

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR
ANNA-KARINE BÉLIZAIRE

INFLUENCE DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN
SUR L'ÉVOLUTION CLINIQUE
DES LÉSIONS PRÉINVASIVES CERVICALES

DÉCEMBRE 1996

À mes parents,

*Jacqueline Dorismond et
Jacques Bélinaire*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
SOMMAIRE	xi
SUMMARY	xiv
INTRODUCTION	xvii
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1. ÉPIDÉMIOLOGIE	2
2. ANATOMIE ET HISTOLOGIE.....	6
3. LÉSIONS PRÉINVASIVES CERVICALES	9
4. TRAITEMENTS	14
4.1 Cryothérapie	14
4.2 Vaporisation au laser	15
4.3 Conisation	15
5.FACTEURS INFLUENÇANT LES RISQUES DE LÉSIONS	17
5.1 Régime alimentaire	17
5.2 Immunodéficience	19

5.3 Parité	20
5.4 Tabac	21
5.5 Contraception	22
5.6 Fréquence du test PAP	23
5.7 Activité sexuelle	23
6. HISTORIQUE DE L'ÉTIOLOGIE DU CANCER DU COL	25
6.1 Origine bactérienne	25
6.2 Origine virale	25
6.3 Épidémiologie virale	26
7. LE VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN	31
7.1 Cycle viral	35
7.2 Structure génomique	35
7.3 Pathogénicité	37
7.4 Oncogénicité	38
8. MÉTHODES DE DÉPISTAGE.....	43
8.1 Lésions cervicales : tests de routine	43
8.1.1 Frottis cervico-vaginal	43
8.1.2 Colposcopie	44
8.1.3 Biopsie du cervical (Bx) et curettage endocervical (CEC).....	45
8.2 Présence virale : tests irréguliers	45
8.2.1 Immunodiagnostic	45
8.2.2 Hybridation in situ.....	45
9. MÉTHODES DE DÉTECTION DE VIRUS	47
9.1 Approche morphologie	47
9.2 Génome viral	47
9.2.1 Hybridation <i>in situ</i> sur filtre (FISH)	47
9.2.2 Hybridation Southern	48
9.2.3 Hybridation en phase liquide (Hybrid Capture™)	48

9.2.4 Hybridation in situ (ISH)	48
9.2.5 Réaction de polymérisation en cascade (PCR)	49
9.2.5.1 Tests PCR HPV spécifique	50
9.2.5.2 Test PCR HPV consensus	50
HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	51
OBJECTIFS	54
1. OBJECTIFS GÉNÉRAL	55
2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	55
3. DESSEIN DE L'ÉTUDE	55
MATÉRIEL ET MÉTHODES	59
1. DÉFINITION DE L'ÉTUDE	60
2. DÉFINITION DE LA COHORTE	60
3. ACCORD DES COMITÉS D'ÉTHIQUES	61
4. SÉLECTION DES PATIENTES	61
4.1 Données de l'Hôtel-Dieu de Montréal	61
4.2 Traitement des données	61
4.3 Consultation des dossiers médicaux	62
4.4 Appariement de témoins aux cas	63
5. PRÉPARATION DU MATÉRIEL	63
5.1 Sortie des blocs paraffinés	63

5.2 Coupe des blocs paraffinés	64
5.3 Extraction de la paraffine	65
5.4 Digestion des tissus	65
5.5 Contrôles cellulaires	66
5.5.1 Conditions de culture des cellules Hela	66
5.5.2 Conditions de culture des cellules WI-38	66
6. ANALYSE DES ÉCHANTILLONS	67
6.1 Réaction de polymérisation en cascade	67
6.2 Amorces	68
6.2.1 Amorces ciblant le gène de la β -globine	68
6.2.2 Amorces consensus GP5+ et GP6+ ciblant HPV	68
7. PRÉPARATION DE LA SONDE MOLÉCULAIRE	71
7.1 Plasmides clonés du génome viral	71
7.2 Transformation de cellules <i>Escherichia coli</i>	72
7.3 Confirmation de la transformation bactérienne.....	73
7.4 Purification plasmidique	73
7.5 Synthèse et marquage à la digoxigénine	74
8. HYBRIDATION SOUTHERN	75
8.1 Transfert sur membrane de nylon	75
8.2 Préhybridation	76
8.3 Hybridation	76
8.4 Détection par colorimétrie	77
9. ESTIMATION DE LA CHARGE VIRALE	77
10. ANALYSE STATISQUE	78
RÉSULTATS	80

1. DESCRIPTION CLINIQUE DES CAS	81
2. PROFIL ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES PATIENTES	86
3. CONTRÔLE DE QUALITÉ DES ÉCHANTILLONS	88
4. PRÉSENCE VIRALE	88
5. INFECTION VIRALE ET FACTEURS CLINIQUES	92
6. FACTEURS DÉTERMINANTS DU GRADE DE LA LÉSION	94
6.1 Présence virale	94
6.2 Facteurs cliniques	95
7. INFLUENCE DU HPV SUR LE TEMPS DE RÉCIDIVE	97
8. ÉVALUATION DU RISQUE DE RÉCIDIVE	100
9. CHARGE VIRALE	102
DISCUSSION	104
1. LIMITES DE L'ÉTUDE	105
2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....	107
CONCLUSION	112
REMERCIEMENTS	114
BIBLIOGRAPHIE	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Nomenclature des lésions préinvasives cervicales: ancienne et nouvelle classification Bethesda	11
Tableau 2	Homologie de séquence entre les amorces GP5+ et GP6+ et leur site d'appariement de la région L1 des différents types d'HPV	70
Tableau 3	Distribution des cas selon leur lésion initiale et le grade de la récurrence	84
Tableau 4	Distribution des récurrences selon leur lésion initiale et le traitement suivi ...	85
Tableau 5	Comparaison entre cas et témoins, en fonction des paramètres cliniques	87
Tableau 6	Facteurs de risque d'infection par HPV chez la population étudiée, cas et témoins combinés: facteurs démographiques	93
Tableau 7	Facteurs de risque d'infection par HPV chez la population étudiée, cas et témoins combinés: indices du comportement sexuel	93
Tableau 8	Corrélation entre la présence du HPV et la sévérité de la lésion cervicale, cas et témoins combinés	94
Tableau 9	Corrélation entre les facteurs cliniques et la sévérité de la lésion cervicale, cas et témoins combinés	96
Tableau 10	Corrélation entre HPV, les facteurs cliniques et le risque de récurrence: résultats calculés par la méthode de régression logistique conditionnelle	101
Tableau 11	Mesure du score viral selon le statut, le diagnostic et l'âge au traitement	103
Tableau 12	Comparaison du score viral entre la lésion initiale et la récurrence chez les cas	103

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Risque à vie de cancer du col dans différentes régions du monde	5
Figure 2	Représentation schématique de la région cervicale de l'utérus	8
Figure 3	Représentation schématique d'une coupe histologique du col à l'état normal et atteint d'une lésion néoplasique	13
Figure 4	Modèle proposé des principaux facteurs étiologiques	30
Figure 5	Carte génomique du virus du papillome humain type 16	34
Figure 6	Modèle d'infection virale entraînant le cancer du col de l'utérus	42
Figure 7	Diagramme du dessein de l'étude	58
Figure 8	Diagramme illustrant la sélection des patientes	83
Figure 9	Amplification des spécimens pathologiques par la paire d'amorces GH20/PC04.....	91
Figure 10	Amplification des spécimens pathologiques par la paire d'amorces GP5+/GP6+.....	91
Figure 11	Proportion ayant récidivé en fonction du temps depuis le diagnostic.....	99

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.a.	: Acides aminés	É.U.	: États-Unis
ADN	: Acide désoxyribonucléique	HDM	: Hôtel-Dieu de Montréal
ARN	: Acide ribonucléique	HGSIL	: Lésion intrépithéliale sévère
ARNm	: Acide ribonucléique messenger humaine	HIV	: Virus de l'immunodéficience
AMP	: Ampicilline	HPV	: Virus du papillome humain
Bx	: Biopsie cervicale	LGSIL	: Lésion intraépithéliale légère
BPV	: Virus du papillome bovin	ND	: Non déterminé
CEC	: Curettage endocervical	PV	: Papillomavirus
CIN 1	: Dysplasie légère	RR	: Risque relatif
CIN 2	: Dysplasie modérée	TET	: Tétracycline
CIN 3	: Dysplasie sévère	U.V.	: Rayons ultra-violet
CIS	: Carcinome <i>in situ</i>		
DIG	: Digoxigénine		
D.O.	: Densité optique		

ANNEXE

Dessein du questionnaire	135
--------------------------------	-----

SOMMAIRE

Dans le cadre de ce projet de maîtrise nous avons tenté de déterminer si la présence de l'acide désoxyribonucléique (ADN) du virus du genre papillomavirus (HPV) influençait le taux de récurrence de patientes traitées pour des lésions cervicales préinvasives. Pour cette étude rétrospective cas-témoin qui couvre une période de 5 ans, nous avons utilisé les données de plus de 3000 patientes traitées pour une lésion préinvasive cervicale à l'Hôtel-Dieu de Montréal. De celles-ci, nous en avons retenu une centaine qui répondaient à nos critères. La population fut séparée en deux groupes. Le groupe des cas était constitué de patientes (n = 55) ayant récidivé suite au traitement (i.e diagnostiqué pour une seconde lésion cervicale), après une période d'au moins douze mois, le groupe témoin comprenait les patientes (n = 55) qui n'ont pas récidivé et dont le suivi médical durait une période d'au moins 21 mois. Ces deux groupes furent appariés selon l'âge (± 5 ans), la lésion, le traitement et l'année du diagnostic (± 1 an).

Les échantillons obtenus des archives du département de pathologie furent analysés par réaction de polymérisation en cascade (PCR). Après vérification de la qualité des échantillons, 89,6% des échantillons furent retenus.

La population étudiée était homogène car nous avons comparé deux groupes de patientes ayant eu la même maladie. En effet, nos résultats n'ont révélé aucune variation significative entre les cas ayant récidivés et les témoins concernant le coïtarce, la cohabitation et la parité. Toutefois, l'infection par M.T.S., particulièrement à *Candida*

albicans était significativement plus importante pour les cas que pour les témoins, $p = 0,003$.

Les patientes traitées pour une lésion HPV positive étaient plus âgées, avec 95,8% des patientes âgées de plus de 30 ans comparativement à 66,7% âgée entre 18 et 24 ans, $p = 0,018$. La lésion traitée était significativement plus sévère chez: les patientes HPV positives ($p = 0,034$), les patientes plus âgées au premier traitement avec 42,1% des plus de 30 ans ayant été traitée pour une lésion CIN 3-CIS comparativement à 2,6 % des patientes âgées entre 18 et 24 ans ($p < 0,001$). La lésion traitée était aussi en général plus sévère chez les femmes cohabitantes avec leur partenaire ($p = 0,008$) et chez celles ayant au moins 1 enfant ($p = 0,031$). Le coïtarche et les M.T.S. ne semblent pas influencer le grade de la lésion traitée.

Le fait d'avoir été traité pour une lésion HPV positive ou négative n'a pas influencé le temps de récurrence et cette étude rétrospective n'a pas mis en évidence de relation entre le HPV et le risque de récurrence. En effet, 70,3% des cas ayant récidivé avaient été traités pour une lésion HPV positive comparativement à 66,7% des témoins. Avec ces résultats nous avons obtenu un risque relatif de récurrence 1,5 fois plus élevé chez les lésions HPV positives, cette augmentation n'est toute fois pas significative.

Seul l'infection par une M.T.S. après traitement a augmenté le risque de récurrence. Ce risque est 6,5 fois plus élevé chez les femmes infectées après traitement (IC95% = 1,467-28,804).

SUMMARY

The purpose of this project was to determine if the presence of human papillomavirus (HPV) influenced the recurrence rate of patients treated for a preinvasive cervical lesion. In his retrospective nested case-control study spans which 5 year period, we analysed hospital data of more than 3000 women treated at the Hôtel-Dieu de Montréal a downtown Montreal hospital. Of these a 110 fulfilled the required criteria. The study population was divided in two groups. Cases (n = 55) were defined as patients who recurred following treatment after a period of at least 12 months. Controls (n = 55) were defined as patients who did not recur and whose medical file contained a follow-up of at least 21 months. Women from both groups were matched according to age (± 5 years), lesion, treatment, and year of diagnosis (± 1 year).

Biopsies were obtained from the pathology department and were analysed by polymerase chain reaction (PCR). After quality control, 89,9% of the specimens were kept in the study for further testing concerning HPV status.

Since the groups compared both contained patients who were treated for a preinvasive lesion of the cervix, the study population was quite homogeneous. Our results did not show any significant variation between cases and controls concerning coitarche, cohabitation or parity. However, infection by a sexually transmitted disease (STD) particularly *Candida albicans* was significantly higher among cases $p = 0,003$.

Women treated for an HPV positive lesion were generally older. Of the women

aged 30 or higher, HPV status was positive in 95,8%, compared to 66,7% of those aged 18-24 years ($p = 0,018$). Lesion was also significantly more severe among patients treated for an HPV positive lesions ($p = 0,034$) and older patients with 42,1% of the aged >30 years treated for a CIN3-CIS compared to 2,6% of those aged 18-24 years ($p < 0.001$). Women living with their partner ($p = 0,008$) and women with at least one child vs none ($p = 0,031$) also suffered from a more severe lesion. According to our results, grade of lesion did not seem to be affected by coitarche or STD.

In this study, HPV status of the treated lesion did not influence treatment-recurrence time-interval. Neither could we show a relation between HPV and risk of recurrent lesion. In fact, infection rates in both cases and controls were quite similar, with 70,3% of cases and 66,7% of controls having been treated for an HPV positive lesion. These results translate into a non significant increased risk of recurrence of 1.5 in patients treated for an HPV positive lesion.

Only infection by a STD after treatment increased risk of recurrence significantly. Relative risk was found 6.5 times higher in women infected after treatment (95%CI = 1,467-28,804).

INTRODUCTION

Plusieurs facteurs mesurant l'activité sexuelle i.e. le nombre de partenaire (Donnan *et al.*, 1989), le coïtarce (Meisels *et al.*, 1977 ; Duncan *et al.*, 1990 ;Herrero *et al.*, 1990) et même le vécu sexuel de l'homme (Slattery *et al.*, 1988) ont été reliés au cancer du col de l'utérus. Pourtant l'agent étiologique responsable demeurait insaisissable. Après avoir considéré plusieurs candidats le choix s'est arrêté sur le virus du papillome humain (HPV). Mais si dans la communauté scientifique un consensus s'était formé au sujet de l'agent responsable, les preuves appuyant son rôle n'étaient pas irrévocables. Il a ensuite été démontré par Franco (1991a) que la faiblesse du lien était due à une question de classification par ce que les méthodes utilisées n'étaient pas assez sensibles. L'utilisation de la méthode de réaction de polymérisation en cascade (PCR) et des études épidémiologiques plus rigoureuses ont permis de confirmer ce lien et d'effacer tout doute concernant le risque attribuable à l'infection. Malgré une plus faible fréquence de cancer cervical au Canada et aux États-Unis comparativement au Brésil et en Inde par exemple (Muir *et al.*, 1987), le nombre de lésions préinvasives demeure très élevé. Le nombre de carcinome *in situ* (CIS) du col estimé demeure 10 fois plus élevé que le nombre de CIS du sein aux États-Unis (Wingo *et al.*, 1995), Ce qui entraîne des coûts énormes pour le dépistage de cette maladie.

Puisque le virus du papillome humain joue un rôle primordial dans l'initiation et l'évolution de cette maladie, la prochaine étape logique serait d'évaluer sa présence en

temps que marqueur déterminant le pronostic.

Le but de nos travaux a donc été de déceler la présence du virus HPV dans des lésions préinvasives cervicales et d'étudier ce virus comme marqueur de pronostic chez les patientes traitées. Pour atteindre cet objectif nous avons compilé et comparé les données démographiques et sexuelles (dossier médical) et les résultats d'HPV de deux groupes de patientes appariées selon l'âge (± 5 ans), la lésion, le traitement, et l'année de diagnostic (± 1 an). Le premier groupe étant constitué de patientes ayant récidivé plus d'un an après le traitement de leur lésion préinvasive, le second, de patientes n'ayant pas récidivé et dont le suivi médical est d'au moins 21 mois.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ÉPIDÉMIOLOGIE

La probabilité qu'une femme soit atteinte du cancer du col, au cours de sa vie, varie grandement selon la région du globe où elle habite. Par exemple, une femme demeurant au Brésil a jusqu'à 8 fois plus de chance d'être atteinte de ce cancer qu'une femme habitant le Canada ou les États-unis (É.U.) (Figure 1).

Dans les pays en voie de développement, ce cancer se situe au premier rang indépendamment du sexe de l'individu (Franco, 1991b) alors qu'il est situé au 5^{ème} rang dans les pays industrialisés (Parkin *et al.*, 1993). Ceci est dû à la baisse dramatique de fréquence au cours des années 60-70 grâce aux méthodes de dépistage, plus particulièrement le test Pap et à la diminution du taux de natalité au cours des 40 dernières années (Revue par Franco, 1996b ; Johannsson *et al.* 1978).

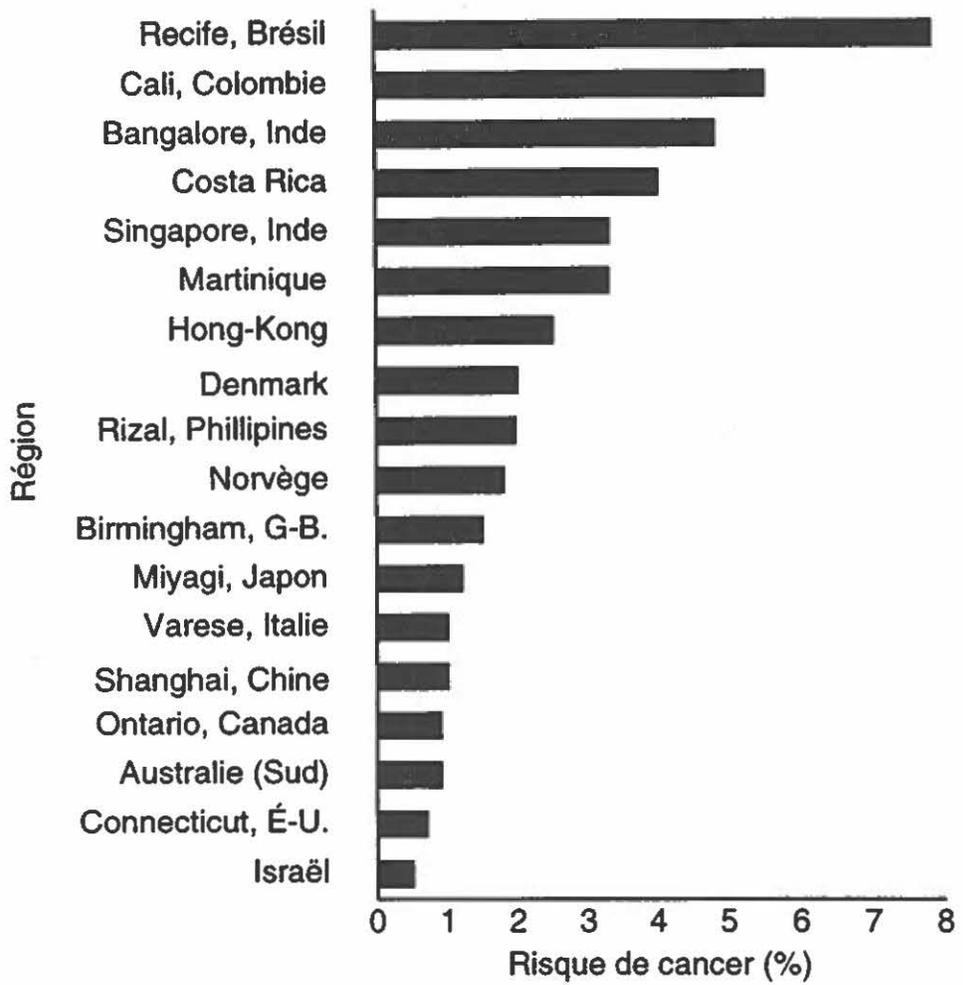
Comparativement au cancer du sein, le cancer du col utérin frappe les femmes plus jeunes (Ries *et al.*, 1994), ce qui entraîne de fortes répercussions sociales dans les pays en voie de développement puisque ces femmes tiennent un rôle important dans l'éducation des enfants et sont le principal véhicule de transmission des valeurs (Revue par Franco, 1996a). Le taux de survie sur 5 ans du cancer du col est plus bas que celui du cancer du sein (Ries *et al.*, 1994). Aux États-Unis ce taux chez les femmes blanches se situe à 70 % vs 82% comparativement à 56% vs 66% chez les femmes noires.

Malgré l'incidence beaucoup plus faible du cancer du col par rapport au cancer du sein ($\sim 1/10$) en Amérique du Nord avec 1300 nouveaux cas de cancers du col estimés au

Canada en 1990 comparativement à 13 400 cancers du sein (Institut national du cancer du Canada, 1990), les chances qu'une femme soit diagnostiquée pour une lésion préinvasive demeurent loin d'être négligeables. Alors que la American Cancer Society estimait le nombre de nouveaux cancers du col aux États-Unis à 13 500 et 15 800 en 1993 et 1995 respectivement, le nombre de cancer *in situ* s'élevait à 65 000 en 1993 et 85 000 en 1995 (American Cancer Society, 1993 ; Wingo *et al.*, 1995). Ces chiffres représentent plus du double du nombre estimé de cancer *in situ* du sein lequel était de 25 000 pour ces deux années; or, le cancer du col *in situ* ne représente qu'une partie des lésions préinvasives, car pour chaque nouveau cas de cancer invasif diagnostiqué on compte environs 50 lésions préinvasives, de la dysplasie légère à sévère et carcinome *in situ* et environs 50 lésions équivoques (Anonymous, 1994).

Le cancer du col demeure l'une des causes majeures de décès chez les femmes à travers le monde. Afin d'améliorer l'issue des traitements il serait important de déterminer les facteurs qui permettraient d'identifier les personnes à risque de récives et chez qui le pronostic serait défavorable.

**Figure 1: Risque à vie de cancer cervical dans différentes régions du monde.
(Adapté de Muir *et al.*, 1987)**



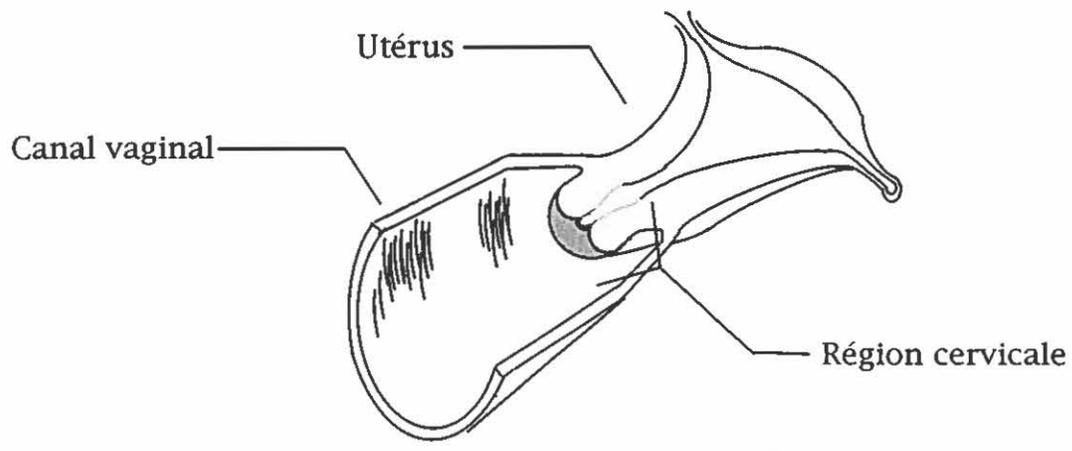
2. ANATOMIE ET HISTOLOGIE

On distingue trois parties (Figure 2): l'exocol, partie visible à l'examen gynécologique; l'endocol, canal cervical non visible à l'examen et l'orifice externe au-delà duquel on ne voit plus l'endocol. Deux types d'épithélium résident au niveau du col. L'épithélium malpighien tapisse l'exocol et l'épithélium glandulaire, aussi appelé cylindrique, tapisse l'endocol. Ces deux muqueuses s'affrontent au niveau de la jonction squamo-cylindrique. Les anomalies ont souvent lieu en cet endroit. Sa situation peut être exo- ou endocervicale. L'épithélium malpighien peut se prolonger dans l'endocol, ou la limite externe de l'épithélium cylindrique peut être visible sur l'exocol (Monsonégo, 1988 ; Lansac et Lecompte 1989).

L'épithélium malpighien est séparé du stroma par la membrane basale. Les cellules de cet épithélium sont différenciées à travers son épaisseur. Ses 5 strates cellulaires sont : la basale interne aux cellules cubiques; la basale externe aux cellules polyédriques; l'intermédiaire, constituée de cellules plus volumineuses dont le cytoplasme contient du glycogène; la couche superficielle dont les cellules s'aplatissent vers la surface et dont le cytoplasme est entièrement constitué de glycogène et enfin la couche desquamative aux cellules aplaties qui se détachent en surface. Contrairement à l'épiderme, ces cellules conservent leur noyau (Monsonégo, 1988).

L'épithélium cylindrique est formé d'une couche unique de cellules cylindriques à noyau arrondi et basal, leur pôle supérieur est chargé de mucus (Monsonégo, 1988).

**Figure 2: Représentation schématique de la région cervicale de l'utérus
(Adapté de Lansac et Lecompte 1989)**



Légende:

- Canal endocervical
- Exocol
- Jonction squamo-cylindrique

3. LÉSIONS PRÉINVASIVES CERVICALES

La région cervicale subit divers changements au cours de la vie d'une femme. Son aspect change, selon qu'il s'agisse d'une femme nullipare, enceinte, ayant accouché, ménopausée ou prenant la pilule. Cette cinétique constante entraîne un processus de réparation, soit le remaniement métaplasique pavimenteux. La cicatrisation se fait par la multiplication des cellules de réserves et par la différenciation des couches profondes et intermédiaires en différents stades de maturation. Quand le processus de régénération se fait de façon anormale, l'absence de différenciation conduit à une lésion préinvasive cervicale (Monsonégo, 1988).

Ces lésions ont deux nomenclatures selon la classification employée (Tableau 1). Dans le cadre de ce projet nous avons utilisé la classification de lésions cervicales néoplasiques intraépithéliales (CIN) de grades 1, 2 et 3 (aussi appelées dysplasie légère, moyenne et sévère) et le carcinome *in situ* (CIS). Cette nomenclature est aussi employée à l'Hôtel-Dieu de Montréal (HDM), où nous avons obtenu les données cliniques et le matériel d'analyse. Bien que la lésion CIN 3 comprenne les dysplasies sévères et les carcinomes *in situ*, les médecins de l'HDM font une distinction entre ces deux diagnostics dans les dossiers médicaux.

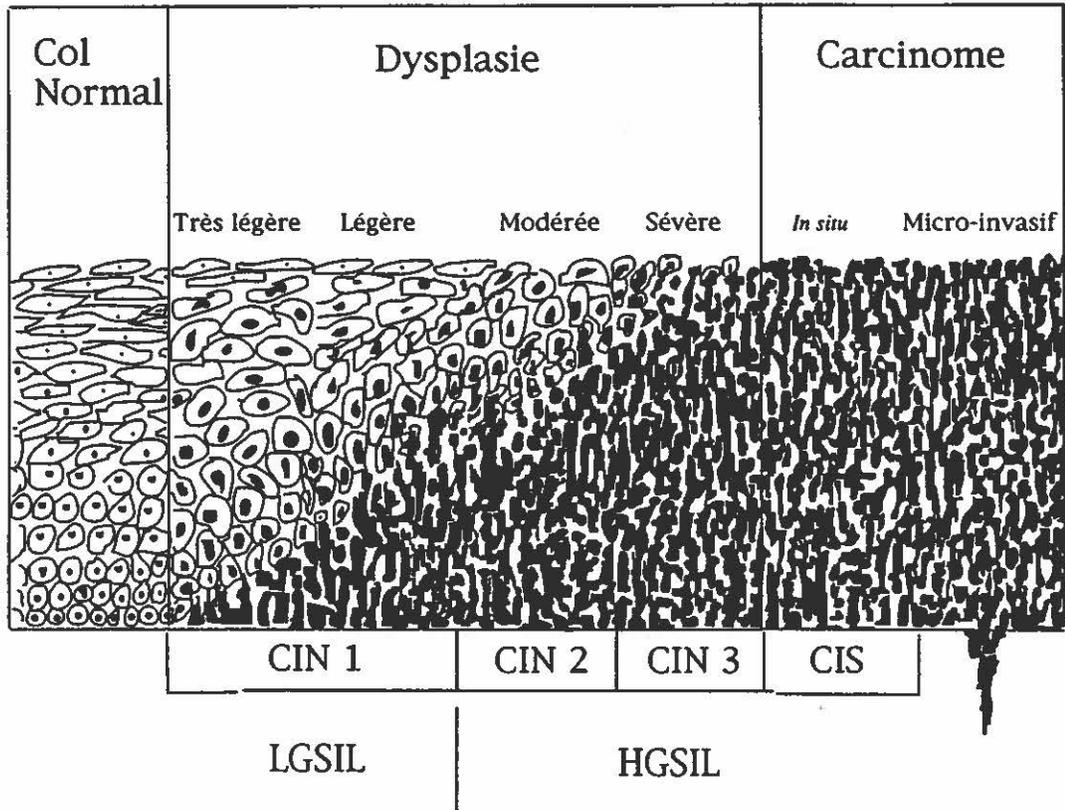
Le grade de la lésion est déterminé par le pathologiste suite à une étude histologique. Il réfère à la surface atteinte de l'épithélium cervical. Pour chaque tiers atteint, le grade augmente (Figure 3). Dans le cas d'un CIS l'épithélium est totalement différencié

(Wright *et al.*, 1994b). Au stade préinvasif, la régression de la lésion demeure possible. Le cancer du col est curable à 100% au stade CIS. Toutefois, s'il y a rupture de la membrane basale on parle alors de lésion invasive (Figure 3), la progression de la maladie est irréversible (Franco, 1991b) et la guérison de la maladie incertaine.

Tableau 1: Nomenclature des lésions préinvasives cervicales: ancienne et nouvelle classification Bethesda. (Adapté de Franco, 1993)

Nomenclature de lésions préinvasives	
Ancienne	Nouvelle (Bethesda)
CIN 1	Lésion intraépithéliale pavimenteuse de bas grade (LGSIL)
CIN 2 CIN 3 CIS	Lésion intrépithéliale pavimenteuse de haut grade (HGSIL)

Figure 3: Représentation schématique d'une coupe histologique du col à l'état normal et atteint d'une lésion néoplasique (Adapté de Meijer *et al.* 1992)



4. TRAITEMENTS

Une fois une lésion diagnostiquée, différents traitements sont possibles. En plus des préférences de la patiente, les paramètres cliniques à considérer sont: le grade de la lésion, sa taille et sa situation topographique.

4.1 Cryothérapie

Ce traitement est généralement utilisé pour le traitement de lésion de grade 1 ou de très petites lésions plus sévères (CIN 2 ou CIN 3). Il consiste à geler, pour une période de deux à trois minutes et décongeler la région avec de l'oxyde d'azote entraînant la destruction des tissus (Crisp *et al.*, 1967).

Selon Andersen et Husth (1992) qui ont suivi des patientes pendant dix ans, les risques augmentent lorsque la lésion s'étend jusqu'à l'endocol, ce traitement est d'ailleurs contre-indiqué dans ces situations. Les risques de récurrence chez les patientes ayant recours à ce traitement seraient aussi plus élevés chez celles diagnostiquées pour un CIN 3 comparativement à un CIN 2. Cette équipe a également observé un taux significativement plus élevé de lésions persistantes durant la première année (8,8%) alors que le taux de récurrence chute à 0,8% de la sixième à la dixième année de suivi médicale. Ces résultats sont incompatibles à ceux obtenus par Richart *et al.* en 1980 où la sévérité de la lésion traitée n'a pas influencé le risque de récurrence et que ce risque demeure aux environs de 0,4% à 5, 10 et 14 ans après traitement. Aussi, Andersen et Husth n'ont observé aucun lien entre l'âge et le

taux de guérison contrairement à Hemmington *et al.* (1981) qui ont pu démontrer une augmentation significative de guérison chez les patientes âgées de moins de 30 ans.

4.2 Vaporisation au laser

Cette procédure conduit aussi à la destruction tissulaire par vaporisation cellulaire. Un rayon laser de 500-1000 watts/cm² est dirigé sur la lésion à éliminer. Celle-ci peut être de grade CIN 1, CIN 2 ou CIN 3 et même CIS selon sa taille.

Higgins *et al.* (1990) ont observé un taux de succès dès le premier traitement de 89% (temps moyen du suivi = 18 mois) et de 100% chez celles qui ont eu recours à une deuxième thérapie. Le facteur déterminant de cette méthode semble être la taille de la lésion. Ils n'ont observé aucun lien entre le succès de cette méthode et l'âge, le nombre de grossesse, la parité, le moyen de contraception utilisé ou la présence de koilocytes.

Les avantages de cette méthode de traitement sont sa précision, l'accord favorable de la patiente, la cicatrisation rapide permettant une évaluation adéquate par colposcopie après traitement (Popkin, 1983 ; Baagish, 1982 ; Stein *et al.*, 1985 ; Burke, 1982 ; Benedet *et al.*, 1981).

4.3 Conisation

C'est le traitement le plus radical, il est surtout utilisé pour des lésions CIN 3 et CIS. Cependant une lésion moins sévère avec extension dans le canal de l'endocol sera aussi traitée de cette façon. La région affectée est excisée au-delà de ses marges au bistouri ou au

laser. Le spécimen est envoyé en pathologie pour fins d'analyse des marges chirurgicales pour confirmer ou exclure la présence de cancer invasif (Richart, 1987).

Alors que le taux de guérison observé avec cette méthode par Yliskoski *et al.* (1991) se situe à 82,7% (temps moyen du suivi = 31,9 mois), l'équipe de Vergote *et al.* (1992) ont noté un taux de 97% (temps moyen du suivi = 30 mois) avec un taux de 100% après un deuxième traitement.

Le facteur déterminant de la récurrence serait l'extension de la lésion jusqu'au canal endocervical (Andersen *et al.*, 1994 ; Demopoulos *et al.*, 1991). L'équipe d'Andersen n'a observé aucune influence due à la sévérité de la lésion.

L'avantage de cette méthode sur les deux autres est qu'elle permet d'obtenir un spécimen dont l'histologie peut être comparé avec le diagnostic initial.

5. FACTEURS INFLUENÇANT LES RISQUES DE LÉSIONS CERVICALES

La manifestation d'une lésion est l'aboutissement d'un processus complexe.

Plusieurs facteurs sont reliés aux lésions préinvasives et au cancer du col de l'utérus.

Certains agissent de façon indépendante alors que d'autres semblent être reliés ou induisent la présence d'un second facteur. Nous présentons, ci-dessous, les différents facteurs étudiés et leur rôle soupçonné dans le développement de la maladie.

5.1 Régime alimentaire

La difficulté de l'étude du régime alimentaire en relation avec l'incidence de lésion cervicale est une question de quantification. L'évaluation de ce facteur peut être faite soit par la consommation des aliments eux-mêmes tels: fruits, légumes verts foncés, jus de fruits, viandes etc. ou encore par la mesure des nutriments qu'ils contiennent, les vitamines A, C et E, la β -carotène et l'acide folique étant parmi les plus étudiés dû à leur capacité d'antioxydant (Willet *et al.*, 1984a et b ; Wassertheil-smoller *et al.*, 1981 ; Ames, 1983 ; Bjelke, 1975).

Si le deuxième choix semble plus logique, encore reste-t-il d'autres paramètres à peser. La valeur d'un nutriment est quantifiée d'après un index de conversion. Or cet index peut varier selon l'année de l'étude (Paganini-Hill *et al.*, 1987) et le pays où celle-ci a été effectuée (Takahashi, 1984). Ajouter à cela la perte de nutriments occasionnée lors de la préparation des aliments et que leur absorption par l'organisme se fait différemment selon

l'aliment dont ils sont issus (VanEenwyk *et al.*, 1992 ; Paganini-Hill *et al.*, 1987) et l'on se retrouve avec une situation où la quantité de nutriment évalué par questionnaire peut diverger de beaucoup de la quantité retrouvée dans l'organisme. Il n'est donc pas surprenant que bons nombres d'études se contredisent.

L'étude de Ziegler *et al.*, en 1990, sur la consommation de 75 aliments a pu montré une variation des risques uniquement en relation avec le complexe de carbohydrates évalué dans les aliments ingérés. Brock *et al.* (1988) ont noté une diminution de 80% des risques entre le quartile le plus élevé vs le plus bas de β -carotène sanguin, $p = 0,02$. Une étude a pu démontrer un effet protecteur de l'acide folique administré en dose thérapeutique chez les femmes utilisant des anovulants (Butterworth *et al.*, 1982). En 1992 Butterworth *et al.* ont observé qu'une faible quantité de folate dans le sang accentuait l'effet des autres facteurs de risque en particulier l'infection par HPV 16.

En 1991, une étude, à deux volets sur le régime alimentaire a calculé sur les mêmes sujets les indicateurs alimentaires (Herrero *et al.*, 1991) et les indicateurs sériques (Potischman *et al.*, 1991). Dans un premier temps, une baisse non négligeable des risques de cancer invasif fut observée chez les femmes dont le régime avait une haute teneur en vitamine C, en β -carotène ou pour d'autres caroténoïdes . Au deuxième volet ils ont observé une diminution des risques correspondant à une quantité de β -carotène sérique plus élevée mais non pour les autres caroténoïdes. Ces chercheurs ont aussi remarqué une hausse significative des risques associés à une quantité plus élevée de γ -tocophérol.

En conclusion, bien que ce facteur pourrait expliquer, dans certains pays, les

variations régionales de fréquences observées pour cette maladie, la question des nutriments ayant un effet protecteur demeure sans réponse claire.

5.2 Immunodéficience

Cet état peut être engendré de plusieurs façons: par une grossesse, l'usage d'anovulants, la cigarette ou encore dû à l'état de santé. Certains chercheurs ont observés une association entre une baisse de cellules de Lagerhans et l'infection par HPV et la manifestation clinique de lésions cervicales (Revue par Koutsky *et al.*, 1988). Chez les patientes ayant subi une transplantation rénale on observe un risque accru de lésions précancéreuses et invasives anorectales de même que de lésions cervicales (Schneider *et al.*, 1983 ; Wright *et al.*, 1994a). Les patientes immunodéficientes sont plus aptes à développer des lésions persistantes (Schneider *et al.*, 1987b). Silman *et al.* (1984), considèrent que le comportement des CIN chez ces patientes serait une version accélérée de l'effet à long terme de ces lésions chez les femmes immunocompétentes. La prévalence des infections par HPV est plus élevée chez les patientes séro-positives pour le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Schafer *et al.*, 1991 ; Wright *et al.*, 1994a). Cette action se ferait par l'affaiblissement des défenses de l'hôte par HIV permettant aux papillomavirus d'exprimer leur potentiel oncogénique. La progression du déficit immunitaire est fortement relié aux lésions cervicales causées par HPV (Maiman *et al.*, 1990 et 1991; Schafer *et al.*, 1991).

5.3 Parité

Ce facteur est particulièrement frappant dans les pays en voie de développement, où le nombre de femmes multipares est élevé. Ceci entraîne de graves conséquences dans ces populations au sein desquelles ces mères jouent un rôle important au niveau de l'éducation et de la transmission des valeurs sociales.

Les risques de cancer augmentent selon le nombre de grossesses et si l'intervalle entre deux grossesses est court (Mukherjee *et al.*, 1994). Une importante étude effectuée aux États-Unis a détecté une augmentation significative des risques de 2.2 fois chez les femmes ayant au moins 5 enfants comparativement à celle ayant donné naissance à un seul enfant (Brinton *et al.*, 1987). Dans cette même étude, aucune association n'a pu être démontrée avec le nombre d'avortement de nature spontanée ou non et le nombre de morts-nés.

Le mécanisme d'action demeure inconnu mais le taux de positivité de la présence du virus HPV augmenterait, graduellement et de façon significative, avec le nombre de grossesses (Gopalkrishna *et al.* 1995) et selon la période de gestation (Schneider *et al.*, 1987a ; Gopalkrishna *et al.* 1995),. Donc la relation entre la parité et le cancer cervical invasif pourrait être interprétée de deux façons. D'abord, la grossesse pourrait induire une immunodéficience locale qui augmenterait le potentiel oncogénique de virus tel HPV (Shingleton *et Orr*, 1983). En second lieu, par la modulation des récepteurs hormonaux présents sur les cellules néoplasiques qui pourrait favoriser la hausse de la réplication virale ou la persistance virale (Hunter *et al.*, 1987 ; Twiggs *et al.*, 1987).

5.4 Tabac

L'effet du tabac varie selon la dose, la durée de l'utilisation et le temps depuis l'arrêt. Des dérivés de nicotine ont été retrouvés dans les muqueuses cervicales de fumeuses (Shiffman *et al.*, 1987). Une étude effectuée en 1986 a démontré que le tabac, allié à un nombre élevé de partenaires sexuels et non à l'usage d'anovulant ou le coïtarche, constitueraient les facteurs à risque les plus importants. En effet dans cette étude, 70% des cas atteints d'un CIN fumaient contre 40% des témoins (Hellberg *et al.*, 1986).

Parmi la multitude de dérivés chimiques constituant la fumée de cigarette on a pu démontrer un effet carcinogène par plus de 40 (Hoffman et Hecht, 1990 ; IARC, 1986). Leur activité biologique se traduit par leur interaction covalente avec l'ADN cellulaire. Les propriétés du tabac en tant qu'inducteur carcinogénique peuvent être mesurées par la présence de ces liaisons covalentes entre les carcinogènes et l'ADN nommés «adducts» (Phillips *et al.*, 1990a).

Il a été établi que l'exposition de l'épithélium des bronches aux composés cancérigènes, induit la formation de tumeurs (Doll et Peto, 1978). La recherche en biologie moléculaire a démontré une présence d'«adducts» d'ADN apparentés au tabagisme plus élevé au niveau du col de l'utérus des fumeuses (Simons *et al.*, 1995 ; Phillips *et al.*, 1990b).

Dès 1984 Zur Hausen *et al.* ont soulevé la possibilité d'une interaction synergique entre HPV et le tabac. Toutefois Simons *et al.*, en 1995 n'ont pas observé de différence significative entre les fumeuses HPV positives et les fumeuses HPV négatives, réfutant

le modèle synergique et appuyant plutôt un rôle cancérigène indépendant ou l'hypothèse de Barton *et al.* (1988), selon laquelle le tabac induirait une immunosuppression locale, facilitant la pénétration virale. Ce facteur peut aussi être considéré comme un «counfounder» de la contraception puisqu'il est contre-indiqué aux fumeuses âgées de 35 et plus d'utiliser les contraceptifs oraux (Kols *et al.*, 1982).

5.5 Contraception

Des études ont démontrées une incidence de dysplasie cervicale ainsi que de carcinome invasif plus élevée chez les femmes employant les contraceptifs oraux par rapport à d'autres moyens de contraception (Brinton, 1991). Deux études de type «population-based» ont trouvé un risque relatif de 2 à 8 fois plus élevé pour développer un adénocarcinome de l'endocol chez les patientes utilisant les contraceptifs oraux pour une durée de huit ans et plus (Kjær et Brinton, 1993). Ce lien est biologiquement possible puisque l'on retrouve des récepteurs hormonaux dans le tissu cervical et que les anovulants peuvent induire l'hyperplasie cervicale (Brinton, 1991). Le développement des tumeurs épithéliales HPV-16 positives chez la souris expérimentale sous l'influence de progestatifs et des oncogènes endogènes activés expliquerait au moins en partie les observations épidémiologiques (Pater et Pater, 1985). Les équipes Postic *et al.* (1978) et Singh *et al.* (1976) ont observé un nombre moins élevé de cancer chez les femmes faisant usage de spermicides possiblement à cause d'un effet virocide, i.e. qu'ils inactiveraient les particules virales comme herpes simplex-2 ainsi que d'autres agents responsables de

maladies transmises sexuellement. Aussi, chez les femmes dont le partenaire porte un condom lors des relations sexuelles, il y aurait diminution des risques due à la barrière physique protégeant l'épithélium.

Le type de moyen anticonceptionnel (intra-utérin, vaginal, oral ou autre) utilisé pourrait aussi influencer le risque associé au cancer du col de façon indirecte. En effet, les moyens de contraception obtenus sous ordonnance tels les anovulants, stérilet et diaphragme, nécessitent la visite chez un médecin où l'occasion de passer un test Pap se présenterait plus facilement, contrairement à d'autres méthodes comme le condom et les crèmes spermicides (revue par Celentano, 1987).

5.6 Fréquence du test Pap

Ce facteur est bien entendu intimement lié au précédent. L'évaluation du programme de dépistage mis en œuvre dans les années 60 en Finlande, Suède et Islande (80% de participation) démontra une baisse du cancer cervical d'environ 50% au cours des 20 années suivantes. Diamétralement opposées sont les observations en Norvège où le programme fut instauré dans une seule région avec 5% de participation (Johannesson *et al.*, 1978), l'incidence du cancer invasif reste élevé de façon similaire aux pays où le dépistage par la cytologie n'a pas été pratiqué.

5.7 Activité sexuelle

Les moyens de contraceptions et la fréquence du test Pap peuvent être reliés à un

dernier facteur qui est le plus convaincant de tous: l'activité sexuelle. Ce facteur est mesuré le plus souvent à l'aide de deux paramètres, soit: l'âge à la première pénétration (coïtarce) et le nombre total de partenaire. Cependant certains chercheurs ont étudié son effet cumulatif en considérant aussi le vécu sexuel du partenaire (Agarwal *et al.*, 1993 ; Buckley, 1981).

Le vécu sexuel du partenaire a aussi fait l'objet d'un certain nombre d'études. Selon Slattery *et al.* (1988) le risque associé de la part de son partenaire actuel, a avoir eu de nombreuses compagnes, équivaut le risque d'un nombre total élevé de partenaires sexuels.

Ceci dit, pour qu'un microorganisme soit directement associé au cancer du col de l'utérus celui-ci devrait être transmissible sexuellement.

6. HISTORIQUE DE L'ÉTIOLOGIE DU CANCER CERVICAL

Puisque le cancer du col suit l'épidémiologie d'une maladie transmise sexuellement (M.T.S.), plusieurs agents transmissibles par cette voie ont été étudiés en vain, tels les spermatozoïdes et les résidus du fluide séminal (Pratt-Thomas *et al.*, 1956 ; Malhotra, 1970 ; Heins *et al.*, 1958).

6.1 Origine bactérienne

Divers agents bactériens ont également fait l'objet d'un certain nombre d'études tels: *Chlamydia trachomatis* (Allerding *et al.*, 1985 ; Harnekar *et al.*, 1985) et *Trichomonas vaginalis* (Meisels, 1969). Bien que ces études cytologiques rétrospectives aient noté une incidence plus élevée d'infection bactérienne chez les femmes ayant éventuellement développé une néoplasie ou une dysplasie sévère, il persiste un manque significatif de corrélation entre la détection par culture bactérienne et les méthodes cytologiques ou immunologiques (Dorman *et al.*, 1983 ; Forster *et al.*, 1983)

6.2 Origine virale

D'autres chercheurs ont tenté d'associer cette maladie à un agent viral tel que le cytomégalovirus, sans pouvoir y trouver de lien. Les recherches sur le virus herpes simplex-2 (HSV-2) amenèrent des résultats intéressants et l'on crut avoir trouvé le coupable, toutefois sa présence dans une faible proportion de tumeurs cervicales et la perte de

l'ADN d'HSV après seulement quelques passages *in vitro* contribuèrent à mettre en doute son rôle comme agent étiologique principal (Revue par Franco, 1991b). Néanmoins, son rôle en temps que cofacteur demeure possible (Hildesheim *et al.*, 1991 ; Pfister et Fuchs, 1991). Par contre, les arguments liant le virus du papillome humain au cancer du col utérin sont très convaincants: HPV a été retrouvé chez jusqu'à 95% des carcinomes cervical (Bosch *et al.*, 1995). La protéine virale E6 se lie et dégrade la protéine p53 (Werness *et al.*, 1990). Cette protéine tient un rôle prépondérant dans le maintien de la régulation cellulaire (Revue par Culotta et Koshland, 1993). La protéine virale E7 se lie à un autre anti-oncogène, soit la protéine p105 du gène du rétinoblastome (Dyson *et al.*, 1989 ; Scheffner, 1992). Aussi la transfection de cellules *in vitro* entraîne-t-elle leur transformation en cellules malignes (Bedell *et al.*, 1987 ; Hawley-Nelson *et al.*, 1989) et les anomalies histologiques induites par HPV-16 observées par McCance *et al.* (1988) par leur modèle de culture cellulaire sur radeau de collagène sont semblables à celles retrouvées *in vivo*.

6.3 Épidémiologie virale

Avant d'accepter un agent comme facteur étiologique principal du cancer du col utérin, celui-ci doit répondre aux critères épidémiologiques de causalité. Soit: une association robuste, rigoureuse et spécifique entre le facteur et la maladie; une suite logique dans le temps; enfin, une cohésion avec les notions accumulées sur la maladie (Shiffman *et al.*, 1993).

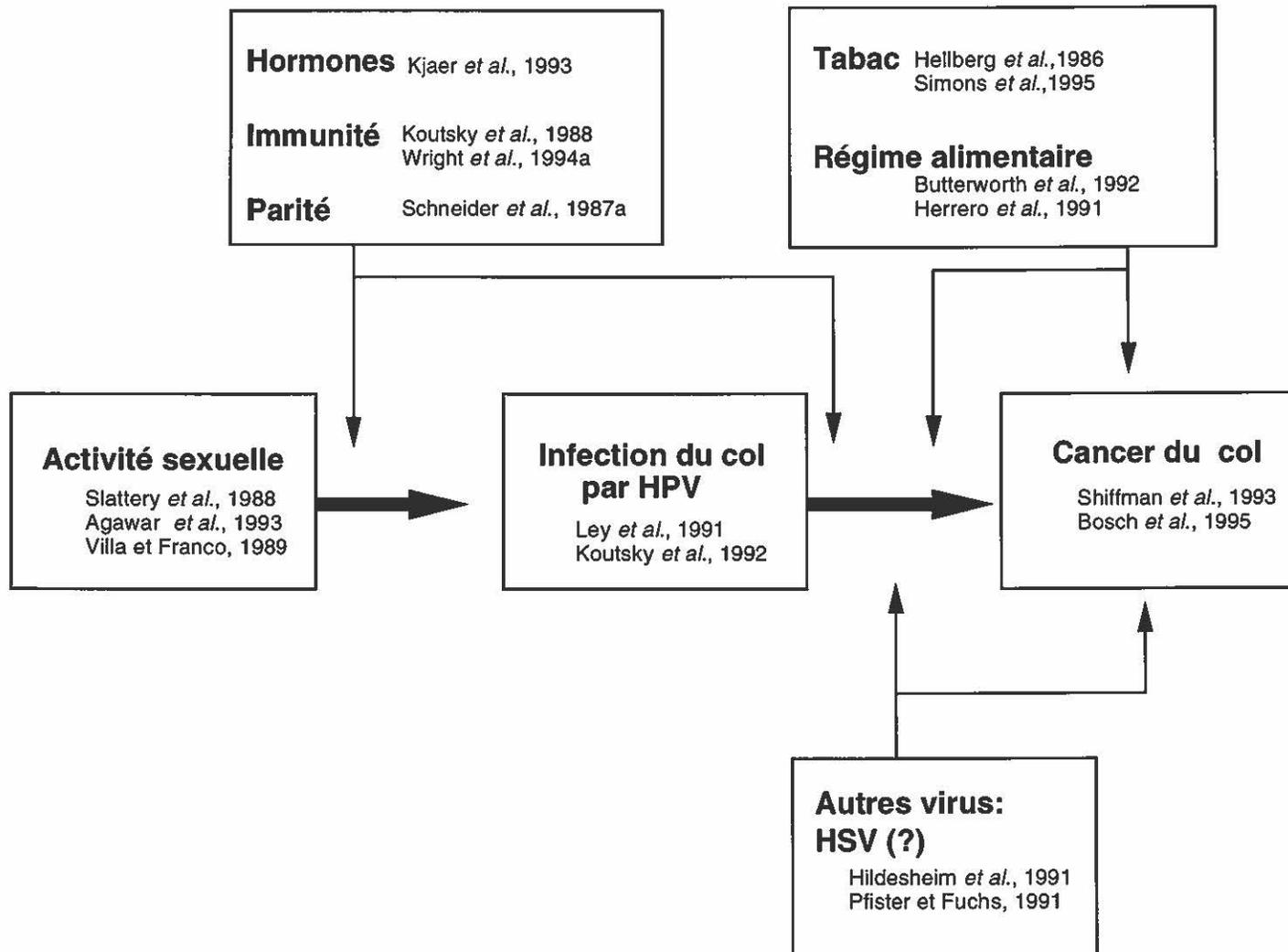
Un nombre impressionnant de travaux ont documenté l'association entre le virus du papillome humain et le cancer du col. Puisque les résultats obtenus sont fortement dépendant de la méthode d'échantillonnage et de détection de l'ADN (Shiffman, 1992), les premières études n'ont pas permis d'établir de relation entre l'infection virale et la maladie. En 1991, Franco (a) a démontré comment l'utilisation de moyens de détection moins précis introduisait un biais vers l'hypothèse nulle i.e. vers une absence d'association. Des études utilisant des méthodes plus précises ont démontré un lien hautement significatif (Revue par Muñoz, 1992). Une études de Koutsky *et al.* (1992) estime qu'un risque relatif (RR) d'au moins 30 associe HPV aux lésions intraépithéliales de grade modéré à carcinome *in situ*, alors que Shiffman *et al.* en 1993 ont observé un RR de 50. De plus, deux travaux (Barasso *et al.*, 1987 ; Schneider *et al.*, 1987b) ont noté une corrélation entre l'infection par HPV chez les hommes et la dysplasie chez leur partenaire. En 1992, Koutsky *et al.* ont mis en évidence l'association temporelle entre l'infection virale et le développement de CIN 2 et CIN 3. Une forte corrélation a déjà été observée entre l'infection et le comportement sexuel (Ley *et al.*, 1991), plus précisément certains de ces paramètres tels : le coïtarche, le nombre de partenaire et les habitudes sexuelles (Villa et Franco, 1989). Finalement, les propriétés oncogénique de certains types d'HPV, mentionnées ci-haut et dont nous discuterons plus tard avec plus de détails, ainsi que la plus importante étude épidémiologique effectuée sur le sujet (Bosch *et al.*, 1995) ont suffi par nous convaincre du rôle primordial de papillomavirus dans l'évolution de cette maladie (Figure 4).

Il demeure toutefois une minorité de cancers cervical HPV négatifs. Leur proportion

se situe aux environs de 10% et ils auraient un pronostic plus défavorable que les lésions positives (Crook *et al.*, 1992; Scheffner *et al.*, 1991; Higgins *et al.*, 1991 ; Riou *et al.*, 1990).

Une étude effectuée à Montréal par le groupe de Franco *et al.* (1996c) suggère aussi un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer HPV négatif. Il reste à savoir s'il s'agit de cancers ayant vraiment une étiologie différente (e.g. mutation somatique des anti-oncogènes) ou, encore une fois, d'une limite d'ordre technologique.

**Figure 4: Modèle proposé des principaux facteurs étiologiques
 (Adapté de Franco, 1993)**



7. LE VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN

Ce virus est de la famille des papovaviridae. Puisque auparavant, les critères de classification étaient plutôt vagues - particule virale non enveloppée ayant une capsidie icosaédrique de 40 à 55 nm de diamètre et dont le génome est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire de 6 à 8kpb - les membres de cette famille virale sont très différents l'un l'autre. Les Papovaviridés comprennent donc les polyomavirus, les virus vacuolants et les papillomavirus (PV) dont fait partie le virus du papillome humain (HPV).

Ce genre très hétérogène comprend plus de 70 types ayant un tropisme pour les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses (Jawetz *et al.*, 1989 ; Howley, 1990). HPV est un virus à ADN bicaténaire circulaire contenant de 7,2 - 8 kpb. Il possède une structure génomique simple de 6-8 cadres de lecture, dont 4-6 gènes précoces et 2 gènes tardifs, en plus d'une région non codante (fig. 5). Ceux-ci sont tous situés sur le même brin d'ADN et se chevauchent en certains endroits. La possibilité de fusion et d'épissage à différents endroits donne naissance à plus de protéines qu'il n'y a de cadres de lecture.

Afin de pouvoir compléter son cycle, le virus nécessite la présence de cellules différenciées d'où le problème de sa culture *in vitro*. La recherche sur le virus du papillome humain n'a subi un essor qu'à l'arrivée du génie génétique moderne. Grâce au clonage il fut dès lors possible d'analyser et comparer les divers types d'HPV. En 1993, le comité de classification des papillomavirus déclara que pour qu'un HPV soit reconnu comme un nouveau type, la séquence nucléotidique des gènes précoces E6 et E7, et du gène tardif L1

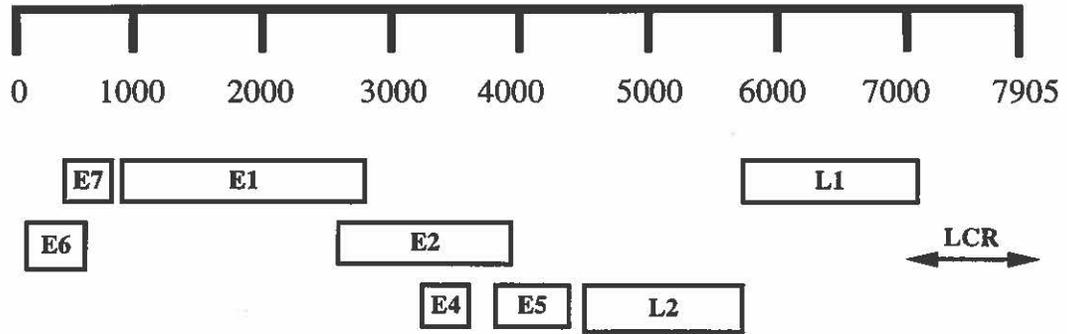
devait varier d'au moins 10% (Van Ranst *et al.*, 1993).

**Figure 5: Carte génomique du virus du papillome humain type 16
(Adapté de Young *et al.*, 1992)**

Gènes précoces: E1, E2, E4, E5, E6 et E7

Gènes tardifs : L1 et L2

Région non codante: LCR



7.1 Cycle viral

Les papillomavirus ont un tropisme pour les cellules épithéliales épidermoïdes et malpighiennes. Selon le type cependant, il y aura une spécificité pour l'épithélium cutané (peau) ou mucosal (région anogénitale) due à l'affinité des protéines capsidiques pour leur récepteur cellulaire épidermoïde.

Ces récepteurs sont situés sur les cellules basales i.e aux strates profondes de l'épithélium. Suite à l'entrée du virus, sa réplication est limitée afin de maintenir le nombre de copies à un minimum dans chaque cellule infectée. Une phase intermédiaire où la réplication de l'ADN viral s'effectue simultanément à la réplication cellulaire, assure ensuite la présence virale dans un état de latence (Orth *et al.*, 1971). L'expression des cadres de lecture reprend lors de la migration des cellules vers les couches superficielles, le niveau de réplication viral devient maximal et il y a traduction des molécules d'acide ribonucléique messenger (ARNm) en protéines capsidiques. De nouvelles particules virales sont assemblées uniquement aux strates les plus superficielles de l'épithélium (Revue par Smotkin, 1989).

7.2 Structure génomique

Vu l'impossibilité de générer de nouvelles particules virales d'HPV *in vitro* (Shah et Howley, 1990), les recherches sur les fonctions génétiques ont débuté sur les PV bovins (BPV). La fonction des cadres de lecture est présumée la même parmi les différents PV étant donné l'homologie génétique observée (Revue par Smotkin, 1989).

Le gène E1 a deux fonctions au niveau de la réplication virale. La première, pour

maintenir constant le nombre de copie à l'état épisomique (E1-M), la seconde pour la réplication active (E1-R) (Berg, *et al.* 1986). E1 semble aussi impliqué dans l'inhibition transcriptionnelle lorsque fusionné au cadre de lecture E2 (E1-M^{E2}) (Chiang *et al.*, 1991). La mutation du gène E1 entraîne une augmentation de la transcription virale (Shiller *et al.*, 1989 ; Lambert et Howley, 1988), lors d'une infection par le BPV de type 1. Les études sur le gène E1 muté d'HPV-16 ont démontré une augmentation du potentiel d'immortalisation dépendant des gènes E6 et E7 (Romanczuk et Howley, 1992). Le gène E2 exerce une fonction régulatrice tant au niveau de la réplication que de la transcription des gènes. Il maintient aussi le génome viral à l'état épisomique. In vitro la protéine de fusion E1^{E4} agit au niveau du cytosquelette et facilite le largage de particules virales par les cellules. Toutefois, ce mécanisme n'a pas encore été observé *in vivo* .

Les gènes E5, E6 et E7 codent pour des protéines de croissances (Revue par de Rosa Husman *et al.*, 1995). Les protéines E6 et E7 sont particulièrement importantes chez les virus à potentiel oncogénique élevé. Nous considérerons les protéines oncogéniques de ces deux gènes avec plus de détails dans la section 7.4.

La capside icosaédrique est formée à partir des gènes L1, qui code la protéine majeure de la capside et L2 (Baker *et al.*, 1991), qui code pour une protéine mineure dont le rôle semble être de stabiliser la structure protéique (Hagensee *et al.*, 1993). Le gène L1 est hautement conservé à travers les différents HPV. La région non codante (URR) contient l'origine de réplication et les séquences promoteur et «enhancer». Elle contient aussi de nombreux récepteurs de facteurs de transcription cellulaire et des sites de liaison.

7.3 Pathogénicité

Les membres du genre papillomavirus sont à l'origine de diverses pathologies e.g. les verrues plantaires. Environ le tiers des 70 types identifiées jusqu'à présent infecte la région anogénitale. Parmi ceux-ci on retrouve les types le plus souvent associés aux lésions vulvaires et anales, telles que les condylomes acuminés avec HPV 6 ou 11, ou le cancer du col et ses précurseurs avec HPV 16, 18, 31, 45 ou 56. Cependant le nombre de type d'HPV retrouvé au niveau du col de l'utérus ne cesse d'augmenter. Le risque associé à ces différents types est déterminé par la fréquence à laquelle un type est retrouvé dans une classe d'anomalie. Par exemple Lorincz *et al.* (1992) a pu identifier des types (6/11, 42,43 et 44) à faible potentiel oncogénique dans des lésions intraépithéliales pavimenteuses de bas grade mais aucun n'était présent dans les lésions cancéreuses. Certains types à potentiel intermédiaire (31,33,35,51,52 et 58) ont été retrouvés à la fois dans des lésions intraépithéliales pavimenteuses de haut grade et dans des cas de cancer. Cette équipe nomme aussi deux catégories d'HPV à potentiel oncogénique élevé qui sont les classes: risque élevé HPV-16 et risque élevé HPV-18. La première contient uniquement le type 16 qu'ils ont plus souvent retrouvé dans les lésions de haut grade que dans les cas de cancer. La seconde contient les types 18, 45 et 58, que les chercheurs ont identifiés dans autant de lésions pavimenteuses de haut grade que de lésions cancéreuses. Bien que le risque associé au type d'HPV varie selon certains auteurs (Lorincz *et al.*, 1992 ; Franco, 1993 ; Lungu *et al.*, 1992) et qu'il ne soit pas absolu, en ce qui concerne les types HPV 16 et 18 diverses études ont pu systématiquement leur associer un potentiel oncogénique élevé. À l'autre extrémité

de l'échelle, le pouvoir oncogénique des types 6 et 11 demeure très faible.

7.4 Oncogénicité

La protéine E6 (pE6) est constituée de 150 acides aminés parmi lesquels on retrouve 4 motifs -CXXC- associés à ses propriétés de liaison au zinc (Grossman, 1989). La pE6 des types HPV considérés à haut risque peut se lier à la protéine p53. Cette protéine agit à la phase G1 de la réplication en exerçant une suppression de croissance cellulaire lors de stress e.g. les radiations U.V. Son action permet la réparation de l'ADN. Le gène p53 peut aussi induire l'apoptose lors de stress importants (Revue par Culotta et Koshland, 1993). La formation du complexe pE6-p53 n'a pas été détecté chez les types de faible risque (Werness *et al.*, 1990). Cette liaison implique la protéine cellulaire AP (Huibregtse *et al.*, 1991).

La protéine E7 (pE7) est une phosphoprotéine nucléaire constituée de 100 acides aminés (a.a.). Ses 38 a.a. N-terminal ont une remarquable similarité aux régions 1 et 2 de la protéine E1A de l'adénovirus ainsi qu'à l'antigène T de SV40 (Phelps, 1988). Ces séquences, retrouvées chez chacun de ces virus sont impliquées dans la liaison de protéines cellulaires telles p107 et pRB (Whyte *et al.*, 1988 ; DeCaprio *et al.*, 1988). *In vitro*, pE7 facilite la dégradation de pRB et probablement d'autre protéines cellulaires. L'inhibition des fonctions des protéines cellulaires Shiller *et al.*, 1989 due à la formation de complexes pVirale-pCellulaire, explique en partie les propriétés de transformation de ces virus.

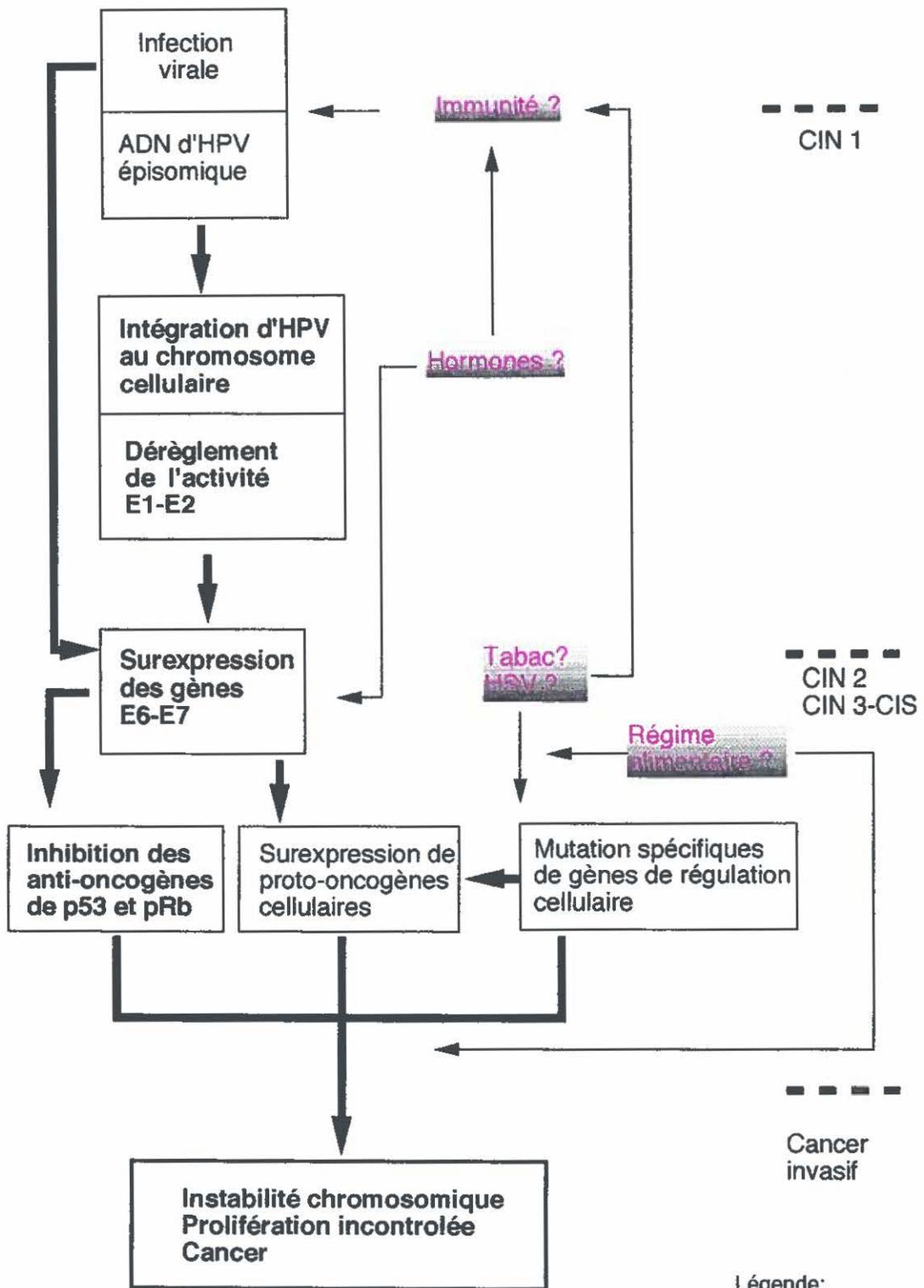
Un autre mécanisme d'attaque est la capacité de trans-activation

transcriptionnelle qu'ont les protéines E6 des types 16 et 18 (Gius *et al.*, 1989 ; Sedman *et al.*, 1991) entraînant une forte augmentation de l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux. Ces phosphoprotéines jouent un rôle important dans la réplication de l'ADN en formant une protéine hétérodimérique qui reconnaît des séquences spécifiques et régule la transcription de plusieurs gènes. En plus de cette variation quantitative, leur expression varie aussi topographiquement car leurs transcrits sont situés dans les kératinocytes au niveau basal et suprabasal des tissus normaux alors qu'il sont uniformément répartis à travers l'épithélium malade (Basset-Seguin *et al.*, 1994). La surexpression de ces proto-oncogènes induit l'activité du promoteur P97 de HPV 16 (Miwa *et al.*, 1995) qui régule l'expression de oncoprotéines E6 et E7. L'activation par les gènes *c-fos* et *c-jun* serait plus grande que celle de *c-myc*.

On suppose la progression des lésions cervicales jusqu'au cancer invasif comme suit: après un traumatisme de l'épithélium, pouvant être causé par la pénétration par exemple, HPV gagne accès et infecte les cellules des strates profondes où il peut demeurer à l'état épisomique. Une autre possibilité serait que les virus aient accès directement aux cellules basales épidermoïdes au niveau de la jonction squamo-glandulaire du col utérin. En effet, la plupart des lésions précoces se situent à cet endroit et prolifèrent de long en large de la zone de remaniement du col utérin. Cette dernière est composée de cellules épidermoïdes métaplasiques immatures, lesquelles se développent après la période post-pubère (Wright *et al.*, 1994b). Son intégration au chromosome cellulaire se fait à proximité des proto-oncogènes et occasionne le plus souvent une rupture au niveau des gènes viraux

E1 et E2. Ceux-ci jouent un rôle primordial dans la régulation des oncogènes viraux E6 et E7 (zur Hausen *et al.*, 1989 ; Pfister et Fuchs, 1991; Howley, 1991). L'expression incontrôlée de ces oncogènes mène à l'inhibition des protéines cellulaire p53 et pRb. Le dérèglement des fonctions de ces protéines anti-oncogéniques entraîne la prolifération cellulaire incontrôlée (Howley, 1991) et le cancer est déclaré (Revue par Franco, 1993, fig. 6).

**Figure 6: Modèle d'infection virale entraînant le cancer du col de l'utérus
(Adapté de Franco, 1993)**



Légende:

Cofacteurs

8. MÉTHODES DÉPISTAGE

Le diagnostic d'une lésion cervicale se fait en plusieurs étapes. Certains tests ont une approche morphologique et se font plus régulièrement que d'autres qui utilisent une méthode de détection virale.

8.1 Lésions cervicales : tests de routine

8.1.1 Frottis cervico-vaginal

Introduit en 1941 par Papanicolaou et Traut (Hatch, 1989), ce test consiste à prélever les cellules détachées ou semi-détachées de l'épithélium cervical. Dès 1949, le prélèvement par la spatule d'Ayre est préféré car l'échantillon abrasif s'avère plus adéquat au dépistage.

Familièrement appelé le test Pap, le frottis cervical constitue notre première ligne offensive au dépistage de lésions du col de l'utérus. Grâce en grande partie à ce test, la fréquence du cancer cervical a grandement diminué durant les trente dernières années. Aujourd'hui, on utilise une spatule en bois en combinaison avec une petite brosse et on prélève les cellules de l'exocol et de l'endocol. Les cellules prélevées sont fixées, colorées et examinées au microscope pour y déceler toute anomalie cytomorphologique. Le test Pap a permis d'intervenir alors que la maladie peut être contrôlée. Toutefois cette méthode n'est pas sans failles puisque environ 20% des lésions précancéreuses et 30% à 50% des lésions invasives ne sont pas détectées par le test Pap (Koss, 1989). En effet, Hildesheim *et al.*

(1994) en utilisant des techniques moléculaires (PCR) ont démontré la présence de HPV latent précédant le développement de CIN chez 35% des femmes choisies comme témoins pour raison de résultats négatifs au test PAP, dans une étude précédente de néoplasie cervicale. Les résultats de Melkert *et al.* (1993) toutefois démontrent une fréquence d'infection virale par HPV plus faible chez les personnes dont le frottis cervical est normal et qui varie de 5,4 à 14%.

8.1.2 Colposcopie

C'est en Allemagne, dès 1925 que Hinselmann a introduit cette méthode de dépistage (Hatch, 1989). Sa théorie est simple: il est plus facile de déceler une anomalie sur un col convenablement éclairé et grossi. Cette méthode fut rapidement acceptée en Europe continentale, mais non aux É.U. et en Grande-Bretagne à cause de sa terminaison difficile et des problèmes de traduction (de l'allemand).

Avec un appareil, le colposcope, il est possible au gynécologue de bien voir le col de l'utérus et la jonction squamo-cylindrique. Il peut alors visualiser certaines lésions en appliquant une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 5%. Au contact du TCA l'épithélium lésionnel a un aspect blanc suite à la coagulation momentanée des protéines cellulaires. Une expertise en colposcopie permet aussi de déceler la présence du cancer invasif précoce. Contrairement au test Pap cette méthode permet de localiser topographiquement la lésion et ainsi mieux cibler l'endroit où doivent être prélevées les biopsies pour examen histologique.

8.1.3 Biopsie cervicale (Bx) et curetage endocervical (CEC)

Dirigée par le colposcope les biopsies cervicales se font à l'exocol. Le curetage endocervical est pratiqué pour éliminer ou démontrer la présence du cancer invasif ou intraépithélial dans le canal du col utérin. La taille du matériel prélevé est mesurée, les spécimens fixés dans la formaline à 10% sont imbibés de paraffine, coupé au microtome et mis sur lame afin d'histodiagnostiquer la lésion observée.

8.2 Présence virale : tests irréguliers

Même lorsque la lésion est indécélable par ces 3 méthodes, si le virus y est présent, celui-ci demeure actif. La demande de ces tests, à l'Hôtel-Dieu de Montréal (HDM), se fait à la discrétion du médecin traitant.

8.2.1 Immunodiagnostic

Il n'existe présentement aucun anticorps spécifique au type, pour les papillomavirus. On utilise l'antisérum réagissant contre le genre HPV par réaction croisé avec l'antigène de la capsid, lequel est préparé par l'immunisation de lapins (Orth *et al.*, 1978). Il s'agit d'un test à la peroxydase qui permet de déceler la présence d'antigènes viraux.

8.2.2 Hybridation *in situ*

Puisque aucun critère immunologique, histologique ou structural n'a été établi pour

différencier les différents types d'HPV, seule l'étude du génome permet de faire le typage. Afin de déterminer le potentiel oncogénique de l'infection virale à l'HDM, la détection de virus se fait par hybridation *in situ*. D'abord, une sonde moléculaire non-spécifique, qui permet de déterminer la présence de plusieurs types d'HPV, est utilisée. Si le test s'avère positif, trois autres sondes respectivement spécifiques aux virus de type 6/11, 16/18 et 31/33/35 sont ensuite utilisées et détermineront cette fois le potentiel oncogénique du virus présent dans le but de guider le gynécologue sur la méthode de traitement à considérer.

9. MÉTHODES DE DÉTECTION DE VIRUS

Pour déterminer s'il y a présence virale ou non, on procède habituellement par culture virale. Cette approche n'est malheureusement pas possible pour HPV. Les chercheurs ont dû envisager d'autres façon d'aborder le problème comme par inférence ou par détection de séquences virales.

9.1 Approche morphologique

La présence du papillomavirus humain peut être déduite à partir des résultats colposcopiques et histologiques obtenus. Un lien a été établi entre des lésions acéto-blanches et la présence de koïlocytes. Cette réaction est hautement spécifique à l'infection par le virus (Meisels et Morin, 1976). Toutefois, la plupart des infections ne démontrent aucun changement cytomorphologique (Bauer, 1991) et l'on constate, grâce aux nouvelles méthodes de détection moléculaires, que ces conclusions à partir de résultats cytologiques, histologiques et cliniques ne sont pas très sensibles.

9.2 Génome viral

9.2.1 Hybridation *in situ* sur filtre (FISH)

Ce fut le premier test utilisé dans les études épidémiologiques à grande échelle. Les cellules de l'échantillon à analyser sont mises en suspension, placées sur un filtre de nitrocellulose puis lysées. L'ADN viral est détecté *in situ* par une sonde marquée (Wagner

et al., 1984). Cette méthode est de nos jours rarement utilisée car elle est peu spécifique et n'est pas très sensible.

9.2.2 Hybridation Southern

L'ADN purifié est digéré par des enzymes de restriction. Les brins sont séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane puis révélés par une sonde marquée. Cette technique (Southern, 1975) a l'avantage d'être spécifique et très sensible. Néanmoins, la charge de travail qu'elle implique fait qu'elle ne peut être envisagée ni dans les études à grande échelle ni en milieu de travail de façon routinière.

9.2.3 Hybridation en phase liquide (Hybrid Capture™)

Il s'agit d'un test commercial. L'ADN de l'échantillon est dénaturé et hybridé dans une solution de sonde d'HPV à ARN. Le complexe ADN-ARN est mis dans un tube tapissé d'anticorps anti-complexe ADN-ARN. Un second anticorps (anti -ADN-ARN) conjugué cette fois est ajouté. La révélation se fait par digestion enzymatique d'une substance chimioluminescente. Ce test a l'avantage d'être facile à exécuter, d'être reproductible et de permettre la quantification d'ADN viral (Cox *et al.*, 1995). Sa sensibilité et sa spécificité sont comparables au test Southern.

9.2.4 Hybridation in situ (ISH)

L'intérêt de cette technique est qu'elle permet de conserver la structure histologique

du spécimen intacte (Beckman *et al.*, 1985). Elle est utilisée surtout pour l'enseignement des jeunes médecins résidents en pathologie. Cette technique est assez spécifique pour distinguer des ARNm qui diffèrent entre eux d'une seule base (Davis *et al.*, 1989). L'ADN et l'ARN peuvent être décelés par cette technique.

9.2.5 Réaction de polymérisation en cascade (PCR)

Comparativement aux autres méthodes, celle-ci est de loin la plus sensible (Guerrero *et al.*, 1992 ; Saiki *et al.*, 1988). Théoriquement, il serait possible d'obtenir un nombre formidable de copie d'un gène à partir d'une seule copie initiale, ou encore, alors qu'il est présent en quantité insuffisante et ayant subi une trop grande dégradation pour être détecté par les autres méthodes (Resnick *et al.*, 1990). La réaction d'amplification enzymatique se déroule habituellement en trois étapes. La dénaturation de l'ADN à amplifier, l'hybridation des amorces chevauchant la région ciblée et la polymérisation i.e. la synthèse de nouvelles copies de gènes. Ces étapes forment un cycle qui est généralement répété de 25 à 40 fois. Cette méthode peut être utilisée sur des échantillons de nature très variée: frottis cervicaux (van den Brule *et al.*, 1990), matériel de biopsie congelé (zur Hausen, 1991) ou paraffiné (Claas *et al.*, 1989) et ce, sans compromettre sur la sensibilité ou la spécificité, à condition que le choix de la paire d'amorces soit judicieux. La technique peut être alliée à d'autres méthodes tels la digestion par enzymes de restriction (Lungu *et al.*, 1992) ou l'hybridation (Manos *et al.*, 1989 ; Resnick *et al.*, 1990). Dû à son extrême sensibilité l'inconvénient majeur de cette technique est la possibilité de contamination entre

les spécimens.

9.2.5.1 Tests de PCR, HPV spécifique

Plusieurs amorces ont été synthétisées pouvant déceler la présence d'un type d'HPV en particulier. Cependant, en tenant compte de l'existence d'au moins 70 différents types d'HPV, la spécificité de ces amorces conduit à la perte de la sensibilité lorsqu'il s'agit de déterminer la présence d'un large spectre d'HPV. Pour contourner cet obstacle, des amorces ciblant des régions hautement conservées ont été synthétisées.

9.2.5.2 Test PCR HPV consensus

Les amorces consensus ont été synthétisées à partir des régions hautement conservées parmi les HPV. Celles-ci sont les cadres de lecture E1 et L1. Puisque ces régions ne sont pas identiques pour plus de 12 nucléotides (Gregoire *et al.*, 1989), certains ajustements ont été faits pour permettre l'hybridation des amorces et la polymérisation du gène voulu. Ces ajustements comprennent: la production d'amorces dégénérées i.e un mélange d'amorces ayant un nucléotide différent à certaines positions (Gregoire *et al.*, 1989 ; Manos *et al.*, 1989), l'incorporation dans les amorces de résidus d'inosine (Gregoire *et al.*, 1989) et l'hybridation des amorces en des conditions moins strictes - en diminuant la température de l'étape - pour permettre une certaine variation des séquences (Snijders *et al.*, 1990).

HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Les recherches ayant pour objet l'étude de la récurrence de lésions néoplasiques se sont attardées sur deux aspects: la récurrence de cancer invasif en relation avec les caractéristiques de la tumeur et /ou de la gestion de la maladie i.e. le traitement suivi (chimiothérapie, radiothérapie, hystérectomie). Peu ont étudié la récurrence des dysplasie ou des facteurs les régissant. Vu le pronostic peu favorable une fois le cancer invasif déclaré, nous nous sommes concentrés sur des lésions bien localisées alors que celles-ci sont plus susceptibles d'être traitées.

Étant donné que pour chaque cas de cancer on compte environ 50 dysplasies et 50 lésions équivoques (Anonymous, 1994); que chacune de ces 100 lésions nécessitent la reprise du test Pap et de l'examen colposcopique; en considérant les coûts encourus et le stress éprouvé par la patiente et que nous savons maintenant le rôle important que joue HPV dans l'initiation et l'évolution de la maladie, nous pensons qu'il serait temps d'évaluer son rôle dans l'évolution clinique et d'étudier si HPV a un effet sur le pronostic. Nous avons donc émis l'hypothèse suivante :

Le virus du papillome humain présent dans les lésions préinvasives cervicales pourrait être un marqueur génétique déterminant dans les récurrences.

Nous avons vérifié cette hypothèse à l'aide de la méthode d'amplification enzymatique, et avons étudié l'ADN de biopsies paraffinées, provenant de femmes qui avaient présenté une récurrence de leur pathologie cervicale préinvasive, après avoir été

traitées antérieurement.

La technique PCR permet un dépistage rapide et spécifique du virus présent en faible quantité et de gènes à copie unique dans des échantillons cliniques, même lorsque l'ADN présent est considéré de mauvaise qualité ou en quantité insuffisante pour être étudié en utilisant d'autres méthodes. L'amplification par PCR s'applique aussi bien aux tissus fixés et paraffinés, qu'aux tissus frais ou congelés. La technologie du PCR nous permettrait donc de travailler sur du matériel archivé et de corréler nos résultats de laboratoire avec d'autres données cliniques présentes dans les dossiers.

Cette dernière technique à joindre l'arsenal du dépistage d'HPV permettra probablement, à long terme, une meilleure administration des cas.

OBJECTIFS

1. OBJECTIF GÉNÉRAL

- Étudier l'influence d'HPV sur la récurrence de lésions cervicales préinvasives par une étude rétrospective.

2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

- Sélectionner des patientes éligibles, d'après les listes de patientes ayant eu un résultat positif pour une lésion préinvasive entre 1989 et 1994, à l'Hôtel Dieu de Montréal.
- Comparer les données cliniques des patientes en rémission à celles dont la maladie a récidivé.
- Déterminer la présence d'HPV dans les lésions préinvasives cervicales par PCR.
- Comparer les résultats PCR entre les récurrences et les témoins.

3. DESSEIN DE L'ÉTUDE

Ce projet s'est déroulé en 4 étapes. À la phase préparatoire, nous avons sollicité la collaboration des médecins de l'Hôtel-Dieu de Montréal. Nous leur avons expliqué nos buts et comment leur contribution serait nécessaire à l'exécution de ce projet. À la seconde phase nous avons sélectionné les patientes, recueilli les données cliniques de leur dossier médical et demandé la sortie des blocs de pathologie.

L'étape suivante s'est déroulée au laboratoire où nous avons effectué l'analyse des blocs et déterminé la présence du virus du papillome humain. À l'étape finale, nous avons effectué différents tests statistiques afin de mesurer s'il y avait des liens entre HPV, les

données cliniques et la récursive (Figure 7).

Figure 7: Diagramme du dessein de l'étude

Consultation avec
les médecins de
l'Hôtel-Dieu de Montréal



PATIENTES



- Sélection
- Dossier médical
- Blocs de pathologie

PRÉSENCE VIRALE



- Préparation de l'ADN
- Présence d'HPV

ANALYSE STATISTIQUE

Relation { DONNÉES CLINIQUES
HPV
RÉCIDIVE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. DÉFINITION DE L'ÉTUDE

Cette étude fut menée en collaboration avec l'Hôtel-Dieu de Montréal (HDM), avec la participation des docteurs Yvon Boivin et Louis Gaboury du département de pathologie et Bernard Lambert du département de gynécologie. Il s'agit d'une étude rétrospective cas-témoin dont les patientes ont été examinées et traitées dans un hôpital du centre-ville de Montréal.

2. DÉFINITION DE LA COHORTE

La cohorte étudiée a été définie comme suit: patientes ayant été traitées à l'Hôtel-Dieu de Montréal pour une lésion de type CIN 1, CIN 2, CIN 3 ou CIS entre 1988 et 1994. Le groupe cas comprend les membres de la cohorte ayant récidivé plus de 12 mois après traitement et le groupe témoins, les membres de la cohorte n'ayant pas récidivé et dont la durée minimale du suivi médical est de 21 mois.

Les deux groupes furent appariés selon l'âge (± 5 ans), la lésion, le traitement suivi et la date (± 1 an) du traitement.

Il est à noter que bien que les lésions de grade CIN 3 comprennent maintenant les dysplasies sévères et les carcinomes *in situ*, les médecins de l'HDM font la distinction entre ces deux diagnostics. Nous avons préservé cette distinction lors de l'appariement mais nous avons regroupé ces deux lésions pour l'analyse des résultats.

3. ACCORD DU COMITÉ D'ÉTHIQUE

Avant d'avoir accès aux dossiers médicaux des archives de l'Hôtel-Dieu de Montréal il nous a fallu obtenir la permission du Comité d'Éthique de la Recherche de l'HDM afin d'utiliser les services de l'hôpital. Le comité a aussi vérifié les mesures prises pour assurer la confidentialité et la non divulgation du contenu des dossiers.

4. SÉLECTION DES PATIENTES

4.1 Données de l'Hôtel-Dieu de Montréal

L'information disponible dans la banque de données de l'Hôtel-Dieu ne remonte qu'à 1989. L'hôpital a fait parvenir, à notre demande deux séries de listes d'examens positifs pour CIN 1, CIN 2, CIN 3 et CIS entre les années 1989 et 1994. La première série, constituée de 6 listes, contenait des patientes ayant eu des examens positifs pour deux lésions de grades différents, à l'intérieur de ces 5 ans, i.e. CIN 1-CIN 2, CIN 1-CIN 3, CIN 1-CIS, CIN 2-CIN 3, CIN 2-CIS et CIN 3-CIS. La seconde série, constituée de 20 listes contenait les patientes diagnostiquées pour un seul grade de lésion par année. Les informations contenues dans ces listes étaient les suivantes : numéro de dossier, nom (nécessaire pour la sortie de dossiers), âge actuel, date du diagnostic, diagnostic et numéro de dossier interne.

4.2 Traitement des données

Cette étape a été effectuée manuellement car le logiciel Wand utilisé en milieu

hospitalier ne permet pas la conversion en logiciel IBM ou MacIntosh et que le nombre de questions pouvant lui être posé est limité et ne satisfaisait pas à nos besoins. Il a donc fallu prendre chaque liste de la première série (deux tests positifs pour deux grades différents) et vérifier l'écart entre les dates d'examen, sélectionner les patientes dont les dates étaient espacées de plus de 12 mois, puis comparer les listes entre elles afin d'être sûr que ces deux tests positifs n'en chevauchaient pas un troisième. Chez les patientes ayant plus de deux entrées à leur nom, si au moins deux de ces dates étaient espacées de plus de 12 mois, elles étaient alors sélectionnées.

Pour obtenir les patientes dont la récurrence était du même grade que la lésion initiale, nous avons pris la seconde série et avons comparé les listes de même grade de lésion mais d'années différentes. Les patientes sélectionnées de cette recherche furent aussi comparées aux 6 listes de la première série pour éviter le chevauchement de résultats d'examen positifs.

4.3 Consultation des dossiers médicaux

Une formule de réquisition de sortie de dossier fut remplie pour chacune des patientes et la consultation fut faite à l'Hôtel-Dieu. L'information pertinente à l'étude fut transcrite dans un questionnaire à cet effet (c.f. Annexe). Des 134 patientes retenues pour le groupe cas, 63 furent rejetées pour statut de faux dossiers car il ne s'agissait que d'examen ponctuels sans autre suivi et 10 autres parce qu'il n'y avait pas d'entrée indiquant le traitement.

4.4 Appariement des témoins aux cas

Des témoins potentiels furent sélectionnés à partir de la seconde série de listes et vérifiés avec trois listes de la première série selon le grade de la lésion initiale du cas à apparié. Par exemple pour une lésion CIN 2 datant de 1990, nous avons choisi des patientes âgées de ± 5 ans, ayant été diagnostiquées pour la même lésion à ± 1 an de la date de traitement, puis nous avons vérifié avec les trois listes d'exams positifs pour CIN 1 et 2, CIN 2 et 3, CIN 2 et CIS entre 1989 et 1994, si son nom y figurait, la candidate était exclue.

La consultation des dossiers nous a permis de faire l'appariement concernant le traitement, la date de ce traitement et l'âge au niveau des dates de naissance. La durée minimale du suivi médical des témoins devait être de 21 mois pour les raisons suivantes : nous avons remarqué un nombre élevé de perte de suivi seulement quelques mois après le traitement, la probabilité de perte de suivi augmente après 2 ans et la grande majorité de ces patientes furent référées et retournent chez leur médecin souvent quelques mois après le traitement.

5. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

5.1 Sortie des blocs paraffinés.

Une fois les patientes sélectionnées, nous avons procédé à la sortie des blocs de pathologie de la voûte des archives de l'HDM, d'après les numéros de pathologie (# de dossier interne) récupérés dans les dossiers car le travail ne pouvait pas être fait selon nos

critères à l'HDM.

Les blocs demandés peuvent appartenir à une des 3 catégories suivantes: bloc de la lésion initiale (I) d'un cas, bloc de la récurrence (R) d'un cas et le bloc témoin (T) apparié à celui de la lésion initiale.

Nous avons dû obtenir la permission du chef pathologiste de l'hôpital, le docteur Marcel Cadotte, avant de pouvoir sortir les blocs de pathologie et les amener à l'Institut Armand-Frappier (IAF). Nous avons ensuite transféré les blocs paraffinés d'une cassette à l'autre, les cassettes de l'hôpital n'étant pas compatibles aux microtomes du département d'histologie de l'IAF.

5.2 Coupe des blocs paraffinés

Le bloc de pathologie est placé sur le support du microtome vis-à-vis une extrémité de la lame. Des coupes de 10 μ m sont tranchées et mises dans des tubes Eppendorf. À cause de la très grande sensibilité de la réaction PCR, de strictes mesures furent exercées pour empêcher la contamination entre les échantillons. Après avoir enlevé le bloc, le support du microtome et son pourtour ainsi que le réceptacle des tranches furent nettoyés avec du p-xylène afin de dissoudre la paraffine. Pour dénaturer toute trace d'ADN nous avons procédé à un nettoyage avec du HCl 1M. Le bloc suivant est placé vis-à-vis l'autre extrémité de la lame et est coupé de la même façon que le précédent. Chaque bloc fut manipulé avec une paire de gant différente. Une fois le bloc enlevé, la lame est jetée et suit un autre nettoyage tel que décrit ci-haut.

Aléatoirement, 4 coupes de 10µm d'un bloc ne contenant pas de tissus, placé à chaque extrémité de la lame et les coupes furent mises dans des tubes Eppendorf. Ces coupes ont servi de témoins négatifs et nous ont permis de déterminer s'il y avait eu contamination lors de la coupe des blocs.

5.3 Extraction de la paraffine

La paraffine fut dissoute à 2 reprises en incubant sous agitation constante les coupes de 10µm dans 1 ml de p-xylène durant 15-30 minutes suivie d'une centrifugation de 3 à 5min à vitesse maximale (Eppendorf centrifuge 5414), le tout à température ambiante. Le p-xylène est enlevé à l'aide d'une pipette Pasteur. Suit une étape de séchage, en agitant par inversion le tube contenant l'échantillon et une centrifugation de 3-5minutes dans 0,5mL d'éthanol 100% qui est enlevé avec une pipette Pasteur. Ces deux dernières étapes sont aussi répétées une autre fois. Finalement nous avons séché sous vide (Speed Vac Concentrator de Savant) les échantillons recouverts d'un film de paraffine troué (Wright et Manos, 1990)..

5.4 Digestion du tissu

L'extraction de l'ADN fut effectuée avec de la protéinase K (40U Protéinase K, tampon PCR (2,5 mM MgCl₂), 0,5% Tween 20) en incubant 2-3 heures à 56°C puis 10 minutes à 95°C pour inactiver l'enzyme (Wright et Manos, 1990).

5.5 Contrôles cellulaires

Nous avons utilisé des contrôles cellulaires afin de déterminer la sensibilité et la spécificité de la réaction PCR. Les cellules Hela (# ATCC CCL 2) contiennent jusqu'à 50 copies du génome du virus HPV type18. Comme contrôle négatif nous avons utilisé les cellules de fibroblastes de poumon humain WI-38 (#ATCC CCL 75) (Hay *et al.*,1988).

5.5.1 Conditions de culture des cellules Hela

Ces cellules dérivées d'un carcinome épidermoïde cervical furent cultivées jusqu'à confluence à 37°C, dans des flacon de plastique T₂₅, dans un milieu 90% MEM/E: 199/H (50:50) (GIBCO, Grand Island, NY), 10% sérum de veau fœtal (SVF) (GIBCO) contenant 2mM/mL de glutamine (GIBCO), 25mM/mL hepes (GIBCO) et 50µg/mL de gentamicine (Schering, Montréal,Canada). Les cellules furent trypsinées deux fois par semaine dans une solution 0,25% trypsine/0,02% EDTA et remises en culture dans une proportion 1:8.

5.5.2 Conditions de culture des cellules WI-38

Ces cellules sont issues de cellules fœtales pulmonaires normales. Elles furent cultivées dans les mêmes conditions que les cellules Hela et trypsinées aussi deux fois par semaines dans une solution 0,25% trypsine/0,02%EDTA, mais remises en culture dans une proportion 1:2.

6. ANALYSE DES ÉCHANTILLONS

6.1 Réaction de polymérisation en cascade

Toutes les expériences ont été effectuées à partir de deux mélanges soit A (15 μ L) et B (20 μ L), pour s'assurer que la réaction ne débiterait pas avant que les tubes aient été mis dans l'appareil de cycles thermiques (PTC-100™ Programmable Thermal Controller ; MJ Research Inc., Watertown, Ma, É.-U). Ces deux mélanges furent séparés par de la cire liquide (Chill out) qui durcit à 4°C mais demeure liquide à la température de la pièce. Le mélange A contenait la moitié du volume total de tampon 10 x Taq (1,35mM MgCl₂) (Bio/Can Scientific Inc.). Ce mélange est ajouté aux 50pmol d'amorces dans le tube de réaction (PCR Rainbow tube strips ; ICN Pharmaceuticals Canada Ltd, Montréal, Qué, Canada). Après avoir mis l'ADN à amplifier (provenant de culture cellulaire, de tissus extrait ou de génome cloné dans des vecteurs), nous avons ajouté le mélange B contenant du tampon 10XTaq (Bio/Can Scientific Inc), 1 unité d'enzyme Taq Polymérase (1,35mM MgCl₂) (Bio/Can Scientific Inc.). Sur le mélange B, un volume de 25 μ L d'huile minérale fut déposé pour prévenir l'évaporation.

Sur un gel d'agarose de 1,2% (gène de la β -globine) ou 0,8% (gène L1 d'HPV) nous avons fait migré le produit d'amplification PCR dans un courant de 100V. Le gel a ensuite été coloré 5 minutes dans un bain de bromure d'éthidium 0,5 μ g/mL et décoloré dans de l'eau distillée pour éliminer le bruit de fond lors de la visualisation et de la prise de photo sous rayons ultra violet (U.V.)

6.2 Amorces

L'analyse des échantillons a été réalisé en deux étapes et a nécessité deux paires d'amorces.

6.2.1 Amorces ciblant le gène de la β -globine

Afin de nous assurer de la qualité des échantillons et de l'ADN extrait nous avons d'abord amplifié le gène de la β -globine (268pb) avec les amorces suivantes:

GH20: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

et PC04: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

respectivement complémentaires au brins positif et négatif (Saiki *et al.*, 1985). La réaction fut complétée en 40 cycles, la dénaturation durant 1 minute à 94°C, l'hybridation 1 minute à 56°C et la polymérisation s'effectuant pendant 1 minute à 72°C. Tous les échantillons furent systématiquement analysés à l'aide de cette paire d'amorces et la recherche de d'ADN viral fut effectuée uniquement sur les échantillons positifs.

6.2.2 Amorces consensus GP5+ et GP6+ ciblant HPV

Pour déterminer la présence du virus HPV nous avons amplifié l'ADN de nos échantillons avec les amorces suivantes:

GP5+: 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3'

et GP6+: 3'-CTT ATA CTA AAT GTC AAA TAA AAG-5'

(de Rosa Husman *et al.*, 1995), ciblant la région L1 du génome viral (140-150pb). Celle-ci est hautement conservée à travers la famille d'HPV (Snijder *et al.*, 1990). Ces amorces consensus ont différents degrés d'homologie avec cette région selon le type du virus (Tableau 2).

Tableau 2: Homologie de séquence entre les amorces GP5+ et GP6+ et leur site d'appariement de la région L1 des différents types dHPV (Adapté de de Rosa Husman, 1995)

Amorces												
GP5+ 5' - TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC - 3'												GP6+ 3' - CTT ATA CTA AAT GTC AAA TAA AAA G - 5'
HPV-6BC	..			
HPV-11C	..			
HPV-13A	..T			
HPV-16T	..T			
HPV-18C	..			
HPV-30T	..G	..C	..C			
HPV-31C			
HPV-32	...	C.AT	..G			
HPV-33C			
HPV-34	...	T.AT			
HPV-35A	..TA			
HPV-39	...	C..T	..G	..C			
HPV-40A	..TC	..C			
HPV-42	...	T.AT			
HPV-45A	..G	..C			
HPV-51	...	A..	..C	TGT	..T			
HPV-52C	..A	..T	..GC			
HPV-53AT	..GC			
HPV-56A			
HPV-58CTC			
HPV-61A	..C	..T	..GC			
HPV-66T	..G			
ME180	...	C..T	..GC			
HPV-6B	..CT			
HPV-11	..C	.A.			
HPV-13A.T			
HPV-16			
HPV-18C			
HPV-30T	C.C	...			
HPV-31A.TT	...			
HPV-32	T..T	...			
HPV-33	G..	C..	...			
HPV-34	..CG	G.C	C.C	...			
HPV-35			
HPV-39	..CTT	...			
HPV-40	..C	.A.C			
HPV-42	C.C	..TT	...			
HPV-45			
HPV-51	..CT	..C	..T			
HPV-52A.T			
HPV-53TT	C.C	...			
HPV-56TT	C..	...			
HPV-58G	C..	...			
HPV-61	..C	.A.C	..T			
HPV-66T	G..	C.C	...			
ME180C	..TT	...			

La réaction de polymérisation fut effectuée dans un volume final de 50µL contenant 200mM de dATP, dTTP, dGTP et dCTP, 1,0 unité de Taq polymérase, KCl, MgCl₂, 50pmol de chaque amorce et 10µL d'ADN. La réaction fut complétée en 40 cycles précédés d'une période 5 minutes à 95°C. La dénaturation durant 1 minute à 95°C, l'appariement, 2 minutes à 40°C et la polymérisation, 1 minutes 30 secondes à 70°C avec une augmentation d'une seconde à chaque cycle. Au dernier cycle le temps de polymérisation fut augmenté à 4 minutes. Après migration dans un gel d'agarose 0,8% (c.f. section 6.1), l'ADN fut transféré sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert Southern sera expliqué avec plus avec détails dans une section à cet effet.

7. PRÉPARATION DE LA SONDÉ MOLÉCULAIRE

Nous avons confirmé les résultats obtenus par PCR avec une sonde moléculaire marquée à la digoxigénine. Cette sonde était constitué d'un mélange de produits PCR obtenus par amplification avec les amorces GP5+/GP6+, de différents types de génome HPV insérés dans des vecteurs.

7.1 Plasmides clonés de génome viral.

Nous avons pu obtenir 6 plasmides clonés avec les génomes suivant: HPV 31, du laboratoire du docteur A. Lörincz (Digene Diagnostic, Inc., Silver Spring, MD, É.-U), HPV 6, 11, 16 et 18 du laboratoire du docteur de Villiers (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Allemagne), et du laboratoire du docteur Orth (Institut Pasteur, Paris, France)

nous avons obtenu HPV 33. Les plasmides furent dilués dans du tampon TE pH 7,4 (5ng/ μ L).

7.2 Transformation des cellules *Escherichia coli* (*E. coli*)

La transformation de *E. coli* XLI blue fut réalisée par la méthode de chlorure de calcium (Ausubel *el al.*, 1987). L'exposition des ions calcium induit l'état de compétence aux bactéries leur permettant d'introduire de l'ADN.

En résumé, une culture en milieu LB liquide est cultivée jusqu'à sa phase logarithmique. Après une centrifugation de 7 minutes à 3000 rpm à une température de 4°C. Le culot bactérien est suspendu dans une solution de CaCl_2 1M froide et centrifugé de nouveau 5 minutes à 2500 rpm à 4°C. Le culot récupéré est resuspendu dans la solution de CaCl_2 , puis incubé à 4°C pendant la nuit afin d'augmenter le rendement. Les cellules compétentes (100 μ L) sont mises en contact avec 15 ng de plasmides clonés d'ADN viral. Un choc thermique de 2 minutes dans un bain d'eau circulante de 42°C permet l'entrée de L'ADN. Les cellules sont incubées 1 heure à 37°C afin de permettre aux cellules d'exprimer le gène de résistance à l'ampicilline contenu dans le vecteur. Des dilution $1/_{10}$ de la culture sont mises en culture sur milieu sélectif SOB 15% agar (50 μ g/ml ampicilline) et gardées à 37°C pendant la nuit. Comme contrôle nous avons utilisé des cellules non transformées et des cellules transformées avec une quantité connue (50ng) de pBR 322.

Une colonie de bactéries transformées est ensuite sélectionnée et amplifiée dans du milieu LB.

7.3 Confirmation de la transformation bactérienne.

Selon le protocole de Sambrook *et al.* (1989), nous avons cultivé les bactéries transformées dans un milieu SOB 15% agar contenant 50µg/mL d'ampiciline et les bactéries non transformées dans un milieu SOB agar 15% agar contenant 12µg/mL de tétracycline jusqu'à ce que le diamètre de la colonie soit d'environ 1mm.

Une partie de la colonie est repiquée avec un cure-dent stérile sur un autre milieu SOB agar contenant l'antibiotique approprié et le reste est suspendu dans 50µL de 10mM EDTA pH 8.0 auquel est ajouté 50µL d'une solution 0,2N NaOH/ 0,5% SDS/ 20% sucrose nouvellement préparée. La suspension est vortexée 30 secondes puis incubée 5 minutes à 70°C. Après avoir refroidi à la température de la pièce, nous avons ajouté 1,5µL de KCl 4M et 0,5µL d'une solution de bleu de bromophénol 0,4%. La solution est vortexé 30 seconde puis incubée dans un bain de glace 5 minutes. Suit une centrifugation 12 000 x g, 3 minutes à 4°C. L'ADN est chargé dans un gel 0,7% d'agarose. Après migration le gel est coloré dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 µg/mL et décoloré dans de l'eau distillée puis visualisé sous U.V.

7.4 Purification plasmidique

Le miniprep par lyse alcaline (Ausubel *et al.*, 1987) a été effectué suite à l'amplification du plasmide par culture d'*E. coli* transformé, suspendu dans 5 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline et cultivé jusqu'à saturation. Environ le tier de cette culture est centrifugé 2 minutes à vitesse maximale. Le culot a été resuspendu avec une solution

50mM glucose/25mM tris-HCl (pH 8.0)/ 10mM EDTA (pH 8.0) et incubé 5 minutes à la température de la pièce. Les protéines bactériennes et l'ADN chromosomique et plasmidique sont ensuite dénaturées avec 200µL d'une solution 0,2N NaOH/ 1% SDS fraîchement préparée. La suspension bactérienne est mise sur glace 5 minutes, puis centrifugée 3 minutes à 4°C à vitesse maximale pour séparer les débris bactériens et l'ADN chromosomique (culot) de l'ADN plasmidique (surnageant). Ce dernier est mélangé à 0,8 mL d'éthanol 95% et incubé 2 minutes à la température ambiante pour précipiter l'acide nucléique. La solution est centrifugée 1 minute et le surnageant enlevé. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70% puis séché sous vide (Speed Vac, Savant). L'ADN est resuspendu dans 30µL de tampon TE pH 8,0 contenant de la RNAase pancréatique exempte de DNAase. L'ADN est conservé à -20°C.

7.5 Synthèse et marquage de la sonde à la digoxigénine.

Le marquage non-radioactif est de plus en plus utilisé non seulement pour des raisons sécuritaires mais aussi car sa stabilité rend possible un entreposage de longue durée (5% de perte après 5 mois). La digoxigénine (DIG) est une molécule de la famille des stéroïdes dérivée des plantes *Digitalis purpurea* et *Digitalis lanata*. Au cours de nos expériences nous l'avons utilisé sous forme de digoxigénine-11-2'-déoxy-uridine-5'-triphosphate, stable en milieu alcalin (DIG-11-dUTP; Boehringer Mannheim Canada Ltd, Laval, Qué, Canada). Cette méthode de marquage alliée au PCR permet la synthèse et le marquage simultané d'oligonucléotides et est beaucoup plus rapide que la méthode

traditionnelle. Au cours de la réaction d'amplification le dTTP est remplacé aléatoirement par DIG-11-dUTP.

La sonde a été synthétisée à partir de l'ADN plasmidique (1ng) selon les conditions de PCR décrites aux sections 6.1 et 6.2.2 à l'exception de la concentration de dTTP qui est de 170 μ M et l'ajout de 30 μ M DIG-11-dUTP (Lion et Haas, 1990).

Le produit PCR a migré dans un gel de «low melting agarose» 1% et la bande de 158pb découpée, incubée 5 minutes à 95°C et ajoutée à 200 μ L d'eau distillée stérile pour isoler la sonde des dimères d'amorces formés lors de la réaction PCR. Le marquage de la sonde a été vérifié par dot blot et la concentration de la sonde ([Sonde]) est ensuite calculée par l'équation suivante:

$$[\text{Sonde}] = \text{Facteur de dilution} (DO_{260} \times 50\mu\text{g/mL})$$

où:

$$DO_{260} = \text{la densité optique mesurée à une longueur d'onde de 260nm.}$$

8. HYBRIDATION SOUTHERN

Nous avons confirmé les résultats de détection virale en effectuant une hybridation Southern suite à la réaction PCR.

8.1 Transfert sur membrane de nylon

Le gel d'agarose contenant le produit d'amplification des échantillons de biopsies par les amorces GP5+/GP6+ est baigné 15 min dans une solution de dénaturation (0,5N

NaOH/ 0,015M NaCl) puis 15 minutes dans une solution de neutralisation (1M Tris-HCl/ M Tris-base/ 1,5M NaCl). Il est ensuite placé sur une membrane de nylon (ICN Pharmaceuticals) sur laquelle l'ADN est transféré et lié en imbibant le gel de 20xSSC de 45 à 60 minutes tout en appliquant le vide par succion avec une pression exercée de 50-60·cm d'H₂O (2016 Vacugene Vacuum Blotting Pump ; LKB, Bromma, Suède).

8.2 Préhybridation

L'acide nucléique transféré est fixé par exposition à 150mJoule de rayons U.V. (GS Gene Linker™ UV Chamber ; Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, Ont, Canada). La membrane est préhybridée au moins 1 heure à 68°C dans un four à hybridation (Bio-Rad) dans une solution 5xSSC/0.1% Sodium-lauroylsarcosine/0.02% SDS/1% Blocking reagent (Boehringer Mannheim) afin de combler les sites non spécifiques de la membrane et réduire le bruit de fond.

8.3 Hybridation

La membrane est mise en contact 12-16h à 68°C avec la sonde à une concentration finale de 25ng/mL, en diluant la sonde dénaturée à 95°C dans le tampon de préhybridation. Cette solution est décantée et conservée à -20°C. Lors d'hybridations subséquentes celle-ci est dégelée sous les mêmes conditions et réutilisée. Pour éliminer la sonde présente en excès, deux lavages de 5 minutes ont été effectués, à la température de la pièce, dans une solution 2xSSC/0,1%SDS. Puis, deux autres lavages de 15 minutes à 68°C dans une

solution 0,1xSSC/0,1%SDS sont effectués.

8.4 Détection par colorimétrie

La présence de la sonde hybridée a été révélée par colorimétrie avec le nitrobleu tetrazolium salt (NBT) et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphate) de Boehringer Mannheim. Toutes les manipulations ont été réalisées à la température de la pièce. La membrane est lavée avec le tampon I (100mM d'acide maléique/150mM NaCl; pH 7,5), puis bloquée 30 minutes avec le tampon II (tampon I contenant 1% de Blocking reagent Boehringer Mannheim). Le tampon est décanté, l'anticorps anti-DIG-alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim) est dilué dans le tampon II (150mU/mL) et cette solution est mise en contact 30 minutes avec la membrane. La membrane est lavée 2 fois avec le tampon I et équilibrée dans le tampon III (100mM Tris-HCl /100mM NaCl /50mM MgCl₂, pH 9,5). La membrane est finalement baignée dans une solution de coloration fraîchement préparée (6,75 mg chlorure de nitrobleu tetrazolium et 3,5 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactopyranoside (X-gal ; Boehringer Mannheim) dissous dans 20 mL de tampon III) (Lion et Haas, 1990) et gardée dans l'obscurité pour un temps maximal de 12 heures. La révélation est arrêtée en baignant la membrane dans le tampon III.

9. ESTIMATION DE LA CHARGE VIRALE

Un fragment de 241pb est co-amplifié avec le segment de 140-150pb par les amorces GP5+/GP6+. D'après les travaux de Caballero et al. (1995) ce fragment (HUM-1)

est d'origine cellulaire et le nombre de copie virale pourrait être calculé par le logarithme du ratio:

$$\frac{\text{D.O. GP5/GP6}}{\text{D.O. HUM-1}}$$

La densité optique de chacune des bandes fut analysée par densitométrie. Pour chaque échantillon le ratio GP5+GP6+/HUM-1 fut calculé et un score attribué à chaque échantillon par le calcul suivant:

$$\frac{\# \text{ copie std} \times \log \text{ ratio std}}{\log \text{ ratio lésion}}$$

où :

copie std: est le nombre de copie amplifié dans le tube contrôle contenant l'ADN de cellules HeLa,

ratio: est le ratio $\frac{\text{D.O. GP5+GP6+}}{\text{D.O. HUM-1}}$ du tube contrôle (std) ou des échantillons (lésion).

10. ANALYSE STATISTIQUE

La comparaison des cas et des témoins pour les paramètres démographiques et sexuels et l'analyse de risque d'infection et de sévérité de la lésion furent évalués par le test de chi-carré de Pearson.

Le risque relatif de récurrence pour tous les paramètres furent calculés par régression logistique conditionnelle.

La comparaison du score viral entre les cas et les témoins fut fait par le test indépendant de Student. Pour les paramètres grade de lésion et âge au traitement, les

résultats furent analysé par ANOVA unidirectionel. Un test de Student pour échantillons appariés fut effectué pour comparer le score viral de la lésion initiale à celui de la récurrence chez les patientes du groupe cas.

RÉSULTATS

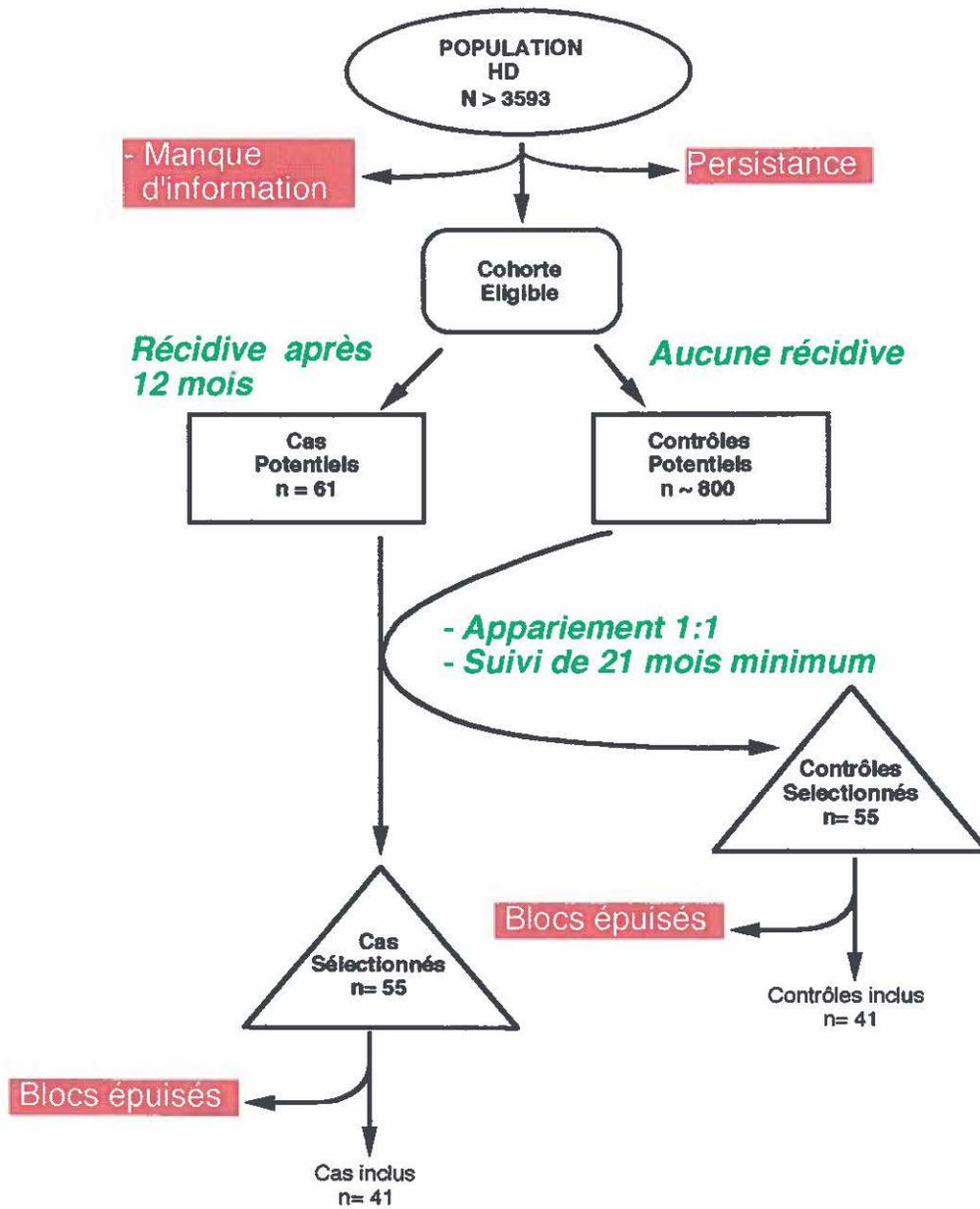
Au cours des 5 années durant lesquelles nous avons prélevé les membres des groupes cas et témoins, plus de 3000 patientes furent traitées pour une lésion préinvasive. De celles-ci, après un triage rigoureux pour satisfaire nos critères de sélections, 61 patientes ont récidivé plus d'un an après avoir été soignée (cas). Lors de la sélection des témoins, l'appariement n'a pu être réalisé que pour 55 cas. La sortie des blocs des archives a abouti pour 41 paires (41 cas et 41 témoins). L'analyse de laboratoire fut effectuée sur ces 82 patientes alors que l'analyse des marqueurs démographiques et sexuels fut réalisée avec l'information retirée des dossiers des 55 paires initiales (110 patientes) (fig. 8).

1. DESCRIPTION CLINIQUE DES CAS

Le grade de la récurrence était dans la grande majorité des cas de même grade ou de grade moins sévère 30/31 CIN 1, 13/14 CIN 2 et 2/2 CIN 3 (Tableau 3).

Au Tableau 4 nous retrouvons la distribution des cas selon la lésion initiale et le traitement suivi. La majorité des cas, 67,7% des CIN 1, 64,3% des CIN 2 et 50,0% des CIN 3 furent traités à l'HDM par cryothérapie. Aucune lésion CIN 3 ne fut traitée par vaporisation au laser. L'excision totale de la lésion par conisation fut la thérapie choisie pour 1 (7,1%) CIN 2, 1 (50,0%) CIN 3 et 7 (87,5%) CIS.

Figure 8: Diagramme illustrant la sélection des patientes



Légende :

Critères d'exclusions:

Critères d'inclusion

Tableau 3: Distribution des cas selon la lésion initiale et le grade de la récurrence.

Lésion initiale	Total	Grade de la récurrence	# Patientes
CIN 1	31	CIN 1	30 (97%)
		CIN 2	1 (3%)
		CIN 3	0
		CIS	0
CIN 2	14	CIN 1	9 (64%)
		CIN 2	4 (21%)
		CIN 3	0
		CIS	1 (8%)
CIN 3	2	CIN 1	0
		CIN 2	0
		CIN 3	2 (100%)
		CIS	0
CIS	8	CIN 1	3 (37,5%)
		CIN 2	3 (37,5%)
		CIN 3	1 (12,5%)
		CIS	1 (12,5%)

Tableau 4: Distribution des récurrences selon leur lésion initiale et le traitement suivi.

Lésion initiale	Total	Traitement	#Récurrences (%)
CIN 1	31	Cryothérapie	21 (67,7)
		Vaporisation laser	10 (33,3)
		Conisation	0
CIN 2	14	Cryothérapie	9 (64,3)
		Vaporisation laser	4 (28,6)
		Conisation	1 (7,1)
CIN 3	2	Cryothérapie	1 (50,0)
		Vaporisation laser	0
		Conisation	1 (50,0)
CIS	8	Cryothérapie	0
		Vaporisation laser	1 (12,5)
		Conisation	7 (82,5)

2. PROFIL ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES PATIENTES

À partir des dossiers nous avons pu obtenir de l'information concernant les 55 cas et les 55 témoins uniquement pour l'âge au traitement et les M.T.S. Pour les autres paramètres, l'information était le plus souvent absente (i.e. non déterminé, ND) chez les cas comparativement aux témoins: coïtarche 40% ND vs 27,2%, cohabitation 32,7% ND vs 21,8%, parité 25,4% ND vs 10,9% et contraception 27,2% ND vs 13% (Tableau 5).

Chez les femmes où les données étaient présentes, 50% étaient mariées ou cohabitaient avec leur partenaire et près de 68% d'entre elles étaient nullipares. La majorité des femmes avaient vécu leur premier coït à l'âge de 18 ans (69,9%). Le moyen de contraception privilégié est l'usage d'anovulants à 43,9% suivi du condom à 20,7%, toutefois plus de 10% des patientes traitées n'utilisaient aucun moyen de contraception. Aucune infection transmissible sexuellement n'a été rapporté dans les dossiers de 86,4% des patientes, mais 9,1% on eu une infection à *Candida albicans*, toutes faisant partie du groupe ayant récidivé (Tableau 5). L'infection par une M.T.S. après traitement est le seul paramètre où nous ayons pu relever une différence hautement significative entre les cas et les témoins $p = 0.003$.

Tableau 5: Comparaison entre cas et témoins, en fonction des paramètres cliniques

Paramètres	Catégories	Cas		Témoins		Total		Valeur p*
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Coïtarche (ans)	<18	20	(60,6)	31	(77,5)	51	(69,9)	0,117
	≥19	13	(39,4)	9	(22,5)	22	(30,1)	
	ND	22		15		37		
Âge au traitement (ans)	18-24	21	(38,2)	17	(30,9)	38	(34,5)	0,453
	25-29	14	(25,4)	20	(36,4)	34	(30,9)	
	≥30	20	(36,4)	18	(32,7)	38	(34,5)	
Cohabitation	Oui	17	(45,9)	23	(53,5)	40	(50,0)	0,501
	Non	20	(54,1)	20	(46,5)	40	(50,0)	
	ND	22		12		34		
Parité	0	29	(70,7)	32	(65,3)	61	(67,8)	0,583
	1-3	12	(29,3)	17	(34,7)	29	(32,2)	
	ND	14		8		22		
Contraception	Pilule	17	(42,5)	19	(45,2)	36	(43,9)	0,824
	Condom	7	(17,5)	10	(23,8)	17	(20,7)	
	Autres	10	(25,0)	8	(19,0)	18	(21,9)	
	Aucune	6	(15,0)	5	(11,9)	11	(13,4)	
	ND	15		12		27		
M.T.S.**	Chlamydia	3	(5,4)	2	(3,6)	5	(4,5)	0,003
	Candida	10	(18,2)	0	(0,0)	10	(9,1)	
	Aucune	42	(76,4)	53	(96,4)	95	(86,4)	

*: Valeur p calculée par le test Chi-carré de Pearson

**: Infection uniquement après traitement

3. CONTRÔLE DE QUALITÉ DES ÉCHANTILLONS

Avant de procéder à la détection virale, nous avons tout d'abord vérifié la qualité des spécimens de pathologie avec les amorces GH20 et PCO4 (Figure 9). Les tests de sensibilité avec les cellules WI-38 ont pu déceler jusqu'à 4 copies du gène de la β -globine. Nous avons rejeté 11,4% des blocs β -globine négatifs du reste de l'analyse.

4. PRÉSENCE VIRALE

Des blocs restant, nous avons comptés 35 lésions I (cas), 32 lésions T (témoins) et 26 lésions R (récidives). De ces 93 lésions nous avons 31 cas (blocs I) appariées à 31 témoins (blocs T) et leur 23 lésions de récurrence (blocs R) correspondantes. Nous avons testé ces blocs par PCR avec les amorces GP5+ et GP6+ (Figure 10). Les tests de sensibilité effectués avec les cellules HeLa ont pu déceler jusqu'à 5 copies virales. Les lésions initiales des cas étaient positives à 70,3% et celles des témoins à 66,7%. Cette différence de pourcentages n'est pas significative.

Le pourcentage de lésions HPV positives est plus élevé chez les récurrences (R) que les lésions initiales (I), 81,8% vs 70,3%. Parmi les 23 patientes dont nous avons pu faire l'analyse PCR pour la présence du papillomavirus de ces deux lésions, 14 lésions initiales HPV positives l'étaient aussi à la récurrence. Chez 5 patientes la récurrence était positive alors qu'elles avaient été traitées pour une lésion HPV négative. La lésion HPV positive de 4

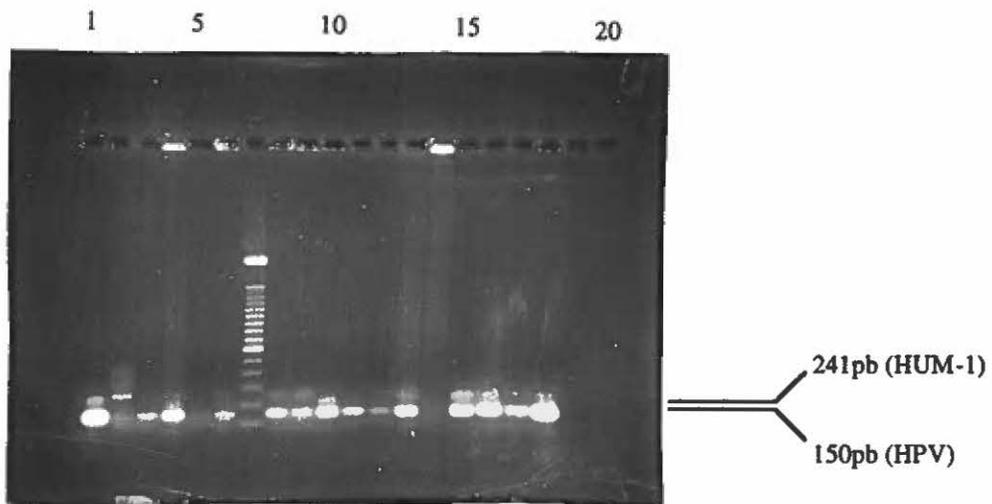
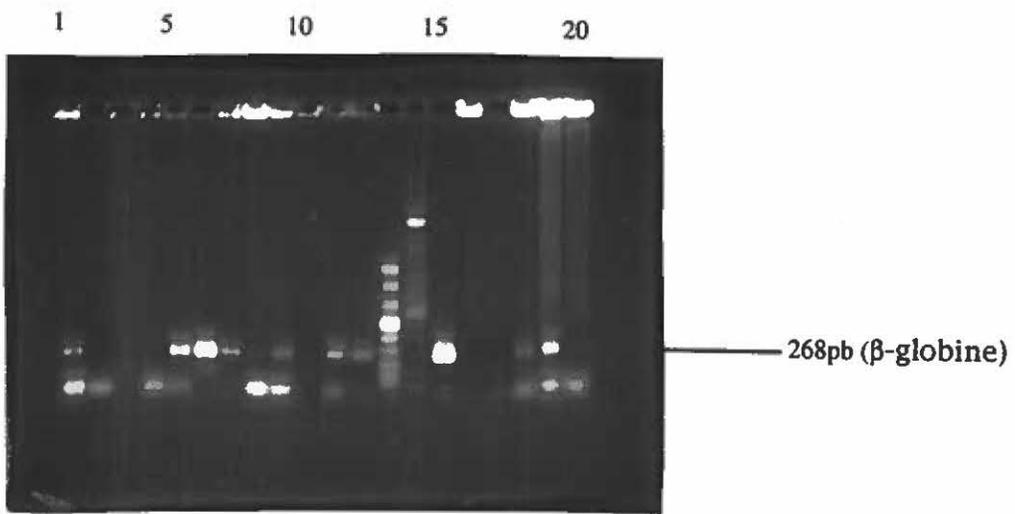
patientes a récidivé en lésion HPV négative.

Figure 9: Amplification des spécimens pathologiques par la paire d'amorces GH20/PC04

#Puits	Échantillon
1-5, 7-12, 15, 17-20	Spécimens pathologiques
6	Cellules WI-38
16	Paraffine témoin
13,14	Échelles moléculaires

Figure 10: Amplification des spécimens pathologiques par la paire d'amorces GP5+/GP6+

#Puits	Échantillon
2-4, 6-18	Spécimens pathologiques
1	Cellules Hela
5	Cellules WI-38
7	Échelle Moléculaire



5. INFECTION VIRALE ET FACTEURS CLINIQUES

Les tableaux 6 et 7 montrent les résultats d'infection virale d'après les facteurs démographiques et les indices sexuels pour les lésions appariées, i.e des deux groupes, cas et témoins combinés. Les femmes HPV positives sont significativement plus âgées, $p = 0,018$. Les autres facteurs démographiques tels cohabitation et parité n'ont pas influencé de façon significative les résultats d'HPV (Tableau 6).

Dans la population étudiée, les patientes HPV positives ont en général vécu leur coïtarce tard, avec 82,6% des 17-18 ans et 75,0% des 19 ans et plus. Cette tendance n'est pas significative. Le moyen de contraception n'a pas influencé le taux d'infection, autant pour l'usage d'anovulants ou non, $p = 0,694$, que pour les moyens offrant une barrière physique ou non, $p = 0,899$ (Tableau 7).

Tableau 6 : Relation entre les facteurs cliniques et la présence d'HPV* chez les deux groupes étudiés: facteurs démographiques

Paramètres démographiques	Catégories	HPV +		HPV -		Valeur P**
		n	(%)	n	(%)	
Âge au traitement (ans)	18-24	16	(66,7)	8	(33,3)	0,018
	25-29	12	(63,2)	7	(36,8)	
	≥30	23	(95,8)	1	(4,2)	
Cohabitation	Oui	20	(80,0)	5	(20,0)	0,507
	Non	18	(72,0)	7	(28,0)	
Parité	0	31	(72,1)	12	(27,9)	0,183
	1-3	15	(88,2)	2	(11,8)	

*:A partir des lésions appariées I et T

** :Valeur p calculée par le test Chi-carré de Pearson

Tableau 7: Relation entre les facteurs cliniques et la présence d'HPV* chez les deux groupes étudiés: indices du comportement sexuel

Paramètres sexuels	Catégories	HPV +		HPV -		Valeur P**
		n	(%)	n	(%)	
Coïtarche	12-16	6	(54,5)	5	(45,5)	0,217
	17-18	19	(82,6)	4	(17,4)	
	≥19	12	(75,0)	4	(25,0)	
M.T.S.***	Oui	2	(25,9)	11	(74,1)	0,423
	Non	14	(15,4)	40	(84,6)	
Contraception:	Anovulants	20	(74,1)	7	(26,1)	0,694
	Autres	22	(78,6)	6	(21,4)	
	Barrière	9	(75,0)	3	(25,0)	0,899
	Autres	33	(76,7)	10	(23,3)	

*: A partir des lésion appariées I et T

** : Valeur p calculée par le test Chi-carré de Pearson

***: Infection à Chlamydia et Candida mesurée à vie

6. FACTEURS DÉTERMINANTS DU GRADE DE LA LÉSION

6.1 PRÉSENCE VIRALE

Le Tableau 8 montre la relation entre les résultats d'HPV et la sévérité de la lésion. Le pourcentage d'infection à papillomavirus augmente significativement en fonction de la sévérité de la lésion, $p = 0,039$. La force de cette corrélation, mesurée par le test de «likelihood» de Mantel est aussi significative à 0,029.

Tableau 8: Corrélation entre la présence du HPV et la sévérité de la lésion cervicale

Grade de la lésion	Présence du HPV*		Indice de signification	
	Positif (%)	Négatif (%)	Global**	Tendance***
CIN 1	18 (62,1)	11 (37,9)	0,034	0,029
CIN 2	17 (80,9)	4 (19,0)		
CIN 3-CIS	16 (94,1)	1 (5,8)		

*: À partir des lésion appariées I et T (blocs β -globine positifs)

** : Valeur p calculée par le test Chi-carré de Pearson

*** : Tendance mesurée par le test de «likelihood» de Mantel

6.2 FACTEURS CLINIQUES

Dans la population étudiée nous avons observé des différences hautement significative pour l'âge au traitement en relation avec le grade de la lésion, $p < 0,001$. Les femmes plus jeunes étaient atteintes d'une lésion moins sévère (Tableau 9).

Même si le pourcentage des femmes atteintes de CIN 1 était semblable chez les femmes célibataires ou cohabitant avec leur partenaire, 60 et 50% respectivement, les lésions sont significativement plus sévères chez celles demeurant avec leur partenaire, $p = 0,008$. Il en est de même pour la parité. Ici aussi, pour un pourcentage comparable de CIN 1 chez les nullipares et les patientes ayant au moins un enfant, la proportion de lésion CIN 3-CIS est plus importante chez les femmes ayant au moins un enfant, soit 37,9 vs 14,8% des femmes nullipares, $p = 0,031$ (Tableau 9).

Aucun paramètre sexuel n'a eu d'effet sur le grade de la lésion. Les tendances observées étaient les suivantes: les femmes ayant vécu leur coïtarche plus tôt étaient généralement atteintes d'une lésion moins sévère ($p = 0,288$); une plus grande proportion de femmes était atteinte de dysplasie légère qu'elles aient eu ou non une infection à une MTS au courant de leur vie ($p = 0,202$) et aucune différence significative n'a été révélée entre les patientes utilisant les œstro-progestatifs par rapport à un autre moyen de contraception, $p = 0,534$, ou chez les patientes utilisant un contraceptif offrant une barrière physique ou non, $p = 0,364$ (Tableau 9).

Tableau 9: Corrélation entre les facteurs cliniques et la sévérité de la lésion cervicale, cas et témoins combinés

Paramètres démographiques et sexuels	Catégories	Lésion						Valeur p*
		CIN 1		CIN 2		CIN 3-CIS		
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Âge au traitement	18-24	21	(55,3)	16	(42,1)	1	(2,6)	<0.001
	25-29	23	(67,6)	8	(23,5)	13	(8,8)	
	≥30	18	(47,4)	4	(10,5)	16	(42,1)	
Cohabitation	Non	20	(50,0)	15	(37,5)	5	(12,5)	0,008
	Oui	24	(60,0)	4	(10,0)	12	(30,0)	
Parité	0	34	(55,7)	18	(29,5)	9	(14,8)	0,031
	1-3	14	(48,3)	4	(13,8)	11	(37,9)	
Coïtarche	12-16	11	(61,1)	5	(27,8)	2	(11,1)	0,288
	17-18	20	(60,6)	8	(24,2)	5	(15,2)	
	≥19	10	(45,5)	4	(18,2)	8	(36,4)	
M.T.S.**	Aucune	47	(54,0)	23	(26,4)	17	(19,5)	0,202
	Candida	8	(50,0)	5	(31,3)	3	(18,8)	
	Autre	7	(100,0)					
Contraception	Anovulants	17	(47,2)	10	(27,8)	9	(25,0)	0,534
	Autres	28	(59,6)	10	(21,3)	9	(19,1)	
	Barrière	13	(68,4)	3	(15,8)	3	(15,8)	0,364
	Autres	32	(50,0)	17	(26,6)	15	(23,5)	

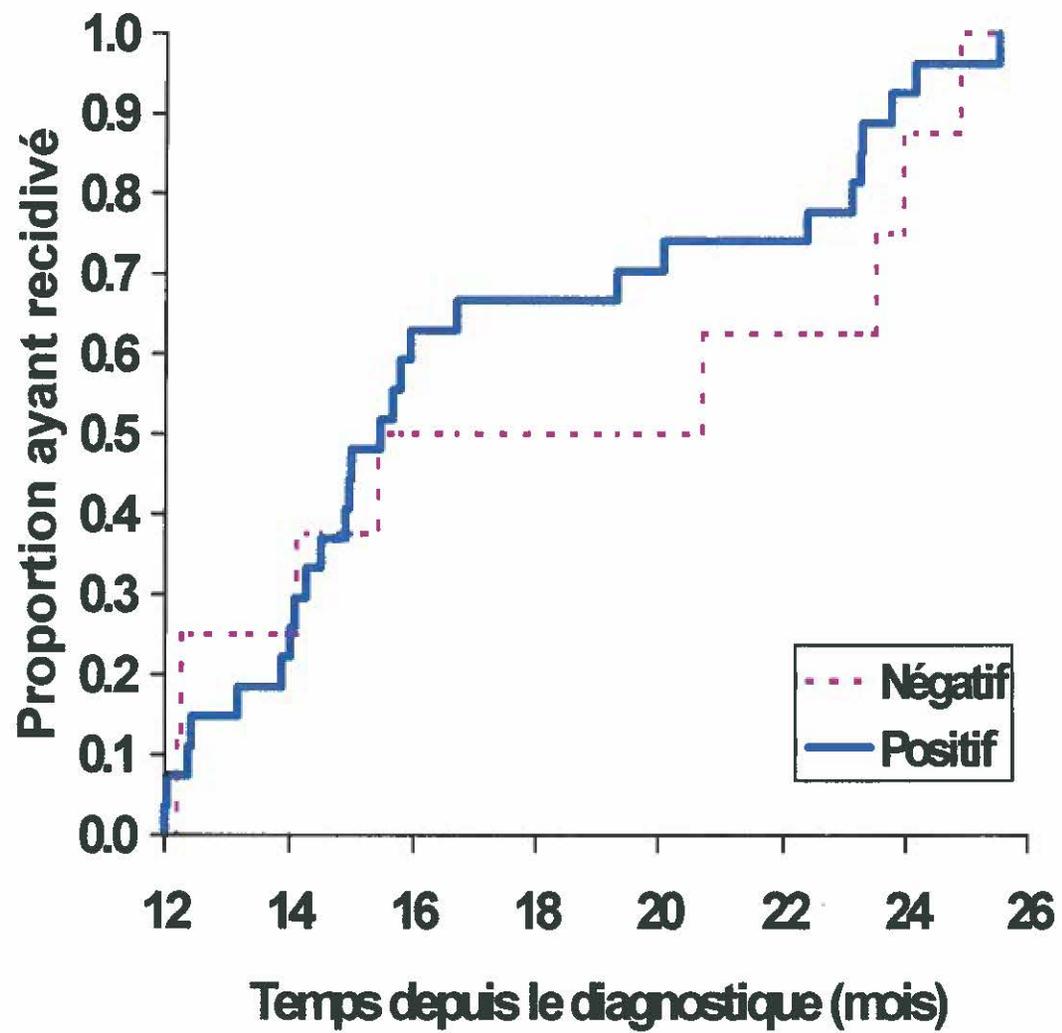
*: Valeur p calculée par le test Chi-carré de Pearson

** : M.T.S au courant de leur vie

7. INFLUENCE DU HPV SUR LE TEMPS DE RÉCIDIVE

Les résultats ne montrent aucune influence sur le temps de la récurrence entre les patientes traitées pour une lésion HPV positive et celles traitées pour une lésion HPV négative. Dans les deux situations 50% des récurrences ont lieu entre 12 et 16 mois après le traitement (Figure 11).

Figure 11: Proportion ayant récidivé en fonction du temps depuis le diagnostic



8. ÉVALUATION DU RISQUE DE RÉCIDIVE

L'analyse de la relation entre la présence d'HPV et l'âge au traitement, la cohabitation, la parité, le coïtarce, l'usage d'anovulants et l'utilisation de contraception offrant une barrière physique (Tableau 10), n'a relevé aucune association significative avec le risque de la récurrence. Nous avons toutefois observés quelques tendances.

Les récurrences sont plus nombreuses parmi les lésions traitées, HPV positives. Chez les patientes âgées de 30 ans et plus, le risque de récurrence est comparable à la catégorie de référence, mais les femmes plus jeunes âgées entre 25 et 29 ans ont obtenu des risques moins élevés. Pour la cohabitation, le risque de récurrence des femmes célibataires (catégorie de référence) est 2 fois plus élevé que chez les femmes vivant avec leur partenaire. Nous avons obtenus des risques moins élevés pour les femmes ayant vécu leur coïtarce plus jeune. Les risques associés à l'usage d'anovulant, tout comme ceux associés à un moyen de contraception par barrière physique sont comparables à la catégorie de référence.

D'après nos résultats, seules les femmes atteintes d'une infection M.T.S. après traitement ont significativement plus de chances de récurrencer ($RR = 6,500$). Cette augmentation est significative, $IC95\% = 1,467 - 28,804$ (Tableau 10).

Tableau 10 : Corrélation entre HPV, les facteurs cliniques et le risque de récurrence: résultats calculés par la méthode de régression logistique conditionnelle.*

Paramètre	Catégorie	Risque relatif de récurrence (RR) et intervalle de confiance à 95% (IC 95%)	
		(RR)	(IC 95%)
HPV	Négatif	1,000	(réf.)**
	Positif	1,500	0,423 - 5,316
Âge au traitement	18-24	1,000	(réf.)
	25-29	0,464	0,137 - 1,570
	≥30	1,066	0,147 - 7,706
Cohabitation	Non	1,000	(réf.)
	Oui	0,500	0,188 - 1,332
Parité	0	1,000	(réf.)
	1-3	0,667	0,188 - 2,362
Coïtarche	12-16	1,000	(réf.)
	17-18	1,948	0,478 - 7,942
	≥19	3,795	0,671 - 21,464
M.T.S.***	Non	1,000	(réf.)
	Oui	6,500	1,467 - 28,804
Anovulants	Non	1,000	(réf.)
	Oui	0,875	0,317 - 2,413
Condom	Non	1,000	(réf.)
	Oui	1,200	0,366 - 3,932

*: Analyse conditionnée par les variables d'appariement (âge, diagnostic, traitement et année de traitement).

** : Catégorie de référence.

***: Infection uniquement après traitement

9. CHARGE VIRALE

Les résultats concernant le score viral n'ont démontré aucune différence significative pour les variables statut ($p= 0,316$), grade de lésion ($p= 0,891$) et âge au traitement ($p= 0,631$) (Tableau 11), ou pour la lésion de récurrence comparativement à la lésion initiale ($p= 0,151$) (Tableau 12). Pour cette dernière relation, le score moyen des lésions initiales a tendance à être plus élevé que celui des lésions de récurrence ($p = 0,151$).

Il est important de ne pas confondre le score viral avec le nombre de copie virale calculé par Caballero *et al.* (1995). Le score a comme seul point de référence le standard Hela testé avec le reste du lot (échantillons et contrôle négatif). Le nombre copie virale a comme référence une courbe standard déterminée à partir de plusieurs échantillons standard testés au même moment que le reste du lot.

Tableau 11: Mesure du score viral selon le statut, le diagnostic et l'âge au traitement

Variable	Catégorie	Score moyen (ET)*	Valeur p**
Statut	Cas	-1,835 (0,362)	0,316
	Témoin	-1,271 (0,423)	
Diagnostic	CIN 1	-1,361 (0,607)	0,891
	CIN 2	-1,482 (0,417)	
	CIN 3	-2,112 (1,130)	
	CIS	-1,801 (0,338)	
Âge au traitement	18-24	-1,432 (0,548)	0,631
	25-29	-1,193 (0,524)	
	≥30	-1,847 (0,408)	

*: Erreur type

** Pour comparer deux catégories, la valeur p est calculée par le test indépendant de student. Pour plus de 2 catégories la valeur p est calculée par le test ANOVA unidirectionnel.

Tableau 12: Comparaison du score viral entre la lésion initiale et la lésion de récurrence chez les cas

Lésion	Score moyen (ET)*	Valeur p **
Initiale	-1,022 (0,318)	0,151
Récidive	-1,824 (0,571)	

*: Erreur type

** : Valeur p calculée par le test de Student pour échantillons appariés

DISCUSSION

Nos travaux avaient pour objet l'étude de facteurs cliniques et de la présence du HPV en tant qu'indicateurs possibles de récurrence chez des femmes traitées pour une lésion cervicale préinvasives. Nous avons donc comparé deux groupes. Le premier regroupait les cas, i.e. les patientes ayant récidivé plus d'un an après traitement. Le second était constitué de témoins appariés aux cas, selon l'âge, la lésion, le traitement et l'année du diagnostic, mais n'ayant pas récidivé.

1. LIMITES DE L'ÉTUDE

Avant d'interpréter les résultats obtenus, nous devons d'abord discuter des limites et des difficultés de l'étude.

Parce que l'étude réalisée est rétrospective, les échantillons analysés ne sont pas frais et sont âgés de 1 à 6 ans. Le traitement de fixation, d'inclusion dans la paraffine et l'entreposage des blocs, même si bénéfique au maintien de la structure histologique de la biopsie, amène inévitablement la dégradation de l'ADN qu'il contient, d'où la nécessité d'amplifier une région restreinte, i.e. inférieure à 200pb, pour réduire le pourcentage de faux négatifs. Le choix des amorces consensus fut fait pour palier à cette difficulté. Notons aussi qu'au moment de l'élaboration du protocole il n'était pas encore possible d'effectuer le typage viral à partir de cette paire d'amorces.

Un autre désavantage est l'absence de données des dossiers cliniques dans presque tous les paramètres démographiques et sexuels étudiés que ce genre de recherche peut occasionner. Ceci s'explique de 3 façons: l'absence de démarche standard dans chaque

bureau de médecin; pour les patientes référées l'information jugée pertinente porte plutôt sur la lésion actuelle et les raisons de consultation (douleurs, saignement, etc.); les questions posées en cabinet n'ont pas pour but de faire un profil épidémiologique précis mais de donner un aperçu de l'historique, la plupart du temps symptomatique tels des lésions ou une inflammation persistantes par exemple.

De la même façon, les biopsies furent prélevées par le médecin uniquement dans le but d'effectuer un diagnostic avant traitement. Dans le cas de traitement par destruction de tissus ceux-ci étaient la seule source de matériel disponible. C'est pourquoi un certain nombre de biopsies étaient déjà épuisées avant de débiter l'étude, contrairement aux conisations, où la lésion excisée est presque entièrement conservée en pathologie.

La plus grande difficulté dans la sélection des patientes fut rencontrée lors de l'appariement des témoins aux cas. Une fois la lésion traitée, beaucoup de patientes cessent leur suivi médical avant 12 mois. Limiter nos critères de sélection des témoins à: aucune deuxième lésion signalée dans le dossier, nous aurait laissé vulnérable à la possibilité d'une consultation dans un autre hôpital. Restreindre l'éligibilité aux patientes dont le suivi se poursuit obligatoirement jusqu'à l'année de l'étude aurait pu inutilement exclure des patientes dont l'appariement était particulièrement laborieux (i.e. la révision de plus de 15 candidates avant de trouver un témoin). Nous avons donc choisi une période de 21 mois. Ce temps diminue la probabilité d'une persistance et dépasse la période moyenne de l'intervalle traitement-récidive.

2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Nous n'avons observé aucune variation entre les cas et les témoins concernant le coïtarce, la cohabitation, la parité et le moyen de contraception utilisé. Toutefois, un nombre significativement plus élevé de cas ont été infecté par une M.T.S après leur traitement (Tableau 5). Ceci reflète la présence de deux population homogènes. Nous avons en effet comparé deux groupes ayant eu la même maladie, contrairement à un groupe cas, malade vs un groupe témoin, sain. La différence observée pour les M.T.S. peut s'expliquer de deux façons: premièrement, l'infection par une M.T.S., particulièrement *Candida albicans*, influencerait le risque de récurrence de lésion cervicale. La littérature suggère que les M.T.S. pourraient agir comme cofacteurs à travers l'immunosuppression ou comme agent opportuniste. Aucune information concernant l'infection par candida n'a été rapporté pour ces deux cas contrairement à HSV-2, *Chlamydia* et *Trichomonas* (Hildesheim *et al*, 1991; Meisels et Morin, 1976 ; Harnekar *et al*, 1985). Ceci nous amène à considérer la possibilité d'une différence dans l'activité sexuelle, laquelle se traduirait par une infection. Ceci n'exclue pas la possibilité qu'un facteur puisse agir comme facteur directement responsable. Quoique d'autres indices d'activité sexuelle, qui ne révèlent aucune différence significative, figurent au Tableau 5 (tels le coïtarce et la cohabitation), seul l'infection par M.T.S. mesure la «qualité» du partenaire.

Nous avons ensuite comparé le taux d'infection des lésions initiales des cas et les lésions appariées des témoins en relation avec différents facteurs (tableaux 6 et 7). Parmi les facteurs démographiques, seul l'âge fut capable d'influencer significativement le

pourcentage d'infection. D'après nos résultats les femmes plus âgées sont plus souvent HPV positives. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature. Alors que des études ont démontré une augmentation du pourcentage d'infection à HPV avec un nombre plus élevé d'enfants (Brinton *et al*, 1989 ; Hildesheim *et al.*, 1989), nous n'avons obtenu aucune relation entre ces deux variables. Toutefois, la proportion des nullipares HPV négatives (Tableau 6) est plus du double de la proportion des femmes ayant au moins un enfant, 27% vs 11%. Des études qui ont mesuré la relation entre la parité et la présence virale, ont remarqué une association dans des populations où les femmes avaient fréquemment plus de 5 enfants (Brinton *et al*, 1987 ; Hildesheim *et al.*, 1989 ; Parazzini *et al.*, 1989). La faiblesse de la relation observée pourrait être expliquée par le plus bas nombre de naissance chez la population étudiée. Les résultats de la littérature indiquent aussi que la relation entre le coïtarche et le taux d'infection à HPV est inversement proportionnel (Meisels *et al.*, 1977 ; Duncan *et al.*, 1990 ; Herrero *et al.*, 1990). Nos données sur le coïtarche en relation avec les résultats d'HPV (Tableau 7), suggèrent plutôt une augmentation de positivité d'HPV avec un coïtarche plus avancé, mais cette tendance n'est pas significative. Comme nous retrouvons le plus grand nombre de données absentes, soit 37, à cette variable (Tableau 5), il est possible que l'absence d'autant de données aient influencé nos résultats malgré la force de l'association démontrée dans la littérature.

La cohabitation et les MTS sont les seuls facteurs recueillis nous donnant un aperçu de l'activité sexuelle des patientes. La cohabitation nous donnant un indice de la stabilité des relations sexuelles et les MTS nous indiquant la «qualité» du ou des partenaires sexuels.

De nombreux travaux (Ley et al., 1991 ; Donnan *et al.*, 1989) ont observé une forte association entre le nombre de partenaires et l'infection à papillomavirus. Cette information n'était pas présente dans les dossiers médicaux et il nous était impossible de rejoindre les patientes pour obtenir cette information. Les données pour la cohabitation et l'infection à vie par une MTS ne suggèrent aucune relation avec le résultat HPV de la lésion traitée. L'absence de relation entre la cohabitation et le résultat HPV peut être dû au fait que cette variable ne serait pas une mesure adéquate de la stabilité des relation vu le contexte dans lequel nous vivons. Ce facteur aurait peut-être eu une valeur plus précise il y a une trentaine d'année. De plus, près de 65% de la population étudiée n'avait pas encore 30 ans lors du traitement (Tableau 5).

D'après nos résultats, l'infection à vie par les M.T.S. n'a pas influencé les risques d'infection par papillomavirus de la lésion traitée (Tableau 7). Peut-être ce cofacteur joue-t-il un plus grand rôle chez les gens ayant déjà eu la maladie. Ceci expliquerait la différence significative d'infection observée uniquement après traitement entre les cas et les témoins (Tableau 5).

La tendance significative des lésions HPV positives à être plus sévère sont en accord avec la littérature (Kæjer *et al.*, 1996 ; Olsen *et al.*, 1995). Il nous a été impossible de faire la révision histologique des blocs analysés par PCR. Une erreur dans le diagnostic des patientes ou une baisse de sensibilité due à des erreurs de mise au point se seraient traduites par une absence de corrélation entre ces deux facteurs. Nous avons donc bien optimisé la technique et les diagnostics histologiques recueillis dans les dossiers étaient

exacts.

La littérature ne fait pas mention de l'effet qu'HPV pourrait avoir sur le temps de la récurrence. Nous n'avons observé aucune différence significative pour le temps de récurrence entre les lésions traitées, HPV positives et HPV négatives (Figure 11). Ce manque de corrélation peut être l'effet accumulé d'un taux d'infection élevé de lésions HPV positives et du faible nombre de patientes de la population étudiée.

Les résultats du Tableau 10, indiquent que l'infection par HPV n'augmente pas significativement le taux de récurrence. Il est bien connu que le potentiel oncogénique de papillomavirus varie selon le type (Lungu *et al.*, 1991 ; Lorincz *et al.*, 1992). Le typage des lésions par les 6 types les plus souvent rencontrés HPV 6, 11, 16, 18, 31 et 33 n'aurait que subdivisé un effectif déjà bien bas, quoiqu'il soit plus élevé que d'autres études apparentées (Nuovo et Pedemonte, 1990 ; Dræby-Kristiansen *et al.*, 1991 ; Schmidt *et al.*, 1992). Le nombre de patientes aurait peut être pu être augmenté en diminuant le nombre de mois nécessaires entre le traitement et la récurrence (5 mois: Nuovo et Pedemonte, 1990 ; 2 mois: Burnett *et al.*, 1993), mais sans cette année d'examen avec tests de colposcopie et de Bx et/ou CEC normaux notre étude aurait été plus vulnérable à la présence de persistance de la maladie par échec du traitement suivi vs de véritables récurrences (Dræby-Kristiansen *et al.*, 1991).

Aussi dans les études de récurrence de cancer, la question de persistance vs récurrence perd son sens, puisqu'à ce stade de la maladie toute nouvelle lésion est évidemment considérée comme étant très importante.

Les conditions de mesure du score viral diffèrent en plusieurs points de celles utilisées par Caballero *et al.* (1995) pour calculer le nombre de copie virale. Leur densité optique furent mesurées à partir de gels SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent, alors que nous les avons mesurées par densitométrie à partir de gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium. Aussi, ce score à été évalué à partir d'un unique point de référence vs une courbe standard interne. Nous ne pouvons donc dire qu'il s'agit d'une méthode quantitative mais plutôt d'une estimation qualitative, i.e. d'un facteur de la charge virale comparativement au standard du lot. Les deux points les plus important sont sans doute que tous les échantillons testés par Caballero *et al.* sont issus de cultures cellulaires, alors que seuls nos témoins proviennent de cultures cellulaire et les autres échantillons proviennent de matériel archivé, ceci pourrait expliquer les bas estimés de copies obtenus (inférieurs à 1) se traduisant en valeurs négatives aux tableaux 11 et 12. Enfin, les amorces utilisées par cette équipe de chercheurs, GP5/GP6 (van den Brule *et al.*, 1990), sont les précurseurs des amorces GP5+/GP6+ utilisées au cours de ce projet. Les deux paires sont semblables sauf pour une élongation en 3' de chaque oligonucléotide chez GP5+ et GP6+. Il est possible que cette élongation, en plus de modifier la spécificité et la sensibilité des amorces, affecte aussi la relation entre les deux bandes co-amplifiées découvert par Caballero et collaborateurs.

D'autres tests si non dans les mêmes conditions expérimentales, du moins avec une courbe standard (GP5+/GP6+) testée simultanément à des échantillons inconnus pourraient répondre à cette question.

CONCLUSION

Le faible nombre de récurrence de lésions préinvasives cervicales observé à l'Hôtel-Dieu de Montréal entre 1988 et 1994 ne devrait pas nous faire croire que la gestion de la maladie est sous contrôle car plus de 60% des 400 dossiers lus lors de la sélection des cas ont eu une seconde lésion de 3 à 11 mois après un premier traitement! Cependant, pour les besoins de notre étude, une récurrence fut qualifiée comme étant une lésion confirmée par biopsie plus de 12 mois après traitement. Ceci, pour la distinguer autant que possible d'une persistance.

À l'exception de la différence entre les groupes cas et témoins concernant l'infection par une M.T.S. la population étudiée était homogène pour les paramètres démographique et sexuels.

Aucune différence significative pour le pourcentage d'infection à HPV n'a été observé entre les lésions initiales des cas ayant récidivé et des lésions témoins appariées.

Nous avons observé une augmentation significative du grade de la lésion traitée chez les cas et les témoins en fonction de l'âge au traitement, du coïtarce des patientes et de la parité. Une relation significative fut aussi observée entre la sévérité de la lésion et l'infection par HPV, en effet, le taux d'infection est plus élevé chez les patientes traitées pour des lésions plus sévères.

L'infection à HPV n'a eu aucun effet sur l'intervalle traitement-récurrence ou le risque de récurrence. Seul l'infection à une MTS après traitement a eu un effet significatif sur la récurrence en augmentant le risque de 6,5 fois.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les gens qui ont participé à l'exécution de ce projet.

Mon directeur de recherche, Djorde Ajdukovic et mes co-directeurs Eduardo L.F. Franco et Gilles Lamoureux pour leur conseils et les nombreuses discussions qui souvent débordaient le domaine restreint de la science.

Les docteurs B. Lambert, Y. Boivin et L. Gaboury de l'Hôtel-Dieu de Montréal, sans leur enthousiasme et leur intérêt, nous n'aurions pas pu réaliser ce projet. Le comité d'Éthique de l'HDM qui nous a permis d'utiliser les services de l'hôpital. Les docteurs A. Lörincz, G. Orth et deVilliers pour nous avoir envoyé les clones d'HPV.

Mmes Richer et Flageolle du département de pathologie, ainsi que tout le département des archives pour leur patience et leur aide précieuse lors de la sélection des patientes et la sortie des blocs.

Je voudrais aussi remercier le docteur C.J.L.M. Meijer qui nous a envoyé les séquences d'amorces pour la détection virale, M. Désy et tout particulièrement Javier Pintos qui m'a été d'une aide incommensurable lors de l'analyse statistique, ainsi que Harriet Richardson pour ses conseils techniques et Iva Ajdukovic pour sa présence et la culture des cellules.

Je m'en voudrais de terminer sans remercier Pierre-Olivier, Jacky, Benoit et Mikhail ainsi que Monica et Frédéric qui m'ont apporté, chacun à leur façon, quelque chose que l'on ne retrouve dans aucun article.

BIBLIOGRAPHIE

- Allerding, T. J., Jordan, S. W. et Boardman, R. E. 1985. Association of human papillomavirus and Chlamydia infections with incidence of cervical neoplasia. *Acta Cytol.* **29**: 653-660.
- Agarwal, S.S., Sehgal, A., Sardana, S., Kumar, A. et Luthra, U. K . 1993. Role of male behavior in cervical carcinogenesis among women with one lifetime sexual partner. *Cancer.* **72**: 1666-1669.
- American Cancer Society. Cancer facts and figures - 1993. American cancer Society Inc: Atlanta, GA, É-U. 1993.
- Ames, B. N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science.* **221**: 1256-1264.
- Andersen, E. S. et Husth M. 1992. Cryosurgery for cervical intraepithelial neoplasia: 10-year follow-up. *Gynecol. Oncol.* **45**: 240-242.
- Andersen, E. S., Pedersen, B. et Nielsen, K. 1994. Laser conization: The results of treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.* **54**: 201-204.
- Anonymous. 1994. Results from the National breast and cervical cancer early detection Program, October 31, 1991-September 30, 1993. *MMWR.* **43**: 531-534.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et Struhl, K. *Current protocol in Molecular Biology.* Elsevier. New York. 1987.
- Baagish, M. S. 1982. Management of cervical intraepithelial neoplasia by carbon dioxide laser. *Obstet. Gynecol.* **60**: 378-384.
- Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C. et Brown, J. C. 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* **60**: 1445-1456.
- Barasso, R., De Brux, J., Croissant, O. et Orth, G. 1987. High prevalence of papillomavirus- associate penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.* **317**: 916-923.
- Barton, S.E. Hollingworth, A., Maddox, P.H., Edwards, R., Cuzick, J., McCance, D.J., Jenkins, D. et Singer, A. 1988. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet.* **2**: 652-654,

- Basset-Seguín, N., Demoly, P., Moles, J. P., Tesnieres, A., Gauthier-Rouviere, C., Richard, S., Blanchard, J. M. et Guilhou, J. J. 1994. Comparative analysis of cellular and tissular expression of c-fos in human keratinocytes: evidence of its role in cell differentiation. *Oncogene*. **9**: 765-771.
- Bauer, H. M., Ying, Y., Greer, C. E., Chambers, J. C., Tashiso, C. J., Chimera, J., Reingold, A. et Manos, M. M. 1991. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *J. Amer. Med. Assoc.* **265**: 472--477.
- Beckmann, A. M., Myerson, D., Daling, J. R., Kiviat, N. B., Fenoglio, C. M. et McDougall, J. K. 1985. Detection and localization of human papillomavirus DNA in human genital condylomas by *in situ* hybridization with biotinylated probes. *J. Med. Virol.* **16**: 265-273.
- Bedell M.A, Jones, K. H. et Laimins, L. A. 1987. The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *J. Virol.* **61**: 3635-3640.
- Benedet, J. L., Nickerson, K. G. et White, G. W. 1981. Laser therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet. Gynecol.* **58**: 188-191.
- Berg, L. J., Lusky, M., Stenlund, A. et Botchan, M. R. 1986. Repression of bovine papillomavirus replication is mediated by a virally encoded trans-acting repressor. *Cell.* **46**: 753-762.
- Bjelke, E. Dietary vitamin A in human lung cancer. 1975. *Int. J. Cancer.* **15**: 561-565.
- Bosh, F. X., Manos, M. M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. et Shah, K. V. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 796-802.
- Brinton, L. A. 1991. Oral contraceptives and cervical neoplasia. *Contraception.* **43**: 581-595.
- Brinton, L. A., Hamman, R. F., Huggins G.R., Lehman, H. F., Levine, R. S., Mallin, K. et Fraumeni, J. F. Jr. 1987. Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**: 23-30.
- Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Herrero, R., de Britton, R. C., Gaitan, E.,

- Tenorio, F., Garsia, M. et Rawls, W. E. 1989. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am. J. Epid.* **130**: 486-496.
- Brock, K. E., Berry, G., Mock, P. A., MacLennan, R., Truswell, A. S. et Brinton, L. A. 1988. Nutrients in diet and plasma and risk of *in situ* cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**: 580-585.
- Buckley, J. D., Doll, R., Harris, R. W. C., Vessey, M. P. et Williams, P. T. 1981. Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. *Lancet.* **2**: 1010-1015.
- Burke, L. 1982. The use of the carbone dioxide laser in the therapy of cervical intraepithelial neoplasia. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **144**: 337-340.
- Burnett, A. F., Grendys, E. C., Willet, G. D., Johnson, J. C., Barter, J. F. et Barnes, W. A. 1993. Preservation of multiple oncogenic human papillomavirus types in recurrences of early-stage cervical cancers. *Obstet. Gynecol.* **170**: 1230-1233.
- Butterworth, C. E., Hatch, K. D., Gore, H., Mueller, H. et Krumdieck C.L. 1982. Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in users of oral contraceptives. *Am. J. Clin. Nut.* **35**: 73-82.
- Butterworth, C. E., Hatch, K. D., Macaluso, M., Cole, P., Sauberlich, H. E. Soong, S. J., Borst, M. et Baker, V. V. 1992. Folate deficiency and cervical dysplasia. *J. Amer. Med. Assoc.* **267**: 528-533.
- Caballero, O. L., Villa, L. L. et Simpson, A. J. G. 1995. Low stringency-PCR (LS-PCR) allows entirely internally standardized DNA quantitation. *Nucl. Ac. Res.* **23**: 192-193.
- Celentano, D. D., Klassen, A. C., Weisman, C. S. et Rosenshein, N. B. 1987. The role of contraceptive use in cervical cancer: the Maryland cervical cancer case-control study. *Am. J. Epid.* **126**: 592-604.
- Chiang, C. M., Broker, T. M. et Chow, L. T. 1991. An E1M-E2C fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is a sequence-specific transcription repressor. *J. Virol.* **65**: 3317-3329.
- Claas, E.C. Melchers, W.J., van der Linden, H.C., Lindeman, J. et Quint, W.G. 1989. Human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical carcinomas and

- metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* **135**: 703-9.
- Cox, J. T., Lorincz, A. T., Schiffman, Sherman, M. E., Cullen, A. et Kurman, R. J. 1995. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in treating women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **172**: 946-954.
- Crisp, W. E., Asadourian, L. et Romberger, W. 1967. Application of cryosurgery to gynecologic malignancy. *Obstet. Gynecol.* **30**: 668-673.
- Crook, T., Wrede, D., Tidy, J. A., Mason, W. P., Evans, D. J. et Vousden, K. D. 1992. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: Association with human papillomavirus-negative tumours. *Lancet.* **339**: 1070-1073.
- Culotta, E. et Koshland, D. E. 1993. p53 sweeps through cancer research. *Science.* **262**: 1958-1961.
- Davis, L.G., DIBNER, M.D. et BATTEY, J.F. 1989. *Basic Methods in Molecular Biology.* Elsevier. New York.
- de Rosa Husman, A. M., Walboomers, J. M. M., van den brule, A. J. C., Meijer, C. J. L. M. et Snijers, P. J. F. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* **76**: 1.57-1062.
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E. et Livingston, D. M. 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell.* **54**: 275-283.
- Demopoulos, R. I., Horowitz, L.F. et Vamvakas, E.C. 1991. Endocervical gland involvement by cervical intraepithelial neoplasia grade III. Predictive value of residual and/or recurrent disease. *Cancer.* **68**: 1932-1936.
- Doll, R. et Peto, R. 1978. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and life-long non-smokers. *J. Epid. Comm. Health.* **32**: 303-313.
- Donnan, S. P., Wong, F. W., Ho, S. C., Lau, E. M., Takashi K. et Esteve, J. 1989. Reproductive and sexual risk factors and human papilloma virus infection in

cervical cancer among Hong Kong Chinese. *Int. J. Epid.* **1**: 2-36.

Dorman, S. A., Danos, L. M., Wilson, D. J., Noller, K. L., Malkasian, G. D., Goellner, J. R. et Smith, T. L. 1983. Detection of chlamydial cervicitis by Papanicolaou stained smears and cultures. *Am. J. Clin. Path.* **79**: 421-425.

Draeby-Kristiansen, J., Garsaae, M., Bruun, M. et Hansen, K. 1991. Ten years after cryosurgical treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165**: 43-45.

Duncan, M. E., Tibaux, G., Pelzer, A., Reimann, K., Peutherer, J. F., Simmonds, P., Young, H., Jamil, Y. et Daroughar, S. 1990. First coitus before menarche and risk of sexually transmitted disease. *Lancet.* **335**: 338-340.

Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. et Harlow, L. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* **243**: 934-937.

Forster, G., Jha, R., Cheethan, D., Munday, P., Coleman, D. et Taylor-Robinson, D. 1983. Cytological diagnosis of chlamydia infection of the female genital tract. *Lancet.* **2**: 578-579.

Franco, E. L. F. Epidemiology of uterine cancers. Dans: Meisels, A., Morin, C. (Éd.) *Cytopathology of the uterus*. Chicago, É.-U. 1996a.

Franco, E. L. F. Epidemiology of anogenital warts and cancer. Dans: Reid, R. et Lörincz, A. (Éd.) *Human papillomavirus*. Philadelphia: Obstetrics and gynecology clinics of North America. 1996b.

Franco, E. L. F., Bergeron, J., Villa, L., Arella, M., Richardson, L., Arsneault, J. et Stanimir, G. 1996c. Human papillomavirus DNA in invasive cervical carcinomas and its association with patient survival: a nested case-control study. *Cancer Epid. Biom. Prev.* **5**:271-275.

Franco, E. L. F. 1993. Human papillomavirus and the natural history of cervical cancer. *Infect. Med.* **10**: 57-64.

Franco, E. L. F. 1991a. The sexually transmitted disease model for cervical cancer: incoherent epidemiologic findings and the role of misclassification of human papillomavirus infection. *Epidemiology.* **1**: 98-106.

- Franco, E. L. F. 1991b. Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 1195-1206.
- Gius, D., Grossman, S., Bedell, M. A. et Laimins, L. A. 1988. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* **62**: 665-672.
- Gopalkrishna, V., Murthy, N. S., Sharma, J. K., Roy, M., Das, D. K., Luthra, U. K. et Das, B. C. 1995. Increased human papillomavirus infection with the increasing number of pregnancies in Indian women. *J. Infect. Dis.* **171**: 254-255.
- Gregoire, L., Arella, M., Campione-Piccardo, J. et Lancaster, W. D. 1989. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J.Clin.Microbiol.* **27**: 2660-2665.
- Grossman, S. R. 1989. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene.* **4**: 1089-1093.
- Guerrero, E., Daniel, R. W., Bosh, F. X., Castellsagué, X., Muñoz, N., Gili, M., Viladiu, P., Navarro, C., Zubiri, M. L., Ascunce, N., Gonzalez, L. C., Tafur, L., Izarzugaza, I. et Shah, K. V. 1992. Comparison of ViraPap, Southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J.Clin.Microbiol.* **30**: 2951-2959.
- Hagensee, M. E., Yaegashi, N., G. et Galloway, D. A. 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J.virol.* **67**: 315-322.
- Harnekar, A. B., Leiman, G. et Markowitz, S. 1985. Cytologically detected chlamydial changes and progression of cervical intraepithelial neoplasias. *Acta Cytol.* **29**: 661-664.
- Hatch, K. D. Handbook of colposcopy. Prognosis and treatment of lower genital tract neoplasia and HPV infections. Boston, É.-U. Little, Brown Company. 1989.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. l., Lowy, D. R. et Schiller, J. T. 1989. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8**: 3905-3910.
- Hay, R., Macy, M., Chen, T.R., McClintock, P. et Reid, Y. Catalogue of cell lines & hybridomas 6th edition. ATCC. É-U.1988

- Heins Jr, H. C., Dennis, E. J. et Pratt-Thomas, H. R. 1958. The possible role of smegma in carcinoma of the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 720-725.
- Hellberg, D., Valentin, J. et Nilsson, S. 1986. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: an association independent of sexual and other risk factors? *Acta Obstet. Gynec. Scand.* 65: 625-631.
- Hemmington, E., Stendahl, U. et Stenson, S. 1981. Cryosurgical treatment of cervical intraepithelial neoplasia with follow-up of five to eight years. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 139: 144-147.
- Herrero, R., Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Tenorion, F., Britton, R. C., Gaitan, E., Montalvan, P., Garcia, M. et Rawls, W. E. 1990. Risk factors for invasive carcinoma of the uterine cervix in Latin America. *Bull. Pan Am. Health Org.* 24: 263-283.
- Herrero, R., Potishman, N., Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Tenorio, F., de Britton, R. C. et Gaitan, E. 1991. A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer I: dietary indicators. *Am. J. Epid.* 134: 1335-1346.
- Higgins, G. D., Davy, M., Roder, D., Uzelin, D. M., Phillips, G. E. et Burrell, C. J. 1991. Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA. *Lancet.* 338: 910-913.
- Higgins, R. V., van Nagell, J. R. Jr, Donaldson, E. S., Gallion, H. H., Pavlik, E. J., Kryscio, R. J. 1990. The efficacy of laser therapy in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 36: 79-81.
- Hildesheim, A., Mann, V., Brinton, L. A., Szklo, M., Reeves, W. C. et Rawls, W. 1991. Herpes simplex virus type 2: a possible interaction with human papillomavirus types 16/18 in the development of invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 49: 335-340.
- Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Gravitt, P. E., Glass, A. g., Greer, C. E., Zhang, T., Scott, D. R., Rush, B. B., Lawler, P., Sherman, M. E., Kurman, R. J. et Manos, M. M. 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J. Infect. Dis.* 169: 235-240.
- Hoffman, D. et Hecht, S. S. Advances in tobacco carcinogenesis. Cooper, C. S., Groveve, P. L. Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Allemagne: Springer. 1990.

- Howley, P. M. Papillomaviruses and their replication. Dans: Fields, B. N. et Knipe, D. M. (Éd.) Fields Virology. Ney York, É-U: Raven Press, 1990.
- Huibregtse, J. M. 1991. A Cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **10**: 4129-4135.
- Hunter, R. E., Longcope, C. et Keough, P. 1987. Steroid hormone receptors in carcinoma of the cervix. *Cancer.* **60**: 392-396.
- IARC. Tobacco smoking. Dans: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon , France: IARC. 1986.
- Institut national du cancer du Canada. Statistiques canadiennes sur le cancer, 1990. Toronto, Canada. 1990.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S. et Ornston, L. N. Medical microbiology. Eighth Edition. Norwalk: Appleton& Lange 1989.
- Johannesson, G., Geirsson, G. et Day, N. 1978. The effect of mass screening in Iceland 1965-74. *Int. J. Cancer.* **21**: 418-425.
- Kjær, S. K. et Brinton, L. A. 1993. Adenocarcinomas of the uterine cervix: the epidemiology of an increasing problem. *Epid. Rev.* **15**: 486-498.
- Kjær, S. K., van den Brule, A. J. C., Bock, J. E., Poll, P. A., Engholm, G., Sherman, M. E., Walboomers, J. M. M. et Meijer, C. J. L. M. 1996. Human papillomavirus: The most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer.* **65**: 601-606.
- Kols, M., Rinehart, W., Piotrow, P. T., Coucette, L. et Quilin, W. F. 1982. Oral contraceptives in the 1980s. *Popul. Rep. A.* **6**: 189-200.
- Koss, L. G. 1989. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *J. Amer. Med. Assoc.* **261**: 737-743.
- Koutsky, L. A., Galloway, D. A. et Holmes, K. K. 1988. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epid. Rev.* **10**: 122-163.
- Koutsky, L. A., Holmes, K. K., Critchew, C. W., Stevens, C. E., Peavonen, J., Beckmann, A. M., ReRouen, T. A., Galloway, D. A., Vernon, D. et Kiviat, N. B. 1992. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation

to papillomavirus infection. *N. Engl. J. Med.* **327**: 1272-1278.

- Lambert P.F. et Howley, P. M. 1988. Bovine papillomavirus type 1 E1 replication-defective mutants are altered in their transcriptional regulation. *J. Virol.* **62**: 4009-4015.
- Lansac, J. et Lecompte, P. *Gynécologie pour le praticien 4ième édition..* Paris: SIMEP. 1994.
- Ley, C., Bauer, H. M., Reingold, A., Schiffman, M. H., Chambers, J. C., Tashiro, C. J. et Manos, M. M. 1991. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 997-1003.
- Lion, T. et Haas, O. A. 1990. Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction . *Anal. Biochem.* **188**: 335-337.
- Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W. et Kurman, R. J. 1992. Human papillomavirus infection of the cervix relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.* **79**: 328-337.
- Lungu, O., Wright, T. C. et Silverstein, S. 1992. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol. Cell. Probes.* **6**:145-152.
- Maiman, M., Tarricone, N., Vieira, J., Suarez, J., Serur, E. et Boyce, J. G. 1991. Colposcopy evaluation of human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet. Gynecol.* **78**:84-88.
- Maiman, M., Fruchter, R. G., Serur, E., Remy, J., Feuer, G. et Boyce, J. 1990. Human immunodeficiency virus infection and cervical neoplasia. *Gynec. Oncol.* **38**: 377-382.
- Malhotra, S. L. 1970. A study of carcinoma of uterine cervix with special reference to its causation and prevention. *Brit. J. Cancer.* **25**: 62-71.
- Manos, M. M., Ting, Y., Wright, D. K., Lewis, A. J., Broker, T. R. et Wolinsky, S. M. 1989. Use of the polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* **7**: 209-214.
- McCance, D. J., Lopan, R., Fuchs, E. et Laimins, L. A. 1988. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

85:7169-7173.

- Meijer, C. J. L. M., van den Brule, A. J. C., Snijders, P. J. F., Helmerhorst, T., Kenemans, T. et Walboomers, J. M. M. 1992. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. Dans: Muñoz, N., Bosh, F. X., Shah, K. V., Meheus, A. (Éd.) *The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer*. Lyon: IARC Publications. **119**: 271-281.
- Meisels, A. 1969. Dysplasia and carcinoma of the uterine cervix. IV. A correlated cytologic and histologic study with special emphasis on vaginal microbiology. *Acta Cytol.* **13**: 224-231.
- Meisels, A., Begin, R. et Schneider, V. 1977. Dysplasias of uterine cervix: epidemiological aspects: role of age at first coitus and of oral contraceptives. *Cancer.* **40**: 3076-3081.
- Meisels, A. et Morin, C. 1976. Condylomatous lesions of the cervix and vagina I. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* **20**: 505-509.
- Melkert, P. W. J., Hopman, E., van dan Brule, A. J. C., Risse, E. K. J., van Diest, P. J., Bleker, O. P., Helmerhorst, T., Schipper, M. E. I., Meijer, C. J. L. M. et Walboomers, J. M. M. 1993. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int. J. Cancer.* **53**: 919-923.
- Miwa, K., Miyamoto, S., Kato H., Imamura T., Nishida M., Yoshikawa Y., Nagata Y. et Wake, N. 1995. The role of p53 inactivation in human cervical cell carcinoma development. *Brit. J. Cancer.* **71**: 219-229.
- Monsonégo, J. *Dysplasie du col utérin et HPV*. Maloine. Paris, France. 1988.
- Muir, C., Waterhouse, J. et Mack, T. 1987. *Cancer incident in five continents, vol. V*. IARC Scientific Publications. **88**: 886-887.
- Mukherjee, B. N., Sengupta, S., Chaudhuri, S., Biswas, L. N. et Maiti, P. 1994. A case-control study of reproductive risk factors associated with cervical cancer. *Int. J. Cancer.* **59**: 476-482.
- Muñoz, N. 1992. HPV and cervical cancer: review of case control and cohort studies. Dans: Muñoz, N., Bosh, F. X. et Shah, K. V. (Éd.) *Epidemiology of cervical cancer and human papillomaviruses*. Lyon: IARC Scientific Publications **119**: 251-262.

- Nuovo, G. J. et Pedemonte, B. M. 1990. Human papillomavirus types and recurrent cervical warts. *J. Amer. Med. Assoc.* **263**: 1223-1226.
- Olsen, A. O., GjØen, K., Torill, S., Ørstavik, I., Næss, O., Kierulf, K., Sponland, G. et Magnus, P. 1995. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade II-III: a population-based case-control study. *Int. J. Cancer.* **61**: 312-315.
- Orth, G., Breiburd, F. et Favre, M. 1978. Evidence of antigenic determinants shared by the structural polypeptides of (Shope) rabbit papillomavirus and human papillomavirus type 1. *Virology.* **91**: 243-255.
- Orth, G., Jeanteur, P. et Croissant, O. 1971. Evidence for and localization of vegetative viral DNA replication by autoradiographic detection of RNA-DNA hybrids in sections induced by Shope papillomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* **68**: 1876-1880.
- Paganini-Hill, A., Chao, A., Ross, R. K. et Henderson, B. E. 1987. Vitamin A, β -carotene, and the risk of cancer: a prospective study . *J. Natl. Cancer Inst.* **79**: 443-448.
- Parazzini, F., La Vecchia, N., Negri, E., Cecchetti, G. et Fedele, L. 1989. Reproductive factors and the risk of invasive and intraepithelial cervical neoplasia. *Brit. J. Cancer.* **59**: 805-809.
- Parkin, D. M., Pisani, P. et Ferlay, J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of 18 major cancers in 1985. *Int. J. Cancer.* **54**: 594-606.
- Pater, M. M. et Pater, A. 1985. Human papillomavirus type 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology.* **145**: 313-318.
- Pfister, H. et Fuchs, P. G. 1991. Relation of papillomaviruses to anogenital cancer. *Derm. Clin.* **9**: 267-276.
- Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K. et Howley, P. M. 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell.* **53**: 539-547.
- Phillips, D. H., Hewer, A., Malcom, A. D., Ward, P. et Coleman, D. V. 1990a. Smoking and DNA damage in cervical cells. *Lancet.* **335**: 417.
- Phillips, D. H., Schoket, B., Hewer, A., Bailey, E., Kostics, Vincze O. 1990b. Influence of

cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int. J. Cancer.* **46**: 569-575.

- Popkin, D. R. 1983. Treatment of cervical intraepithelial neoplasia with the carbon dioxide laser. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **145**: 177-180.
- Postic, B., Singh, B., Squeglia, N. L. 1978. Inactivation of clinical isolates of Herpesvirus hominis types 1 and 2, by chemical contraceptives. *Sex. Trans. Dis.* **5**: 22-24.
- Potishman, N., Herrero, R., Brinton, L. A., Reeves, W. C., Stacewicz-Sapuntzakis, Jones, C. J., Breenes, M. M., Tenorio, F., de Britton, R. C., Gaitan, E. 1991. A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer II: serologic indicators. *Am. J. Epid.* **134**: 1347-1355.
- Pratt-Thomas, H. R., Heins, H. C., Latham, E., Dennis, E. J., McIver, F. A. 1956. The carcinogenic effect of human smegma: an experimental study I. Preliminary report. *Cancer.* **9**: 671-680.
- Resnick, R. M. , Cornelissen, M. T. E., Wright, D. K., Eichinger, G. H., Fox, H. S., Schegget, J. T., Manos, M. M. 1990. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1477-1484.
- Richart, R. M. 1987. Causes and management of CIN. *Cancer.* **60**: 1951-1959.
- Richart, R. M., Townsend, D. E., Crisp, W., DePetrillo, A., Rerency, A. Johnson, G., Roy, M. et Villa Santa, U. 1980. An analysis of «long-term» follow-up results in patients with cervical intraepithelial neoplasia treated by cryotherapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **137**: 823-826.
- Ries, L. A. G., Miller, B. A., Hankey, B. F. SEER Cancer statistics Review, 1973-1991: tables and graphs. Bethesda, É.U. National Cancer Institute NIH. 1994.
- Riou, G., Favre, M., Jeannel, D., Bourhis, J., Le Doussal, V., Orth, G. 1990. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet.* **335**: 1171-1174.
- Romanczuk H. et Howley, P. M. 1992. Disruption of either E1 or E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.* **89**: 3159-3163.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. et Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**: 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. et Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*. **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition). New York, É-U.: Cold Spring Harbour Laboratory. 1989.
- Schafer, A., Friedmann, W., Mielke, M., Schwartlander, B. et Koch, M. A. 1991. The increased frequency of cervical dysplasia-neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus is related to the degree of immunosuppression. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **164**: 593-599.
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C. et Howley, P. M. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sc. U. S. A.* **88**: 5523-5527.
- Scheffner, M., Münger, K., Huibregtse, J. M. et Howley, P. M. 1992. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins. *EMBO J.* **11**: 2425-2431.
- Schiffman, M. H. 1992. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J. Natl Cancer Inst.* **84**: 394-398.
- Schiffman, M. H., Bauer, H. M., Hoover, R. N., Glass, A. G., Cadell, D. M., Rush, B. B., Scott, D. R., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Wacholder, S., Stanton, C. K. et Manos, M. M. 1993. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**: 958-964.
- Schiffman, M. H., Haley, N. J., Felton, J. S., Andrews, A. W., Kaslow, R. A., Lancaster, W. D., Kurman, R. J., Brinton, L. A., Lannom, L. B. et Hoffmann, D. 1987. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix. *Cancer Research.* **47**: 3886-3888.
- Schmidt, C., Pretorius, R. G., Bonin, M., Hanson, L., Semrad, N. et Waring, W. 1992. Invasive cervical cancer following cryotherapy for cervical intraepithelial neoplasia or human papillomavirus infection. *Obstet. Gynecol.* **80**: 797-800.

- Schneider, A., Hotz, M. et Gissmann, L. 1987a. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int. J. Cancer.* **40**: 198-201.
- Schneider, A., Sawada, E., Gissmann, L. et Shah, K. 1987b. Human papillomaviruses in women with a history of abnormal Papanicolaou smears and in their male partners *Obstet. Gynecol.* **69**: 554-562.
- Schneider, V., Kay, S. et Lee, H. M. 1983. Immunosuppression as a high-risk factor in the development of condyloma acuminatum and squamous neoplasia of the cervix. *Acta Cytol.* **27**: 220-224.
- Sedman, S. A., Barbosa, M. S., Vass, W. C., Hubbert, N. L., Haas, J. A., Lowy, D. R. et Schiller, J. T. 1991. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J. Virol.* **65**: 4860-4866.
- Shah, K. V. et Howley, P. M. Papillomaviruses. Dans: Fields, B. N. et Knipe, D. M. (Éd.) *Fields Virology*. New York, É.-U. Raven Press. 1990.
- Shiller J.T., Kleiner, E., Androphy, E. J., Lowy, D. R. et Pfister, H. 1989. Identification of bovine papillomavirus E1 mutants with increased transforming and transcriptional activity. *J. Virol.* **63**: 1775-1782.
- Shingleton, H. M. et Orr, J. W. *Cancer of the cervix. Diagnosis and treatment*. New York, É.U. Churchill Livingstone. 1987.
- Sillman, F., Stanek, A., Sedlis, A., Rosenthal, J., Lanks, K. W., Buchhagen, D., Nicastrì, A. et Boyce, J. 1984. The relationship between human papillomavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosuppressed women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **150**: 300.
- Simons. A. M., Migica van Herckenrode, C., Rodriguez, J. A., Maitland, N., Anderson, M., Phillips, D. H. et Coleman, D. V. 1995. Demonstration of smoking-related DNA damage in cervical epithelium and correlation with human papillomavirus type 16, using exfoliated cervical cells. *Brit. J. Cancer.* **71**: 246-249.
- Singh B., Postic, B. et Cutler, J. C. 1976. Virucidal effect of certain chemical contraceptives on type 2 herpes-virus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **126**: 422-425.
- Slattey, M. L., Overall, J. C., Abbott, T. M., French, T. K., Robinson, L. M. et Gardner, J.

1988. Sexual activity, contraception, genital infections, and cervical cancer: support for a sexually transmitted disease hypothesis. *Am. J. Epid.* **130**: 248-258.
- Smotkin, D. Virology of human papillomavirus. 1989. *Clin. Obst. Gyn.* **32**: 117-126.
- Snijders, P. F. J., Cromme, F. V., van den Brule, A. J. C., Schrijnemakers, H. F. J., Snow, G., Meijer, C. J. L. M. et Walboomers, J. M. M. 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* **71**: 173-181.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stein, D. S., Ulrich, S. A. et Hasiuk, A. S. 1985. Laser vaporisation in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Reprod. Med.* **30**: 179-183.
- Stoler, M. H. et Broker, T. R. 1986. *In situ* hybridization detection of human papillomavirus DNA and messenger RNA in genital condylomas and cervical carcinoma. *Hum. Path.* **17**: 1250-1258.
- Takahashi, T. 1984. Vitamin A in new food composition tables from Japan. *J. Natl Cancer Inst.* **73**: 1405-1407.
- Twiggs, L. B., Potish, R. A., Leung, B. S., Carson, L. F., Adcock, L. L., Savage, J. E. et Prem, K. A. 1987. Cystolic estrogen and progesterone receptors as prognostic parameters in stage 1B cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **28**: 156-160.
- van den Brule, A.J.C., Snijders, P. J. F., Gordin, R. L. J., Bleker, O. P., Meijer, C. J. M. L. et Walboomers, J. M. M. 1990. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int. J. Cancer.* **45**: 644-649.
- van den Brule, A. J. C., Meijer, C. J. L. M., Bakels, V., Kenemans, P. et Walboomers, J. M. M. 1990. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2739-2743.
- van Ranst, M. A., Tachezy, R., Delius, H. et Burk, R. D. 1993. Taxonomy of the human papillomavirus. *Papillomavirus rep.* **4**: 61-65.
- VanEenwyck, J., Davis, F. G. et Colman, N. 1992. Folate, vitamin C, and cervical

1988. Sexual activity, contraception, genital infections, and cervical cancer: support for a sexually transmitted disease hypothesis. *Am. J. Epid.* **130**: 248-258.
- Smotkin, D. Virology of human papillomavirus. 1989. *Clin. Obst. Gyn.* **32**: 117-126.
- Snijders, P. F. J., Cromme, F. V., van den Brule, A. J. C., Schrijnemakers, H. F. J., Snow, G., Meijer, C. J. L. M. et Walboomers, J. M. M. 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* **71**: 173-181.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stein, D. S., Ulrich, S. A. et Hasiuk, A. S. 1985. Laser vaporisation in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Reprod. Med.* **30**: 179-183.
- Stoler, M. H. et Broker, T. R. 1986. *In situ* hybridization detection of human papillomavirus DNA and messenger RNA in genital condylomas and cervical carcinoma. *Hum. Path.* **17**: 1250-1258.
- Takahashi, T. 1984. Vitamin A in new food composition tables from Japan. *J. Natl Cancer Inst.* **73**: 1405-1407.
- Twiggs, L. B., Potish, R. A., Leung, B. S., Carson, L. F., Adcock, L. L., Savage, J. E. et Prem, K. A. 1987. Cystolic estrogen and progesterone receptors as prognostic parameters in stage 1B cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **28**: 156-160.
- van den Brule, A. J. C., Meijer, C. J. L. M., Bakels, V., Kenemans, P. et Walboomers, J. M. M. 1990. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2739-2743.
- van Ranst, M. A., Tachezy, R., Delius, H. et Burk, R. D. 1993. Taxonomy of the human papillomavirus. *Papillomavirus rep.* **4**: 61-65.
- VanEenwyck, J., Davis, F. G. et Colman, N. 1992. Folate, vitamin C, and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Epid. Biom. Prev.* **1**: 119-124.
- Vergote, I. B., Makar, A. P. L. et Kjell, E. K. 1992. Laser excision of the transformation zone as a treatment of cervical intraepithelial neoplasia with satisfactory colposcopy. *Gynecol. Oncol.* **44**: 235-239.

- Villa, L. L. et Franco, E. L. F. 1989. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *J. Natl Cancer Inst.* **81**: 332-340.
- Wagner, D., Ikenberg, H., Boehm, N. et Gissman, L. 1984. Identification of human papillomavirus in cervical swab by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. *Obstet. Gynecol.* **64**: 767-772.
- Wassertheil-Smoller, S., Romney, S. L., Wylie-Rosset, J., Salgle, S., Miller, G., Licido, D., Duttagupta, C. et Palan, P. R. 1981. Dietary vitamin C and uterine cervical dysplasia. *Am. J. Epid.* **114**: 714-724.
- Werness, B. A., Levine, A. J. et Howley, P. M. 1990. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* **248**: 76-79.
- Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. et Harlow, E. 1988. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature.* **334**: 124-129.
- Willet, W. C. et MacMahon, B. 1984a. Diet and cancer: an overview (first or two parts). *N. Engl. J. Med.* **310**: 633-638.
- Willet, W. C., Polk, B. F. et Underwood, B. A. 1984. Relation of serum vitamin A and E and carotenoids to the risk of cancer. *N. Engl. J. Med.* **314**: 430-434.
- Wingo, P. A., Tong, T. et Bolden, S. Cancer statistics 1995. *CA-A Cancer Journal for Clinicians.* **52**: 8-30.
- Wright, D. K. et Manos, M. M. Sample preparation from paraffin- embedded tissues. Dans: Innis, D. A., Gelfand, D. H., Snisky, J. J., White, T. J. *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications.* New York, É.U.: Academic Press, Inc. 1990.
- Wright, T. C., Ellerbrock, T. V., Chiasson, M. A., et . 1994a. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with HIV: prevalence, risk factors and validity of Papanicolaou smears. *Obstet. Gynecol.* **84**: 591-597.
- Wright, T. C., Kurman, R. J., Ferenczy, A. Precancerous lesions of the cervix. Dans: Jurman, R. J. (Éd.) *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 4th edition. New York, É-U.: Springer Verlag. 1994b.

- Yliskoski, M., Saarkoski, S. et Sirjänen, K. 1991. Conization for CIN associated with human papillomavirus infection. *Arch. Gynecol. Obstet.* **249**: 59-65.
- Young, L. S., Tierny, Ellis, J. R., Winter, H. et Woodman, C. B. 1992. PCR for the detection of genital human papillomavirus infection: a mixed blessing. *Ann. Med.* **24**: 215-219.
- Ziegler, R. G., Brinton, L. A., Hamman, R. f., Lehman, H. F., Levine, R. S., Mallin, K., Norman, S. A., Rosenthal, J. F., Trumble, A. C. et Hoover, R. N. 1990. Diet and the risk of invasive cervical cancer among white women in the United States. *Am. J. Epid.* **132**: 432-445.
- zur Hausen, H. 1991 Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology.* **184**: 9-13.
- zur Hausen, H. 1989. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* **49**: 4677-4681.
- Zur Hausen, H., Gissmann, L., Schlehofer, J. R. 1984. Viruses in the etiology of human genital cancer. *Prog. Med. Virol.* **30**: 170-186.