalle moyen entre chaque endoscopie (jours)	213	51	<b>&lt;0,0001</b>
Nombre total d'injection de Cidofovir	3	5	0,311

Tableau 12 : Comparaison des médianes des données cliniques entre le groupe pathologie sévère et peu sévère (test de Mann-Whitney)

## 2.2 Analyse des données histologiques

En ce qui concerne les données histologiques (tableaux 13 et 14) les deux groupes ne présentaient pas de différences statistiquement significatives concernant :

- Les pourcentages de noyaux marqués par les anticorps anti-p53 et anti-p63 pour toutes les intensités de marquages additionnées
- Les pourcentages de noyaux marqués par les anticorps anti-p53 et anti-p63 pour l'intensité de marquage +++
- La localisation du marquage nucléaire de l'anticorps anti-p63 en fonction du tiers de l'épithélium de surface.
- Le marquage par l'anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup>.

	Intensité de marquage	Peu sévère (24)	Sévère (24)	p
<b>Médiane du marquage immunohistochimique avec l'ac anti-p53 (pourcentage de noyaux marqués)</b>	+	57,76	57,92	0,523
	++	3	4,46	<b>0,037</b>
	+++	0,07	0,14	<b>0,011</b>
	<b>Total des 3 intensités</b>	62,1	65,22	0,216
	<b>++ et +++</b>	3,22	4,57	<b>0,019</b>
<b>Médiane du marquage immunohistochimique avec l'ac anti-p63 (pourcentage de noyaux marqués)</b>	+	55,7	49,56	0,095
	++	23,99	36,1	<b>0,043</b>
	+++	0,16	0,74	0,138
	<b>Total des 3 intensités</b>	82,19	86,07	0,127
	<b>++ et +++</b>	24,1	36,9	<b>0,043</b>

**Tableau 13 : Comparaison des médianes des pourcentages de noyaux marqués en fonction de l'intensité pour les anticorps anti-p53 et anti-p63 entre les patients ayant une pathologie sévère et ceux ayant une pathologie peu sévère (test de Mann-Whitney)**

En ce qui concerne les pourcentages de noyaux marqués par les anticorps anti-p53 et anti-p63 pour les autres intensités de marquages les deux populations présentaient des différences statistiquement significatives décrites dans le tableau 13. Cependant, les différences étaient assez faibles entre les médianes des deux populations : ainsi, pour le marquage p53 associant les intensités ++ et+++ , les médianes étaient de 3% et 4,6% respectivement pour les enfants avec une pathologie peu sévère et ceux avec une pathologie sévère.

		Peu sévère n=24 (Fréquence)	Sévère n=24 (Fréquence)	p
<b>RNAScope</b>	<b>Score 1+</b>	13 (54%)	6 (25%)	0,075
	<b>Score 2+</b>	11 (46%)	18 (75%)	0,075
<b>Marquage IHC p63 supérieur à 1/3</b>		19 (79%)	23 (96%)	0,191
<b>Marquage IHC p63 supérieur à 2/3</b>		8 (33%)	12 (50%)	0,157
<b>Marquage IHC p16<sup>INK4a</sup> hétérogène</b>		23 (96%)	24 (100%)	1

**Tableau 14 : Comparaison des données histologiques entre le groupe de patients ayant une maladie sévère et ceux ayant une maladie peu sévère.**

En ce qui concerne les scores du RNAScope il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux populations ( $p=0,075$ ) comme présenté dans le tableau 14. La répartition des scores du RNAScope en fonction des groupes est schématisé dans la figure 19. On retrouvait 75% de patients avec un score 2+ dans le groupe de pathologie sévère contre 46% de patients de score 2+ dans le groupe de pathologie peu sévère.

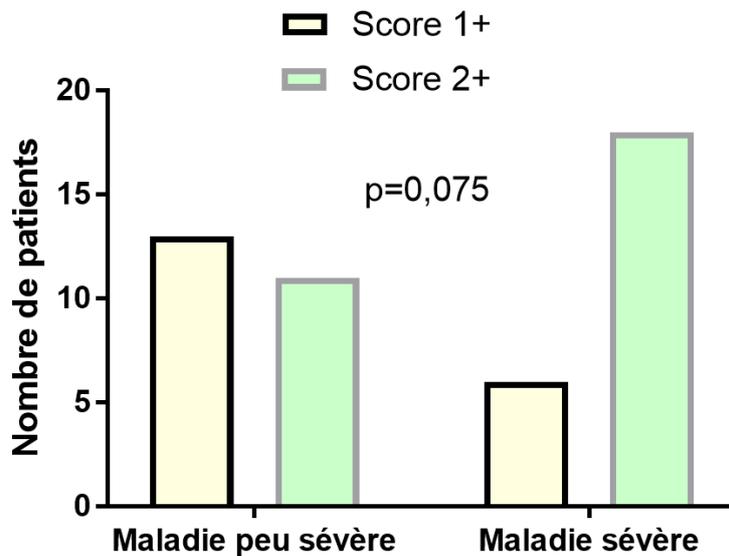


Figure 19 : Répartition des scores du RNAscope dans les populations avec pathologie sévère et peu sévère.

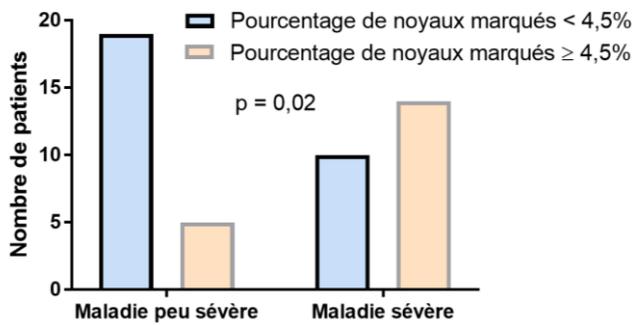
### 2.3 Détermination d'une valeur seuil et analyse de la répartition en fonction de la sévérité

Nous avons recherché une valeur seuil de pourcentage de cellules marquées par les anticorps anti-p53 et p63 permettant de trier les prélèvements correspondant à une atteinte sévère ou peu sévère. Cette valeur seuil a été calculée grâce au logiciel SPSS pour chaque immunomarquage :

- Pour le marquage p63, en combinant les intensités ++ et +++, le seuil a été fixé à 30% de noyaux marqués.
- Pour le marquage p53, en combinant les intensités ++ et +++, le seuil a été fixé à 4,5% de noyaux marqués.

Les résultats des analyses statistiques sont représentés dans la figure 20. On a observé que les patients ayant un prélèvement avec un marquage p63 ++ et +++  $\geq$  30% étaient statistiquement associés à un statut sévère : 17 patients avec une maladie sévère avaient un marquage  $\geq$  30% contre 8 patients avec une maladie peu sévère, avec une différence statistiquement significative entre les deux groupes ( $p=0,02$ ) et un odd ratio de 4,9 (IC95% [1,4 ; 15,6]). De même, 14 patients avec une maladie sévère avaient un marquage  $\geq$  4,5% contre 5 patients avec une maladie peu sévère avec une différence statistiquement significative entre les deux groupes ( $p=0,02$ ) et un odd ratio de 5,3 (IC95% [1,4 ; 18,1]).

### Immunohistochimie avec l'anticorps anti-p53



### Immunohistochimie avec l'anticorps anti-p63

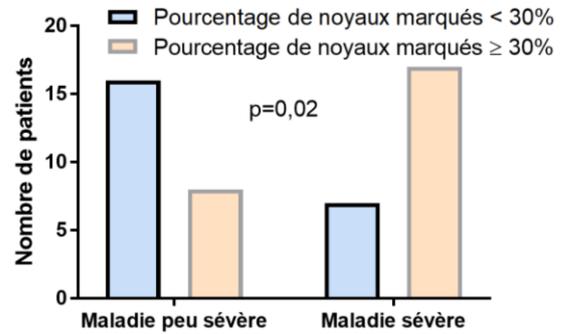


Figure 20 : Représentation de la distribution des valeurs seuil des marquages d'intensité ++ et +++ pour chaque anticorps en fonction de la sévérité de la maladie.

Enfin, lorsque l'on a assemblé ces deux critères pour former deux groupes en fonction du seuil du marquage des anticorps anti-p53 (intensité ++ et +++,  $\ge 4,5\%$ ) et anti-p63 (intensité ++ et +++,  $\ge 30\%$ ), on a observé des résultats avec une significativité encore plus marquée avec un  $p=0,001$  et un odd ratio de 13 (IC95 [2,6 ; 62]), représentés dans la figure 21. En effet, dans le groupe ayant une pathologiesévère, 13 patients avaient un marquage p63 et p53 supérieur aux deux seuils alors que dans le groupe ayant une pathologie peu sévère 2 patients étaient dans ce cas.

### Signature immunohistochimique avec les anticorps anti-p53 et anti-p63 combinés

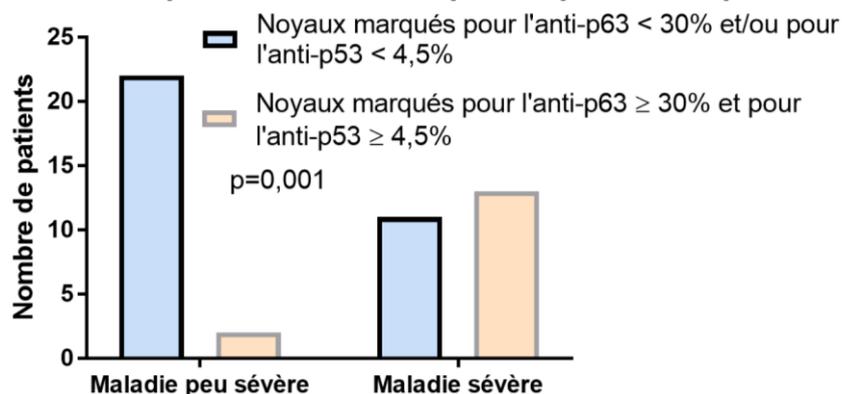


Figure 21 : Représentation de la distribution des patients en fonction de la sévérité de leur maladie et de leur seuil combiné de noyaux marqués à l'immunohistochimie d'intensité ++ et +++ pour les anticorps anti-p63 et anti-p53.

### 3. Comparaison des populations de score RNAscope 1+ et 2+

En RNAscope avec la sonde HPV 6/11 la cohorte présentait 19 patients avec un score 1+ et 29 patients avec un score 2+.

Les comparaisons des données cliniques en fonction du score du RNAscope sont présentées dans le tableau 15. Les deux populations étaient bien comparables avec une répartition équivalente du sexe, du type d'HPV et du délai entre la 1<sup>ère</sup> et la dernière endoscopie sous AG. Les deux populations ne présentaient pas de différences statistiquement significatives en ce qui concerne l'extension de la PRR, la présence de morbidité post-chirurgicale, la présence d'un antécédent de trachéotomie ou la présence de lésions lors du dernier contrôle.

		Score 1+ (Fréquence)	Score 2+ (Fréquence)	p
Sexe	Garçons	10 (53%)	12 (41%)	0,444
	Filles	9 (47%)	17 (59%)	0,444
Typage HPV	Co-inf HPV6 et 11	1 (5%)	2 (7%)	1
	HPV11	5 (26%)	8 (28%)	0,923
	HPV6	12 (63%)	19 (66%)	0,867
Trachéotomie		2 (11%)	6 (21%)	0,451
Atteinte sous-glottique		12 (63%)	21 (72%)	0,499
Atteinte trachéale		5 (26%)	7 (24%)	1
Atteinte pulmonaire		1 (5%)	3 (10%)	1
Transformation maligne		0 (0%)	1 (3%)	1
Décès		0 (0%)	1 (3%)	1
Morbidité post-opératoire		4 (21%)	6 (20%)	1
Lésion lors du dernier contrôle		11 (58%)	23 (79%)	0,278
Injection de Cidofovir avant le prélèvement		2 (10%)	4 (14%)	0,11

Tableau 15 : Comparaison des données cliniques entre les groupes RNAscope avec une sonde HPV6/11 score 1+ et score 2+ (test du Chi<sup>2</sup> ou de Fisher).

Enfin, même s'il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes en ce qui concerne la transformation maligne et la mortalité, la seule patiente décédée de transformation maligne de sa PRR présentait un score 2+ avec la sonde HPV6/11 en RNAscope.

En ce qui concerne les marqueurs d'activité de la maladie, exposés dans le tableau 16, ils étaient plus élevés dans la population avec un score 2+ par rapport à la population avec un score 1+, on a observé une différence statistiquement significative :

- Pour le nombre d'endoscopies la première année avec une médiane de 2 dans la population avec un score 1+ et de 5 pour celle avec un score 2+ (p=0,029)
- Pour le nombre d'endoscopies par an avec une médiane de 2,8 pour la population avec un score 1+ et 6,1 celle avec un score 2+ (p=0,036).

Par ailleurs, la médiane de l'intervalle moyen entre chaque endoscopie de la population de score 2+ était inférieur à celui de la population avec un score 1+ avec un p proche de la significativité (p=0,067). Enfin, la médiane du nombre total d'injection de Cidofovir était également plus élevée chez les patients avec un score 2+ par rapport à ceux avec un score 1+, respectivement 5 et 1, avec un p proche de la significativité (p=0,053).

	Score 1+ (19)	Score 2+ (29)	p
Age au diagnostic (ans)	2	4	0,676
Délai entre la 1ère et la dernière endoscopie (année)	2,58	1,5	0,292
Nombre total d'endoscopies	8	9	0,128
Nbre d'endoscopies la 1ère année	2	5	<b>0,029</b>
Intervalle moyen entre chaque endoscopie (jours)	168,0	79,7	0,067
Nombre total d'injection de Cidofovir	1	5	0,053
Nombre d'endoscopies moyen/an	2,8	6,1	<b>0,036</b>

**Tableau 16 : Comparaison des médianes des marqueurs cliniques d'activité de la maladie en fonction du score de la sonde HPV6/11 en RNAscope (test de Mann-Whitney).**

#### **4. Prise en compte de l'injection de Cidofovir avant le prélèvement**

Le Cidofovir inhibe la réplication de l'ADN viral. Il est donc possible que le traitement par Cidofovir modifie les résultats de la sonde HPV6/11 en RNAscope.

Une 2<sup>ème</sup> analyse statistique a donc été réalisée comparant les scores de la sonde HPV6/11 en RNAscope chez les patients avec une pathologie sévère et ceux avec une pathologie peu sévère, en censurant les six patients qui avaient eu une injection de Cidofovir lors d'une endoscopie antérieure au prélèvement. Les résultats sont présentés dans la figure 22.

On a observé alors une association statistiquement significative entre une maladie sévère et le score RNAscope 2+ (p=0,036 et odd ratio de 4,1 (IC95 [1,1 ; 13,7])) : dans le groupe de pathologie sévère 14 patients (78%) avaient un score 2+ et 4 patients (22%) un score 1+.

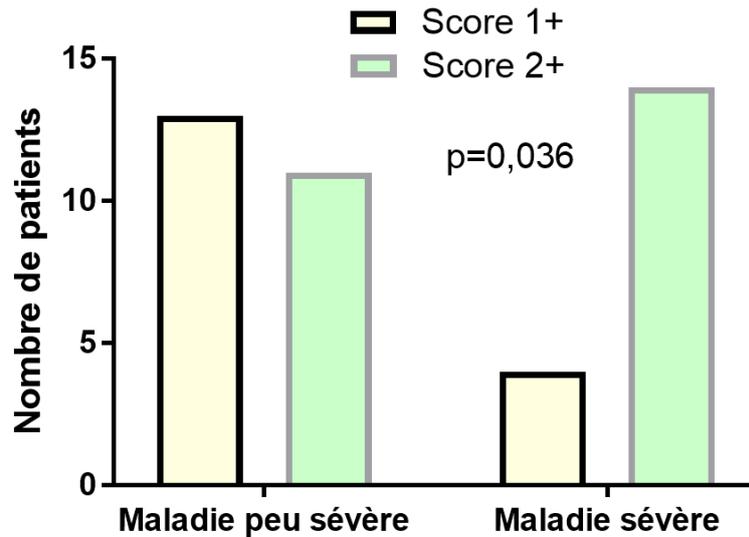


Figure 22 : Représentation du nombre de patients non traités par Cidofovir avant le prélèvement ayant au RNAscope des score 1+ ou 2+ en fonction de la sévérité de la PRR.

Par ailleurs, les médianes des deux groupes pour les critères d'activité de la maladie ont été peu modifiées. Ces données sont détaillées dans le tableau 17. En revanche, deux critères sont devenus statistiquement significatifs par rapport aux analyses statistiques précédentes, avec des médianes plus péjoratives pour les patients avec un score 2+ :

- L'intervalle moyen entre chaque endoscopie (p=0,02)
- Le nombre total d'injection de Cidofovir (p=0,021)

Ainsi les deux critères pour lesquels on a trouvé de la même façon une différence significative entre les deux populations étaient :

- Le nombre d'endoscopies la première année
- Le nombre d'endoscopie par an.

	Score 1+ (17)	Score 2+ (25)	p
Age au diagnostic (ans)	2	4	0,706
Délai entre la 1ère et dernière endoscopie (ans)	2,58	1,25	0,155
Nbre total d'endoscopies	8	9	0,105
Nbre d'endoscopies la 1ère année	2	5	<b>0,001</b>
Intervalle moyen entre chaque endoscopie (jours)	237	80	<b>0,02</b>
Nbre total d'injection de Cidofovir	1	5	<b>0,021</b>
Nbre d'endoscopies/ans	2,8	6,1	<b>0,011</b>

Tableau 17 : Comparaison des médianes des données cliniques d'activité de la maladie entre les patients non traités par Cidofovir ayant un score 1+ et un score 2+ avec la sonde HPV6/11 en RNAscope (tests de Mann-Whitney).

## 5. Résultats supplémentaires

### 5.1. Analyse multivariée

Etant donné que seuls 48 patients font partie de la cohorte, il n'a pas été possible de réaliser de modèle d'analyse multivariée.

### 5.2. Patiente présentant un papillome malpighien laryngé lié à HPV16

La patiente présentant un papillome malpighien laryngé lié à l'HPV16 n'a pas été intégrée dans la cohorte compte tenu de son histoire clinique et de l'aspect histologique totalement atypique.

Cette patiente avait présenté à l'âge de 6 ans un papillome malpighien isolé de la corde vocale droite : l'examen histologique avait mis en évidence des lésions de carcinome *in situ*. Elle n'avait, par la suite, jamais eu de récurrence ou de complications dans les suites de l'exérèse de ce papillome. Elle n'avait pas reçu de traitement adjuvant.

Une étude immunohistochimique du statut p16<sup>INK4a</sup>, p53 et p63 ainsi qu'un marquage RNAscope avec une sonde d'hybridation HPV16 ont néanmoins été réalisés. La CISH avec une sonde ARN HPV16 montrait un score 1+. Le marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-p16<sup>INK4a</sup> était positif avec un marquage intense et homogène de plus de 70% des cellules. Le marquage avec l'anticorps anti-p63 était étendu à tout l'épithélium. Les pourcentages de cellules marquées pour les marquages avec les anticorps anti-p53 et p63 sont détaillés dans le tableau 18.

	Intensité de marquage	% de noyaux marqués
Marquage immunohistochimique avec l'ac anti-p53	+	57,7
	++	0,7
	+++	0,0
	<b>Total des 3 intensités</b>	<b>58,5</b>
	<b>++ et +++</b>	<b>0,7</b>
Marquage immunohistochimique avec l'ac anti-p63	+	59,8
	++	21,9
	+++	0,3
	<b>Total des 3 intensités</b>	<b>82,1</b>
	<b>++ et +++</b>	<b>22,2</b>

Tableau 18 : Donnée des analyses d'images des marquages immunohistochimiques avec les anticorps anti p53 et p63 chez la patiente avec le papillome malpighien lié à HPV16.

# Quatrième partie : Discussion

---

## 1. Population

La papillomatose respiratoire récurrente juvénile est une maladie rare et les études portent souvent sur de petites cohortes, ce qui limite considérablement la portée de telles séries. Des bases de données nationales aux Etats-Unis et au Canada ont ainsi été mises en place et portent respectivement sur 603 et 243 enfants atteints de PRR [82], [89].

La cohorte que nous avons étudiée intéresse 48 patients, ce qui représente une série importante en dehors de tout registre national. Par rapport aux séries nord-américaines, plusieurs différences quant aux caractéristiques des populations doivent toutefois être soulignées. Ces différences semblent être en faveur de patients présentant une maladie plus sévère par rapport aux cohortes américaine et canadienne.

Tout d'abord, la médiane de l'âge au diagnostic était de 3,1 ans dans la cohorte américaine et de 4,4 ans dans la cohorte canadienne contre 2 ans dans notre cohorte. Or il est admis que l'âge précoce au diagnostic est associé à une PRR plus sévère [89], [95].

D'autre part, le nombre d'endoscopies sous AG par an était également plus élevé dans notre cohorte avec une médiane de 4,8 contre 1,5 pour l'étude canadienne. Cette différence de nombre d'endoscopies par an n'est pas retrouvée avec l'étude américaine où les patients présentaient une médiane de 4,3 comparable à notre série.

Par ailleurs, les malades de notre cohorte avaient une atteinte plus étendue de l'arbre respiratoire : 75% des enfants dans notre série présentaient une atteinte restreinte au larynx contre 84% dans la série américaine.

Enfin, le pourcentage de patients traités par Cidofovir était dans notre cohorte bien plus élevé que la cohorte canadienne (respectivement 73% contre 4,7%). Ceci est à nuancer avec les indications de traitement par Cidofovir qui peuvent varier selon les pratiques locales : l'indication de traitement peut ainsi être plus restreinte selon les centres, surtout en l'absence de recommandations officielles.

Ces différences peuvent être dues au fait que notre cohorte provient de deux CHU avec un recrutement ORL purement pédiatrique, avec des patients présentant probablement une atteinte plus sévère. A noter également que la population de notre cohorte présentait une fréquence de trachéotomie élevée (16,7%) par rapport à la cohorte canadienne (2,8%). Il est important de noter que la majorité des trachéotomies dans notre cohorte n'ont pas été réalisées en France

mais dans les pays d'origine des enfants, laissant supposer que la différence de prise en charge est davantage liée à une différence d'accès aux soins et de prise en charge plutôt qu'à la sévérité de la maladie.

Enfin on peut souligner dans notre étude que le délai entre la première et la dernière endoscopie sous AG était relativement court puisque la médiane est de 1,9 ans. Cette donnée peut être extrapolée pour avoir une idée de la durée du suivi dans les deux CHU, qui semble donc courte. Cependant le suivi est assez comparable avec celui que l'on retrouve dans les deux études nord-américaines avec un suivi médian de 2,4 ans pour la cohorte canadienne et de 3,6 ans pour la cohorte américaine [82], [89].

En ce qui concerne la répartition des sous types d'HPV, elle est comparable aux données de la littérature [63]–[65] avec une faible proportion de co-infection avec les HPV6 et 11 (6,3%) et une prédominance de l'HPV6 (64,6%).

## **2. Validation des techniques du RNAscope et de l'analyse d'image**

Lors de la technique de CISH, un témoin négatif (sonde DaPB) et un témoin positif (sonde PPIB) ont été réalisés pour chaque prélèvement, permettant de valider nos résultats. Par ailleurs, les analyses statistiques n'ont pas retrouvé d'association entre les scores de la CISH avec la sonde PPIB et la sonde HPV6/11. Ceci prouve qu'il n'y a pas d'association entre la qualité de l'ARN représenté par la sonde PPIB et le score de la sonde HPV6/11. Nos résultats peuvent donc être interprétés en fonction du score de la sonde HPV6/11.

Concernant l'analyse d'image avec le logiciel Inform®, l'architecture des papillomes entraîne une comptabilisation non désirée des noyaux des cellules de l'axe fibro-vasculaire. En effet, lors de la sélection de la zone d'intérêt, il est difficile de ne pas englober dans le champs l'axe des papillomes. Ceci entraîne donc une modification du pourcentage de noyaux marqués. Pour l'anticorps anti-p63, les cellules de l'axe du papillome ne sont pas marquées : le pourcentage de noyaux marqués est donc diminué. En revanche, pour l'anticorps anti-p53, les cellules de l'axe conjonctivo-vasculaire peuvent être marquées : le pourcentage de noyaux marqués peut donc être également modifié.

Cette prise en compte des cellules de l'axe fibro-vasculaire étant systématique dans tous les champs sélectionnés, il est probable que cela n'impacte pas la comparaison entre les patients. Par ailleurs le fait d'analyser au moins 8 champs d'intérêts par prélèvement permet également

de lisser les différences qui pourraient exister quant à la quantité d'axes papillaires entre les champs d'intérêts.

Enfin le choix de comparer les pourcentages de noyaux marqués par les anticorps et non le nombre brut de noyaux marqués permet de s'affranchir des différences potentielles de densité cellulaire entre les champs d'intérêts.

### **3. Comparaison entre les patients présentant une maladie sévère et peu sévère**

L'objectif principal de cette thèse est l'identification de facteurs histologiques de sévérité de la PRR.

La première difficulté a été de définir les critères de sévérité de la maladie. En effet, il n'existe pas de définition consensuelle dans la littérature, ce qui est source d'une grande hétérogénéité. Certains auteurs utilisent des scores composites intégrant des critères de localisation de la maladie, comme le score de Derkay-Wiatrack, et des critères liés aux interventions, comme le nombre d'endoscopies sous AG par an. D'autres n'utilisent que des critères liés aux interventions [64], [82], [86], [89], [96], [139]. On retrouve fréquemment, comme critère de sévérité, un nombre total d'endoscopies sous AG supérieur ou égal à 10 ou un nombre d'endoscopies sous AG/an supérieur à 3 ou 4 [95]. Dans notre cas, le score de Derkay-Wiatrack n'était pas disponible dans un des centres, et n'a donc pas pu être utilisé.

Parmi les différentes localisations de la PRR seule l'atteinte pulmonaire est reconnue comme un critère de gravité de la maladie puisqu'elle est plus fréquemment associée à la transformation carcinomateuse [92]. Il nous a donc paru nécessaire d'intégrer la localisation pulmonaire comme critère de sévérité.

Nous nous sommes intéressés aux différents critères endoscopiques au sein de cette série. Le nombre moyen d'endoscopies par an est couramment employé dans la littérature et paraît représenter un des critères de sévérité les plus fiables et reproductibles. Ce critère permet également de s'affranchir de durées de suivi inégales. Cette dernière peut être assimilée au délai entre la première et la dernière endoscopie : ainsi, dans notre cohorte, ce délai médian était significativement différent chez les enfants avec une PRR sévère (médiane = 1 an) par rapport aux enfants avec PRR peu sévère (médiane = 3 ans).

Dans la littérature, le nombre moyen d'endoscopies par an est utilisé pour définir la sévérité de la maladie. Néanmoins, il n'est pas reconnu de valeur seuil de référence. Le seuil de 5 endoscopies/an nous a ici permis de diviser la population en deux groupes d'effectifs équilibrés

permettant une meilleure puissance des tests statistiques. Cette valeur est supérieure à ce qui est habituellement retrouvé dans la littérature [95]. Ceci peut s'expliquer par le caractère plus sévère de l'atteinte dans notre série par rapport aux études publiées.

Comme attendu, la médiane de l'intervalle moyen entre chaque endoscopie varie avec le nombre moyen d'endoscopies par an. Ainsi, cette médiane était de 51 jours pour les PRR sévères contre 213 jours pour les PRR peu sévères ( $p < 0,001$ ). Par ailleurs les malades avec une PRR sévère présentaient de façon statistiquement significative plus de trachéotomie que ceux avec une PRR peu sévère ( $p = 0,048$ ).

Parmi les autres différences, non significatives, observées entre les 2 groupes, on pouvait noter une médiane du nombre d'endoscopies la première année de suivi égale à 5 pour les PRR sévères contre 3,5 pour les PRR peu sévères ( $p = 0,054$ ). Par ailleurs, la médiane du nombre total d'injections de Cidofovir était de 5 pour les pathologies sévères contre 3 pour les peu sévères ( $p = 0,311$ ).

Conjointement à l'analyse de ces critères interventionnels, nous avons mené une analyse anatomopathologique détaillée des PRR.

Une étude publiée en 2000 a décrit une tendance à l'association entre l'expression de la p53 et la sévérité de la PRR [131]. Nos résultats montrent une différence significative entre le pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps anti-p53 des deux populations, notamment avec les marquages d'intensité ++, +++ ainsi que ces deux intensités additionnées. De même, le marquage p63 d'intensité ++ ainsi que l'addition des intensités ++ et +++ étaient statistiquement différents entre les deux populations. Il semble plus applicable en routine de ne retenir que les intensités ++ et +++ combinées car il peut être difficile de trancher entre l'une ou l'autre. Par ailleurs, la prise en considération du marquage d'intensité + peut être contestable : il correspond à une intensité non prise en compte systématiquement en routine.

Afin de permettre de classer facilement les patients, il a été déterminé statistiquement un seuil pertinent pour les marquages avec l'anticorps anti-p63 d'intensités combinées ++ et +++ et pour ceux avec l'anticorps anti-p53 d'intensités combinées ++ et +++ . Les valeurs seuils de 30% et 4,5% respectivement pour les anticorps anti-p63 et p53 permettent indépendamment de classer les patients dans les deux catégories PRR sévère versus PRR peu sévère de façon significative. Il faut toutefois noter que l'intervalle de confiance des odd ratio était proche de 1. Ceci permet de conclure que les papillomes avec plus de 30% de noyaux marqués par l'anticorps anti-p63 étaient statistiquement associés à une maladie sévère mais de façon faible. Il en va de même pour ceux ayant plus de 4,5% de noyaux marqués par l'anticorps anti-p53.

La combinaison de ces deux marquages (supériorité des seuils des deux marquages avec les anticorps anti-p53 ( $\geq 4,5\%$ ) et anti-p63 ( $\geq 30\%$ )) montrait une différence statistiquement significative plus marquée ( $p=0,001$ ) et un odd ratio plus important dont l'intervalle de confiance s'éloigne de 1. On peut donc conclure que les patients ayant une combinaison de plus de 30% de noyaux marqués par l'anticorps anti-p63 avec plus 4,5% de noyaux marqués par l'anticorps anti-p53 avaient statistiquement un risque plus élevé d'avoir une maladie sévère. Ces seuils paraissent difficilement applicables en routine actuellement dans le cas d'un comptage manuel par un pathologiste, même expérimenté. Toutefois, l'anatomie pathologique est actuellement en pleine mutation : la numérisation croissante des lames histologiques, y compris en routine et le développement des logiciels d'analyse d'images et des techniques dérivées de l'intelligence artificielle permettront probablement de quantifier plus aisément et de façon fiable de nombreux paramètres. Ceci est en partie illustré dans ce travail par l'absence d'association entre la topographie du marquage avec l'anticorps anti-p63 et la sévérité de la maladie. En effet, cette topographie a été déterminée manuellement, les logiciels n'étant actuellement pas capable d'identifier la localisation d'un marquage au sein d'un tissu. Alors même qu'il existe une association entre le pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps anti-p63 et la sévérité de la maladie, on aurait pu penser que les patients présentant un marquage pan-épithélial auraient également tendance à avoir une maladie plus sévère. Cette discordance apparente pourrait s'expliquer par une précision supérieure du système d'analyse d'image.

Enfin, on peut souligner que la CISH avec des sondes à ARN HPV6/11 a, pour la première fois à notre connaissance, été réalisée sur une cohorte de PRR.

On a observé que les patients avec une maladie sévère avaient tendance à avoir un score 2+ (figure 19). Cependant, dans l'analyse principale, il n'y avait pas de différence significative entre les deux populations concernant le score de CISH ( $p=0,075$ ).

Parmi les facteurs confondants possibles, le Cidofovir est susceptible de perturber l'intensité de marquage du RNAscope. Il a donc été réalisé de nouvelles analyses en excluant les patients qui avaient eu une injection de Cidofovir avant la réalisation du prélèvement où le RNAscope a été réalisé. Ces six patients avaient été classés comme ayant une maladie sévère par nos critères. Sur cette cohorte plus restreinte, une différence statistiquement significative a pu être mise en évidence, posant la question d'une association entre le score 2+ et la sévérité. Cependant, l'association est restée faible, l'intervalle de l'odd ratio étant proche de 1. Par ailleurs parmi les patients exclus, quatre avaient un score 2+, ce qui peut faire suspecter l'existence d'un autre facteur confondant.

L'effet du Cidofovir sur l'expression de l'ARNm viral est inconnu, même si on peut théoriquement supposer que le Cidofovir diminue la transcription virale. Ainsi il serait intéressant de réaliser une étude comparant le score du RNAscope sur des prélèvements réalisés lors d'interventions avant et après injection de Cidofovir et rechercher une corrélation avec la réponse au traitement. On peut faire l'hypothèse que la sonde à ARN HPV6/11 pourrait aider à prédire la réponse au Cidofovir et éviter ainsi des injections aux patients non répondeurs. L'observation de la patiente décédée d'une transformation maligne de sa PRR semble être un premier argument envers la possibilité de prédire la réponse au Cidofovir. En effet cette patiente avait reçu 67 injections de Cidofovir qui n'avaient pas permis de contrôler la maladie : la CISH a montré un score 2+ avec la sonde ARN HPV6/11 sur le prélèvement réalisé après avoir reçu des injections de Cidofovir.

#### **4. Comparaison des populations en fonction des résultats du RNAscope**

C'est une grande opportunité d'avoir réalisé pour la première fois une CISH avec une sonde ARN HPV6/11 sur une cohorte de PRR. Cette technique a démontré son intérêt dans une cohorte de CEVADS liés à l'HPV : il a été montré une survie globale statistiquement supérieure dans le groupe exprimant fortement les ARNm E6 et E7 d'HPV par rapport au groupe les exprimant faiblement [49].

Le RNAscope n'a, à ce jour, pas été utilisé dans l'étude de pathologies bénignes liées à l'HPV. Il nous a paru intéressant d'analyser l'activité transcriptionnelle virale dans la PRR. Nous avons décidé, dans notre cohorte, d'analyser les caractéristiques de ces deux groupes de patients (score 1+ exprimant faiblement les ARNm d'E6 et E7 d'HPV, score 2+ exprimant fortement ces ARNm). Ce score étant lié à l'expression des ARNm et donc à l'activité du virus, une PRR plus sévère pourrait être associée à une activité transcriptionnelle de l'HPV plus élevée. Nos résultats montrent une tendance vers une telle association. Pour l'ensemble des critères de sévérité interventionnels, la médiane était supérieure dans le groupe avec un score 2+ en RNAscope. Néanmoins une différence statistiquement significative n'a été identifiée qu'avec le nombre d'endoscopies la 1<sup>ère</sup> année d'une part et le nombre d'endoscopies par an d'autre part.

La valeur médiane de l'intervalle moyen entre chaque endoscopie était également inférieure dans le groupe avec un score 2+ (79 jours) par rapport au groupe avec un score 1+ (168 jours), avec un p se rapprochant de 0,05.

On peut donc conclure que les patients qui ont un score 2+ avaient, de façon significative, un nombre moyen d'endoscopies par an et un nombre d'endoscopies la 1<sup>ère</sup> année plus élevés que la population de score 1+.

A nouveau, les patients ayant reçu une injection de Cidofovir avant le prélèvement sur lequel a été réalisé les techniques ont été exclus pour réaliser une 2<sup>ème</sup> analyse statistique. Cette nouvelle étude a mis en évidence, dans le groupe avec un score 2+ en RNAscope, un intervalle moyen entre chaque endoscopie inférieur et un nombre total d'injection de Cidofovir supérieur de façon statistiquement significative par rapport au groupe avec un score 1+.

Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les deux groupes présentant un score au RNAscope 1+ ou 2+ concernant la localisation des lésions ou l'antécédent de trachéotomie.

Ainsi les patients avec un prélèvement avec un score 2+ ne semblaient pas avoir de maladie plus étendue dans les voies aériennes que les patients avec un prélèvement avec un score 1+.

Enfin il est à noter que la seule patiente décédée du fait de la transformation carcinomateuse de papillomes pulmonaires avait un score 2+ en RNAscope. Bien sûr, aucune corrélation ne peut être recherchée.

# Conclusion

---

La population ici présentée intéresse une importante cohorte de PRR juvéniles. Ceci a été rendu possible grâce à la collaboration entre 2 centres référents en pathologie ORL pédiatrique.

Nous avons eu l'opportunité d'approfondir la biologie des PRR grâce à l'utilisation d'une CISH permettant d'analyser l'activité transcriptionnelle virale des HPV 6 et 11 (protéines E6 et E7). Cet outil a montré sa pertinence chez l'adulte dans l'étude des carcinomes épidermoïdes des VADS liés à l'HPV. Il a ici été utilisé conjointement avec une analyse plus classique d'immunohistochimie ciblée sur des acteurs de l'homéostasie cellulaire peu ou pas encore étudiés dans la PRR, p63 et p53. Les marquages immunohistochimiques ont été analysés par des techniques dérivées de l'intelligence artificielle.

Nous avons montré une corrélation statistiquement significative entre :

- Plusieurs critères de sévérité endoscopiques (nombre d'endoscopies/an notamment) et un score 2+ en CISH avec une sonde à ARNm ciblant les HPV 6 et 11 ;

- Une atteinte sévère et un marquage immunohistochimique étendu des cellules malpighiennes des papillomes avec les anticorps anti-p53 et anti-p63 (seuils des noyaux marqués  $\geq 4,5\%$  pour p53 et  $\geq 30\%$  pour p63).

Ces éléments pourraient constituer une signature histologique et moléculaire des formes sévères de PRR. Une telle utilisation nécessitera bien sûr, dans un premier temps, la validation de cette signature dans une cohorte prospective plus large. Cette étude pourrait être réalisée dans le cadre de la constitution d'une cohorte nationale de PRR, actuellement en discussion.

En attendant cette validation, ce travail montre l'intérêt des nouveaux outils technologiques de comptage automatisé, dérivés de l'intelligence artificielle. Il permet par ailleurs d'apporter de nouveaux éléments afin de mieux appréhender la biologie de la PRR et, de façon plus large, des pathologies liées à l'infection par HPV.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Meyers, E. Ryndock, M. J. Conway, C. Meyers, et R. Robison, « Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants », *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, n° 6, p. 1546-1550, juin 2014.
- [2] J. Guan *et al.*, « Cryoelectron Microscopy Maps of Human Papillomavirus 16 Reveal L2 Densities and Heparin Binding Site », *Structure*, vol. 25, n° 2, p. 253-263, 07 2017.
- [3] K. Van Doorslaer *et al.*, « ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae », *Journal of General Virology*, 2018.
- [4] E.-M. de Villiers, C. Fauquet, T. R. Broker, H.-U. Bernard, et H. zur Hausen, « Classification of papillomaviruses », *Virology*, vol. 324, n° 1, p. 17-27, juin 2004.
- [5] M. Segondy, « Classification des papillomavirus (HPV) », *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2008, n° 405, p. 23-25, oct. 2008.
- [6] M. M. Jelen *et al.*, « Global Genomic Diversity of Human Papillomavirus 11 Based on 433 Isolates and 78 Complete Genome Sequences », *J. Virol.*, vol. 90, n° 11, p. 5503-5513, 01 2016.
- [7] M. M. Jelen *et al.*, « Global genomic diversity of human papillomavirus 6 based on 724 isolates and 190 complete genome sequences », *J. Virol.*, vol. 88, n° 13, p. 7307-7316, juill. 2014.
- [8] S. de Sanjosé *et al.*, « Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis », *Lancet Infect Dis*, vol. 7, n° 7, p. 453-459, juill. 2007.
- [9] IARC, *Human Papillomaviruses*. .
- [10] S. R. Skinner *et al.*, « Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study », *Int. J. Cancer*, vol. 138, n° 10, p. 2428-2438, mai 2016.
- [11] D. Forman *et al.*, « Global burden of human papillomavirus and related diseases », *Vaccine*, vol. 30 Suppl 5, p. F12-23, nov. 2012.
- [12] Z. C. Wood, C. J. Bain, D. D. Smith, D. C. Whiteman, et A. Antonsson, « Oral human papillomavirus infection incidence and clearance: a systematic review of the literature », *J. Gen. Virol.*, vol. 98, n° 4, p. 519-526, avr. 2017.
- [13] F. Dayyani, C. J. Etzel, M. Liu, C.-H. Ho, S. M. Lippman, et A. S. Tsao, « 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*, vol. 2, p. 15, juin 2010.
- [14] A. R. Kreimer, G. M. Clifford, P. Boyle, et S. Franceschi, « Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review », *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 14, n° 2, p. 467-475, févr. 2005.
- [15] N. Muñoz, « Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence », *J. Clin. Virol.*, vol. 19, n° 1-2, p. 1-5, oct. 2000.
- [16] S. V. Porceddu, « A TNM classification for HPV+ oropharyngeal cancer », *The Lancet Oncology*, vol. 17, n° 4, p. 403-404, avr. 2016.
- [17] A. N. Burchell, R. L. Winer, S. de Sanjosé, et E. L. Franco, « Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection », *Vaccine*, vol. 24 Suppl 3, p. S3/52-61, août 2006.
- [18] K. M. Johnson, R. C. Kines, J. N. Roberts, D. R. Lowy, J. T. Schiller, et P. M. Day, « Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus », *J. Virol.*, vol. 83, n° 5, p. 2067-2074, mars 2009.
- [19] T. D. Culp, L. R. Budgeon, M. P. Marinkovich, G. Meneguzzi, et N. D. Christensen, « Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human

- papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells », *J. Virol.*, vol. 80, n° 18, p. 8940-8950, sept. 2006.
- [20] D. Pyeon, S. M. Pearce, S. M. Lank, P. Ahlquist, et P. F. Lambert, « Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression », *PLoS Pathog.*, vol. 5, n° 2, p. e1000318, févr. 2009.
- [21] M. Bergant Marušič, M. A. Ozburn, S. K. Campos, M. P. Myers, et L. Banks, « Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17 », *Traffic*, vol. 13, n° 3, p. 455-467, mars 2012.
- [22] A. A. McBride, « Replication and partitioning of papillomavirus genomes », *Adv. Virus Res.*, vol. 72, p. 155-205, 2008.
- [23] C. B. Buck, C. D. Thompson, Y.-Y. S. Pang, D. R. Lowy, et J. T. Schiller, « Maturation of papillomavirus capsids », *J. Virol.*, vol. 79, n° 5, p. 2839-2846, mars 2005.
- [24] P. B. McIntosh *et al.*, « Structural analysis reveals an amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein and provides a molecular basis for its accumulation », *J. Virol.*, vol. 82, n° 16, p. 8196-8203, août 2008.
- [25] J. S. Horton et A. J. Stokes, « The transmembrane channel-like protein family and human papillomaviruses », *Oncoimmunology*, vol. 3, avr. 2014.
- [26] A. G. Ostör, « Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review », *Int. J. Gynecol. Pathol.*, vol. 12, n° 2, p. 186-192, avr. 1993.
- [27] M. Scheffner, B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, et P. M. Howley, « The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53 », *Cell*, vol. 63, n° 6, p. 1129-1136, déc. 1990.
- [28] T. Veldman, I. Horikawa, J. C. Barrett, et R. Schlegel, « Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein », *J. Virol.*, vol. 75, n° 9, p. 4467-4472, mai 2001.
- [29] L. Sherman et R. Schlegel, « Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. », *J. Virol.*, vol. 70, n° 5, p. 3269-3279, janv. 1996.
- [30] K. Zerfass, A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein, et P. Jansen-Dürr, « Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation », *J. Virol.*, vol. 69, n° 10, p. 6389-6399, oct. 1995.
- [31] B. Ruttkay-Nedecky *et al.*, « Relevance of infection with human papillomavirus: The role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review) », *International Journal of Oncology*, vol. 43, n° 6, p. 1754-1762, déc. 2013.
- [32] C. Badoual *et al.*, « [HPV (Human Papilloma Virus) implication in other cancers than gynaecological] », *Rev Med Interne*, vol. 36, n° 8, p. 540-547, août 2015.
- [33] C. Picard et A. Belot, « [Type I interferonopathies. Literature review] », *Rev Med Interne*, sept. 2016.
- [34] U. A. Hasan *et al.*, « TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16 », *J. Immunol.*, vol. 178, n° 5, p. 3186-3197, mars 2007.
- [35] L. V. Ronco, A. Y. Karpova, M. Vidal, et P. M. Howley, « Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity », *Genes Dev.*, vol. 12, n° 13, p. 2061-2072, juill. 1998.
- [36] M. S. Campo *et al.*, « HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells », *Virology*, vol. 407, n° 1, p. 137-142, nov. 2010.

- [37] M. Stanley, « Immune responses to human papillomavirus », *Vaccine*, vol. 24 Suppl 1, p. S16-22, mars 2006.
- [38] K. Middleton *et al.*, « Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers », *J Virol*, vol. 77, n° 19, p. 10186-10201, oct. 2003.
- [39] M. Pett et N. Coleman, « Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? », *J. Pathol.*, vol. 212, n° 4, p. 356-367, août 2007.
- [40] M. Rusan, Y. Y. Li, et P. S. Hammerman, « Genomic Landscape of Human Papillomavirus–Associated Cancers », *Clin Cancer Res*, vol. 21, n° 9, p. 2009-2019, mai 2015.
- [41] D. Lee *et al.*, « Human papillomavirus E2 down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 31, p. 27748-27756, août 2002.
- [42] A. J. Klingelhutz et A. Roman, « Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses », *Virology*, vol. 424, n° 2, p. 77-98, mars 2012.
- [43] A. C. Jung *et al.*, « Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma », *Int. J. Cancer*, vol. 126, n° 8, p. 1882-1894, avr. 2010.
- [44] D. Holzinger *et al.*, « Sensitivity and specificity of antibodies against HPV16 E6 and other early proteins for the detection of HPV16-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma », *Int. J. Cancer*, vol. 140, n° 12, p. 2748-2757, 15 2017.
- [45] J. J. Carter *et al.*, « The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women », *J. Infect. Dis.*, vol. 174, n° 5, p. 927-936, nov. 1996.
- [46] C. Liang *et al.*, « Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma », *Cancer Res.*, vol. 72, n° 19, p. 5004-5013, oct. 2012.
- [47] H. Mirghani *et al.*, « Diagnosis of HPV-driven head and neck cancer with a single test in routine clinical practice », *Mod. Pathol.*, vol. 28, n° 12, p. 1518-1527, déc. 2015.
- [48] J. A. Bishop *et al.*, « Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method », *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 36, n° 12, p. 1874-1882, déc. 2012.
- [49] J. Augustin *et al.*, « HPV RNA CISH score identifies two prognostic groups in a p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma population », *Mod. Pathol.*, juin 2018.
- [50] E.-S. Prigge, M. Arbyn, M. von Knebel Doeberitz, et M. Reuschenbach, « Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis », *Int. J. Cancer*, vol. 140, n° 5, p. 1186-1198, mars 2017.
- [51] J. S. Lewis *et al.*, « p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status », *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 34, n° 8, p. 1088-1096, août 2010.
- [52] A. K. El-Naggar, J. K. C. Chan, J. R. Grandis, T. Takata, et P. J. Slootweg, Éd., *WHO classification of head and neck tumours*, 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.
- [53] N. Muñoz, X. Castellsagué, A. B. de González, et L. Gissmann, « Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer », *Vaccine*, vol. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, août 2006.
- [54] D. Novakovic *et al.*, « A Prospective Study of the Incidence of Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis After Implementation of a National HPV Vaccination Program », *J. Infect. Dis.*, vol. 217, n° 2, p. 208-212, janv. 2018.

- [55] HCSP, « Recommandations vaccinales contre les infections à papillomavirus humains chez les hommes », Haut Conseil de la Santé Publique, Paris, févr. 2016.
- [56] HCSP, « Infections à HPV des jeunes filles : révision de l'âge de vaccination », Haut Conseil de la Santé Publique, Paris, sept. 2012.
- [57] Fonteneau L, Guthmann JP, Levy Bruhl D, et DMI, *Estimation des couvertures vaccinales en France à partir de l'Échantillon généraliste des bénéficiaires (EGB) : exemples de la rougeole, de l'hépatite B et de la vaccination HPV. Numéro thématique. De nouveaux outils pour améliorer la mesure de la couverture vaccinale en France.* 2013.
- [58] « Vaccination contre les infections à HPV et risque de maladies auto-immunes : une étude Cnamts/ANSM rassurante - Point d'information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». [En ligne]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Vaccination-contre-les-infections-a-HPV-et-risque-de-maladies-auto-immunes-une-etude-Cnamts-ANSM-rassurante-Point-d-information>.
- [59] N. Andrews, J. Stowe, et E. Miller, « No increased risk of Guillain-Barré syndrome after human papilloma virus vaccine: A self-controlled case-series study in England », *Vaccine*, vol. 35, n° 13, p. 1729-1732, 23 2017.
- [60] H. Kashima, P. Mounts, B. Leventhal, et R. H. Hruban, « Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis », *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 102, n° 8 Pt 1, p. 580-583, août 1993.
- [61] E. Ullman, « On the aetiology of the laryngeal papilloma. », *Acta Otolaryngol (Stockh)*, n° 5, p. 317-334, 1923.
- [62] A. J. Donne, L. Hampson, J. J. Homer, et I. N. Hampson, « The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis », *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, vol. 74, n° 1, p. 7-14, janv. 2010.
- [63] B. J. Wiatrak, D. W. Wiatrak, T. R. Broker, et L. Lewis, « Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population », *Laryngoscope*, vol. 114, n° 11 Pt 2 Suppl 104, p. 1-23, nov. 2004.
- [64] M. Gabbott, Y. E. Cossart, A. Kan, M. Konopka, R. Chan, et B. R. Rose, « Human papillomavirus and host variables as predictors of clinical course in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, n° 12, p. 3098-3103, déc. 1997.
- [65] P. Draganov, S. Todorov, I. Todorov, T. Karchev, et Z. Kalvatchev, « Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR Green real-time PCR », *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, vol. 70, n° 3, p. 469-473, mars 2006.
- [66] P. Dickens, G. Srivastava, S. L. Loke, et S. Larkin, « Human papillomavirus 6, 11, and 16 in laryngeal papillomas », *J. Pathol.*, vol. 165, n° 3, p. 243-246, nov. 1991.
- [67] M. Peñaloza-Plascencia, H. Montoya-Fuentes, S. E. Flores-Martínez, F. J. Fierro-Velasco, J. M. Peñaloza-González, et J. Sánchez-Corona, « Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis », *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 126, n° 9, p. 1119-1123, sept. 2000.
- [68] M. Jamshidi *et al.*, « The impact of human papillomavirus (HPV) types 6, 11 in women with genital warts », *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 286, n° 5, p. 1261-1267, nov. 2012.
- [69] M. J. Silverberg, P. Thorsen, H. Lindeberg, L. A. Grant, et K. V. Shah, « Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis », *Obstet Gynecol*, vol. 101, n° 4, p. 645-652, avr. 2003.

- [70] M. J. Silverberg, P. Thorsen, H. Lindeberg, L. Ahdieh-Grant, et K. V. Shah, « Clinical Course of Recurrent Respiratory Papillomatosis in Danish Children », *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 130, n° 6, p. 711-716, juin 2004.
- [71] V. Gerein, S. Schmandt, N. Babkina, N. Barysik, W. Coerdts, et H. Pfister, « Human papilloma virus (HPV)-associated gynecological alteration in mothers of children with recurrent respiratory papillomatosis during long-term observation », *Cancer Detect. Prev.*, vol. 31, n° 4, p. 276-281, 2007.
- [72] E. M. Smith, M. A. Parker, L. M. Rubenstein, T. H. Haugen, E. Hamsikova, et L. P. Turek, « Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants », *Infect Dis Obstet Gynecol*, vol. 2010, p. 326369, 2010.
- [73] X. Castellsagué *et al.*, « Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain », *BMC Infect Dis*, vol. 9, p. 74, mai 2009.
- [74] P. Liu, L. Xu, Y. Sun, et Z. Wang, « The prevalence and risk of human papillomavirus infection in pregnant women », *Epidemiol. Infect.*, vol. 142, n° 8, p. 1567-1578, août 2014.
- [75] V. R. Bonagura *et al.*, « Enriched HLA-DQ3 phenotype and decreased class I major histocompatibility complex antigen expression in recurrent respiratory papillomatosis », *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 1, n° 3, p. 357-360, mai 1994.
- [76] V. R. Bonagura *et al.*, « Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis », *Hum. Immunol.*, vol. 71, n° 2, p. 212-219, févr. 2010.
- [77] C. M. Gelder *et al.*, « HLA Class II Polymorphisms and Susceptibility to Recurrent Respiratory Papillomatosis », *J. Virol.*, vol. 77, n° 3, p. 1927-1939, janv. 2003.
- [78] V. R. Bonagura *et al.*, « HLA alleles, IFN-gamma responses to HPV-11 E6, and disease severity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. », *Hum Immunol*, vol. 65, n° 8, p. 773-782, août 2004.
- [79] V. R. Bonagura, L. Hatam, J. DeVoti, F. Zeng, et B. M. Steinberg, « Recurrent respiratory papillomatosis: altered CD8(+) T-cell subsets and T(H)1/T(H)2 cytokine imbalance », *Clin. Immunol.*, vol. 93, n° 3, p. 302-311, déc. 1999.
- [80] V. R. Bonagura *et al.*, « Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11 », *APMIS*, vol. 118, n° 6-7, p. 455-470, juin 2010.
- [81] A. Vambutas, V. R. Bonagura, et B. M. Steinberg, « Altered Expression of TAP-1 and Major Histocompatibility Complex Class I in Laryngeal Papillomatosis: Correlation of TAP-1 with Disease », *Clin Diagn Lab Immunol*, vol. 7, n° 1, p. 79-85, janv. 2000.
- [82] P. Campisi, M. Hawkes, K. Simpson, et Canadian Juvenile Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis Working Group, « The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database », *Laryngoscope*, vol. 120, n° 6, p. 1233-1245, juin 2010.
- [83] L. R. Armstrong *et al.*, « Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle », *Clin. Infect. Dis.*, vol. 31, n° 1, p. 107-109, juill. 2000.
- [84] H. Lindeberg et O. Elbrønd, « Laryngeal papillomas: the epidemiology in a Danish subpopulation 1965-1984 », *Clin Otolaryngol Allied Sci*, vol. 15, n° 2, p. 125-131, avr. 1990.
- [85] M. Marsico, V. Mehta, B. Chastek, K.-L. Liaw, et C. Derkay, « Estimating the incidence and prevalence of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis in publicly and privately insured claims databases in the United States », *Sex Transm Dis*, vol. 41, n° 5, p. 300-305, mai 2014.

- [86] C. S. Derkay, D. J. Malis, G. Zalzal, B. J. Wiatrak, H. K. Kashima, et M. D. Coltrera, « A staging system for assessing severity of disease and response to therapy in recurrent respiratory papillomatosis », *Laryngoscope*, vol. 108, n° 6, p. 935-937, juin 1998.
- [87] N. N. Venkatesan, H. S. Pine, et M. P. Underbrink, « Recurrent respiratory papillomatosis », *Otolaryngol. Clin. North Am.*, vol. 45, n° 3, p. 671-694, viii-ix, juin 2012.
- [88] R. A. Tasca et R. W. Clarke, « Recurrent respiratory papillomatosis », *Archives of Disease in Childhood*, vol. 91, n° 8, p. 689-691, août 2006.
- [89] W. C. Reeves, S. S. Ruparelia, K. I. Swanson, C. S. Derkay, A. Marcus, et E. R. Unger, « National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis », *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 129, n° 9, p. 976-982, sept. 2003.
- [90] C. Go, M. R. Schwartz, et D. T. Donovan, « Molecular Transformation of Recurrent Respiratory Papillomatosis: Viral Typing and P53 Overexpression », *Ann Otol Rhinol Laryngol*, vol. 112, n° 4, p. 298-302, avr. 2003.
- [91] P. M. Reidy *et al.*, « Integration of Human Papillomavirus Type 11 in Recurrent Respiratory Papilloma-Associated Cancer », *The Laryngoscope*, vol. 114, n° 11, p. 1906-1909.
- [92] J.-F. Gélinas, J. Manoukian, et A. Côté, « Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature », *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, vol. 72, n° 4, p. 433-452, avr. 2008.
- [93] S. Karatayli-Ozgursoy, J. A. Bishop, A. Hillel, L. Akst, et S. R. A. Best, « Risk Factors for Dysplasia in Recurrent Respiratory Papillomatosis in an Adult and Pediatric Population », *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 125, n° 3, p. 235-241, mars 2016.
- [94] V. Gerein, E. Rastorguev, J. Gerein, W. Draf, et J. Schirren, « Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 years experience », *Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 132, n° 3, p. 392-394, mars 2005.
- [95] J. Niyibizi, C. Rodier, M. Wassef, et H. Trottier, « Risk factors for the development and severity of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review », *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, vol. 78, n° 2, p. 186-197, févr. 2014.
- [96] F. J. Buchinsky *et al.*, « Age of child, more than HPV type, is associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis », *PLoS ONE*, vol. 3, n° 5, p. e2263, mai 2008.
- [97] R. Rabah, W. D. Lancaster, R. Thomas, et L. Gregoire, « Human Papillomavirus-11-associated Recurrent Respiratory Papillomatosis Is More Aggressive Than Human Papillomavirus-6-associated Disease », *Pediatr. Dev. Pathol.*, vol. 4, n° 1, p. 68-72, janv. 2001.
- [98] S. M. Zeitels et J. A. Burns, « Laser applications in laryngology: past, present, and future », *Otolaryngol. Clin. North Am.*, vol. 39, n° 1, p. 159-172, févr. 2006.
- [99] M. Carifi, D. Napolitano, M. Morandi, et D. Dall'Olio, « Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives », *The Clin Risk Manag*, vol. 11, p. 731-738, 2015.
- [100] S. Schraff, C. S. Derkay, B. Burke, et L. Lawson, « American Society of Pediatric Otolaryngology members' experience with recurrent respiratory papillomatosis and the use of adjuvant therapy », *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 130, n° 9, p. 1039-1042, sept. 2004.
- [101] H. Nodarse-Cuní *et al.*, « Interferon alpha-2b as adjuvant treatment of recurrent respiratory papillomatosis in Cuba: National Programme (1994-1999 report) », *J Laryngol Otol*, vol. 118, n° 9, p. 681-687, sept. 2004.

- [102] G. B. Healy, R. D. Gelber, A. L. Trowbridge, K. M. Grundfast, R. J. Ruben, et K. N. Price, « Treatment of recurrent respiratory papillomatosis with human leukocyte interferon. Results of a multicenter randomized clinical trial », *N. Engl. J. Med.*, vol. 319, n° 7, p. 401-407, août 1988.
- [103] E. DE Clercq, J. Descamps, P. DE Somer, et A. Holyacute, « (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine: An Aliphatic Nucleoside Analog with Broad-Spectrum Antiviral Activity », *Science*, vol. 200, n° 4341, p. 563-565, mai 1978.
- [104] C. S. Derkay *et al.*, « Current use of intralesional Cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis », *Laryngoscope*, vol. 123, n° 3, p. 705-712, mars 2013.
- [105] A. N. Naiman, S. Ayari, R. Nicollas, G. Landry, B. Colombeau, et P. Froehlich, « Intermediate-term and long-term results after treatment by Cidofovir and excision in juvenile laryngeal papillomatosis », *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 115, n° 9, p. 667-672, sept. 2006.
- [106] J. S. McMurray, N. Connor, et C. N. Ford, « Cidofovir efficacy in recurrent respiratory papillomatosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study », *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 117, n° 7, p. 477-483, juill. 2008.
- [107] R. D. Wemer, J. H. Lee, H. T. Hoffman, R. A. Robinson, et R. J. H. Smith, « Case of progressive dysplasia concomitant with intralesional Cidofovir administration for recurrent respiratory papillomatosis », *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 114, n° 11, p. 836-839, nov. 2005.
- [108] F. I. Broekema et F. G. Dikkers, « Side-effects of Cidofovir in the treatment of recurrent respiratory papillomatosis », *Eur Arch Otorhinolaryngol*, vol. 265, n° 8, p. 871-879, août 2008.
- [109] R. E. A. Tjon Pian Gi *et al.*, « Safety of intralesional Cidofovir in patients with recurrent respiratory papillomatosis: an international retrospective study on 635 RRP patients », *Eur Arch Otorhinolaryngol*, vol. 270, n° 5, p. 1679-1687, mai 2013.
- [110] T. Shih et C. Lindley, « Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies », *Clin Ther*, vol. 28, n° 11, p. 1779-1802, nov. 2006.
- [111] R. Rahbar *et al.*, « Role of vascular endothelial growth factor-A in recurrent respiratory papillomatosis », *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 114, n° 4, p. 289-295, avr. 2005.
- [112] D. J. Rogers, S. Ojha, R. Maurer, et C. J. Hartnick, « Use of adjuvant intralesional bevacizumab for aggressive respiratory papillomatosis in children », *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 139, n° 5, p. 496-501, mai 2013.
- [113] D. R. Sidell, M. Nassar, R. T. Cotton, S. M. Zeitels, et A. de Alarcon, « High-dose sublesional bevacizumab (avastin) for pediatric recurrent respiratory papillomatosis », *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, vol. 123, n° 3, p. 214-221, mars 2014.
- [114] R. Wu, A. L. Abramson, M. J. Shikowitz, A. J. Dannenberg, et B. M. Steinberg, « Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated through phosphatidylinositol-3 kinase, not mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase, in recurrent respiratory papillomas », *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, n° 17, p. 6155-6161, sept. 2005.
- [115] A. Limsukon, I. Susanto, G. W. Soo Hoo, S. M. Dubinett, et R. K. Batra, « Regression of recurrent respiratory papillomatosis with celecoxib and erlotinib combination therapy », *Chest*, vol. 136, n° 3, p. 924-926, sept. 2009.
- [116] B. Bostrom, J. Sidman, S. Marker, T. Lander, et D. Drehner, « Gefitinib therapy for life-threatening laryngeal papillomatosis », *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 131, n° 1, p. 64-67, janv. 2005.
- [117] J. Ahn, J. A. Bishop, R. B. S. Roden, C. T. Allen, et S. R. A. Best, « The PD-1 and PD-L1 pathway in recurrent respiratory papillomatosis », *Laryngoscope*, vol. 128, n° 1, p. E27-E32, janv. 2018.

- [118] D. L. Young, M. M. Moore, et L. A. Halstead, « The use of the quadrivalent human papillomavirus vaccine (gardasil) as adjuvant therapy in the treatment of recurrent respiratory papilloma », *J Voice*, vol. 29, n° 2, p. 223-229, mars 2015.
- [119] G. R. Dion *et al.*, « Adjuvant Human Papillomavirus Vaccination for Secondary Prevention: A Systematic Review », *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 143, n° 6, p. 614-622, juin 2017.
- [120] I. Hočevár-Boltežar *et al.*, « Human papilloma virus vaccination in patients with an aggressive course of recurrent respiratory papillomatosis », *Eur Arch Otorhinolaryngol*, vol. 271, n° 12, p. 3255-3262, déc. 2014.
- [121] M. Chirilă et S. D. Bolboacă, « Clinical efficiency of quadrivalent HPV (types 6/11/16/18) vaccine in patients with recurrent respiratory papillomatosis », *Eur Arch Otorhinolaryngol*, vol. 271, n° 5, p. 1135-1142, mai 2014.
- [122] M. Marsico, V. Mehta, et C. Wentworth, « Estimating the disease burden of juvenile onset RRP in the US using large administrative databases – preliminary pilot results ». Presented May 2009 at the International Papillomavirus Conference, 2009.
- [123] C. S. Derkay, « Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report », *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 121, n° 12, p. 1386-1391, déc. 1995.
- [124] K. T. Bieging et L. D. Attardi, « Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression », *Trends in Cell Biology*, vol. 22, n° 2, p. 97-106, févr. 2012.
- [125] J. Pflaum, S. Schlosser, et M. Müller, « p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer », *Front Oncol*, vol. 4, p. 285, 2014.
- [126] D. W. Meek, « Regulation of the p53 response and its relationship to cancer », *Biochem. J.*, vol. 469, n° 3, p. 325-346, août 2015.
- [127] J. K. McKenney, S. Desai, C. Cohen, et M. B. Amin, « Discriminatory immunohistochemical staining of urothelial carcinoma in situ and non-neoplastic urothelium: an analysis of cytokeratin 20, p53, and CD44 antigens », *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 25, n° 8, p. 1074-1078, août 2001.
- [128] H. Xie *et al.*, « Diagnostic utility of TP53 and cytokeratin 7 immunohistochemistry in idiopathic inflammatory bowel disease-associated neoplasia », *Mod. Pathol.*, vol. 27, n° 2, p. 303-313, févr. 2014.
- [129] H.-L. Fu, L. Shao, Q. Wang, T. Jia, M. Li, et D.-P. Yang, « A systematic review of p53 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma », *Tumour Biol.*, vol. 34, n° 6, p. 3817-3821, déc. 2013.
- [130] W. Yao *et al.*, « Association of p53 expression with prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma », *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 7, n° 10, p. 7158-7163, 2014.
- [131] R. Rabah, W. Sakr, R. Thomas, W. D. Lancaster, et L. Gregoire, « Human papillomavirus type, proliferative activity, and p53: potential markers of aggressive papillomatosis », *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 124, n° 5, p. 721-724, mai 2000.
- [132] S. Gonfloni, V. Caputo, et V. Iannizzotto, « P63 in health and cancer », *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 59, n° 1-3, p. 87-93, 2015.
- [133] C. P. Crum et F. D. McKeon, « p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia », *Annu Rev Pathol*, vol. 5, p. 349-371, 2010.
- [134] C. J. Di Como *et al.*, « p63 expression profiles in human normal and tumor tissues », *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, n° 2, p. 494-501, févr. 2002.
- [135] G. Gualco, L. M. Weiss, et C. E. Bacchi, « Expression of p63 in anaplastic large cell lymphoma but not in classical Hodgkin's lymphoma », *Hum. Pathol.*, vol. 39, n° 10, p. 1505-1510, oct. 2008.
- [136] V. Y. Jo et C. D. M. Fletcher, « p63 immunohistochemical staining is limited in soft tissue tumors », *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 136, n° 5, p. 762-766, nov. 2011.

- [137] L. Lo Muzio *et al.*, « p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma », *Hum. Pathol.*, vol. 36, n° 2, p. 187-194, févr. 2005.
- [138] N. Ramer *et al.*, « Prognostic value of quantitative p63 immunostaining in adenoid cystic carcinoma of salivary gland assessed by computerized image analysis », *Cancer*, vol. 116, n° 1, p. 77-83, janv. 2010.
- [139] R. E. A. Tjon Pian Gi *et al.*, « Clinical course of recurrent respiratory papillomatosis: comparison between aggressiveness of human papillomavirus-6 and human papillomavirus-11 », *Head Neck*, vol. 37, n° 11, p. 1625-1632, nov. 2015.
- [140] A. H. Coons, H. J. Creech, et R. N. Jones, « Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. », *Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group.* », *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 47, n° 2, p. 200-202, juin 1941.
- [141] M. H. van Regenmortel, « The recognition of proteins and peptides by antibodies », *J Immunoassay*, vol. 21, n° 2-3, p. 85-108, août 2000.
- [142] M. Werner, A. Chott, A. Fabiano, et H. Battifora, « Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry », *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 24, n° 7, p. 1016, juill. 2000.

## Annexe 1

Le RNAscope consiste en une hybridation *in situ* des ARN messagers d'E6 et E7 spécifiques des types d'HPV ciblés, développé par la société ACD™ sur coupes de tissus congelés ou coupes provenant de tissus fixés dans le formol et inclus en paraffine (FFPE). La technique comprend plusieurs étapes pour arriver à la révélation de la sonde schématisées sur la figure 23.

Lorsque l'on travaille sur coupe FFPE la première étape consiste à déparaffiner et déshydrater les lames (bains successifs de xylène et d'éthanol). On bloque ensuite les peroxydases endogènes pour éviter un marquage non spécifique. Il s'en suit l'étape de révélation de l'ARN cible : l'hybridation des sondes est facilitée par un prétraitement par une protéase libérant l'ARN cible à hybrider d'éventuelles liaisons tissulaires. On dépose ensuite la sonde d'hybridation que l'on laisse incuber 2h à 40°C. Les sondes ont une conformation « en Z » avec une branche du Z complémentaire de l'ARN ciblé et l'autre complémentaire de l'hémi-site de liaison de la sonde de pré-amplification qui est déposée dans un second temps. Il faut deux sondes Z pour la fixation de la sonde de pré-amplification permettant une fixation stable résistante aux différents lavages lors des étapes d'amplification, évitant des liaisons non spécifiques. Six cycles d'amplification permettent la fixation de six bras sur la sonde de pré-amplification où des sondes liées à des peroxydases vont pouvoir s'accrocher.

La révélation des sondes RNAscope se fait par réaction enzymatique : on rajoute de la diaminobenzidine qui va être oxydée par les peroxydases, produisant ainsi un précipité marron insoluble dans l'alcool. Les lames sont ensuite contre-colorées avec de l'hématoxyline et montées avec une lamelle et de la colle pour être interprétées au microscope.

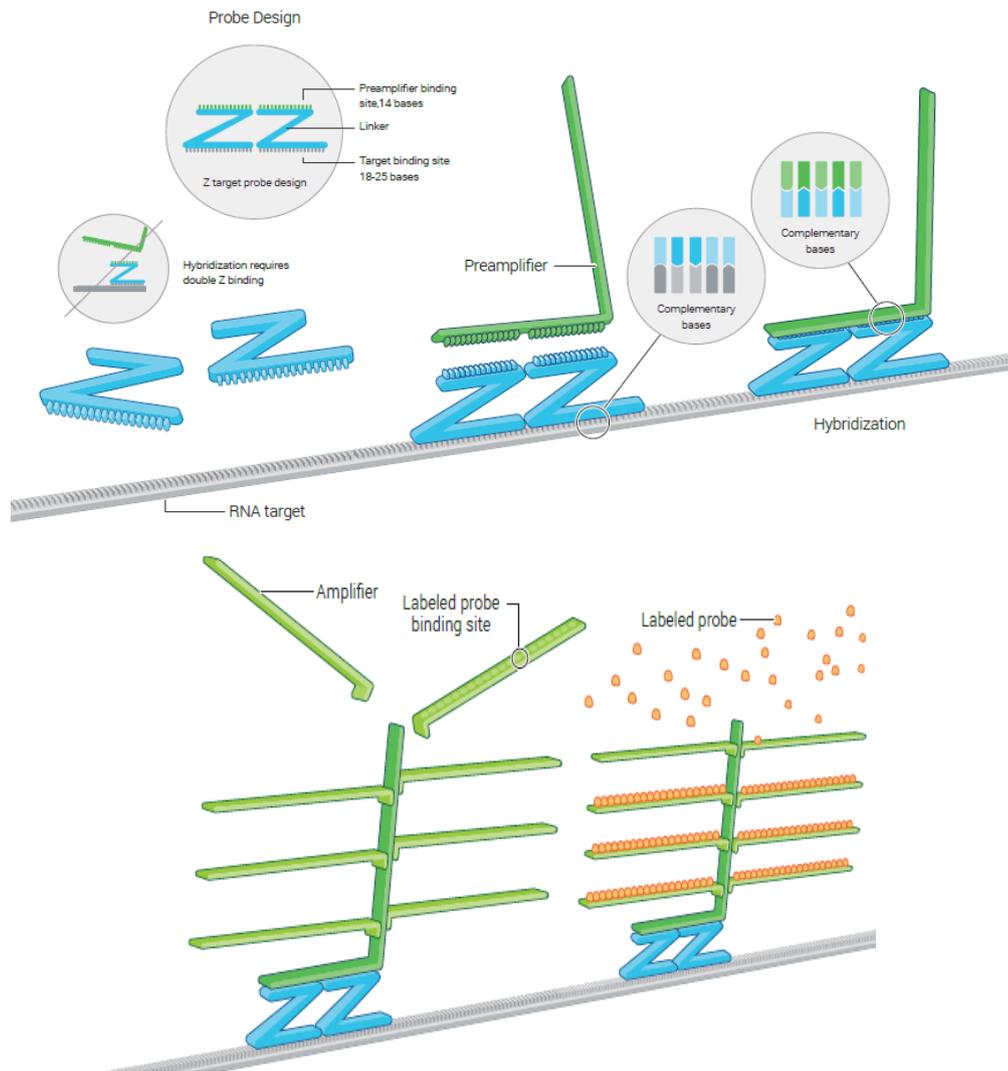


Figure 23 : principe du RNAscope, d'après le manuel fabricant.

## Annexe 2

### STAGING ASSESSMENT FOR RECURRENT LARYNGEAL PAPILLOMATOSIS

PATIENT INITIALS:\_\_\_\_\_ DATE OF SURGERY\_\_\_\_\_ SURGEON\_\_\_\_\_  
PATIENT ID #\_\_\_\_\_ INSTITUTION\_\_\_\_\_

1. How long since the last papilloma surgery? \_\_\_days, \_\_\_weeks, \_\_\_months,  
\_\_\_years,\_\_\_ don't know,  
\_\_\_\_\_this is the child's first surgery
  2. Counting today's surgery, how many papilloma surgeries in the past 12 months? \_\_\_\_\_
  3. Describe the patient's voice today:  
normal\_\_(0), abnormal\_\_(1), aphonic\_\_(2)
  4. Describe the patient's stridor today:  
absent\_\_(0), present with activity\_\_(1), present at rest\_\_(2)
  5. Describe the urgency of today's intervention:  
scheduled\_\_(0),elective\_\_(1),urgent\_\_(2),emergent(3)
  6. Describe today's level of respiratory distress:  
none\_\_(0), mild\_\_(1), Mod\_\_(2), severe\_\_(3), extreme\_\_(4)
- Total score for questions 3-6=\_\_\_\_\_

FOR EACH SITE, SCORE AS: 0= NONE, 1= SURFACE LESION, 2=RAISED LESION, 3=BULKY LESION

#### LARYNX:

Epiglottis  
Lingual surface\_\_\_\_\_ Laryngeal surface\_\_\_\_\_  
Aryepiglottic folds: Right\_\_\_\_\_ Left\_\_\_\_\_  
False vocal cords: Right\_\_\_\_\_ Left\_\_\_\_\_  
True vocal cords: Right\_\_\_\_\_ Left\_\_\_\_\_  
Arytenoids: Right\_\_\_\_\_ Left\_\_\_\_\_  
Anterior commissure\_\_\_\_\_  
Posterior commissure\_\_\_\_\_  
Subglottis \_\_\_\_\_

#### TRACHEA:

Upper one-third\_\_\_\_\_  
Middle one-third\_\_\_\_\_  
Lower one-third\_\_\_\_\_  
Bronchi: Right\_\_\_\_\_ Left\_\_\_\_\_  
Tracheotomy stoma\_\_\_\_\_

#### OTHER:

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

-----  
TOTAL SCORE ALL SITES: \_\_\_\_\_ TOTAL CLINICAL SCORE:\_\_\_\_\_

Fig. 1. Staging/severity scale.

## Annexe 3

### 1.1 Principe de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie permet de mettre en évidence des protéines grâce à un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine recherchée. Elle a d'abord été développée dans les années 1940 sur coupe congelée avec des anticorps fluorescents[136] puis s'est très rapidement développée en anatomie et cytologie pathologiques dans les années 1990 grâce à l'invention de méthodes permettant de révéler les antigènes sur les coupes fixées en formol et incluses en paraffine (FFPE). L'immunohistochimie est maintenant utilisée en routine dans les laboratoires d'anatomie et de cytologie pathologiques dans diverses applications dont les principales sont l'aide au diagnostic, la prédiction de réponse au traitement ou encore l'évaluation du pronostic. Enfin le marquage peut être membranaire, nucléaire ou cytoplasmique en fonction de la localisation de l'antigène.

#### 1.1.1 Anticorps

L'anticorps est un assemblage de protéines ayant la capacité de se lier de façon spécifique à un antigène. Ce dernier est caractérisé par des épitopes qui sont des motifs correspondant soit à une succession d'acides-aminés contiguës dans la séquence protéique (épitopes dits séquentiels) soit à une succession d'acides aminés non contiguës dans la séquence protéique mais mis côte à côte grâce à la structure tertiaire entraînant un repliement protéique (épitope de conformation). Chaque paratope d'un anticorps se lie spécifiquement avec l'épitope de l'antigène contre lequel il est dirigé. Il arrive que certains épitopes présentent d'importantes similarités entre deux antigènes différents et entraînent des réactions croisées avec un même anticorps[137]. Ainsi les anticorps dit monoclonaux, c'est-à-dire dirigés contre le même épitope d'un antigène, ne garantissent pas en théorie la détection d'un antigène spécifique. En pratique les anticorps utilisés en routine présentent une spécificité très élevée. Il est également utilisé des anticorps polyclonaux, c'est-à-dire que la préparation contient plusieurs anticorps dirigés contre plusieurs épitopes de cet antigène. Ils présentent une sensibilité légèrement plus élevée et une spécificité légèrement plus faible que les anticorps monoclonaux. Par ailleurs les anticorps sont obtenus grâce à l'immunisation d'animaux contre l'antigène voulu, majoritairement des souris.

### **1.1.2 Préparation des échantillons**

Pour que la réaction puisse se faire il faut d'abord déparaffiner et réhydrater les coupes FFPE. Ensuite la préparation de l'échantillon va permettre d'une part d'éviter un marquage non spécifique et d'autre part pour les tissus FFPE de rendre accessible l'épitope à l'anticorps.

Les anticorps étant des molécules chargées elles risquent de se fixer de façon non-spécifique à des composants du tissu présentant une charge opposée (par exemple le collagène). Pour éviter cela on incube le tissu avec un sérum de l'animal de même espèce que l'anticorps secondaire pour saturer ces liaisons non spécifiques. Par ailleurs il faut également bloquer l'activité enzymatique endogène des cellules comme les peroxydases pour éviter que les peroxydases endogènes agissent sur le substrat lors de la révélation entraînant un précipité coloré non spécifique.

Le formol, en créant une réaction de réticulation entre les protéines, modifie la structure des protéines et peut masquer des épitopes. Pour démasquer ces antigènes on utilise soit des enzymes soit la chaleur, cette dernière étant la méthode la plus employée car la plus efficace. Les micro-ondes sont le plus souvent utilisés pour chauffer les coupes.

### **1.1.3 Révélation**

Pour détecter l'anticorps spécifique de l'antigène que l'on cherche à mettre en évidence, de nombreuses méthodes ont été développées. La plus utilisée en routine est la révélation indirecte avec un anticorps secondaire spécifique de la partie constante de l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène choisi, comme schématisé sur la figure 24. Il s'agit d'un anticorps d'une espèce animale différente de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est associé à une enzyme, par exemple la peroxydase, qui en présence de son substrat, par exemple le DAB, va produire un précipité coloré à l'endroit où l'antigène se trouve, par exemple marron pour le DAB. Il peut également être associé à un fluorochrome et ainsi être révélé au microscope à fluorescence. Les avantages de cette méthode sont que l'on peut utiliser moins d'anticorps primaire que dans une révélation directe car plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur un anticorps primaire et l'on peut réaliser plusieurs marquages sur une même lame grâce à des anticorps primaires d'espèces animales différentes et des anticorps secondaires liés à des enzymes différentes. En revanche, comme l'anticorps secondaire n'est pas spécifique d'un anticorps primaire, si une erreur d'anticorps primaire a été faite ou s'il se fixe de façon non spécifique, on risque d'avoir un marquage interprété comme faussement positif. Cette méthode

nécessite donc des contrôles soigneux lors des réalisations des manipulations et une interprétation en fonction du marquage attendu de l'anticorps primaire (marquage nucléaire et non pas membranaire par exemple).

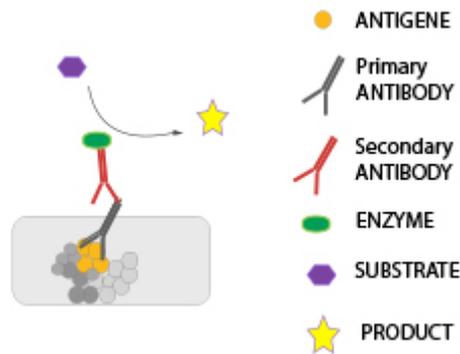


Figure 24 : Schéma de l'immunohistochimie avec révélation indirecte d'après Cogentech.

#### 1.1.4 Altérations des épitopes dans les tissus FFPE

La technique de fixation au formol et d'inclusion en paraffine nécessaire à la préparation des tissus pour une analyse en coloration standard des échantillons en anatomie et cytologie pathologiques peut entraîner un certain nombre d'altération réversible et irréversible des épitopes[138].

Un délai important avant la fixation va entraîner une dégradation protéolytique des tissus, provoquant une diminution voire une absence de marquage et cela de façon irréversible. Cela est en général dû à une trop longue attente avant la mise en formol (>30min) ou à un prélèvement trop grand non ouvert empêchant la pénétration rapide du formol dans les tissus.

De la même façon un temps de fixation dans le formol trop court va également entraîner une pénétration insuffisante du formol au sein des tissus.

Enfin un temps de fixation trop long dans le formol va quant à lui entraîner un nombre très important de réticulation entre les protéines au sein du tissu rendant les épitopes plus difficilement accessibles voire occasionnant des lésions irréversibles. Les méthodes de révélations antigéniques permettent de palier au moins en partie à ce problème.

## Annexe 4

	<b>Clone</b>	<b>Fabriquant</b>	<b>Dilution</b>
<b>Anticorps anti-p63</b>	4A4	Roche	1/50
<b>Anticorps anti-p53</b>	DO-7	Dako	1/50
<b>Anticorps anti- p16<sup>INK4a</sup></b>	E6H4	Roche	1/2

**Tableau 19 : caractéristiques des anticorps anti-p63, anti-P53 et anti- p16<sup>INK4a</sup>**

## Annexe 5

### RNAscope 2.5 Assay

#### **Préparation du matériel :**

Il faut que les réactifs soient frais

#### Préparation du Wash Buffer 1X:

2,94L d'eau distillée + 60mL de RNAscope Wash Buffer (50X)

*Remarque : S'il y a des précipités Chauffer le RNAscope Wash Buffer (50X) à 40°C pendant 10 à 20min avant la préparation. Le 1X peut être préparé en avance et conservé à température ambiante pendant 1 mois.*

#### Préparation réactif contre coloration: SOUS LA HOTTE

1/ Préparation hématoxyline 50% : 100mL eau distillée + 100mL hématoxyline Gill's

*Remarque : Peut être réutilisé pendant 1 semaine. Il n'a pas besoin d'être utilisé frais mais doit être uniquement utilisé pour le RNAscope.*

2/ Préparation 0,02% Ammonium :

1,43mL 1N ammonium hydroxide + 250mL eau distillée dans une éprouvette fermée par du parafilm, mélanger 3 à 5 fois par retournement

*Remarque : pour l'analyse quantitative, il est crucial d'utiliser de l'ammonium hydroxide.*

#### Préparation réactifs déshydratants: SOUS LA HOTTE

*IMPORTANT : Ne pas réutiliser les réactifs de déparaffinage pour la déshydratation des lames après l'essai.*

1/ bain 200mL xylène

2/ deux bains de 200mL éthanol 95%

3/ Ethanol 70% : 140mL EtOH 95% + 60mL eau distillée couvrir parafilm, mélanger

*Remarque : Il peut être préparé avant l'utilisation mais doit rester couvert.*

*Remarque 2 : Xylène, Alcool doivent être changés tous les jours.*

#### Stabilisation des réactifs :

1/ Sortir AMP 1-6 du réfrigérateur et mettre à TA. Tous les Réactifs AMP peuvent être gardés à température ambiante pendant la manipulation.

2/ S'assurer que le four et la chambre sont à 40°C

3/ Avant chaque utilisation, réchauffer les sondes cibles et contrôles moins de 10min à 40°C dans un bain d'eau ou incubateur.

#### 2/ Déparaffinage: sous hotte à température ambiante

- Xylène 1 frais (200mL) 5min en remuant de temps en temps

- Xylène 2 frais (200mL) 5min en remuant de temps en temps

- Ethanol 1 100% frais (200mL) 3min en agitant tout le temps

- Ethanol 2 100% frais (200mL) 3min en agitant tout le temps

- mettre le rack avec les lames sur papier absorbant et laissez sécher 5min

### **Prétraitement des échantillons (à adapter en fonction du tissu étudié) :**

#### **3/ Préparer le réactif Target RetrievalRNAscope 1X:**

- Préparer TRR1X = 630mL eau distillée + 70mL Target RetrievalReagent 10X (boite rose TA)
- Placer le mélange, couvert de papier aluminium sur la plaque chauffante
- Faire bouillir entre 100 et 104°C pendant 10 à 15min

*Attention: ne pas laisser bouillir plus de 30min*

*Remarque : Il faut monitorer la température pendant la manipulation. Il doit toujours y avoir une petite/douce ébullition autour des lames.*

#### **4/ Bloquer l'activité des peroxydases: Pendant que le TRR1X bout 10/15 min**

- Mettre 5/8 gouttes de RNAscopeHydrogen Peroxyde (petite boite rose à 4°C) / échantillon
- incuber 10min à Température Ambiante
- Faire tomber la goutte
- Premier bain d'eau distillée (agiter 3 à 5 fois)
- Deuxième bain d'eau distillée (agiter 3 à 5 fois)

#### **5/ Casser les liaisons ARN/tissus qui ont pu se former lors de la fixation de l'échantillon:**

- A l'aide d'une pince, enlever le papier aluminium du mélange TRR 1X et y ajouter TRES DOUCEMENT le rack de lames
- Remettre le couvercle en papier aluminium et laisser incuber ( $\approx 100^\circ\text{C}$ ) le temps spécifié dans le tableau de recommandations : Appendix A Tissue Prétraitement (en majorité 15min)
- avec la pince transférer immédiatement le rack de lames chaudes dans un bain d'eau distillée (ne surtout pas laisser les lames refroidir dans RNAscope 1X TRR !!!!)
- lavage dans un bain d'eau distillée (secouer 3 à 5 fois)
- lavage dans de l'éthanol 100% frais
- laisser les lames sécher à température ambiante

#### **6/ Création de la barrière:**

- Dessiner la barrière en entourant le prélèvement 2 à 4 fois autour de chaque échantillon avec le Immedge (stylo à barrière hydrophobe)

*Remarque : Ne pas laisser la barrière toucher le tissu.*

- laisser la barrière sécher complètement 1min ou une nuit à température ambiante

*Remarque : Si besoin de refaire la barrière hydrophobe pendant la procédure, sécher la zone appropriée de la lame sans toucher le tissu.*

*Remarque 2 : Possibilité de laisser sécher la lame en overnight et de continuer la manipulation le jour suivant à l'étape suivante.*

#### **7/ Digestion des protéases:**

- Secouer chaque lame une par une dans un bac à déchets et les placer sur le portoir bleu dans la chambre à l'obscurité
- Ajouter 5 gouttes de RNAscopeProtease Plus (boite rose à 4°C)
- Incuber dans le four à 40°C le temps spécifié dans le tableau de recommandations (en général 30min).
- Prendre une lame à la fois du portoir et les secouer dans un bac à déchet
- IMMEDIATEMENT mettre chaque lame dans un bac d'eau distillée (agiter 3 à 5 fois)
- 2ème bain d'eau distillée propre (agiter 3 à 5 fois)

## Exécuter le test

*IMPORTANT : Ne pas laisser dessécher le prélèvement entre les étapes d'incubations.*

### Avant de commencer:

- Les AMP 1 à 6 du frigo et les laisser revenir à température ambiante
- Préchauffer le four à hybridation à 40°C
- Préchauffer les sondes 10min à 40°C directement dans l'incubateur ou dans un bain d'eau, pour dissoudre toute précipitation avant l'utilisation

### 8/ Sonde hybridation :

- Secouer chaque lame pour enlever l'excès de liquide et les placer sur le portoir bleu + chambre
- Mettre 3/4 gouttes de la sonde appropriée (contrôle+ PPIB, contrôle- DapB, HPV18) sur l'échantillon (en fonction de la taille de la barrière)
- Incuber dans le four à hybridation pendant 2h à 40°C

*Remarque: Pour prévenir de l'évaporation, s'assurer que le bouton est complètement tourné dans sur la position « lock ».*

- Retirer les lames du four
- RAPIDEMENT, une lame à la fois, enlever l'excès de liquide dans un bac à déchets
- les mettre au fur et à mesure dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante
- faire un 2<sup>ème</sup> bain de Buffer 1X en agitant pendant 2min à température ambiante

### 9/ Hybridation Amplification 1:

- Secouer les lames une à la fois pour enlever l'excès de liquide et les placer sur le portoir
- Attention: ne pas laisser le tissu sécher.*

- Ajouter 3/4 gouttes d'**AMP1** sur le tissu et mettre dans le four **30 min à 40°C**
- Retirer les lames du four
- RAPIDEMENT, une lame à la fois, enlever l'excès de liquide dans un bac à déchets
- les mettre au fur et à mesure dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante
- faire un 2<sup>ème</sup> bain en Buffer 1X en agitant occasionnellement pendant 2min à TA

### 10/ Hybridation Amplification 2:

- Secouer les lames une à la fois pour enlever l'excès de liquide et les placer sur le portoir
- Ajouter 3/4 gouttes d'**AMP2** sur le tissu et mettre dans le four **15 min à 40°C**
- Retirer les lames du four
- RAPIDEMENT, une lame à la fois, enlever l'excès de liquide dans un bac à déchets
- les mettre au fur et à mesure dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante
- faire un 2<sup>ème</sup> bain en Buffer 1X en agitant occasionnellement pendant 2min à TA

### 11/ Hybridation Amplification 3:

- Secouer les lames une à la fois pour enlever l'excès de liquide et les placer sur le portoir
- Ajouter 3/4 gouttes d'**AMP3** sur le tissu et mettre dans le four **30 min à 40°C**
- Retirer les lames du four
- RAPIDEMENT, une lame à la fois, enlever l'excès de liquide dans un bac à déchets
- les mettre au fur et à mesure dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante
- faire un 2<sup>ème</sup> bain en Buffer 1X en agitant occasionnellement pendant 2min à TA

### 12/Hybridation Amplification 4:

- Secouer les lames une à la fois pour enlever l'excès de liquide et les placer sur le portoir

- Ajouter 3/4 gouttes d'**AMP4** sur le tissu et mettre dans le four **15 min à 40°C**
- Retirer les lames du four
- RAPIDEMENT, une lame à la fois, enlever l'excès de liquide dans un bac à déchets
- les mettre au fur et à mesure dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante
- faire un 2<sup>ème</sup> bain en Buffer 1X en agitant occasionnellement pendant 2min à TA

#### 13/ Hybridation Amplification 5:

- Secouer les lames une à la fois pour enlever l'excès de liquide et les placer sur le portoir
- Ajouter 3/4 gouttes d'**AMP5** sur le tissu et incuber **30 min à TA**
- Retirer les lames du four
- RAPIDEMENT, une lame à la fois, enlever l'excès de liquide dans un bac à déchets
- les mettre au fur et à mesure dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante
- faire un 2<sup>ème</sup> bain en Buffer 1X en agitant occasionnellement pendant 2min à TA

*Remarque: L'intensité du marquage peut être modifiée en ajustant le temps d'incubation de l'AMP5.*

#### 14/ Hybridation Amplification 6:

- Secouer les lames une à la fois pour enlever l'excès de liquide et les placer sur le portoir
- Ajouter 3/4 gouttes d'**AMP6** sur le tissu et mettre dans le four **15 min à TA**
- Retirer les lames du four
- RAPIDEMENT, une lame à la fois, enlever l'excès de liquide dans un bac à déchets
- les mettre au fur et à mesure dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante
- faire un 2<sup>ème</sup> bain en Buffer 1X en agitant occasionnellement pendant 2min à TA

#### 15/ Détection du signal :

- Préparer 120µL de substrat DAB/lame = 2 gouttes DAB-A + 2 gouttes DAB-B dans un eppendorf et retourner 3 à 5 fois

*Attention : DAB toxique, prendre précautions pour élimination des déchets*

- Prendre chaque lame une par une et les positionner sur le portoir bleu
- Mettre 120µL de DAB / échantillon dans la chambre à l'obscurité 10min à TA
- Jeter la goutte de DAB dans un falcon contenant de l'eau de javel à 20%
- Lavage en eau du robinet, en agitant 3 à 5 fois
- Remplacer l'eau par de l'eau fraîche du robinet

*Remarque : Conservation des réactifs dans le réfrigérateur*

#### 16/ Contre coloration des lames :

- Mettre les lames dans un bain contenant 50% d'hématoxyline qu'il y a quelques secondes à TA
- IMMEDIATEMENT lavage dans un bain d'eau du robinet, en agitant 3 à 5 fois
- Répéter l'opération avec de l'eau fraîche
- Bain d'eau ammoniaquée à 0,02% et agiter le rack 2 à 3 fois
- Bain d'eau du robinet et agiter le rack 3 à 5 fois

#### 17/ Déshydratation des lames : sous la hotte

- Bain d'éthanol à 70% 2 min en remuant occasionnellement
- Bain 1 d'éthanol à 95% 2 min en remuant occasionnellement
- Bain 2 d'éthanol à 95% 2 min en remuant occasionnellement
- Bain de Xylène 5 min en remuant occasionnellement

18/ Montage des échantillons :

- Mettre lames à plat, échantillon vers le haut
- Mettre une goutte de milieu de montage (cytoseal ou autre base de « xylene-medium ») + lamelle et chasser les bulles d'air
- Laisser sécher les lames minimum 5min

**Identification de facteurs prédictifs de sévérité des papillomatoses respiratoires récurrentes juvéniles : A propos d'une série de 48 patients.**

La papillomatose respiratoire récurrente (PRR) juvénile est caractérisée par la survenue de papillomes malpighiens au niveau des voies aériennes due à l'infection par les HPV 6 et 11. L'évolution de la maladie reste imprévisible : d'une guérison spontanée à une forme floride potentiellement obstructive et de rares transformations malignes. L'objectif de ce travail est l'identification de critères histologiques prédictifs de la sévérité de la PRR juvénile.

Quarante-huit enfants ont été inclus. La sévérité a été définie comme un nombre d'endoscopies par an  $\geq 5$ , une localisation pulmonaire, la transformation carcinomateuse ou le décès. Une étude immunohistochimique des papillomes avec les anticorps anti-p16, p53 et p63 a été combinée à une hybridation in situ chromogénique (CISH) reconnaissant les ARNm des HPV 6 et 11. Les marquages immunohistochimiques avec les anticorps anti-p53 et anti-p63 ont fait l'objet d'un comptage avec un logiciel utilisant l'intelligence artificielle. L'intensité de marquage de la CISH a été divisée en deux catégories : score 1+ et 2+.

Vingt-quatre enfants présentaient une PRR sévère. Nous avons mis en évidence une association statistiquement significative entre le caractère sévère de la PRR et le marquage  $\geq 4,5\%$  des cellules avec l'anticorps anti-p53 et  $\geq 30\%$  avec l'anticorps anti-p63 ( $p=0,001$ ). En CISH, un score 2+ semble associé à une maladie sévère ( $p=0,067$ ).

En conclusion grâce à l'utilisation de l'analyse d'image avec l'intelligence artificielle, nous avons mis en évidence une signature immunohistochimique associée à la sévérité de la PRR. La CISH paraît également intéressante mais l'étude d'une cohorte plus large est nécessaire.

**Mots clés :** Papillomatose respiratoire récurrente, HPV de bas risque, CISH, facteurs prédictifs de sévérité, p53, p63, p16, intelligence artificielle, analyse d'image.

**Severity risk factors identification in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: about a 48 patients cohort.**

Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (JoRRP) is a condition characterized by the repeated growth of benign exophytic papilloma in the respiratory tract. The course of the disease is still unpredictable: Some children experience spontaneous remission, while others require multiple surgeries due to florid growth, uncommonly the disease may transform into malignant lesions. Our study aimed to identify severity risk factors in the JoRRP.

Forty-eight children were included retrospectively. We defined the severity as an annual rate of interventional endoscopy  $\geq 5$ , a spread to the lung, a carcinomatous transformation or the death. We conducted immunostaining against p16, p53 and p63 combined with a chromogenic in situ hybridization (CISH) against E6 and E7 transcripts of HPV 6 and 11. Immunostainings against p63 and p53 was analyzed with an artificial intelligence-based software allowing us to count the nuclear staining depending on the strength. CISH staining strength was divided in two categories: 1+ and 2+. Twenty-four patients had serious disease. Staining with p53 antibody  $\geq 4,5\%$  and with p63 antibody  $\geq 30\%$  was associated with severity ( $p=0,001$ ). Score 2+ in CISH tend to be associated with severity ( $p=0,067$ ).

In conclusion we pointed out with computerized image analysis based on artificial intelligence that our immunostaining signature is associated with severity in JoRRP. CISH might be a promising risk factor to be explored in further larger cohorts.

**Keywords:** juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, low risk HPV, CISH, severity risk factor, p53, p63, p53, artificial intelligence, computerized image analysis

**Université Paris Descartes  
Faculté de Médecine Paris Descartes  
15, rue de l'Ecole de Médecine  
75270 Paris cedex 06**