

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

**Département de Biologie**

*Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à  
l'environnement (LAMAABE)*

**MEMOIRE**

Présenté par

**MOUHOUN Malika & DAHMANI Bouchra**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Biologie

Option : Microbiologie

**Thème**

Etude de profil épidémiologique des cancers génitaux au service  
d'épidémiologie et identifications du Papillomavirus humain à partir des  
biopsies

Soutenu le 27/06/2017, devant le jury composé de :

Présidente	Benariba N.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen
Encadreur	Boublenza L.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen
Examinatrice	Chabni N.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen
Examinatrice	Bensalah F	Maitre de conférences B	Université de Tlemcen

**Année Universitaire : 2016-2017**

# *Dédicace I*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie cette thèse de master à :*

*A Mon très cher Père **SLIMEN***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*A Ma tendre Mère **AICHA***

*Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*A ma très chère sœur **NEUZHA**, son mari **TARIK** et leur fille **AMINA***

*Malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère.*

*A mes chers frères : **BILAL MOHAMED** et **YOUCEF***

*Pour leur soutien et de leur présence constante.*

*Je dédie ce travail aussi à tous ceux qui me sont chers et proches,*

*A mon fiancé **AMINE**.*

*A mes tantes et oncles.*

*A mes chers cousins et cousines.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection*

*A mes deuxième sœurs : Chère binôme **BOUCHRA** et chère amie **IMENE**,*

*Votre encouragement et votre soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance. Notre amitié est pour moi, le plus beau cadeau du ciel.*

*A mes très chères et merveilleuses amies, **Sihem, Wahiba, Samia...***

*Je vous aime beaucoup mes chères amies, et jamais j'oublierai les moments agréables que nous avons passés ensemble.*

*A mes chers collègues **DALEL, ABIYA, DONIA***

*En souvenir des bons moments passés ensemble.*

*A mes enseignants*

*A tous ceux que j'ai oublié de nommer.*

**MALIKA**

## *Dédicace II*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce travail...*

*A Mon très cher père MOKHTAR,*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consenti pour mon éducation et ma formation.*

*Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

*A Ma très chère mère NAÏMA,*

*Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A Mon cher grand père ALI et mes chères grands-mères FATÏNA et FATÏNA,*

*Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

*A mon frère, le bijou de la famille : ABDELADIM*

*Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de Réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de Fraternité et d'amour.*

***A ma très chère petite sœur RAYHANE***

*Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, Je te dédie ce travail.*

***À mes chers oncles, tantes, MOHAMED ABOUBAKR, ABDEL FETTAH KARIMA SAMIRA SOUAD ET KHADIDJA ainsi leurs épouses, époux et enfants***

*Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.*

***A mes chères et adorable cousines et spécialement LAMIA la douce, au cœur si grand FATIMA, la prunelle de mes yeux IMENE l'aimable.***

*A tous les membres de ma famille, petits et grands Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection*

***A IMENE** Plus qu'une amie, tu es ma sœur, ma confidente, ma complice. Ce témoignage de mon affection est bien peu de choses au regard de tout ce que je te dois. Toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.*

***A ma très cher binôme MALIKA** Ton encouragement et ton soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance.*

***À mes amis de toujours: SIHEM, SAMIA, WAHIBA***

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

***A mes chers collègues DALEL, ABIYA, DONIA***

*En souvenir des bons moments passés ensemble.*

***A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.***

**BOUCHRA**

# Remerciements

*En préambule à ce mémoire nous remerciant **ALLAH** qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.*

*Ce travail est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel nous avons bénéficiés de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes, à qui nous tenons à dire profondément et sincèrement merci.*

*La première personne que nous tenons à remercier est notre encadreur Mme **BOUBLEENZA Lamia**, pour le sérieux, l'orientation, la confiance et la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'elle trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche :*

*Je pense ici en particulier à **Mme Benariba F**, qui nous a fait l'honneur de présider le Jury de ce mémoire, d'examiner notre travail et de l'enrichir par vos propositions.*

*Un grand merci au **Dr.Chabni N**, pour son aide précieuse, pour sa gentillesse, pour avoir mis à notre disposition les données épidémiologiques nécessaires pour le bon déroulement de notre mémoire et nous la remercions, de même que pour sa participation au jury pour contribuer par ses remarques et suggestion à améliorer la qualité de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'étendent également à **Mme Bensalah F**, pour l'honneur qu'elle nous fait pour avoir accepté d'évaluer le travail.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à la doctorante MASDOUAN  
et Docteur NAHETA pour votre patience, votre disponibilité et vos qualités  
humaines qui par leur compréhensions et leur aides, on a pu accomplir notre travail de  
recherche et à tous les membres de laboratoire de recherche LAMABE sous la direction  
de professeur Mme HASSAINE Hafida.*

*Merci pour tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de  
ce travail.*

## ملخص

إن فيروس الورم الحليمي البشري من أبرز أسباب الإصابة بسرطان عنق الرحم, كما يؤثر نسبة معتبرة من أنواع آخر للأورام الخبيثة, بما فيها سرطان الفرج و المهبل.

إن الهدف من هذا العمل يتمحور من جهة في الوصول إلى دراسة مرجعية, تتبنى السيرة الوبائية لسرطان الجهاز التناسلي مثبتة لمدة خمسة سنوات بولاية تلمسان, و من جهة ثانية الكشف عن الحمض النووي لفيروس الورم الحليمي البشري إنطلاقاً من عينات سرطان الجهاز التناسلي مرورا ب PCR التقليدي و اختبار AMPLICOR.

تم أحصاء 476 حالة لسرطان الجهاز التناسلي كمعدل عام خلال الخمس سنوات الأخيرة بذروة 30 بالمائة سنة 2014, حيث كان سرطان عنق الرحم في المرتبة الأولى إذ سجلت 233 حالة, أي بمعدل 48.94 بالمائة.

تم الكشف عن فيروس الورم الحليمي البشري من خلال دراسة 36 عينة للأجهزة التناسلية, حيث 70.7 بالمائة منها أعطى نتيجة إيجابية, وقد تم تسجيل حضور فيروس الورم الحليمي البشري بنسبة 100 بالمائة في سرطان عنق الرحم, 40 بالمائة منها أحصيت في سرطانات المهبل, و 17 بالمائة في سرطانات الفرج.

تستهدف إستراتيجيات الوقاية على وجه الخصوص سرطان عنق الرحم, فيكون لبرنامج الفحص الطبي و التلقيح ضد الفيروس دورا فعالا لتجنب سرطان الجهاز التناسلي.

**الكلمات المفتاحية :** فيروس الورم الحليمي البشري – سرطان الجهاز التناسلي -عينة- AMPLICOR-PCR



## **Résumé**

L'infection par le virus du papillome humain (HPV) provoque pratiquement tous les cas de cancer du col de l'utérus, aussi une proportion variable de certaines tumeurs malignes non cervicales incluant le cancer vulvaire et vaginal.

L'objectif de ce travail consiste en une première partie, de réaliser une étude rétrospective du profil épidémiologique des cancers génitaux, histologiquement prouvés pendant une période de 5 ans (2012-2016) dans la région de Tlemcen, et dans une seconde partie, de détecter l'ADN d'HPV à partir des biopsies des cancers génitaux par PCR classique et test Amplicor.

Au total, 476 cas des cancers génitaux ont été enregistrés sur les cinq dernières années, avec un pic en 2014 (30%) cancer de col de l'utérus était le plus important avec 233 cas (48.94%). 36 prélèvements biopsiques génitaux ont fait l'objet de la détection d'HPV, dont 70,7% se sont révélés positifs, la fréquence des HPV était de 100% dans les cancers du col utérin, 40% dans les cancers du vagin, 17% dans l'ensemble des cancers de la vulve.

Les stratégies de prévention ciblent essentiellement le cancer du col de l'utérus, dont le programme de dépistage et le vaccin contre l'HPV offrent un optimisme selon lequel les cancers génitaux peuvent être évités.

**Les mots clés :** HPV, PCR, Amplicor, Biopsie, cancers génitales.

## **Abstract**

Cervical cancer cases are generally consequent upon the infection by human papillom virus (HPV), and a variable proportion of some tricky cervical tumors, including vulvar and vaginal cancers.

The contributions of this project are twofold, firstable, to realise a retrospective study for epidemiological profile of genital cancers, histologically proved during a five (05) years period (2012/2016) in Tlemcen. The seconde part sets out the detection of HPV DNA starting by genital cancers biopsies through classical PCR and Amplicor test.

Overall, in the five (05) latest years, 476 cases of genital cancers have been registerated reaching with that a peak of 30% in 2014, headlighted by 233 cases (48,94%) cervix cancer. The detection of HPV comes by the genital biopsy samples, where 70,7% of them have been revealed positive. The HPV frequency was at 100% in the cervix cancer ;40% related to vaginal cancers, 17% concern vulvar cancers.

The cervix cancer is essentially targeted by the strategies of prevention, where screening program and vaccination against HPV offer an optimisme through which genital cancers can be avoided.

**Key words :** HPV, PCR, Amplicor, biopsy, genital cancer

**Table des matières**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction..... 1**

**Synthèse bibliographique**

**Chapitre I : Les papillomavirus humains**

1. Historique.....	5
2. La phylogénie des papillomavirus.....	6
2.1 Les Alpha papillomavirus.....	6
2.2 Les bêta-papillomavirus.....	7
2.3 Les gamma-papillomavirus.....	7
2.4 Les Mu-papillomavirus.....	7
2.5 Les Nu-papillomavirus.....	7
3. La classification des papillomavirus.....	8
3.1. Selon leur génome .....	8
3.2 Selon le potentiel oncogène .....	8
3.2.1. Les HPV à haut risques.....	8
3.2.2. Les HPV à bas risques.....	8
3.2.3 Les HPV à risques intermédiaire.....	9
3.3 Selon le tropisme tissulaire.....	9
3.3.1 HPV à tropisme cutanée.....	9
3.3.2 HPV à tropisme muqueux.....	9
4. Structure.....	10
4.1 Organisation structurale.....	10
4.2 Organisation génomique.....	11
4.2.1 Une région régulatrice en amont (URR) (Upstream regulatory region).....	11
4.2.2 Une région précoce.....	11
4.2.3 Une région tardive.....	12
5. Cycle virale.....	13
5.1 Attachement.....	13

5.2	Internalisation.....	14
5.3	Décapsidation et translocation.....	14
5.4	Maintien et génome viral.....	14
5.5.	Prolifération cellulaire.....	15
5.6	Amplification de génome viral.....	15
5.7	Encapsidation et libération.....	15
6.	L'intégration et carcinogénèse.....	15
7.	La réponse immunitaire.....	17
7.1	Immunité à médiation cellulaire.....	17
7.2	Immunité à médiation humorale .....	17
8.	Mode de transmission.....	17
8.1	Transmission sexuelle.....	18
8.2	Transmission non sexuelle.....	18
<b>Chapitre II : Les cancers associés aux papillomavirus humains</b>		
1.	Cancers génitaux associées à l'HPV.....	20
1.1	Cancer de col de l'utérus.....	20
1.1.1	Epidémiologie du cancer du col de l'utérus.....	20
1.1.2	Anatomie et histologie.....	21
1.1.3	Définition de cancer du col de l'utérus.....	21
1.1.4	Histoire naturelle de l'infection.....	21
1.1.5	Facteurs influençant l'histoire naturelle du cancer du col utérin.....	22
1.2	Le cancer du vagin.....	24
1.2.1	Épidémiologie.....	25
1.2.2	Anatomie du vagin.....	25
1.2.3	Développement de cancer du vagin.....	25
1.3	Le cancer de vulve.....	26
1.3.1	Épidémiologie.....	26
1.3.2	Anatomie de vulve.....	26
1.3.3	Développement de cancer de vulve.....	26
2.	Autres cancers liée à HPV.....	27
2.1	HPV et l'appareil digestif.....	27
2.1.1	HPV et le cancer œsophagien.....	27
2.1.2	HPV et le cancer de l'anus.....	27

2.2	HPV et appareil urinaire.....	28
2.2.1	HPV et cancer de pénis.....	28
2.2.2	HPV et cancer de la vessie.....	28
2.3	HPV et cancer des voies aérodigestives.....	28
2.3.1	Cancer de l’oropharynx.....	28
2.3.2	Cancer de la cavité buccale.....	29
2.4	HPV et lésion de peau.....	29
2.5	HPV et cancer des poumons.....	29
2.6	HPV et cancer de sein.....	29
3.	HPV et immunodépression.....	30
3.1	Infections à HPV chez les femmes séropositives.....	30
3.2	Infections à HPV chez les greffés/transplantés.....	31

**Chapitre III : Méthodes de détection d’HPV**

1.	Détection qualitative de l’ADN d’HPV.....	33
1.1	Technique de détection.....	33
1.1.1	Southern Blot.....	33
1.1.2	Dot Blot.....	33
1.1.3	La réaction en chaîne de la polymérase (PCR).....	34
1.1.4	Hybridation en phase liquide.....	34
1.1.5	Hybridation in situ .....	35
1.2	Génotypage des HPV.....	35
1.2.1	Génotypage par séquençage.....	36
1.2.2	Génotypage par hybridation moléculaire inverse.....	36
1.2.3	Génotypage par puce d’ADN.....	38
1.2.4	Génotypage par technologie d’array en suspension : Luminex®.....	39
2.	Détection quantitative d’ADN.....	39
2.1	Détection des ARNm des HPV.....	40
2.2	Le Détection de marqueurs moléculaires (marquage immunochimique de la p16).....	40

**Partie pratique**

**I. Méthodologie**

1.	Etude de profil épidémiologique des cancers génitaux dans la région de Tlemcen..	43
1.1	Objectif principal.....	43

1.2 Objectifs spécifiques.....	43
1.2 Lieu d'étude.....	43
1.3 Méthode d'analyse.....	43
2. Recherche d'HPV à partir des cancers génitaux par PCR classique et test Amplicolor®.....	43
2.1 Objectif.....	44
2.2 Lieu d'étude.....	44
2.3 Matériel et méthodes.....	44
2.3.1 Déparaffinage des tissus fixés et inclus en paraffine.....	44
2.3.2 Extraction d'ADN par salting out .....	44
2.3.3 Contrôle de qualité de l'ADN par spectrométrie.....	45
2.3.4 Amplification de la l'ADN cible par PCR.....	45
2.3.5 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose.....	47
2.3.6 Recherche d'HPV par test Amplicolor®.....	49

## **II. Résultat**

1. Résultats de l'étude du profil épidémiologique des cancers génitaux dans la région de Tlemcen.....	53
1.1 Répartition des cancers génitaux par tranche d'âge.....	53
1.2 Répartition des cancers génitaux par année.....	53
1.3 Distribution des patientes selon la localisation.....	54
1.4 Répartition des types en fonction des années.....	54
1.5 Répartition des types des cancers en fonction des tranches d'âge.....	55
1.6 Répartition des cancers génitaux selon la morphologie.....	55
1.7 Répartition des cancers génitaux selon le stade de diagnostic.....	55
1.8 Répartition des cancers génitaux selon la base de diagnostic.....	56
1.9 Répartition des types des cancers selon de la région.....	57
2. Résultats d'extraction d'ADN par méthode classique et test Amplicolor.....	58

## **III. Discussion**

1. Discussion de l'étude épidémiologique des cancers génitaux au niveau de la région de Tlemcen entre 2012 et 2016.....	61
2. Discussion des techniques de détection des papillomavirus humains.....	63
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>67</b>
<b>Référence bibliographique.....</b>	<b>70</b>

**A**

**ACC** : Adénocarcinome à Cellule Claire  
**ADC** : Adénocarcinome  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.  
**AL** : tampon de lyse  
**ANEAS** : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé.

**ARN** : Acide Ribose Nucléique  
**ARNm** : Acide Ribose Nucléique messenger

**ASC** : Atypique Squamous Cell.  
**ATP** : Acide tri-phosphate

**B**

**Bax gène** : BCL2 Associated X gène.  
**BET** : Bromure d'Ethidium.  
**BPV** : Bovins papillomavirus.

**C**

**CE** : Carcinome Epidermoïde  
**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire  
**CIN** : Néoplasie cervicale intra-épithéliale.  
**CIN1** : Néoplasie cervical intra-épithéliale de grade 1 ou dysplasie légère.  
**CIN2** : Néoplasie cervical intra-épithéliale de grade 2 ou dysplasie modérée (souvent regroupé avec CIN3)  
**CIN3** : Néoplasie cervical intra-épithéliale de grade 3 ou dysplasie sévère ou carcinome in situ.  
**CIRC** : Le Centre International de Recherche sur le Cancer  
**CIS** : Carcinome In Situ  
**COPV** : Canins papillomavirus

**D**

**DES** : Diéthylstilboestrol  
**dNTP** : désoxyNucléotide TriPhosphate

**E**

**E** : Early (gène précoce)  
**EcPV** : Equins papillomavirus  
**EDTA** : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid  
**EV** : Epidermodysplasie verruciforme

**F**

**FISH** : Hybridation In Situ en technique Fluorescente

**J**

**JC** : Jésus-Christ

**H**

**HC** : Hybride Capture  
**HIS** : Hybridation In Situ  
**HPV** : Papillomavirus humains  
**HPV-BR** : Papillomavirus humains à bas risque  
**HPV-HR** : PapillomaVirus Humains à Haut Risque  
**HSIL** : High Squamous Intraepithelial lesion (lesion malpighiennes intraépithéliales de haut grade)  
**HSV** : Herpes Simplex virus

**I**

**ICTV** : International Committee on the Taxonomie of Viruses  
**IgA** : Immunoglobine A  
**IgG** : Immunoglobine G  
**IST** : Infections sexuellement transmissibles

**L**

**L** : Late (gène Tardif)  
**LA** : Linear Array  
**LAMAABE** : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement.  
**LCR** : Long control region  
**LSIL** : Low Squamous Intraepithelial lesion (Lésion malpighienne intraépithéliales de bas grade).

***N***

**NCR** : Non codant region

**NASBA** : Nucleic Acid Sequence  
Based Amplification

**NASBA** : Nucleic Acid Sequence  
Based Amplification

***O***

**ORFs** : Open Reading Frames.

**Ori** : Origine de réplication.

***P***

**p53** : Protéine 53.

**pb** : paire de base

**PCR** : Polymerase-- Chain Reaction  
(Réaction de Polymérisation en  
Chaîne).

**PCR –TR** : PCR en Temps Réel

**pRb**: Protéine Retinoblastome.

**PV** : Papillomavirus

***S***

**SDS**: Sodium Dodécyl Sulfate

**SHPG** : Sulfate Heparan  
Proteoglycans

**SIL** : Squameuses Intraepitheliales  
Lesions

***T***

**TAE** : Tris Acétate EDTA

**TH** : T Helper

**Treg** : T régulatrice

***U***

**URR** : Upstream regulatory region (Une  
région non codante)

**UV** : Ultra-Violet

***V***

**VADS** : Voies Aéro-Digestives  
Supérieure

**VaIN** : Vaginal Intra-epithelial  
Neoplasia.

**VIH** : virus de l'Immunodéficience  
Humaine

**VIN** : vulvar intraepithelial neoplasia ou  
néoplasie intraépithéliale vulvaire.

**VLP** : virus Like-Particles (Pseudo-  
particules virales).

**VNED** : Vulvar Non-neoplastic  
Epithelial Disorder.



**Liste des tableaux**

**1. Partie bibliographique**

**Tableau I.1** : Manifestations cliniques dues aux HPV et géotypes correspondants (Riethmuller, 2010).....10

**2. Partie expérimentale**

**Tableau II.1** : Recherche des HPV dans les cancers génitaux (NAHET *et al.*, 2016)...61

**Liste des figures**

**1. Partie bibliographique**

Fig I. 1 : Arbre phylogénétique des papillomavirus basé sur la séquence génétique de la protéine de capsid L1 (de Villiers, 2013)..... 7

Fig I. 2 : Structure tridimensionnelle du Papillomavirus humain (Pereira et Hitzlerith, 2009)..... 11

Fig I.3 : Représentation schématique du génome, illustrée sur HPV16, montrant l'emplacement des gènes précoces(E) et des gènes tardifs (L) et de l'URR (Bravo et Féllez-Sanchez., 2015)..... 13

Fig I. 4 : Réglementation et déréglementation du cycle de vie de papillomavirus à haut risque (Egawa et al., 2015) ..... 13

Fig I. 5 : Modèle de l'entrée de l' HPV : attachement et pénétration (Horvath et al., 2010)..... 14

Fig I. 6 : Principales étapes de la carcinogénèse associée à E7 et E6 des HPV haut risque (Mougin et al., 2008) ..... 17

Fig I. 7 : Schéma de l'utérus d'une femme en âge procréer (OMS, 2007)..... 21

Fig I. 8 : Schéma représentatif des deux épithéliums du col de l'utérus et la jonction et la jonction pavimonto-cylindrique (OMS, 2007). ..... 21

Fig I. 9 : Schéma présentant l'évolution vers une prolifération maligne au cours d'une infection par un HPV muqueux génital (Alain et al., 2010)..... 24

Fig I. 10 : Présentation schématique de PCR (Garibyan et Avashia,2014)..... 34

Fig I. 11 : La technologie Hybrid capture (Monsonogo 2007). ..... 35

Fig I. 12 : Principe de l'hybridation in situ (Fish) (Bouayed, 2004). ..... 36

Fig I. 13 : Principe de génotypage par hybridation inverse sur bandelettes (Hantz et al., 2010)..... 38

Fig I. 14 : Principe de génotypage par hybridation inverse sur puce à ADN (Hantz et al., 2010)..... 39

**2. Partie expérimentale**

Fig II. 1 : Le mélange réactionnel pour la PCR..... 46

Fig II. 2 : Le programme de thermocycleur pour le test HPV ..... 47

Fig II. 3: La préparation de gel d'agarose..... 48

Fig II. 4 : Le dépôt des échantillons sur gel d'agarose dans la plaque à électrophorèse .. 48

Fig II. 5 : Le mélange réactionnel MMX.....	49
Fig II. 6 : La programmation de thermocycleur pour le test HPV.....	50
Fig II. 7 : Après l'ajout de substrat actif.....	51
Fig II. 8 : Répartition des cancers génitaux par tranche d'âge entre 2012-2016.....	55
Fig II. 9 : Répartition des cancers génitaux par année entre 2012 et 2016.....	56
Fig II.10: Distribution des patientes selon la localisation.....	56
Fig II. 11 : Répartition des types en fonction des années entre 2012-2016.....	57
Fig II. 12 : Répartition des types des cancers en fonction des classes d'âge.....	57
Fig II. 13 : Répartition des cancers génitaux selon le type.....	58
Fig II. 14 : Répartition des cancers génitaux selon le stade de diagnostic.....	58
Fig II. 15 : Répartition des cancers génitaux selon la base de diagnostic.....	59
Fig II. 16 : Répartition des types des cancers selon la région.....	59
Fig II. 17 : La méduse d'ADN obtenu après extraction.....	<b>60</b>
Fig II. 18 : L'observation des bandes d'ADN sous-UV.....	60

# **INTRODUCTION**

Selon la Société américaine d'oncologie clinique 10% des cancers annuels dans le monde entier (ou > 1 million de cas par an) sont causés par des infections virales. Ce nombre se traduit par plus d'un demi-million de vies perdues chaque année par des tumeurs malignes causées par le virus. La plupart de ces cancers et les décès qui en découlent sont attribuables à un nombre relativement faible de virus: le virus du papillome humain (HPV), le virus de l'hépatite B (HBV), le virus de l'hépatite C (HCV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV) (**Bailey *et al.*, 2016**). Environ 5% du taux de cancer dans le monde, seraient attribuables aux HPV (**Dok et Nuyts, 2016**).

Le virus du papillome humain (HPV) est un membre de la famille des *Papillomaviridae* qui infecte l'épithélium stratifié de la peau et des muqueuses. Bien que la majorité des 200 types de HPV connus ne provoquent aucun symptôme, 30 à 40 types de HPV sont capables d'infecter la région anogénitale et causer une maladie. L'infection par le HPV semble être l'agent étiologique central pour le développement de la plupart des cas de cancer du col de l'utérus ainsi que des tumeurs malignes de plusieurs autres organes, y compris la vulve, le vagin, l'anus et l'oropharynx .... (**Lee *et al.*, 2013**). Elle est considérée comme la maladie virale sexuellement transmissible la plus fréquente au monde (**Burd, 2003**).

Bien que les données soient limitées sur les cancers anogénitaux autres que celui du col utérin, on dispose d'un corpus de plus en plus étoffé permettant d'établir une corrélation entre le HPV et les cancers de la vulve, du vagin et du pénis. Si ces cancers sont moins fréquents que celui du col utérin, leur association avec le HPV les rend potentiellement évitables en utilisant des stratégies de prévention primaire analogues à celles proposées pour le cancer du col (**OMS, 2015**).

Compte tenu de l'importance de la détection du HPV et des biomarqueurs associés, une variété de méthodes sont en cours d'élaboration à ces fins (**Abreu *et al.*, 2012**). Ces tests, de nature très variée, reposent sur des techniques de biologie moléculaire pour la détection du génome viral compte tenu du caractère difficilement cultivable en routine de ces virus (**Hantz *et al.*, 2010**).

Dans la première partie de notre étude, nous allons développer les caractéristiques biologiques des papillomavirus humains et les cancers génitaux associés, ainsi que les principales méthodes moléculaires utilisées pour sa détection. La seconde partie de notre travail nous sommes intéressés à réaliser une étude rétrospective des cancers génitaux

## *Introduction*

dans la région de Tlemcen durant les cinq dernières années, du 2012 à 2016. Ainsi qu'une recherche d'HPV suivant le kit Amplicor®HPV, et aussi une recherche par la méthode de réaction de polymérisation en chaine (PCR) sur des biopsies des cancers génitaux.

**SYNTHÈSE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

**LES**  
**PAPILLOMAVIRUS**  
**HUMAINS**



## Chapitre 1 : Les papillomavirus humains

### 1. Historique

La découverte des papillomavirus humains (HPV) est passée par les étapes suivantes :

- 25 avant JC (Jésus-Christ), les écrits du médecin Romain Celsus concernant la souffrance de l'humanité a cause des verrues (**Maurin, 1985**).
- En 1907, C'est Ciuffo qui fut le premier à démontrer que les verrues étaient probablement causées par des virus, en réussissant à faire apparaître des verrues sur ses propres mains (**Maurin, 1985**).
- En 1933, R. Shope décrit la papillomatose du lapin sauvage (**Mougin et al., 1997**).
- En 1935, P. Rous, démontre que les papillomes cutanés chez le lapin peuvent évoluer vers un carcinome après une longue période de latence (**Mougin et al., 1997**).
- En 1950, M.J. Strauss confirme les travaux de G. Ciuffo et de R. Shope ; il observe en microscopie électronique des particules semblables à des virus dans des papillomes cutanés (**Mougin et al., 1997**).
- Depuis les années 1960, le cancer de col de l'utérus était supposé par une infection sexuellement transmissible (**Vaubourdolle, 2013**).
- En 1965, les premiers rapports apparus caractérisant l'ADN double brin circulaire du virus papillome humain.
- En 1967, Rowson et Mahy décrivent encore les différentes formes de verrues et papillome causées par le virus de la verrue humaine (**Zur Hausen, 2009**).
- Dans les années 1970, les chercheurs ont décrit la diversité de papillomavirus (PV), et zur Hausen a proposé l'hypothèse selon laquelle les HPVs ont participé à l'étiologie des cancers du col utérin (**Leto et al., 2011**).
- En 1974, les virus impliqués dans le cancer cervical semblaient être également responsables des verrues et d'autres lésions cutanéomuqueuses.
- En 1983, HPV-16 fut mis en évidence dans des biopsies des lésions cancéreuses.
- En 1984, identification de HPV-18 dans des lésions et des lignées cellulaires de cancer de col.

- En 1995, l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (CIRC) a conclu que quatre études cas-témoins ont donné des preuves suffisantes pour classer les types de HPV 16 et 18 comme cancérogènes pour l'homme (**Munoz et al., 2003**).
- En 2008, Harald zur Hausen, un médecin allemand a reçu le prix Nobel de Médecine pour ces travaux de recherche sur le rôle d'HPV dans la genèse des cancers du col utérin.

## **2. La phylogénie des papillomavirus**

Les papillomavirus (PV) (du latin papilla, diminutif de papula signifiant bouton, et du suffixe grec -ome, désignant le caractère tumoral) (**Mougin et al., 1997**).

Le papillomavirus avait d'abord été regroupé avec les *Polyomavirus* dans une famille, les *Papovaviridae*. Cela était basé sur les capsides similaires, nus et un génome circulaire d'ADN double brin. Comme il a été reconnu plus tard que les deux groupes de virus sont différents dans leurs tailles, organisations et enchaînements des nucléotides et des acides aminés. Ils sont maintenant officiellement reconnus par le Comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) en tant que deux familles séparées, *Papillomaviridae* et *Polyomaviridae* (**de Vellier et al., 2004**).

Beaucoup d'espèces animales abritent des papillomavirus (**Fig. I.1**): bovins (BPV), canins (COPV), équins (EcPV), humains (HPV) (**Pasquier et al., 2005**). Il n'a pas été rapporté de contamination croisée entre espèces animales, ce qui suggère que chaque papillomavirus est spécifique de son hôte (**Monsonogo, 2007**).

Les papillomavirus ont été découverts dans un large éventail des vertébrés. Plus de 300 papillomes ont été identifiés et entièrement séquencés, y compris plus de 200 papillomavirus humains (**Egawa et al., 2015**). L'ensemble actuel de HPV est contenu dans cinq genres (alpha-, bêta-, gamma-, mu- et Nu-PVs) (**Annexe1**), alors que les PVs des mammifères, d'oiseaux et de reptiles sont contenus dans 20, 3 et 1 genres, respectivement (**Bernard et al., 2010**).

### **2.1. Les Alpha-papillomavirus**

Les HPVs à tropisme pour l'épithélium génital font partie de ce groupe. Toutefois, certains types appartenant à ce genre provoquent des verrues vulgaires. Ce genre comprend les types de HPV qui présentent un risque élevé de cancer

du col de l'utérus, tels que les HPV 16 et 18, ainsi que les types à faible risque d'HPV, tels que HPV 6 et 11 (Leto *et al.*, 2011). Il comprend certains génotypes cutanés tels que HPV2, HPV3 et HPV10, qui causent les verrues de la peau (Lazarczyk, 2009).

## 2.2. Les bêta-papillomavirus

Ils sont divisés en cinq espèces différentes. HPVs 5 et 8, qui appartiennent à des espèces 1 de ce genre, sont les plus couramment identifiés dans la peau des personnes atteintes de épidermodysplasie verruciforme (EV) (Leto *et al.*, 2011).

## 2.3. Gamma-papillomavirus

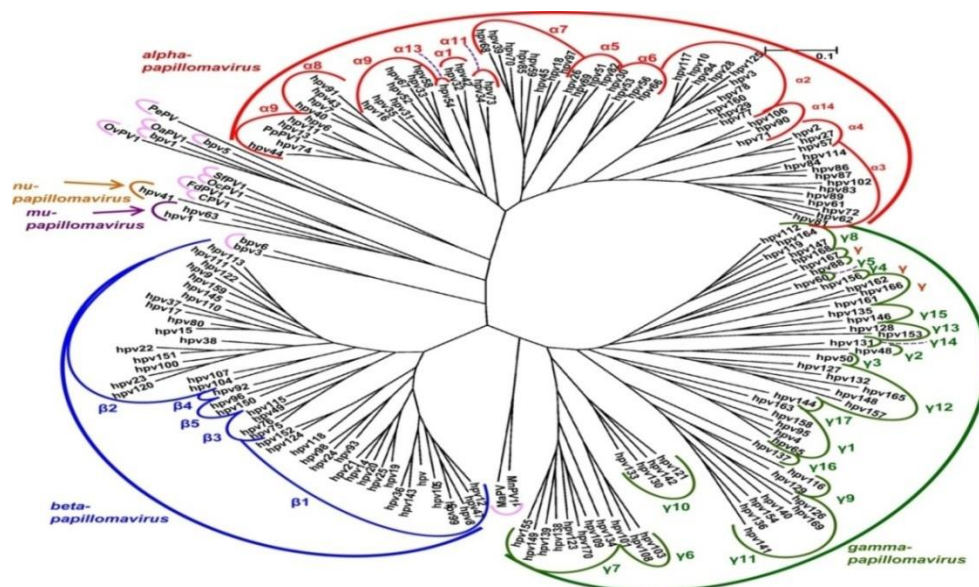
Il couvre les cinq espèces différentes avec sept types différents qui provoquent des lésions cutanées: HPV 4, 48, 50, 60, 88, 65, et 95 [(Leto *et al.*, 2011) ; (Ure et Forslund, 2014)].

## 2.4. Mu-papillomavirus

Il comprend HPV 1 et 63. HPV 1 est le membre le plus étudié de ce groupe et provoque des verrues communes et palmaires (Leto *et al.*, 2011) .

## 2.5. Nu-papillomavirus

Il comprend une seule espèce: HPV 41 (Leto *et al.*, 2011).



**Fig I. 1 :** Arbre phylogénétique des papillomavirus basé sur la séquence génétique de la protéine de capsid L1 (de Villiers, 2013).

### **3. La classification des papillomavirus**

Les papillomavirus peuvent être classés en fonction de leur tropisme cutané ou muqueux, leur caractère oncogène et leur génome (**Vaubourdolle, 2013**).

#### **3.1. Selon leur génome**

Cette classification est basée sur une comparaison de la séquence de nucléotides de la capside L1. Malgré leur structure identique, le degré d'homologie génomique entre les différents papillomavirus n'est que de 40 %, témoignant de la grande dispersion de cette famille. Les papillomavirus sont regroupés en genres définis par un degré d'homologie inférieur à 60 % de la séquence L1, parmi les quels cinq correspondent aux HPV alpha-, bêta-, gamma-, mu- et Nu et sept aux papillomavirus animaux. Il est considéré comme un nouveau type d'HPV lorsque son génome présente des variations de plus de 10% des gènes L1 (**Leto et al., 2011**). Au sein des types existent des variants, qui peuvent ne différer des autres virus du même type que par une ou quelques paires de bases (moins de 2 % de divergence) (**Alain et al., 2010**).

Un autre système de classification basé sur la séquence nucléotidique ORFs (Open reading frames) de l'E1 et E2 a récemment été proposé (**Lazarczyk, 2009**).

#### **3.2. Selon le potentiel oncogène**

##### **3.2.1. Les HPV à haut risque**

L'infection persistante par des HPV potentiellement oncogènes, dits HPV à haut risque, peut avoir pour conséquence le développement de néoplasies intraépithéliales (lésions précancéreuses) pouvant évoluer vers un cancer invasif (**Segondy, 2010**). Les 19 HPV sont de types 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 à 73, 82 [(**Jacob, 1995**) ; (**Munoz et al., 2003**)].

Le HPV-16 et -18 sont responsable d'environ 70% des cancers du col de l'utérus, du vagin et de l'anus et d'environ 30 à 40% des cancers de la vulve, du pénis et de l'oropharynx (**Munoz et al., 2006**).

##### **3.2.2. Les HPV à bas risque**

Les types de HPV non cancérogènes, il s'agit de 12 HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 72, 81 et 89) [(**Lazarczyk et al., 2009**) ; (**Jacob, 1995**)]. Ils peuvent provoquer des lésions à bas grade, condylomes acuminés et une papillomatose

respiratoire (maladie au cours de laquelle se développent des tumeurs dans les voies respiratoires conduisant du nez de la bouche aux poumons) (DiMaio et Liao, 2006).

### **3.2.3. Les HPV à risque indéterminé**

24 ont été classés comme étant de risque indéterminé (HPV2, -3, -7, -10, -27, -28, -29, -30, -32, -34, -57, -62, -67, -69, -71, -74, -77, -83, -84, -85, -86, -87, -90 et -91) (Lazarczyk *et al.*, 2009).

### **3.3. Selon le tropisme tissulaire**

Les papillomavirus sont épithéliotropes et infectent les épithéliums cutanés et muqueux. Sur le plan clinique, ils sont responsables de tumeurs bénignes ou malignes (Monsonogo, 2007).

#### **3.3.1. HPV à tropisme cutanée**

La plupart des HPV ciblent la peau et provoquent proliférations bénignes (verrues et papillomes) qui régressent spontanément en 1 à 5 ans (Lazarczyk *et al.*, 2009). La transformation maligne de ces lésions est observée uniquement chez les patients souffrant d'épidermodysplasie verruciforme (EV) (Orth, 2006). Parmi les bêta-HPVs, HPV5 et HPV8 sont classés comme des génotypes à haut risque car ils sont associés à des carcinomes cutanés survenant chez des patients EV. Il convient de souligner que les bêta-HPVs ont été détectés en quantités infimes dans une grande proportion des cancers de la peau non mélanique (NMSCs) des patients non-EV, en particulier les carcinomes qui se développent chez les personnes immunodéprimées (Lazarczyk *et al.*, 2009). En outre, il a été suggéré que ces virus peuvent contribuer à des tumeurs de la peau chez les individus immunocompétents (Harwood *et al.*, 2000).

Parmi les types de HPV associés à la maladie cutanée sont des types de HPV 2, 3, 10, 27 et 57 de genre Alpha, les types de HPV 4, 60 et 65 du genre Gamma, et les types de HPV 1 et 63 du genre Mu.

#### **3.3.2. HPV à tropisme muqueux**

Plus de 40 génotypes de HPV infectent la muqueuse épithéliale du tractus anogénital et d'autres zones de la muqueuse du corps (Trottier et Franco, 2006), dont HPV-6 et 11 qui représentent plus de 85% des HPV impliqué dans les verrues

anogénitales et peuvent également provoquer une autre maladie (**Tableau. I. 1**), la papillomatose laryngée et HPV-16 et 18 qui sont à l'origine d'environ 70 à 90% des cancers anogénitales (**Peyrot et al., 2013**).

**Tableau. I.1 :** Manifestations cliniques dues aux HPV et génotypes correspondants (**Riethmuller, 2010**)

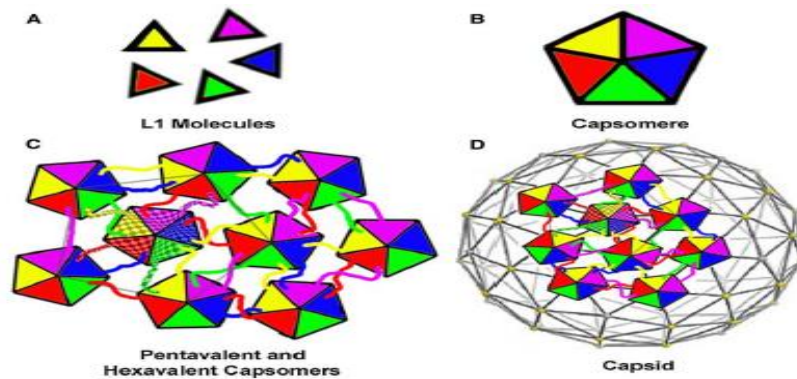
Localisation	Lésions	Génotypes en cause
Peau	Verrues cutanées	1 à 4, 7, 10, 27, 49, 57, 60, 63
	Epidermodysplasie verruciforme	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20 à 25, 36, 46, 47, 50
Muqueuse génitale	Cancer du col	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
	SIL	6, 11, 30, 40, 42 à 44, 57, 61, 62, 66*
	Condylome acuminé	6, 11
	Buschke-Loewenstein	6, 11
	Maladie de Bowen	16, 34
Muqueuse oropharyngée	Hyperplasie épithéliale focale	13, 32
	Papillomatose orale floride	6, 11, 16
Muqueuse laryngée	Papillomatose laryngée	6, 11, 32

## 4. Structure

### 4.1 Organisation structurale

Les HPV sont des virus de petite taille (de 45 à 55 nm de diamètre), non enveloppés, avec une capsid d'une symétrie icosaédrique (**Monsonogo, 2006**), contenant 360 molécules de protéines L1 disposées en 72 capsomères, composées chacune de 5 molécules de L1 (**Doorbar et al., 2015**).

La capsid est constituée de la protéine L1 (**Fig. I.2**) qui est un polypeptide représentant environ 90% de la teneur en protéine de particules virales et présente un poids de 54 à 58 kDa. Les capsides virales contiennent également un Polypeptide mineur, désigné par L2, avec un poids moléculaire de 68 à 76 kDa (**Favre et al., 1997**).



**Fig I. 2 :** Structure tridimensionnelle du Papillomavirus humain (Pereira et Hitzerith, 2009)

#### **4.1. Organisation génomique**

Le génome consiste à une molécule circulaire d'ADN double brin de 8 000 paires de bases environ (Mougin *et al.*, 2000), avec huit cadres de lecture ouverts (ORF) bien définis, qui sont tous transcrits à partir du même brin d'ADN et dans la même orientation (Lowe *et al.*, 2008).

Le génome est organisé en trois régions principales (Fig. I.3):

##### **4.2.1. Une région régulatrice en amont (URR) (Upstream regulatory region)**

Au début des protéines E1 et E2, et la fin des protéines L1 et L2. Le URR est pas transcrit et contient des activateurs et des promoteurs des séquences (Garcie-Vallvé *et al.*, 2005), il a entre 500 et 1000 paires de bases, on peut l'appeler aussi LCR (Long control region , longue région de contrôle) ou NCR (non coding region , région non codante) (Leto *et al.*, 2011).

##### **4.2.2. Une région précoce**

Codant pour les six gènes impliqués dans de multiples fonctions, y compris la réplication virale et la transformation cellulaire (Bravo et Féléz-Sanchez., 2015), occupe plus de 50% du génome du virus (Zheng et Baker, 2006).

✓ **E1** : une ADN hélicase ATP-dépendante, est la seule enzyme codée par le papillomavirus (PV). Elle est essentielle pour la réplication et l'amplification de l'épisome viral dans le noyau des cellules infectées. L'étape clé dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral à l'ori (origine de réplication) est l'assemblage de E1 dans sa

forme enzymatiquement active, une hélicase double hexamérique capable de dérouler le ori et l'ADN avant la fourche de réplication (**Bergvall et al., 2013**).

✓ **E2** : Ce sont des protéines multifonctionnelles et impliqué dans de nombreux processus viraux, principalement associés à la transcription et la réplication du génome viral. Elles sont exprimées à des stades précoces et intermédiaires du cycle de vie (**McBride, 2013**).

✓ **E4** : Cette ORF se trouve dans la plus grande ORF E2, et varie considérablement en taille entre les types de papillomavirus, cette protéine contribue à l'amplification du génome et la synthèse de virus, ils sont abondamment exprimés et peuvent faciliter la libération efficace du virus et la transmission (**Doorbar, 2013**).

✓ **E5** : Sont des protéines transmembranaires codées par de nombreux papillomavirus, ils stimulent la prolifération cellulaire (**DiMaio et Petti, 2013**).

✓ **E6 et E7** : Peuvent être réglés au niveau transcriptionnel par E2 (**Fu et al., 2010**). Ces deux protéines jouent un rôle majeur dans la transformation cellulaire. En effet, elles entraînent la dégradation de deux protéines anti-oncogènes majeures: P53 et Rb (protéine du rétinoblastome). E6 et E7 sont retrouvées dans de nombreux cancers cutanéomuqueux (**Cheng et al., 1995**).

#### **4.2.3. Une région tardive**

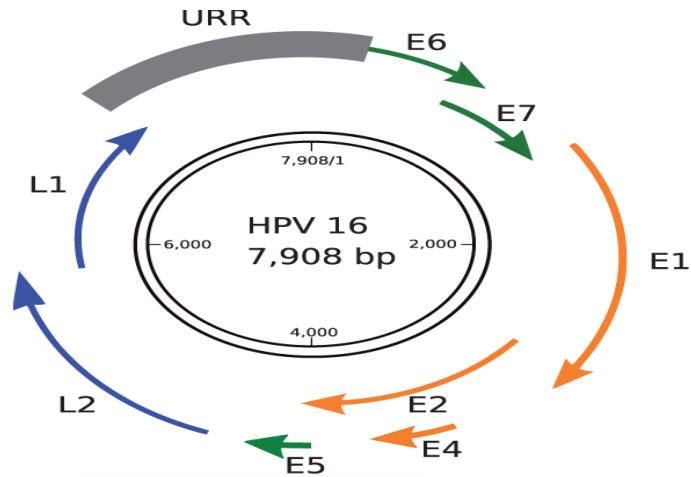
Codant pour les protéines de capsid L1 et L2 qui s'auto-assemblent pour donner le virion (**Zheng et Baker, 2006**).

✓ **L1** : La protéine majeure de capsid L1 est une protéine avec la capacité de s'auto-assembler spontanément dans des particules de type virus (VLP). Les VLP sont hautement immunogènes et servent de base pour les vaccins actuels contre le HPV (**Buck et al., 2013**).

L'interaction de la particule avec la surface cellulaire survient en grande partie via l'interaction de la protéine de capsid majeure L1 avec des protéoglycanes d'héparane sulfate de surface cellulaire (**Day et Schiller, 2006**).

✓ **L2** : Il s'agit de la protéine mineure de la capsid, elle porte les antigènes de type. Cette protéine permet le recrutement des capsomères formés de L1 ainsi que du génome viral. Au final, elle permet l'assemblage du virus et la stabilisation de la capsid (**Pouppart, 2005**).

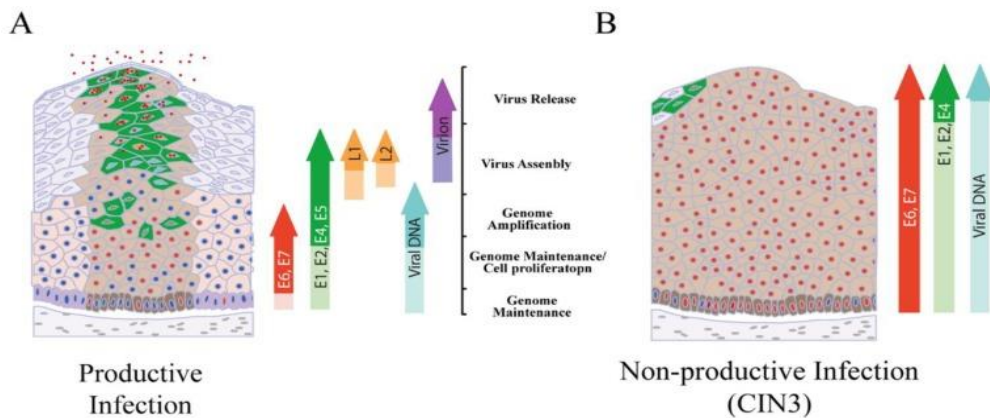




**Fig I. 3 :** Représentation schématique du génome, illustrée sur HPV16, montrant l'emplacement des gènes précoces (E) et des gènes tardifs (L) et de l'URR (**Bravo et Félez-Sanchez., 2015**).

### 5. Cycle viral des HPV

Le cycle viral des papillomavirus ne peut se produire que dans les cellules des Épithéliums stratifiés de l'épiderme ou des muqueuses (**Fig. I.4**) (**Schiller, 2010**).



**Fig I. 4 :** Réglementation et déréglementation du cycle de vie de papillomavirus à haut risque (**Egawa et al., 2015**)

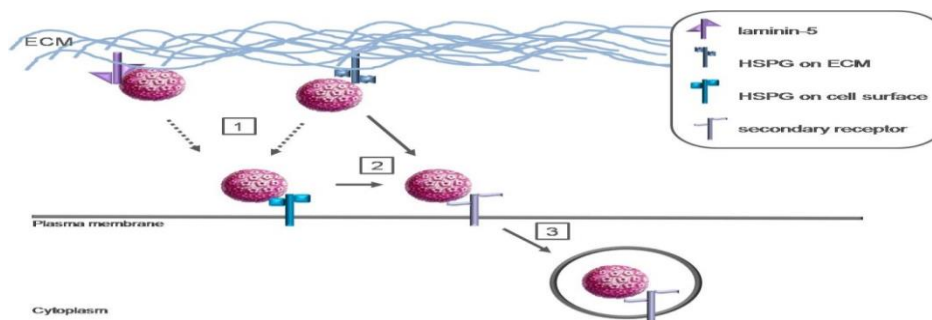
#### 5.1. Attachement

La première étape de l'infection virale est la liaison du virus à son récepteur sur une cellule hôte (**Fig. I.5**). Les protéoglycanes d'héparane sulfate de surface cellulaire (heparan sulfate proteoglycans SHPG) servent de récepteurs d'attachement primaire pour HPV (**Selinka et al., 2003**). La pénétration dans la cellule est favorisée par des

récepteurs comme la sous-unité  $\alpha$ -6 des intégrines (Yoon *et al.*, 2001) ou des composants de la matrice extracellulaire comme la laminine5 (Culp *et al.*, 2006).

## 5.2. Internalisation

La liaison du HPV déclenche des changements conformationnels, qui affectent les protéines de capsid L1 et L2. La plupart des types de HPV qui ont été examinés semblent pénétrer dans la cellule par l'intermédiaire d'un mécanisme endocytaire (Horvath *et al.*, 2010) grâce aux récepteurs à clathrine ou calvéoline (Abban et Meneses, 2010) (Fig. 1.5).



**Fig I. 5 :** Modèle de le l'entrée de l' HPV : attachement et pénétration (Horvath *et al.*, 2010).

## 5.3. Décapsidation et translocation

La décapsidation se produit dans des vésicules d'endocytose avant le transfert dans le cytosol par rupture des ponts disulfures intra-capsomériques grâce au milieu réducteur intracellulaire contribue à la sortie des endosomes (Sapp et Bienkowska-Haba, 2009). Le trajet endosomal se produit le long des microtubules à l'aide de complexe protéine L2-ADN qui assure l'arrivée de génome viral au niveau de noyau (Day et Schelhaas, 2014).

## 5.4. Maintien de génome viral

Les papillomavirus se répliquent et se rassemblent exclusivement dans le noyau. Cependant, l'expression des gènes viraux et la réplication se déroulent d'une façon étroitement contrôlée et régulée par la différenciation des kératinocytes (Zheng et Baker, 2006). Le virus maintient son génome en un faible nombre de copies épisomales dans les cellules basales de l'épithélium (à environ 10 à 200 copies par cellule). E1 et E2 sont des protéines exprimées dans le but de maintenir l'ADN viral en tant que épisode et

pour faciliter la bonne séparation des génomes au cours de la division cellulaire (**Doorbar, 2005**).

### **5.5. Prolifération cellulaire**

L'entrée de papillomavirus doit être suivie d'une période de prolifération cellulaire, dans laquelle la cellule infectée est amenée à se diviser afin de produire une feuille de cellules qui hébergent des épisomes viraux (**Doorbar, 2007**), où il y a un rôle clair des protéines virales E6 et E7 (**Doorbar et al., 2012**).

### **5.6. Amplification de génome viral**

Bien que la prolifération cellulaire est nécessaire pour la formation des lésions et l'entretien de tous les épisomes de papillomavirus humains, les changements d'environnement de la cellule et les signaux de différenciation provoquent l'activation du promoteur, qui n'est pas dépendante de l'amplification du génome viral, entraîne une l'expression de protéines virales nécessaires à la réplication, y compris E1, E2, E4 et E5 (**Doorbar, 2007**) et permet l'expression des protéines de capsid L1 et L2 (**Mougin et al., 2008**).

### **5.7. Encapsidation et libération**

Une fois que l'ADN viral a été amplifié, l'expression des protéines de capsid L1 et L2 commence, ce qui est suivi par l'assemblage des virions entiers (**Lazarczyk et al., 2009**).

## **6. L'intégration et carcinogénèse**

Dans les cellules infectées, le génome viral peut être retrouvé soit sous forme épisomale, soit sous forme intégrée dont l'intégration est généralement observée dans les cancers invasifs (**Mougin et al., 2000**). Elle implique la linéarisation du génome, par rupture des phases ouvertes de lecture E1et/ouE2 en aval d'E6 et E7. Dans ce cas, la perte de l'expression d'E2 induit une perte du contrôle négatif que cette protéine exerce sur le promoteur précoce (**Xu et al., 2013**).

L'intégration de l'ADN viral conduit à la surexpression de deux oncoprotéines virales E6 et E7 (**Fig. I.6**). Ces protéines, en association avec E5, favorisent

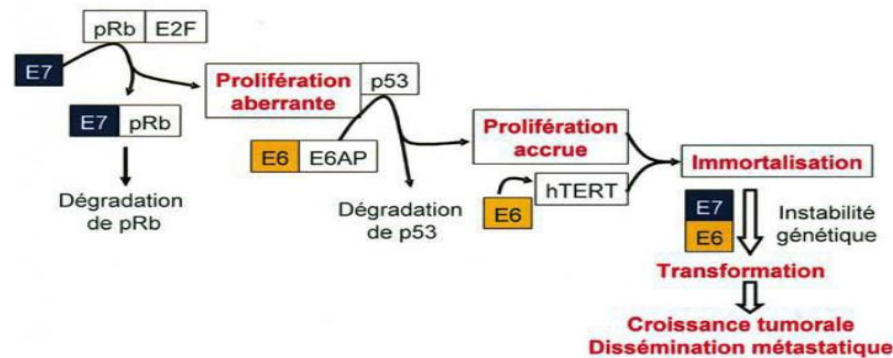
l'immortalisation et la transformation des cellules, ainsi que l'instabilité génomique et l'invasion tumorale (**Pretete et al., 2007**).

Les oncoprotéines E6 et E7 interfèrent avec le cycle cellulaire en ciblant les protéines suppresseurs de tumeur p53 et pRb, respectivement (**Peitsaro et al., 2002**). En outre, des études ont démontré que ces deux oncoprotéines virales en coopération perturbent les mécanismes de duplication et la ségrégation des chromosomes pendant la mitose (**Wentzensen et al., 2004**).

Il a été démontré que la protéine E6 du HPV à haut risque interfère avec la fonction de p53, présentant une activité anti-apoptotique. Le stress cellulaire induit par une infection virale ou d'autres situations de stress physique ou chimique et/ou par des facteurs augmente la synthèse de p53. Cela conduit soit à l'activation du facteur de transcription p21 et le blocage de cycle cellulaire dans la phase G<sub>1</sub> ou à l'apoptose après l'activation de la transcription du *bax* (Bcl-2-Associated X protein) gène (**Lazarczyk et al., 2009**).

La protéine E7 du HPV à haut risque se lie à pRb phosphorylé avec une affinité élevée et élimine la régulation du cycle cellulaire entraînée par ce facteur (**Huh et al., 2007**). Ainsi, la libération d'E7 induite par des facteurs de transcription E2F à partir de leur complexe avec la pRb se traduit par la synthèse de gènes cellulaires impliqués dans la réplication de l'ADN cellulaire et enfin dans la progression vers la phase S. La protéine E7 interagit également avec p16, p21, et d'autres protéines qui inhibent la progression du cycle cellulaire (**Munger et Howley, 2002**).

Au total, les protéines E6 et E7 assurent la réplication du génome du HPV dans les cellules épithéliales post-mitotiques différenciées, et cette déréglementation du programme de différenciation naturelle est proposé d'être responsable de la cancérogenèse liée au HPV (**Lazarczyk et al., 2009**).



**Fig I. 6 :** Principales étapes de la carcinogenèse associée à E7 et E6 des HPV haut risque (Mougin et al., 2008) .

## 7. La réponse immunitaire

### 7.1. Immunité à médiation cellulaire

Plusieurs observations illustrent l'importance des réponses cellulaires. Dans les modèles animaux comme chez l'Homme, les réponses cytotoxiques sont faibles ou indétectables dans les lésions cancéreuses. Au contraire, la régression des lésions est associée à une réponse cytotoxique et T helper (Th) intense, dirigée contre les protéines E1, E2, E6, E7 et L2. La dérégulation de la réponse cellulaire spécifique par les HPV associe l'inhibition des réponses Th1 et Th2, l'inhibition par E7 et l'induction de cellules T CD4 régulatrices (Treg), favorisant la tolérance de l'infection et sa persistance (Alain et al., 2010) .

### 7.2. Immunité à médiation humorale

La réponse immunitaire systémique est principalement objectivée par la synthèse, dans les sécrétions et le sang, d'anticorps de classe IgG et IgA dirigés contre une série d'épitopes portés par les protéines de capsid L1 et L2 du virus HPV (Riethmuller et Seilles, 2000).

## 8. Mode de transmission des HPV

Les papillomavirus humains sont des virus épithéliotropes qui infectent la peau et les muqueuses. La transmission interhumaine a lieu essentiellement par contact direct (Louie et al., 2008).

### 8.1. Transmission sexuelle

Le papillomavirus humain est l'infection sexuellement transmissible la plus courante (**Braaten et Laufer, 2008**). Il est apparu que la prévalence de l'infection à HPV chez la femme augmentait avec le nombre de partenaires sexuels qu'elle avait pu avoir durant sa vie. Ce phénomène apparaît aussi chez l'homme mais à un degré moindre (**Gavillon et al., 2010**).

## **8.2. Transmission non sexuelle**

La transmission peut se produire directement par contact avec la peau ou les muqueuses (entre les personnes ou par auto-inoculation), ou indirectement par l'intermédiaire d'objets contaminés, ou encore au cours de la période périnatale (**Rombaldi et al., 2008**).

- *l'auto-inoculation et l'hétéroinoculation* : à partir des verrues cutanées est possible (**Akom, 2002**) mais aussi, en raison de la grande résistance de ces virus nus dans l'environnement, peuvent être transmis indirectement par l'intermédiaire d'objets contaminés (linge, sol des piscines) (**Huraux et al., 2003**).
- *Transmission mère-enfant* : Plusieurs études ont démontré que les nourrissons peuvent acquérir des infections de HPV à haut risque de leur mère à la naissance. Lorsque la mère est porteuse de papillomavirus génitaux, la contamination lors du passage dans la filière génitale lors de l'accouchement est possible. La transmission anténatale à travers le placenta serait possible avant la délivrance (**Rombaldi et al., 2008**).

**LES CANCERS**  
**ASSOCIÉS AU**  
**PAPILLOMAVIRUS**  
**HUMAINS**

## **Chapitre 2 : Les cancers associés au papillomavirus humain**

### **1. Cancers génitaux associées à l'HPV**

De nombreuses études montrent une relation hautement probable entre plusieurs maladies sexuellement transmises et la survenue de cancers génitaux, ceci a été particulièrement bien documenté à propos du cancer du col utérin et autres cancers génitaux, dont la relation avec des infections à papillomavirus est hautement probable (**Libert, 1994**).

Dans le monde, environ 2 millions de cancers gynécologiques apparaissent chaque année, ce qui représente presque 50% des cancers féminins (**Sancho-Garnier, 2013**).

#### **1.1. Cancer de col de l'utérus**

Le cancer de col utérin est un cancer à évolution lente. Son incidence et sa mortalité ont diminué pendant ces 20 dernières années grâce au dépistage cytologique et au traitement des lésions précancéreuses, qui sont associées à certains types de papillomavirus dits oncogènes (**Monge, 2007**).

##### **1.1.1. Epidémiologie du cancer du col de l'utérus**

Le cancer du col de l'utérus est le deuxième cancer le plus fréquent (**Muñoz et al., 2003**), estimé à 528 000 nouveaux cas et à environ 266 000 décès dans le monde en 2012 (**Baskaran et al., 2015**).

En Afrique, le nombre de cas de cancer du col estimé chaque année est de 78.897, soit une incidence standardisée sur l'âge de 29,3 pour 100.000 par an, avec de grandes variations entre les régions : 42,7 pour 100.000 par an en Afrique de l'Est (pic en Tanzanie : 68,6 pour 100.000 par an), 38,2 pour 100.000 par an en Afrique de Sud, 29,3 pour 100.000 par an en Afrique de l'Ouest, 28% pour 100.000 par an en Afrique du Centre et 12,1 pour 100.000 par an en Afrique du Nord où l'incidence varie entre 6,8 pour 100.000 par an en Tunisie, et 13,2 pour 100.000 par an au Maroc (**Diouri, 2008**).

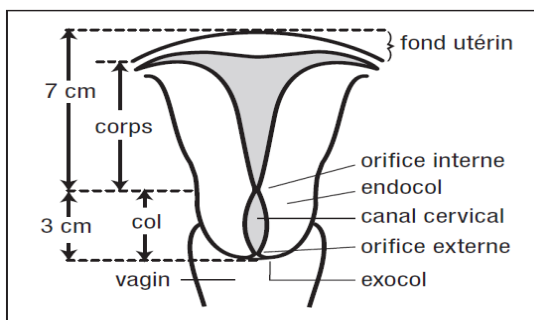
En Algérie, le cancer du col de l'utérus est le quatrième cancer le plus fréquent estimé à 12,5%. Il faut noter la stagnation, voire une petite diminution de l'incidence



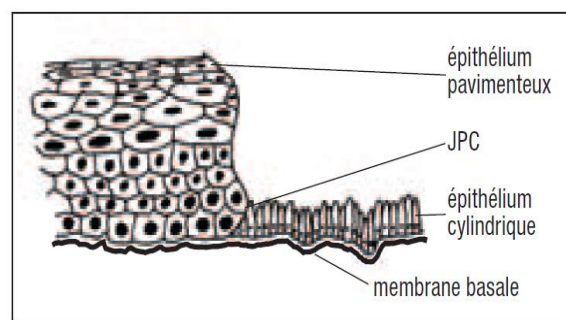
brute du cancer du col de l'utérus qui a été longtemps le deuxième cancer féminin (Zitouni *et al.*, 2014).

### 1.1.2. Anatomie et histologie

Le col de l'utérus est la partie inférieure de l'utérus faisant saillir dans le vagin. Il est symétrique et cylindrique, mesure environ 3cm de longueur sur 2-2,5 cm de diamètre (fig. I.7) (Stevens et Lowe, 2006). Le col est divisé en 2 parties principales : l'endocol et l'exocol. La jonction exoendocervicale est la ligne où l'épithélium du canal endocervical rencontre l'épithélium pavimenteux de l'exocol ; c'est le siège le plus fréquent de pathologie de col (Stevens et Lowe, 2006) (fig. I.8).



**Fig I. 7 :** Schéma de l'utérus d'une femme en âge procréer (OMS, 2007).



**Fig I. 8 :** Schéma présentatif des deux épithéliums du col de l'utérus et la jonction pavimento-cylindrique (OMS, 2007).

### 1.1.3. Définition de cancer du col de l'utérus

C'est une maladie de la muqueuse du col de l'utérus, autrement dit du tissu qui le recouvre. Il se développe à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme et se multiplie de façon anarchique (INCa, 2011).

La quasi-totalité des cancers du col de l'utérus sont des carcinomes épidermoïdes, 85% : ils se développent à partir de l'épithélium de l'exocol. Environ 15% sont des adénocarcinomes qui se développent à partir de l'épithélium de l'endocol (Annexe2) (Stevens et Lowe, 2006).

C'est une maladie d'origine infectieuse à évolution lente qui met en général plus de quinze ans à se développer depuis la primo-infection par un papillomavirus humain oncogène à tropisme génital jusqu'aux différentes lésions histologiques précancéreuses accompagnant la persistance de l'infection (Duport, 2008). Les HPV-16 et HPV-18 sont

les types les plus communs identifiés et représentent 50% et 10% respectivement, des types viraux impliqués dans le cancer invasif (**Bosch et al., 2002**).

#### **1.1.4. Histoire naturelle de l'infection**

##### **a. Infection par HPV haute risque**

L'infection par un HPV est une condition nécessaire au développement d'un cancer du col utérin, comme en témoigne la présence du génome viral, retrouvée dans 99,9 % des cancers du col et dans plus de 80 % des lésions de haut grade (**Alain et al., 2010**).

##### **b. La persistance des lésions cervicales précancéreuses**

Il est plausible que l'infection par le HPV à haut risque se produit tôt dans la vie, peut persister et en association avec d'autres facteurs favorisant la transformation des cellules, peut conduire à une progression graduelle de la maladie (**Burd, 2003**), sous forme des lésions qui sont considérées comme les changements morphologiques les plus précoces associés au cancer (**Edith et Sylvie, 2003**).

On peut caractériser les lésions d'après une classification histologique ou cytologique :

❖ **La classification histologique** : les modifications associées au HPV sont appelées *néoplasies intraépithéliales cervicales (CIN ; Cervical Intrapithelial Neoplasia)* et sont notées de 1 à 3, en fonction de la profondeur des cellules anormales. Le système CIN est basé sur l'architecture des tissus et a été introduit en 1973 pour promouvoir le concept de la maladie à partir de lésions précurseurs de cancer invasif (**Burd, 2003**).

-CIN 1 : comprend une dysplasie légère et condylomes (verrues anogénitales), et comprend des lésions dans lesquelles seulement un tiers de la profondeur de l'épithélium est anormal (**Braaten et Laufer, 2008**).

-CIN 2 : comprend des lésions avec une prolifération anormale de jusqu'à deux tiers de l'épithélium (**Braaten et Laufer, 2008**).

-CIN 3 : qui comprend la dysplasie sévère et carcinome in situ (CIS), l'ensemble de l'épithélium est anormal (**Annexe 3**) (**Braaten et Laufer, 2008**).

❖ **La classification cytologique** : Les changements cytologiques dans l'épithélium malpighien sont appelés *lésions intraépithéliales squameuses (SIL ; squamous*

## *Les cancers associés aux papillomavirus humains*

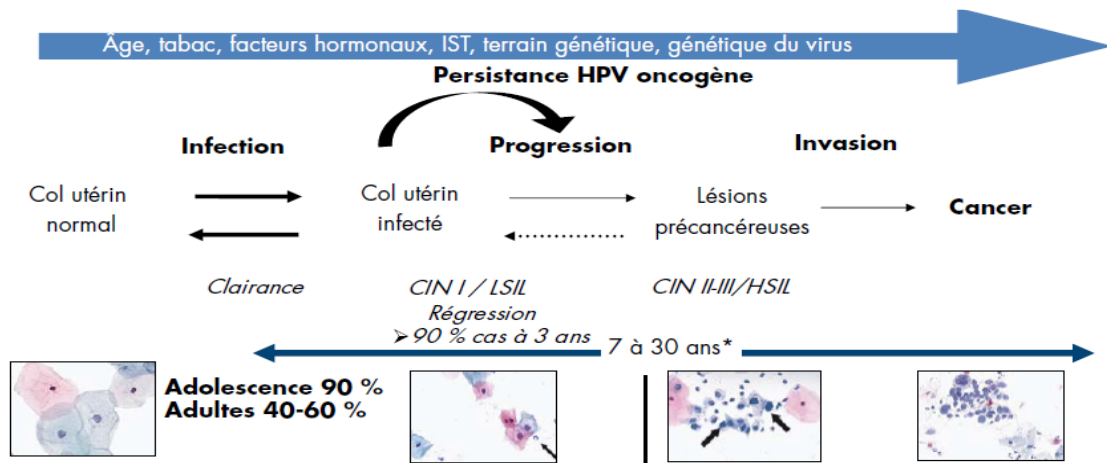
intraépithelial Lesions) et peuvent être caractérisées comme bas ou de haut grade (**Braaten et Laufer, 2008**). Cette classification est basée sur le système de Bethesda qui a été introduit en 1988 (**Burd, 2003**).

Le système Bethesda 2001 classe les anomalies des cellules squameuses en quatre catégories:

- ASC (cellules squameuses atypiques).
- LSIL (lésions intraépithéliales squameuses de bas grade), lésions malpighiennes intra épithélial de bas grade correspondant à CIN1.
- HSIL (haute qualité lésions intraépithéliales squameuses), lésions malpighiennes de haut grade regroupant CIN2 et CIN3.
- le carcinome spino-cellulaire [(**Burd, 2003**) ; (**OMS, 2007**)].

### **c. Progression vers un cancer invasif**

On parle de cancer invasif quand des cellules anormales envahissent l'épaisseur du tissu conjonctif fibreux (**Fig. I.10**), sous-jacent à la membrane basale. Le processus débute par un stade microinvasif, invisible à l'œil nu lors de l'examen au spéculum et qui ne peut être diagnostiqué qu'après examen histologique d'un échantillon de tissu provenant d'une biopsie par conisation ou d'une hystérectomie (**Annexe 4**). Le stade micro invasif évolue ensuite vers des lésions plus importantes qui peuvent s'étendre au vagin, aux parois pelviennes, à la vessie, au rectum et aux organes distants. S'il n'est pas traité, le cancer du col évolue de façon tout à fait prévisible et l'issue en sera presque toujours fatale. Quatre voies, généralement séquentielles, participent au processus de progression du cancer invasif : (i) Propagation à l'intérieur du col. (ii) Propagation aux structures voisines. (iii) Propagation par voie lymphatique. (iv) Métastases à distance (**OMS, 2007**).



**Fig I. 9** : Schéma présentant l'évolution vers une prolifération maligne au cours d'une infection par un HPV muqueux génital (Alain et al., 2010).

### 1.1.5. Facteurs influençant l'histoire naturelle du cancer du col utérin

L'incidence de différents facteurs sur la fréquence de survenue des cancers du col a été largement étudiée (Mougin et al., 1998).

#### a. Cofacteurs liés au HPV

- ✓ **Type viral** : Il est démontré que les femmes qui ont acquis des HPV à haut risque ont un risque accru de développement de néoplasies cervicales (Monsonogo, 2006).
- ✓ **Infection simultanée avec plusieurs types oncogéniques** : Elle est associée à des taux plus élevés de cancer du col utérin, de l'anus, de la vulve, du vagin et du pénis, et le cancer de l'anus est particulièrement fréquent chez les HARSAH séropositifs pour le VIH [(OMS, 2007) ; (Palefsky et Rubin, 2009)]
- ✓ **Charge virale** : Une charge virale élevée est associée à une diminution de la probabilité de clairance de l'infection à HPV et est un indicateur de CIN sous-jacente (Monsonogo, 2006).
- ✓ **Persistance virale** : La persistance virale se traduit par l'expression de certains gènes viraux, en particulier E6 et E7 des HPV à risque (Blanc, 2005).

#### b. Facteurs d'hôte

- ✓ **Statut immunitaire** : Chez les individus souffrant d'immunodéficience, les infections à HPV ont plus souvent tendance à persister et le développement de lésions précancéreuses et cancéreuses est plus rapide (OMS, 2007).

## *Les cancers associés aux papillomavirus humains*

✓ **Comportement sexuel :** Le risque de développer un cancer du col est environ trois fois supérieur chez les femmes ayant 10 partenaires différents, comparativement à celles ayant un seul partenaire. Les femmes ayant eu leur premier rapport sexuel avant l'âge de 16 ans présentent un risque deux fois plus élevé que celles dont le premier rapport a eu lieu après 20 ans (**Mougin et al., 1998**).

### **c. Facteurs exogènes**

✓ **Tabagisme :** Le tabagisme actif est significativement associé aux lésions cervicales. Il diminue la réponse immunitaire, en augmentant les risques d'infections persistantes. Les fumeuses ont un risque deux fois plus élevé de cancer du col utérin (**Blanc, 2005**).

✓ **La co-infection par des germes transmis sexuellement :** principalement le VIH, mais aussi le virus herpes simplex 2 (HSV-2), *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* (**OMS, 2007**).

✓ **Contraceptifs oraux :** L'utilisation de contraceptifs oraux pendant cinq ans ou plus est un cofacteur qui augmente jusqu'à quadrupler le risque de cancer du col utérin chez les femmes qui sont porteuses de l'ADN d'HPV (**Castellasgué et al., 2006**).

## **1.2. Le cancer du vagin**

### **1.2.1. Épidémiologie**

Les cancers du vagin représentent environ 2 % des cancers gynécologiques (**Barillot, 2011**). Leur incidence est en diminution constante. Les cancers du vagin de la femme adulte surviennent dans 80 % des cas après 60 ans (**Barillot, 2011**).

Certaines populations doivent être considérées comme étant à risque pour développer ce type de lésions, notamment les femmes qui ont eu des CIN ou de la radiothérapie pour le cancer du col ainsi que les femmes immunodéprimées (**Walker et al., 2001**).

### **1.2.2. Anatomie du vagin**

Le vagin est un conduit fibromusculaire élastique s'étendant de l'introïtus au col de l'utérus (**Stevens et Lowe, 2006**). Ses parois intérieures forment de nombreux replis, lui permettant d'augmenter de volume lors des rapports sexuels et de l'accouchement. Les parois du vagin restent normalement en contact l'une contre l'autre. La partie basse

du col (exocol) fait saillir dans l'extrémité supérieure du vagin et la zone vaginale qui l'entoure abrite les culs de sac antérieurs, postérieurs et latéraux (OMS, 2007).

### **1.2.3. Développement de cancer du vagin**

Le cancer du vagin concerne essentiellement la femme âgée. Il existe néanmoins des cancers du vagin survenant chez la très jeune fille, et même chez l'enfant très jeune (3 ans). Le carcinome épidermoïde plus ou moins bien différencié est le type histologique le plus fréquemment rencontré : il correspond à 80-90 % des cancers primitifs du vagin, alors que l'adénocarcinome, souvent développé à partir de l'épithélium glandulaire de la glande de Bartholin [(Touboul *et al.*, 2001) ;(William *et al.*,1998)]. Des mélanomes, et des sarcomes sont aussi identifiés mais très rarement (William *et al.*, 1998).

Pour les cancers épidermoïdes, il est souvent considéré que les facteurs de risque sont les mêmes que ceux des cancers du col, en particulier les HPV. Les arguments dans ce sens sont que les femmes qui ont un cancer épidermoïde du vagin ont plus souvent un autre cancer anogénital, et que l'on retrouve un HPV oncogène dans plus de 90 % des cas de cancers invasifs et dans 80 % des lésions précurseurs de haut grade VaIN3 (vaginal intraepithelial neoplasia ou néoplasie intra-épithéliale vaginale). Le HPV16 étant comme pour le col le type le plus prévalent. On retrouve en outre, dans les quelques études réalisées, les risques liés au nombre de partenaires, à l'âge de début de la vie sexuelle, à la séropositivité au HSV2 et au tabagisme (Sancho-Garnier, 2013).

## **1.3. HPV et cancer de vulve**

### **1.3.1. Épidémiologie**

Les cancers vulvaires représentent moins de 1% de l'ensemble des cancers et de 3 à 5% des cancers génitaux chez la femme âgée. Dans la majorité des cas, les cancers touchent la femme après la ménopause (Fewou *et al.*, 2011), une étude récente a noté qu'environ 15% de tous les cancers vulvaires surviennent chez des femmes de moins de 40 ans (Gunther, 2012).

### **1.3.2. Anatomie de vulve**

La vulve est composée des organes génitaux externes féminins, qui comprennent des grandes et petites lèvres, le clitoris, le vestibule, entrée du vagin, et le méat urétral. Le nerf ilio - inguinal et génito innerve la partie antérieure de la vulve, tandis que

la partie postérieure est innervée par la branche périnéale du nerf cutané postérieur. La majorité de la vulve est drainée par les vaisseaux lymphatiques qui passent latéralement vers les ganglions lymphatiques inguinaux superficiels (**Alkatou et al., 2015**).

### **1.3.3. Développement de cancer de vulve**

Cancer de la vulve est une lésion rare de l'appareil génital féminin. De nombreuses conditions sont considérées comme des facteurs de risque pour la pathogénèse de cette tumeur, tels que l'infection à HPV (**Annexe5**) (**Batous et al., 2013**).

Des études ont montré que plus de 40% des carcinomes vulvaires sont associés à HPV et l'association est plus élevée chez les jeunes femmes (**Gustafson et al., 2014**).

Les différents types de cancer de la vulve sont étiologiquement hétérogènes (**Batous et al., 2013**) :

✓ **Le premier type** : concerne l'HPV, ce qui conduit à la néoplasie intraépithéliale vulvaire (VIN), un facteur prédisposant pour le cancer de la vulve. On estime que 80% des femmes non traitées souffrant de VIN III développent une maladie invasive (**Davidson et al., 2003**).

✓ **Le second type** : est souvent observée chez les femmes âgées de plus de 50 ans et est associée à des troubles épithéliaux non néoplasiques (VNED) tels que l'inflammation ou la sclérose de lichen chronique (**Stroup et al., 2008**).

## **2. Autres cancers liée à HPV**

### **2.1. HPV et l'appareil digestif**

#### **2.1.1. HPV et le cancer œsophagien**

Le cancer de l'œsophage est le huitième cancer le plus répandu dans le monde (**Guo et al., 2016**). L'infection par l'HPV à haut risque peut avoir un rôle dans la carcinogénèse œsophagienne (**Turkay et al., 2016**), l'œsophage peut être infecté par l'HPV de la même manière que la cavité buccale, les amygdales, et du pharynx, on suppose que les similitudes histologiques d'épithéliums squameux entre la tête, le cou et de l'œsophage. La prévalence d'HPV à haut risque est de 22,2% dans le cancer de l'œsophage (**Guo et al., 2016**).

### **2.1.2. HPV et le cancer de l'an**

Les cancers de l'an est une maladie rare, comprennent à la fois les cancers du canal anal et les cancers de la marge anale qui représentent 85% et 15% respectivement. La très grande majorité des cancers invasifs de l'an sont des carcinomes (**Badoual et al., 2015**). Il est connu surtout chez les hommes hétérosexuels (**Nyitrai, 2008**). Des études épidémiologiques ont montré que environ 85% des cancers de l'an sont associés à l'infection par le HPV 16 et 18 (**Salati et Al Kadi, 2012**).

## **2.2. HPV et appareil urinaire**

### **2.2.1. HPV et cancer de pénis**

Le papillomavirus humain est très répandu chez les hommes y compris le développement des verrues génitales, des néoplasies intraépithéliales péniennes et des carcinomes pénien invasifs (**Anic et Giuliano, 2011**). Des études ont été conduites pour évaluer la prévalence de l'infection par le HPV et la transmission chez les hommes. La détection de l'ADN d'HPV par l'échantillonnage anogénital mâle, montre que la prévalence est souvent 20% ou plus (**Kelly et al., 2016**). Il est prouvé que l'infection par le HPV et les verrues génitales surviennent plus fréquemment chez les hommes non circoncis que chez les hommes circoncis (**Hernandez et al., 2008**).

### **2.2.2. HPV et cancer de la vessie**

Plusieurs auteurs ont cherché à déterminer le rôle de l'HPV dans les carcinomes de la muqueuse urothéliale, en raison de sa proximité anatomique avec l'appareil reproducteur. De rares études avaient montré la présence d'une éventuelle infection par HPV dans moins de 10 % de cancers vésicaux, mais la place de l'HPV dans les cancers de la vessie reste très discutée. Ainsi, la recherche d'HPV n'est pas effectuée en routine dans les carcinomes vésicaux (**Badoual et al., 2015**).

## **2.3. HPV et cancer des voies aérodigestives**

Les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) sont fréquents dans le monde (**Dufour et al., 2012**). La plupart des études ont démontré que les caractéristiques du tabac et la consommation d'alcool sont les principaux facteurs de risque pour le cancer



des VADS, mais au cours des 10-15 dernières années, l'infection par le HPV a été de plus en plus reconnu comme un important facteur étiologique (**Elrefaey et al., 2014**).

### **2.3.1. Cancer de l'oropharynx**

Un nombre croissant de recherches montrent que l'HPV est une cause fréquente et croissante de carcinome épidermoïde oropharyngé (**Ramvist et Dalianis, 2010**) en particulier des amygdales et cancer de la langue (**Elrefaey et al., 2014**).

### **2.3.2. Cancer de la cavité buccale**

Les infections à HPV 16, 18 et 31 provoquent 10 % des cancers buccaux (**Chikhani, 2012**). Plusieurs études ont été entreprises pour définir la prévalence et l'histoire naturelle de l'infection par le HPV dans la cavité buccale des sujets sains et de trouver un lien possible avec le développement de tumeurs oropharyngées, ils ont aussi montré que l'incidence de l'infection par le HPV est plus fréquente chez les hommes par rapport aux femmes (10,1% vs 3,6%) (**Morbini et Benazzo, 2016**).

## **2.4. HPV et lésion de peau**

Il existe maintenant un corpus croissant de preuves que la peau humaine saine héberge également les virus résidents ou transitoires. La validité de ce concept a été largement démontrée pour les bêta et gamma papillomavirus humains cutanés ( $\beta$  et  $\gamma$ -HPV) qui sont généralement présents sur les couches superficielles de la peau dans la plupart des individus (**Foulongne et al., 2012**). Les verrues communes sont le plus souvent causées par le HPV 2, tandis que les lésions punctiformes le plus souvent vus sur les paumes des mains sont associées à HPV 4 (**Cubie, 2013**).

Il n'y a aucune preuve épidémiologique solide liant les types de HPV spécifiques à un risque accru de cancer de la peau. Certaines infections par le HPV semblent être impliqués dans le développement du cancer de la peau non mélanique et ses lésions précurseurs dans la peau, le plus souvent dans des zones exposées au soleil (**Iftner et al., 2003**).

## **2.5. HPV et cancer des poumons**

Le cancer bronchique est la deuxième tumeur maligne la plus fréquente chez les hommes et les femmes. Des études ont montré que le HPV pourrait contribuer dans le

développement du cancer bronchique. L'intérêt a été suscité par des descriptions morphologiques des changements épithéliales ressemblant étroitement à celles des verrues génitales dans et autour des cellules bronchiques, cela a conduit à l'hypothèse sur le rôle possible du HPV dans la carcinogénèse bronchique (**Syrjanen, 2002**). Des résultats suggèrent que le tissu pulmonaire avec l'infection par le HPV 16 et 18 a une forte association avec le cancer de poumon (**Zhai et al., 2015**). L'ADN des HPV est détecté dans environ 20 % des tissus de cancer du poumon (**Myon Bae et Hee Kim, 2015**)

## **2.6. HPV et cancer de sein**

Les rapports sur la distribution de l'infection par le HPV dans le cancer du sein sont controversés. Plusieurs auteurs n'ont trouvé aucune relation entre la présence de séquences du génome de HPV et le développement du cancer du sein (**Fernandez et al., 2015**). En 2016, des études ont rapporté une fréquence modérée de l'infection par le HPV chez 4,4% à 60% des cancers du sein. Différents sous - types de HPV, y compris le HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-58, HPV-59, HPV-73 et HPV-82 ont été détectés. En outre, les infections à HPV ont été détectées non seulement dans les cancers du sein, mais aussi dans différentes lésions mammaires bénignes telles que le fibroadénome et papillome intracanalair (**Choi et al., 2016**).

## **3. HPV et immunodépression**

### **3.1. Infections à HPV chez les femmes séropositives**

L'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) est associée à une prévalence plus élevée d'infection par un ou plusieurs HPV-HR. L'immunodépression induite par le VIH favorise la persistance de l'infection HPV et le développement des lésions cervicales (**Segondy, 2010**). D'une part, l'HPV est détecté dans le tractus génital, deux fois plus fréquemment chez les femmes séropositives que chez les femmes séronégatives, et presque toutes les femmes séropositives auront au moins une fois, une infection par l'HPV au niveau du col pendant une période de 2 ans. D'autre part, le taux de persistance de l'infection HPV est environ six fois plus élevé chez les femmes séropositives (24% contre seulement 4% dans le groupe témoin) (**Heard, 1997**).

### **3.2. Infections à HPV chez les greffés/transplantés**

Chez les transplantés, les infections à HPV à tropisme cutané induisant des verrues planes ou vulgaires sont les plus fréquentes et touchent la majorité des patients. Après plusieurs années, ces infections peuvent conduire à une dissémination profuse des verrues. Le risque de carcinome cutané est environ 100 fois plus élevé chez les transplantés que dans la population générale (**Segondy, 2010**).

Chez les transplantés, les infections à HPV à tropisme muqueux ont donné lieu à plusieurs études. Globalement, l'incidence des cancers touchant la sphère génitale (col utérin, vulve) est élevée chez les femmes transplantées (**Denis et Ardaens, 2011**).

**LES METHODES DE  
DETECTION ET  
D'IDENTIFICATION  
DES HPV**

### **Chapitre 3 : Les méthodes de détection et d'identification d'HPV**

En microbiologie, les laboratoires de virologie ont été les premiers à utiliser la biologie moléculaire pour le diagnostic quotidien (**Le Faou, 2012**). Actuellement, les méthodes de détection moléculaires sont l'étalon-or pour l'identification du HPV (**Zaravinos et al., 2009**).

#### **1. Détection qualitative de l'ADN d'HPV**

##### **1.1. Technique de détection**

###### **1.1.1. Southern Blot**

C'est une technique d'analyse des molécules d'ADN été mise au point par E. M. Southern en 1975, mettant en jeu :

- Une étape digestion par les enzymes de restriction ;
- Une étape de séparation électrophorétique sur gel d'agarose ou de polyacrylamide ;
- Une étape de transfert des acides nucléiques séparés sur membrane ;
- Une étape de détection des acides nucléiques recherchés à l'aide d'une sonde ADN marquée (**Maréchal, 2006**).

Elle a finalement été abandonnée en pratique quotidienne en raison de sa complexité (**Blanc, 2005**).

###### **1.1.2. Dot Blot**

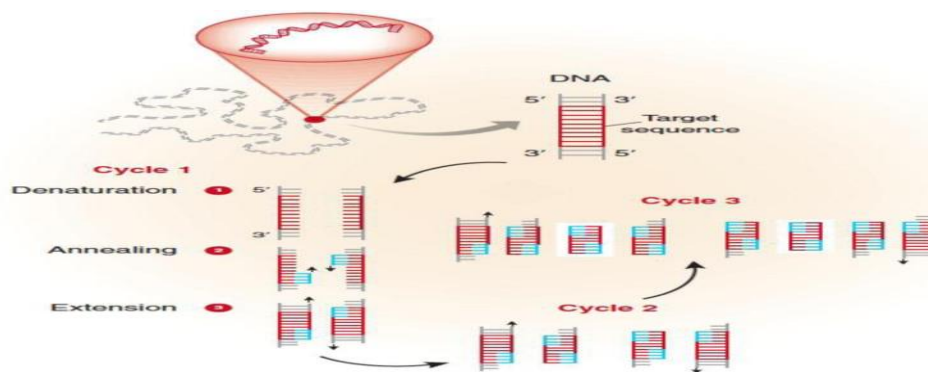
Ici un simple dépôt d'ADN est effectué sur une membrane synthétique, suivi d'une hybridation moléculaire avec une sonde marquée. Cette technique est plus simple, plus rapide, applicable à de grandes séries d'échantillons mais moins sensible que le Southern Blot : le seuil de détection est environ d'une copie par cellule [(**Leto et al., 2011**) ;(**Monsonogo, 2006**)] .

Cette technique est maintenant utilisée après PCR, ce qui augmente sa sensibilité : l'ADN amplifié étant alors déposé sur une membrane synthétique, puis hybride avec des sondes de divers HPVs (**Monsonogo, 2006**).

### 1.1.3. PCR

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a été découverte par Dr. Kary Mullis, c'est une technique puissante, largement répandue pour amplifier l'ADN spécifique [(Garibyan et avashia, 2014) ; (Pasternak, 2003) ; (Mullis, 1990)]. L'élément essentiel de la PCR est une paire d'amorces d'oligonucléotide de synthèse (d'environ 20 nucléotides chacune) qui sont complémentaire de régions sur des brins opposés et qui encadre la séquence choisie pour l'amplification. Cette technique comporte de nombreux cycles. Chaque cycle comporte trois étapes successives (**Fig. I.10**): La dénaturation de l'ADN, l'hybridation aux amorces et la synthèse de l'ADN (l'allongement de l'amorce) (**Pasternak, 2003**).

Les protocoles de HPV-PCR utilisent des amorces consensus telles que PGMY09 / PGMY11 et GP5 + / GP6 +, qui permettent l'amplification d'un grand nombre de génotypes d'HPV dans une seule réaction. Les amorces ciblent des régions conservées du génome de HPV, généralement le gène de capsid L1 [(Camargo *et al.*, 2011) ; (Ennaifer, 2014)] .



**Fig I. 10** : Présentation schématique de PCR (**Garibyan et Avashia,2014**).

### 1.1.4. Hybridation en phase liquide

L'hybridation en phase liquide, à la fois l'acide nucléique cible et la sonde est libre d'interagir dans un mélange réactionnel aqueux qui accélère la vitesse à laquelle l'hybridation se produit (**Chernesky, 1999**). Il s'agit d'une ancienne technique permettant une hybridation en solution comme Southern Blot, Dot Blot et HIS (Hybridation in situ). Le seul système utilisable et commercialisé sous le nom d'Hybrid capture.

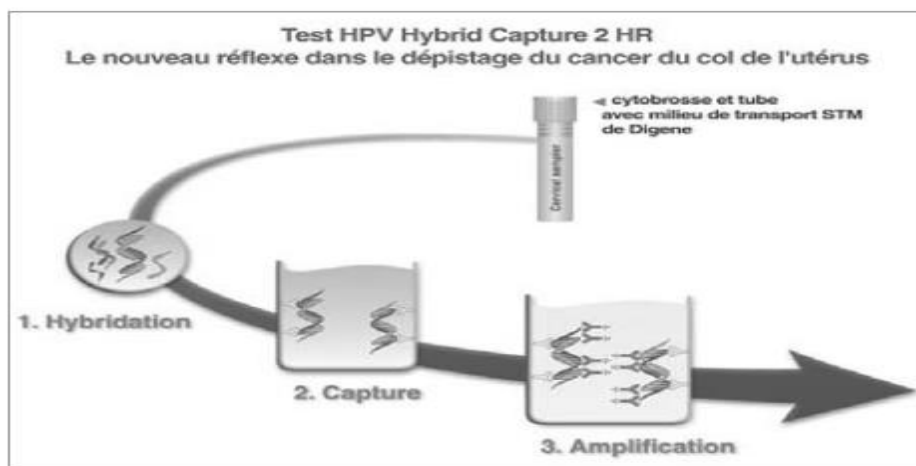
## Méthodes de détection et d'identification des HPV

Depuis 1995, Digene Corporation a développé et breveté la technologie dite de capture des hybrides version 2 ou Hybrid Capture 2 (hc2) (**Fig. I.11**), qui a été utilisée pour détecter les HPV [(Clavel *et al.*, 1999) ;(Monsonogo, 2006)]. Il s'agit d'une hybridation suivie d'une immunodétection en microplaques avec détection luminométrique (**Monsonogo, 2007**). Ce système repose sur une hybridation en phase liquide d'un ADN viral avec une sonde ARN complémentaire de la cible recherchée et une amplification du signal (**Pfeffer *et al.*, 2008**). Il est non radioactif, rapide, automatisable qui permet de mettre en évidence actuellement 18 types d'HPV classé comme à haut risque (16, 18, 31, 33, 35,39,45,51,52, 56, 58, 59 et 68) et bas risque (types 6, 11, 42, 43 et 44) (**Clavel *et al.*, 1999**).

Le rendu du résultat est qualitatif :

-test HPV HR positif, présence d'HPV à haut risque.

-test HPV HR négatif, absence d'HPV à haut risque (**Monsonogo, 2007**).



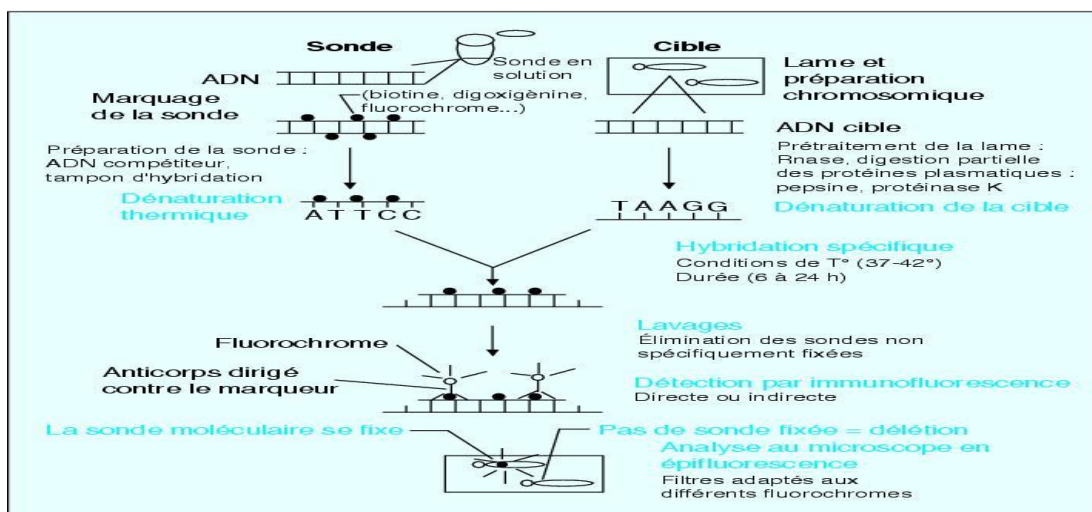
**Fig I. 11** : La technologie Hybrid capture (**Monsonogo 2007**).

### 1.1.5. Hybridation in situ (HIS)

C'est une technique permettant la détection et la localisation de séquences nucléotidiques au niveau : d'une coupe de tissu ; d'un étalement cellulaire ; d'une préparation chromosomique. Sur les préparations tissulaires et cellulaire, l'HIS permet de détecter des séquences nucléotidiques virales (ADN et ARN), elle permet aussi de détecter d'expression d'un gène codant pour la synthèse de protéines : ARN messager. L'HIS est dérivée des progrès de la biologie moléculaire qui produits les sondes d'hybridations. L'HIS est complémentaire des autres techniques de biologie moléculaire qui détectent des séquences nucléotidiques dans des extraits tissulaires (Northern Blot, Dot

blot) : ces techniques sont sensibles mais ne permettent pas le typage cellulaire (Bruneval, 1988).

Le principe de cette méthode repose sur la spécificité de l'hybridation entre deux séquences nucléotidiques complémentaires (Fig. I.12) (Bruneval, 1988). Actuellement, on emploie comme marqueurs des colorants fluorescents de préférence à des molécules radioactives. L'acronyme choisi habituellement pour ce protocole est le FISH (pour *fluorescent hybridization in situ*, hybridation *in situ* en fluorescence) (Pasternak, 2003). Un aspect ponctué, en grains d'hybridation, évoque une intégration de l'ADN d'HPV, alors qu'un aspect homogène diffus du marquage serait plutôt en faveur d'une forme épisomale de l'ADN viral (Chevalier, 1997).



**Fig I. 12 :** Principe de l'hybridation in situ (Fish) (Bouayed, 2004).

## 1.2. Génotypage des HPV

Quatre méthodes de génotypage différentes pour la détection des types de HPV génital (Klug *et al.*, 2008).

### 1.2.1. Génotypage par séquençage

Le principe du séquençage consiste à déterminer la séquence de l'ADN cible. Les alignements de séquences sont réalisés sur diverses séquences de génotypes d'HPV standard stockés dans la base de données GenBank par analyse BLAST en ligne pour arriver à un génotypage spécifique (Lee *et al.*, 2007).

La région la plus fréquemment utilisée est située au niveau du gène codant la protéine de capsid L1 car les différents génotypes des HPV ont été définis par alignement de la séquence complète de cette région (Hantz *et al.*, 2010).



Après le séquençage des échantillons, les données de séquence brutes sont analysées à l'aide du logiciel interne et sont ensuite classées en HPV BR ou HPV HR (Zou *et al.*, 2014).

Cette méthode est considérée comme la référence mais elle présente comme inconvénient principal de ne pas pouvoir analyser les infections multiples. Par contre, tous les variants intratypiques peuvent être détectés. De plus, son utilisation en routine demeure relativement fastidieuse (Hantz *et al.*, 2010).

### **1.2.2. Génotypage par hybridation moléculaire inverse**

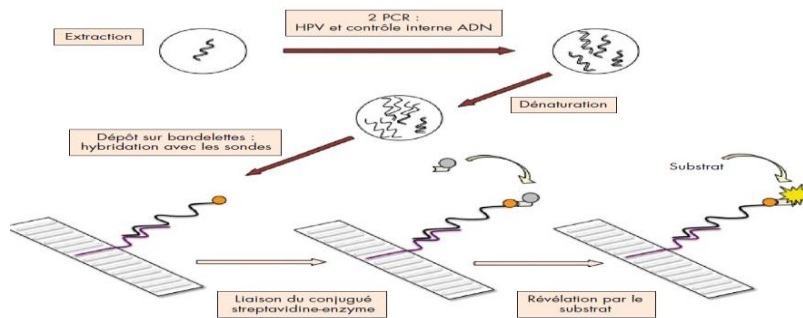
Le principe de l'hybridation inverse (reverse line blotting) repose sur la mise en contact des produits d'amplification en phase liquide d'une part et des sondes oligonucléotidiques spécifiques immobilisées sur un support solide de type membrane de nylon d'autre part. Les systèmes de génotypage des HPV comportent des bandelettes sur lesquelles les différentes sondes sont déposées selon des bandes parallèles. Les produits d'hybridation présents sont révélés par réaction colorimétrique ou chimioluminescente (Fig. I.13) (Monsonogo, 2008).

Les deux tests commerciaux les plus utilisés sont le test Linear Array Genotyping Test® (Roche Diagnostics) et le test INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Innogenetics) (Debaque et Eide, 2012).

Le test LA(Linear Array) de Roche Diagnostics utilise des amorces PGMY09 / 11 biotinylés de consensus pour amplifier une région de 450 pb du gène L1 qui vont ensuite être dénaturés puis hybridés avec des sondes spécifiques de types, immobilisées sur bandelettes (Liu *et al.*, 2010), et est capable de détecter 37 génotypes du HPV, dont 17 types à haut risque (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 68, 73, 82, IS39) et 15 types à faible risque (types 6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 64, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 89), et 5 inconnus (Low *et al.*, 2015).

Le test INNO-LiPA® est basé sur le même principe : l'ADN extrait est amplifié par PCR avec des amorces consensus SPF10 biotinylées, les amplicons de 65 pb obtenus sont révélés sur bandelettes. Les génotypes identifiés sont déterminés par comparaison avec la bandelette de référence. Ce test détecte 28 génotypes HPVs : 18 HPVs de haut risque, sept HPVs de bas risque et trois HPVs non classés (Debaque et Eide, 2012).

Dans chacun des deux tests, il existe un contrôle ADN humain : la  $\beta$ -globine pour Linear Array® et HLA-DBP1 pour INNO-LiPA®. Ces contrôles valident les étapes d'extraction, d'amplification et d'hybridation-révélation pour chaque échantillon testé (Debaque et Eide , 2012).



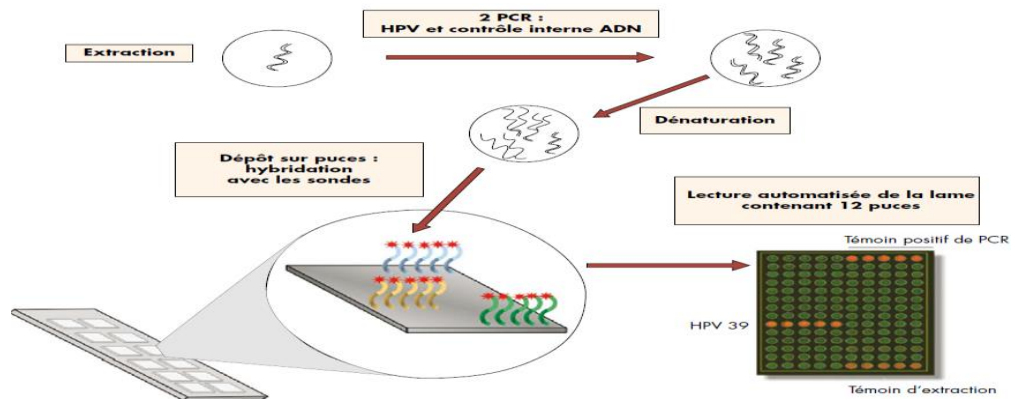
**Fig I. 13 :** Principe de génotypage par hybridation inverse sur bandelettes (Hantz et al., 2010).

### 1.2.3. Génotypage par puce d'ADN

Le principe des puces à ADN est très proche de celui de l'hybridation inverse, c'est le support sur lequel sont fixées les sondes qui est différent. Elles sont déposées sous forme de spots circulaires sur un support plastique ou en verre de tailles différentes (Fig. I.14) (Monsonogo, 2008).

La révélation peut être soit colorimétrique soit fluorimétrique selon le marquage des amorces utilisées pour la PCR (respectivement biotine ou fluorochrome), avec une lecture automatisée. Cette technique, simple et rapide, permet également de détecter les infections multiples (Hantz et al., 2010).

Les systèmes PapilloChek et Clinical Arrays HPV sont deux exemples de systèmes de puces disponibles aujourd'hui sur le marché pour le génotypage des HPV (Monsonogo, 2008).



**Fig I. 14 :** Principe de génotypage par hybridation inverse sur puce à ADN (Hantz *et al.*, 2010).

#### **1.2.4. Génotypage par technologie d'array en suspension : Luminex®**

Le principe repose sur l'utilisation de microbilles de polystyrène couplées à des sondes oligonucléotidiques spécifiques de chaque génotype d'HPV (Oh *et al.*, 2007).

Les billes sont marquées par un fluorophore spécifique pour chaque type tandis que l'amplicon est marqué par un autre fluorophore. L'analyse est effectuée par cytométrie de flux à deux lasers permettant de détecter simultanément des réactions multiples dans un même tube.

Plusieurs approches ont été décrites dans la littérature mais une seule est commercialisée à ce jour. Il s'agit du test Digene HPV Genotyping LQ Test® (Qiagen), qui amplifie le gène L1 à partir des amorces GP5+/GP6+ (Nazarenko *et al.*, 2008).

## **2. Détection quantitative d'ADN d'HPV**

La quantification génique basée sur l'amplification en temps réel (PCR-TR), encore appelée *real time PCR*, est une technique très utilisée pour la quantification des génomes viraux (collot *et al.*, 2001). Parmi les avantages de cette méthode est la capacité de déterminer la charge virale; l'utilisation de différents fluorochromes qui émettent une fluorescence, avec le produit réactionnel de PCR, les acides nucléiques peuvent être détectés même en très petites concentrations, et enfin, il est extrêmement reproductible, rapide et applicable à des échantillons cliniques (Abreu *et al.*, 2012).

Le mélange d'amplification contient un colorant fluorescent (SYBR Green) ou une sonde oligonucléotidique spécifique par mesure de la fluorescence émise à chaque cycle de PCR. Étant donné que la courbe de fusion de l'ADN dépend de la séquence,

la longueur et la teneur en GC des produits de PCR peuvent être distingués par leurs courbes de fusion (**Cubie et al., 2001**).

### **2.1. Détection des ARNm des HPV**

La surveillance de l'expression de ARNm E6 / E7 peut fournir une approche de diagnostic précis et informatif pour la détection de l'activité oncogène lié au développement de la dysplasie sévère ou un carcinome du col (**Coquillard et al., 2011**). Le test NucliSENS EasyQ HPV® (Biomérieux) utilise la technologie NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) (**Molden et al., 2007**).

Les échantillons ont été analysés pour l'ARNm E6 et E7 d'HPV par une amplification basée sur une séquence d'acide nucléique multiplex en temps réel grâce à des sondes fluorescentes spécifiques (**Cattani et al., 2009**). Dans cette technique le risque de contamination est limité car toutes les étapes sont réalisées dans un même tube (**Burger et al., 2010**).

### **2.2. Détection de marqueurs moléculaires (marquage immunochimique de la p16)**

Les difficultés pratiques rencontrées par les cytologistes dans l'identification des cellules anormales ont conduit à rechercher de nouveaux marqueurs susceptibles de rendre plus sensible et tout aussi spécifique l'approche cytologique. Parmi eux, la p16 semble la plus intéressante.

La protéine p16 est une protéine cellulaire impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et son expression est alors strictement contrôlée dans les cellules normales. Dans les cellules dysplasiques, la p16 est nettement surexprimée en raison, notamment, de l'activité transformante d'E7 par inhibition de la protéine suppresseur de tumeur produit du gène du Rétinoblastome (pRb) (**Dachez, 2008**). La protéine p16<sup>INK4a</sup> un marqueur cytologique pour détecter les néoplasies intraépithéliales de haut grade du col utérin (**bergeron et al., 2006**).

PARTIE

PRATIQUE

# MÉTHODOLOGIE

## **I. Méthodologie**

### **1. Etude de profil épidémiologique des cancers génitaux dans la région de Tlemcen**

#### **1.1. Objectif principal**

Etudier le profil épidémiologique des cancers génitaux au niveau de la région de Tlemcen entre 2012 et 2016.

#### **1.2. Objectifs spécifiques**

Etudier la répartition des cancers génitaux.

- ✓ Selon l'âge des patients
- ✓ Par année
- ✓ Selon le type
- ✓ Selon la base de diagnostic
- ✓ Selon La morphologie
- ✓ Selon le stade de diagnostic
- ✓ Selon la région.

#### **1.3 Lieu d'étude**

Notre étude a été réalisée au niveau de service d'épidémiologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Tlemcen.

#### **1.4. Méthode d'analyse**

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur 8514 cas de cancers pris en charge au niveau du CHU de Tlemcen, avec 476 cas des cancers génitaux touchant le femmes de Tlemcen. Le traitement des données épidémiologiques a été fait par le logiciel Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007.

### **2. Recherche d'HPV à partir des cancers génitaux par PCR classique et test Amplicor<sup>®</sup>HPV**

#### **2.1 Objectif**

Détection d'ADN d'HPV à partir des cancers génitaux par PCR classique et par le test Amplicor<sup>®</sup>HPV.

## **2.2 Lieu d'étude**

La détection d'HPV par PCR classique et test Amplicor®HPV ont été réalisés au niveau de laboratoire de biologie moléculaire (faculté de SNV-STU), ainsi que le laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédicale et à l'environnement (LAMAABE).

## **2.3. Matériel et méthodes**

-Origine des prelevement: 36 prélèvements tissulaires sous forme des cellules paraffinées d'une collection de LAMAABE réalisés par la Docteur NAHET Amira ont été utilisés dans ce travail.

### **2.3.1. Déparaffinage des tissus fixés et inclus en paraffine**

Dans chaque tube contenant les coupesissulaires, 900 µl de toluène, et 100 µl d'éthenol absolu ont été ajoutés pour se débarrasser de la paraffine tout en évitant de toucher l'échantillon. Suivi d'une agitation à l'aide du vortex et une centrifugation pendant 5 min à vitesse maximale (12000 tours/min). Après centrifugation le surnageant est jeté. 900 µl d'alcool absolu sont ensuite ajoutés au culot pour réhydrater l'échantillon suivi d'une agitation manuelle pendant 10 min et une centrifugation pendant 5min à vitesse maximale (12000 tours /min), cette dernière étape est répétée au culot obtenus afin d'améliorer le déparaffinage. Ensuite, le culot est laissé à l'air libre pour sécher.

### **2.3.2. Extraction d'ADN par salting out**

#### **a. Principe**

C'est une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée. Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol puis repris en suspension (**Jean Nesson, 2007**).

#### **b. Protocole**

Dans un tube eppendorf, contenant 200 µl des cellules cervicales, on ajoute 200 µl de tampon de lyse plus 20 µl protéinase K. Les tubes sont vortexés et mis dans une étuve à 55°C pendant une nuit.

- Ajouter 200 µl de NaCl, puis centrifuger durant 10 minutes à 4000 rpm.

- Récupérer 400 µl de surnageant dans un autre tube, et y ajouter 800 µl d'éthanol absolu froid (-20 0C). Mélanger et centrifuger à 14000 rpm pendant 8 minutes.



- Ensuite jeter le surnageant et garder le culot et y ajouter 500 µl du tampon de lavage (l'éthanol 70%) puis le rejeter.

- Enfin, ajouter 20µl de l'eau ultra pure.

Pour la conservation de l'ADN, il faut ajouter 20 µl de TE (Tris-EDTA) et garder les tubes à -20°C.

### **2.3.3. Contrôle de qualité de l'ADN par spectrométrie**

#### **a. Objectif**

Cette expérience a pour but de rechercher la pureté de l'ADN extrait sous l'intensité des longueurs d'onde déterminées (260nm pour l'ADN et 280nm pour les protéines).

#### **b. Principe**

Etablir les spectres d'absorption de l'ADN, d'une protéine et justifier l'utilisation du rapport A260/A280 comme indicateur de pureté d'un extrait d'ADN.

#### **c. Mode opératoire**

-Les tubes contenant l'ADN ont été dilués au 1/100 pour permettre une bonne lecture.

-Le spectromètre doit être ajusté avec le blanc (cuve d'eau ultra pure).

-Les échantillons ont été versés dans la cuve en quartz.

-Les lectures étaient effectuées à 260 nm et 280nm en même temps.

-Le ratio 260/280nm a été calculé afin de mesurer la pureté de l'ADN qui doit être comprise entre 1,8 et 2.

### **2.3.4. Amplification de la l'ADN cible par PCR**

#### **a. Objectif**

Elle permet d'obtenir d'une quantité suffisamment importante d'un fragment d'ADN pour l'analyse.

#### **b. Principe**

La réaction en chaine de la polymérase (PCR) est une technique d'amplification de l'ADN spécifique in vitro .Cette technique comporte de nombreux cycles. Chaque cycle comporte trois étapes successives : La dénaturation de l'ADN, l'hybridation de l'ADN avec des amorces et la synthèse de l'ADN (**Pasternak, 2003**).

**c. Mode opératoire**

Pour une réaction de PCR, le mélange réactionnel doit contenir :

-10  $\mu\text{l}$  de mix de Qiagen (MQ) qui est constitué de tampon de polymérase 1x  $\text{MgCl}_2$  1,5 millimol), les 4 dNTP (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates) à 0,2 mmol.

-1  $\mu\text{l}$  de l'amorce MY11

-1  $\mu\text{l}$  de l'amorce MY09

-0,2  $\mu\text{l}$  de la hot star Taq polymérase (**Fig II. 1**)

-32.8  $\mu\text{l}$  d'eau distillée stérile pour obtenir un volume de 45ml

-Dans des tubes en barrettes numérotés, 45 $\mu\text{L}$  du mélange réactionnel sont mis.

- 5  $\mu\text{l}$  de chaque extrait d'ADN sont ajoutés en respectant l'ordre des tubes.



**Fig II. 1:** Le mélange réactionnel pour la PCR

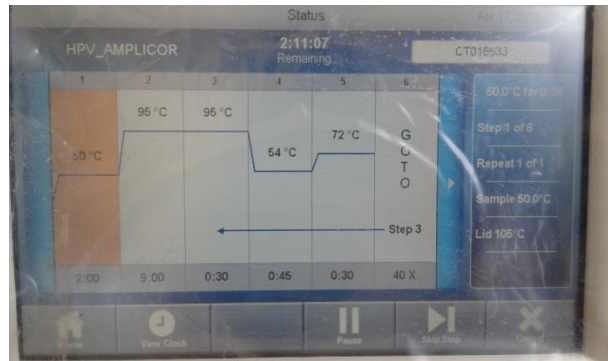
Les tubes sont par la suite placés dans le thermocycleur.

Le thermocycleur contrôle les changements de températures à différentes étapes de la réaction, le programme d'amplification était comme suite (**Fig II. 2**) :

- Etape de dénaturation initiale  $\longrightarrow$  95°C pendant 15 minutes
- Etape de dénaturation  $\longrightarrow$  95°C pendant 30 secondes.
- Etape d'hybridation  $\longrightarrow$  53°C pendant 45 secondes.
- Etape d'extension  $\longrightarrow$  72°C pendant 1 minute pour l'élongation
- Etape d'extension finale  $\longrightarrow$  72°C pendant 5 minutes
- Etape finale : Fin du programme 4°C jusqu'à l'infini

40 cycles

Le temps de la réaction est de 2 heures et 30 minutes.



**Fig II. 2 :** Le programme de thermocycleur pour le test HPV 2.3.5. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%

**a. Objectif**

L'objectif principal de cette technique est la séparation des molécules d'ADN en fonction de leur taille (analyse qualitative).

**b. Principe**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour séparer des molécules en fonction de leur charge, leur taille et leur forme. Il s'agit d'un moyen de séparation particulièrement efficace pour des biomolécules chargées telles que l'ADN, l'ARN et les protéines (Stellwagen, 2010)

**c. Mode opératoire**

- Préparer le TAE (Tris, acide acétique et EDTA ; un tampon de migration utilisé en électrophorèse) à 0,5x à partir de la solution mère TAE 10 fois :
- L'agarose est un polymère à base d'agar purifié, il est utilisé à 1,5 %. Pour cela, 1,5g d'agarose est dissoute dans 100 ml de tampon TAE (0,5X) au micro onde (agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange).
- Ajouter le BET (Bromure d'éthidium ) qui est employé comme marqueur non radioactif pour identifier et visualiser des bandes d'acides nucléiques dans le gel d'électrophorèse.
- Placer ensuite le peigne (à 1mm du fond et à environ 1cm de l'extrémité) à l'une des extrémités du support et couler doucement le gel (5mm d'épaisseur) en évitant toute formation de bulle d'air avec un cône (Fig II. 3).

- Laisser le gel se solidifier. Le gel étant chaud éviter d'inhaler la vapeur de BET au niveau de la cuve puis retirer délicatement le peigne.



**Fig II. 3 :** La préparation de gel d'agarose

- Positionner le plateau de moulage au niveau de la cuve à électrophorèse, les puits du côté de la cathode.
- Remplir la cuve de tampon TAE 0,5X pour qu'il couvre complètement le gel.
- Mélanger 6  $\mu$ l d'échantillon avec le tampon de charge (bleu de bromophenol, xylène cyanol et glycérol et prélever le mélange avec une micropipette en changeant des cônes à chaque prélèvement.
- Remplir les puits en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette (**Fig II. 4**).
- Déposer 5 $\mu$ l de marqueur de taille dans le dernier puits. Enfin, fermer la cuve et brancher les électrodes. Choisir le voltage à 135 et laisser migrer pendant 20 min.



**Fig II. 4 :** Le dépôt des échantillons sur gel d'agarose dans la plaque a électrophorèse - Après migration, placer le gel dans l'appareil UV réuni avec caméra et prendre une photo.

### **2.3.6. Recherche d'HPV par test Amplicor®**

Le test Amplicor® réalisée au niveau de LAMAABE été utilisé pour l'analyse de 10 prélèvements sur les 36.

Le test HPV Amplicor est un test qualitatif réalisé in vitro servant à la détection de l'ADN, basé sur la PCR qui peut identifier 13 types d'HPV à haut risque. Ce système utilise des amorces biotinylées pour amplifier une région d'environ 165 pb de la séquence L1 à l'intérieur de la région polymorphe du génome du HPV en utilisant une PCR suivie d'une hybridation d'acide nucléique, sans permettre le génotypage et possède un control interne, le gène cellulaire la  $\beta$ -globine.

#### **a. Mode opératoire**

Les échantillons vont être traités par le test Amplicor® HPV. Ce dernier comporte 3 étapes principales: Extraction de l'ADN ; amplification par PCR ; détection des amplicons.

Par manque de certaines conditions, l'étape de l'extraction n'a pas pu être réalisée. Des extraits de docteur NAHET Amira ont été utilisés pour les étapes suivantes.

#### **b. Amplification**

La PCR a été effectuée avec un volume de réaction final de 50 $\mu$ L, dans des tubes eppendorf contenant 25  $\mu$ L de mélange MMX (**Fig II.5**) constitué de : l'ADN polymérase, les dNTP, les amorces biotinylés (pour ADN HPV haut risque et pour l'ADN  $\beta$ -globine), de l'activateur MgCl<sub>2</sub> et (25 $\mu$ L) et de l'échantillon (ADN extrait). Ces tubes sont posés dans un plateau d'amplification qui est placé dans un bloc du thermocycleur (BIO-RAD).



**Fig II. 5:** Le mélange réactionnel MMX

Il était incubé pendant 2 minutes à 50 ° C (**Fig II. 6**) pour une activation de l'enzyme et 9 min à 95°C (dénaturation initiale), suivi de 40 cycles :

Un cycle commence en dénaturant les deux brins à 95°C pendant 30 s, suivi d'une hybridation qui permet aux amorces de s'hybrider aux ADN pendant 45 s à 54 ° C et une élongation pendant 30 s à 72 ° C, avec un prolongement final pendant 10 minutes. Enfin une étape à 4 °C à l'infini peut être ajoutée. Le cycle dure 2h 30 min à 72 ° C.

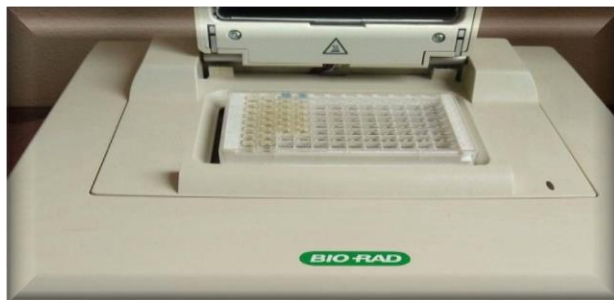
### **c. Détection**

Après l'amplification, un volume de 50µl de la solution de dénaturation (**DN** : l'EDTA, NaOH) a été ajouté à chaque tube de PCR, suivi d'une incubation pendant 10 minutes dans le thermocycleur pour permettre une dénaturation complète.

Les étapes qui suivent sont réalisées sur microplaque. Elle est constituée de douze barrettes, chaque barrette contient 8 puits. Deux types de puits sont utilisés : des puits revêtus de sonde d'ADN (**HPV MWP**) pour HPV et des puits revêtus de sonde d'ADN de β-globine (**BG MWP**).

Un tampon **HPV HYB** (100 µl) a été ajouté à chacun des 2 types de puits de la plaque contenant 25 µl de l'amplicon dénaturé pour favoriser l'hybridation. Tapoter le bord de la plaque jusqu'à ce que la couleur vire du bleu au jaune clair (ce changement de couleur indique que le mélange est suffisant).

Les plaques ont été recouvertes et incubées pendant 1 h à 37 ° C pour permettre une hybridation entre les amplicons et les sondes oligonucléotidiques.



**Fig II. 6:** Incubation de la microplaque dans le thermocycleur

100µl du tampon de lavage a été préparé : mettre 1 volume de WB (10 fois concentré) à 9 volumes d'eau distillée. Pour chaque barrette de microplaque, on prépare 40 ml de solution de lavage.

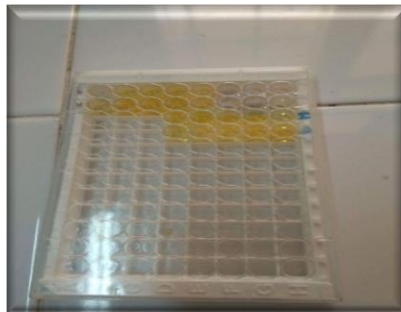
La solution de lavage est conservée entre 2 et 25°C pendant 2 semaines dans un récipient fermé.

Les plaques ont été lavées cinq fois avec du tampon de lavage (**WB**) pour éliminer le matériau non hybride.

Le conjugué avidine-peroxydase (**AV-HRP**) (100  $\mu$ l) a été ajouté dans les puits, étant donné que les amplicons sont biotynilés (amorces biotynilés), la biotine se fixe sur l'avidine conjuguée à la peroxydase de raifort. Une fois l'incubation terminée. Les plaques ont été recouvertes et incubées pendant 15 min à 37 ° C et étaient lavé de nouveau comme décrit ci-dessus.

Le substrat actif a été préparé par le mélange de 2 ml La tétraméthylbenzidine (**SUBA**) et 0.5 ml du peroxyde d'hydrogène (**SUB B**).

100  $\mu$ L de mélange actif ont été ajouté à chaque puit (**Fig II.7**), et les plaques ont été incubées dans l'obscurité à température ambiante pendant 10 min.



**Fig II.7:** Après l'ajout de substrat actif

Le réactif d'arrêt (**STOP**) (100  $\mu$ L) a été ajouté dans les puits, et la densité optique du mélange réactionnel a été mesurée à 450 nm dans le spectrophotomètre (voir détail des constitutions de kit Amplicor dans annexe 6)

- **Remarque :**

Le point de coupure positif pour était une valeur  $A_{450}$  de 0,2.

$A_{450} \geq 0.2$  —————> positif                       $A_{450} < 0.2$  —————> négatif

# RÉSULTATS



# DISCUSSION

observée dans une étude de **Sando et al. (2014)** sur une population à Cameroun est également en accord avec les statistiques de notre analyse. Pour le cancer de col utérin, les carcinomes épidermoïdes donne un taux 78,11% et les adénocarcinomes un taux de 7,73%, ce qui est en accord avec la littérature, où **Duport (2008)** indique une proportion de 80% à 90% pour les carcinomes épidermoïdes et de 10% à 20% pour les adénocarcinomes. Une fréquence de 92,85% des cas de carcinome épidermoïde a été enregistrée dans notre étude pour le cancer de vulve ce résultat est supérieure à celui de **Boujoual et al. (2014)** où la forme de carcinome épidermoïdes représente de 50% des cas. En fonction du type histopathologique, on note que les lésions ovariennes sont à 53,10 % des carcinomes épidermoïde dans notre analyse ce qui diffère des résultats obtenu par **Benhessou et al. (2016)** au Maroc, où le cancer de l'ovaire est essentiellement un adénocarcinome et les résultats de **Sando et al. (2014)** où le type histologique de cancer de l'ovaire est constituait de 90.32% des tumeurs épithéliales.

L'analyse descriptive des anomalies a montré un taux de 11,49 % pour les femmes qui avaient atteint un stade métastatique ; ces patientes consultent en effet à des stades très tardifs. Au Maroc, selon une étude de **Berraho et al. (2012)**, le diagnostic des cancers génitaux en général est fait à un stade avancé avec 82,8% des cas à un stade métastatique. Le diagnostic des cancers génitaux reste aussi tardif au autres pays Africain, ceci s'explique par le long délai entre l'apparition des symptômes et le recours aux soins et l'absence de politique nationale de dépistage et de vaccination (**Sando et al., 2014**).

## **2. Discussion des techniques de détection des papillomavirus humains**

L'infection par HPV représente l'une des maladies sexuellement transmissibles les plus fréquentes. Il est bien démontré que le HPV joue un rôle primordial dans le développement des lésions intraépithéliales et des cancers génitaux, notamment au niveau du vagin, de la vulve mais surtout au niveau du col utérin (**Walker et al., 2001**). On estime que ces types d'agents causent environ 5% du taux de cancer dans le monde, qui comprend 99% des cancers du col de l'utérus, 70% des cancers vaginaux et 43% des cancers de la vulve (**Dok et Nuyts, 2016**).

Nos résultats confirment la force d'association entre HPV et cancer épidermoïde invasif du col de l'utérus puisque 100% des lésions de notre série abritent un HPV, ce qui

concorde avec la littérature. Cette prévalence est similaire a une étude réalisé par la Société Algérienne de l'HPV (SAHPV) en **2010**, et à celle rapportée par Hammouda et collaborateurs (97,7%) dans une série hospitalière de cancers du col de l'utérus à Alger (**Hammouda et al., 2005**), et celle de **Khenchouche et al. 2013** dont HPV est positif dans 95% des cas.

En Tunisie Les cancers du col utérin étaient associés aux HPV à haut risque dans 73,1 % des cas (**Missaoui et al., 2010**).

Selon une étude américaine réalisée par **Saraiya et al. (2015)** l'HPV est associée à 91% des cancers du col de l'utérus.

Selon une étude rétrospective transversale à l'échelle mondiale de **Wright et al. (2010)** 85% de cancer de col utérin est positifs pour l'ADN du HPV, une autre étude de **Munoz et al. (2003)** l'ADN du HPV a été détecté dans 90,7% des patients atteints de cancer du col de l'utérus. Une autre étude réalisée par **Parkin, 2006** montres que 100% des cancers du col de l'utérus attribuables aux virus du papillome.

En ce qui concerne les autres sites génitaux, le cancer de la vulve abrite un seul cas d'HPV positif (1/6) ce qui est très peu fréquent (17%) par rapport a une étude de **Van Beurden et al. (1995)** dont 92% des néoplasies intra-épithéliales vulvaires étaient HPV-positifs et par rapport a celle de **De Vuyst et al. (2009)** où les auteurs ont indiqué dans leur méta-analyse de 63 études totalisant 1873 carcinomes épidermoïdes de la vulve, une prévalence globale du HPV de 40%. Une autre étude de **Saraiya et al. (2015)** à montré 69% des cancers de la vulve sont liés à l'HPV, ce qui est similaire à une autre (69%) étude américaine réalisée par **Bailey et al. (2016)**.

Le cancer de vagin, deux tumeurs abritent un HPV (2/5), la prévalence est plus faible (40%) à celle rapportée par **De Vuyst et al. (2009)** (60%). Des distributions plus élevées sont observées aux USA (75%) (**Saraiya et al., 2015**) et dans une autre étude réalisée par **Van Beurden et al. (1995)** dont HPV est positif dans 75% des cancers vaginaux.

Le nombre modeste de tumeurs disponibles pour les localisations vulvaires (n=6) et vaginales (n=5) a sans doute induit un biais de sélection et les prélèvements que nous

avons analysés ne sont vraisemblablement pas représentatifs des cas de cancers dans la population algérienne.

CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES

## **Conclusion et perspectives**

Le virus du papillome humain est un virus à ADN oncogène qui provoque une prolifération épithéliale sur les surfaces cutanées et muqueuses. Les lésions et les cancers associés aux HPV peuvent se développer en différents sites du tractus génital de la femme, comme le col de l'utérus le deuxième cancer féminin le plus fréquent au monde, le vagin et la vulve (**Didier, 2010**).

L'évaluation du profil épidémiologique a montré que le cancer du col de l'utérus se place à la première position des cancers génitaux (30.46%) dans la région de Tlemcen suivi par le cancer de vulve se place à la deuxième position (2.94%) suivi par le cancer de vagin (1.05%), ce qui est en accord avec la littérature (**Dufit et al., 2016**). Cette étude a montré aussi que l'âge moyen de survenue des cancers génitaux était de 56.5 ans, avec des extrêmes d'âge de 21 à 92, ce qui confirme l'étude de et de **Gustafson et al. (2015)**

Le carcinome semble être le type de cancer le plus prédominant avec 63,24% des lésions génitales contre 23,74% d'adénocarcinome. La nette prédominance du carcinome épidermoïde dans tous les cancers génitaux (184 cas sur 210 soit 87.6%) observée dans une étude de **Sando et al. (2014)** sur une population à Cameroun ce qui est en accord avec les statistiques de notre analyse.

La plupart des femmes ayant une activité sexuelle seront infectés à un moment de leur vie et certains risquent de l'être à plusieurs reprises, Il est donc important qu'elles soient informées sur cette infection sexuellement transmissible et sur les moyens de s'en protéger (**OMS , 2015**)

Le diagnostic de l'infection à HPV repose essentiellement sur la détection du génome viral par biologie moléculaire compte tenu du caractère difficilement cultivable en routine de ces virus et La technique d'amplification en chaîne de séquence d'ADN par la polymérase (PCR) reste la méthode la plus sensible (**Hantz et al.,2010**).

La recherche d'ADN d'HPV par PCR sur 36 cancers génitaux montre que 70,7% se sont révélés positifs, la fréquence des HPV était de 100% dans les cancers du col utérin, 40% dans les cancers du vagin, 17% dans l'ensemble des cancers de la vulve.

L'adoption généralisée du test HPV et des vaccins actuels contre le HPV permet de réduire l'incidence et la mortalité de ces cancers par au moins les deux tiers. Une

réduction de la mortalité pourrait être obtenue plus rapidement si des programmes de dépistage des cancers génitales rentables pour les femmes adultes étaient mis en place avec la vaccination des jeunes adolescentes, on pourrait avoir des avantages non cumulables dans la réduction des cancers génitaux par l'association dépistage-vaccination (**Lowy et Schiller, 2012**).

Suite à cette étude, nous pouvons ressortir avec les perspectives suivantes :

- Augmenter le nombre des échantillons pour promouvoir la vaccination anti-HPV.
- Utiliser d'autres techniques de détection comme la PCR en temps réel afin d'estimer la charge virale.
- La nécessité d'une politique de surveillance systématique des affections génitales instituant le dépistage à son stade initial.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

A

- Abban,C.Meneses,P(2010).** Usage of heparan sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection. *Virology*,403,1-16.
- Abreu,ALP.Souza,RP.Gimens,F.Consolaro,MEL(2012).** A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology journal*,9(262).
- Accradi,R.Gheit,T(2014).** Cutaneous HPV and skin cancer. *La Presse Médicale*, 12 ,435-443.
- Akom E., Venne S. (2002).** Institut National de Santé Publique du Québec. L'infection au virus du papillome humain (VPH) : ampleur et nature du problème, explorations des avenues de prévention de ces infections et de leurs complications. Novembre 2002.
- Alain,S.Hantz,S.Denis,F(2010).**Papillomavirus : les virus et la physiologie de l'infection.*Medicine therapeutique/pédiatrie*,13(1).
- Alkatout,I.Schubert,M.Garbrecht,N.Weigel,MT.Jonat,W.Mundhenke,C.Gunther,V (2015).** Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options.*International journal womens health*,7,305-313
- Anic,GM.Giuliano,AR(2011).**Genital HPV infection and related lesions in men.*Previous medicine*,53(1),36-41.
- Ardhaoui,M.Ennaifer,E.Letaief,H.Salsabil,R.Lassil,T.Chahed.K.Bougatef,S.Bahrini, AEI Fehri,E.Ouerhani,K.Jimenez,A (2016).** Prevalence, Genotype Distribution and Risk Factors for Cervical Human Papillomavirus Infection in the Grand Tunis Region, Tunisia. *PLoS One*,11(6), e0157432.

B

- Badoual C., Tartour E., Roussel H., Batsd A.S., Pavie J., Pernotf S., Weisse L., Si Mohamed A., Thariath L., Hoffmanni C., Pérég H. (2015).** Impact de l'HPV (Human Papilloma Virus) dans les carcinomes autres que gynécologiques. *La Revue de médecine interne* ; 36:540–547.
- Bae,JM.Kim,HE(2015).** Human papillomavirus infection and risk of lung cancer in never-smokers and women: an 'adaptive' meta-analysis.*Epidemiology health*,37,e2015052.

- Barillot I. (2011).** Col / vagin. IN Jean-François Morère,Françoise Mornex,Denis Soulières .
- Bailey,HH. Chuang,LT. duPont,NC. Eng,c. Foxhall,LE. Merrill,JK (2016).** American Society of Clinical Oncology Statement: Human Papillomavirus Vaccination for Cancer Prevention. *Journal of Clinical Oncology* ,34(15), 1803-1812.
- Baskaran,K.Kumar,PK.Karunanithi,S.Sethupathy,S.Thamaraiselvi,B.Swaruparani, S (2015).**Detection of high-risk human papillomavirusesin the prevention of cervical cancer in india .*Asian Pac J Cancer Prev*,16(18),8187-8190 .
- Benhessou,M. Anicet Boumba,LM. Benchkrroun,MN.Bouhya,S.Ennaji,MM (2016).** Epithelial Ovarian Cancer in Morocco: epidemiology analysis on a series of 182 cases at the Ibn Rochd University Hospital of Casablanca, Morocco. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 20(1), 153-162.
- Bergvall,M.Melendy,T.Archambault,J(2013).** The E1 proteins.*Virology*,445,35-56 .
- Bernard,HU.Burk ,RD.Chen,Z.vanDoorslaer,K. zur Hausen H.deVillier,EM(2010) .** Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. 401,70-79.
- Berraho,M.Najdi,A.Mathoulin-Pelissier,S.Salamon,R.Najjari,C (2012).** Direct costs of cervical cancer management in Morocco.*Asian pacific journal of cancer prevention*,13,3159.
- Blanc,B.Boulager,J.Cravello,L.Agostini,A.Roger,V (2002).** Cancer de vagin. *Gynécologie*.
- Blanc, B (2005).** Le dépistage du cancer du col de l'utérus. Springer P 107
- Bosch,FX.Lorincz,N.Meijer,CJLM.Shah,KV(2002).** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer .*J Clin Pathol*, 55, 244-265 .
- Bouayed,AN(2004).** Apport de la cytogénétique moléculaire audiagnostic des anomalies chromosomiques.*Annales de biologie clinique*, 62(6), 629-637.
- Boujoual,M.Hachi,H.Rimani,M.El Khannoussi,B.Bougtab,A (2014).** Verrucous carcinoma of the vulva: report of four cases. *The pan African medical journal*,17,303.

- Boutas,I.Sofoudis,C ,Kalampokas,E.Anastassopoulos,C.Kalampokas,T.Salakos,N (2013).** Verruqueux Carcinome de la vulve: Un rapport de cas.case report in obstetrics gynecology,2013,932-712.
- Braaten, KP. Laufer,MR(2008).**Human papillomavirus (HPV), HPV-related disease, and the HPV vaccine. Reviews in obstetrics and gynecology, 1(1), 2.
- Bravo,IG et Sanchez,MF(2015)** .Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine .Evol Med Public Health,2015, 32-51 .
- Bruneval,P(1988).**Hybridation moléculaire in situ.Histochnol .1 ;17-22
- Buck,CB.Day,PM.Trus,BL(2013).**The papillomavirus major capsid protein L1.Virology,445,169-174.
- Burd,EM(2003).**Human papillomavirus and cervical cancer.Clinical microbiology, reviews,16 (1).
- Burger,EA.Kornor.Klemp,M.Lauvrak,V.Kristiansen,IS.(2010).**HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia :a systematic review.Gynecologic Oncology,120,430-8.

## C

- Camargo,M.S.Soto-DeLeon,S.Sanchez,R.Munoz,M.Vega,E.Beltran,M.Perez-Prados,A.**  
cancer :The basics to know in clinical practice.Acta Otorhinolaryngologica Italica, 34(5),299–309.ELSEVIER,France.
- Castellsagué,X.Diaz,M.Munoz,N.Herrero,R.Francash,S.Peeling,RW.Ashley,R.Smith ,JS.Snijders,PJF (2006).** Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical Adenocarcinoma and Its Cofactors: Implications for Screening and Prevention.J Natl Cancer Inst,98 (5),303-315 .
- Cattani,P.Zannoni,GF.Ricci,C.D’Onghia,S.Trivellizzi,IN.DiFranco,A.Vellone,VG.D urante,M.Fadda,G.Capelli,G.Scambia,G.De Vincenzo,R.(2009).** Performance clinique du papillome humain E6 et E7 Test ARNm pour High-Grade Lésions du col utérin. Journal of Clinical microbiology, 47 (12), 3895-3901.
- Chafi,B.Barkat,B.Derguini,M (2015).** Epidémiologie des cancers gynécologiques et mammaires chez la femme en Algeri.
- Cheng,S.Schmidt-Grimminger,DC.Murant,T.Broker,TR.Chow,LT(1995).**  
Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene

- reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes & Development*, 9, 2885-2849.
- Chernesky, MA (1999).** Nucleic acid tests for the diagnostic of sexually transmitted diseases. *Pathogens and diseases*, 24, 437-446.
- Chevalier J., Yi J., Michel O., Tang XM. (1997).** Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy in situ hybridization probes: where do we stand?. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 45:481–91.
- Chikhani, L (2012).** Dépistage précoces des lésions cancéreuses de la cavité buccale . *EDP Science*, 258, 193-197.
- Choi, J. Kim, C. Lee, H.S. Choi, Y.J. Kim, H.Y. Lee, Chang, H. Choi. Kim, A (2016).** Detection of Human Papillomavirus in Korean Breast Cancer Patients by Real-Time Polymerase Chain Reaction and Meta-Analysis of Human Papillomavirus and Breast Cancer. *Journal of pathology and translational medicine*. 50(6), 442–450.
- Clavel, C. Masure, M. Putaud, I. Mangeonjean, C. Gabriel, R. Quereux, C. Birembaut, P (1999)** Intert de la detection des papillomavirus humain par hybridation en phase en routine : comparaison avec l'examen cytologique classique pour le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin. *Revue Française des Laboratoires*, 318, 29-33.
- Collot, S. Alain, S. Denis, F. Ranger-Rogez, S (2001).** Quantification by real-time PCR, TaqMan technology and virology applications. *Laboratoire de virologie*, 6.
- Coquillard, G. Palao, B. Patterson, B.K. (2011).** Quantification intracellulaire expression HPV E6 / E7 mRNA augmente la spécificité et la valeur prédictive positive de dépistage du cancer du col de l'utérus par rapport à l'ADN du VPH. *Journal of Clinical microbiology*, 120(1), 89-93.
- Cubie, H.A. Seagar, A.L. McGoogan, E. Whitehead, J. Brass, A. Arends, M.J. Whitley, M.W. (2001).** Real time Rapid PCR to distinguish between high-risk human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Pathol*, 54(1), 24-29.
- Cubie, H.A (2013).** Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, 445(1-2), 21-34.
- Culp, T.D. Budjeon, L.R. Christensen, N.D. (2006).** Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virologie*, 347, 147-59.

**D**

- Dachez,R.(2008).**Intérêt des nouveaux marqueurs dans la prise en charge des lésions précancéreuses du col utérin .Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction,10,1016
- Davidson,EJ.Boswell,CM Sehr ,P. Pawlita ,M .Tomlinson ,EA.McVey ,RJ. Dobson ,J. Roberts ,J Hickling,J. Kitchener ,HC.Stern ,PL(2003).** Immunological and Clinical Responses in Women with Vulval Intraepithelial Neoplasia Vaccinated with a Vaccinia Virus Encoding Human Papillomavirus 16/18 Oncoproteins.Cancer research, 63(18), 6032-6041.
- Day,PM.Schiller,JT(2006).**Eerly events in the papillomavirus life cycle.in :Papillomavirus research :From natural history ti vaccines and beyond.edited by : M.Sarveria Campo. Horizon Scientific Press. France ,423p.
- Day,PM.Schelhaas,M(2014).**Concepts of papillomavirus entry into host cells.Curr Opin Virol,0,24-31.
- Debaque,H.Eide,ML(2012).** Méthodes de détection des HPVs et techniques de génotypage dans le dépistage du cancer du col utérin. Annales de pathologie ,32, 401-409.
- Denis,F.Ardaens,K(2011).**Papillomavirus et immunodépression.La lettre du gynécologue,362.
- Devillier,EM.Fauquet,C.Broker,TR.Bernard,HU.zurHausen,H (2004).** Classification of papillomavirus.Virology, 324,17-27.
- DeVilliers,EM(2013).** Cross-roads in the classification of papillomaviruses.Virology,445,2-10.
- DiMaio, D., et JB Liao(2006).** Les papillomavirus humains et le cancer du col utérin Adv. Virus res,66,125-159.
- DiMaio,D.Petti,ML(2013).**The E5 proteins.Virology,445,99-114.
- Diouri, M.K (2008).**Dépistage du cancer du col utérin aux préfectures de rabat et skhirat temara : état des lieux et perspectives. Mémoire présente pour l’obtention du diplôme de maitrise en administration sanitaire et sante publique. Institut national d’administration sanitaire. Maroc. P 19.
- Doorbar ,J(2005).** The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology 32 ,S7–S15.
- Doorbar,J(2007).** Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection.Disease Markers , 23 ,297–313.
- Doorbar,J.Quint,W.Banks,L.Brabo,IG.Stoler,M.Broker,TM.Stanley,MA(2012).**The biology and life-cycle of human papillomavirus .Vaccine,30,55-70 .

**Doorbar,J(2013).** The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*,445,99-114.

**Doorbar,J.Egawa ,N.Griffin,H.Kranjec,C.Murakami,I(2015).**Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*,25,2-23.

**Dufit,V. Adenis,A. Douine,M Najioullah,F. Kilie,O. Molinie,V. Catherine,D Thomas,N. Deshayes,JL .Brousse,P. Carles,G. Lacoste,V. Cesaire, R (2016).** The epidemiology of Human Papilloma Virus in women aged 20-65 years living in remote villages in French Guiana: Adapting interventions to the territory. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*,34.

**Dufour,X.Beby-Defaux,A.Agius,G.Lacau St Guily,J(2012).** HPV et cancer ORL.*Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale*,129(1),32-38.

**Duport,N(2008).** Données épidémiologiques sur le cancer du col de l'utérus -État des connaissances - Actualisation 2008 .Institut de veille sanitaire.

**Dok,R .Nuyts,S (2016).** HPV Positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies.*Cancer review*,8(4),41.

## E

**Edith, A. et Sylvie, V. (2003).**L'infection au virus de papillome humain : recension des écrits et consultation d'experts dans une perspective de santé publique. Institut nationale de santé publique de Québec. ISBN 2-550-41003-3. P 22-159.

**Egawa ,N.Egawa,K.Griffin,H.Doorbar,J (2015).** Human Papillomaviruses; Epithelial

**Elrefaey,S.Massaró,MA.Chiocca,S.Chiesa,F.Ansarin,M(2014).** HPV in oropharyngeal cancer.The basics to know in clinical practice.*Acta Otorhinolaryngologica Italica* ,34(5),299–309.

**Ennaifer,E.Tounsi,H.BenAissa,R.Kalai,K.Fehri,E.Laassili,T,Guizani,I.Boubaker,MS(2014)**Détection de l'infection à papillomavirus humain chez des consultantes d'un centre tunisien de recherche de la santé de la reproduction .*La tunisie médicale*,92(04),253-257.

**Engbang,JPN. Koh,VM.Tchente, CN.Fewou,Ain (2015).** **Histo-epidemiological aspects of genital cancers in women in the Littoral Region, Cameroon**  
Histo epidemiological aspects of genital cancers in women in littoral region, Cameroon.*The pan African medical journal*,21, 116.

**F**

- Favre,M.Ramoz,N.Orth,G(1997).**Human papillomavirus:general features.Clinic in dermatology,15,181-198.
- Fernandes,A.Bianchi,G.Feltri,AP,Pérez,M.Corenti,M (2015).** Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors. *Ecancermedicalscience*,. 9: 548.
- Fewou,A.Gasser,B.Essame Oyono,JL,Vetter,JM,Emile,P.(2011).** Détection de l'ADN de human papilloma virus das les cancers de la vulve utilisant le PCR.*Health Sci*,12(1).
- Fouatih, N. Midoun, F. Ammour, O. Lahouel, L. Mokhtari (2008).** Registry of Oran, Ten years of registration : 1996-2005.
- Foulongne,V.Sauvage,V.Hebert,C.Dereure ,O.Justine,C.ArGouilh,M.Pariete,K.Sege ndy,M.Burguière,A.Manuguerra,JC.Caro,V.Eloit,M(2012).** Microbiota Peau humaine: Haute diversité de l'ADN des virus identifiés sur la peau humaine par séquençage à haut débit.*Plos one*,7 (6),e38499.
- Fu,L.VanDoorslaer,K.Chen,Z.Ristriani,T.Masson,M.Travé,G.Burk,RD.(2010)..**Degradation of p53 by human alphapapillomavirus E6 proteinson shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PLoS ONE*, 5(9)12816.

**G**

- Garcia-Vallvé,S.Alonso,A.Bravi ,IG(2005).** Papillomavirus: Gènes Différents have des histoires Différentes .*Trends Microbiol*,13,514-521 .
- Garibyan,L.Avashia,N(2014).** Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR).*J Invest Dermatol*,133(3) :e6.
- Gavillon,N.Vervaet,H.Derniaux,E.Terrosi,P.Graesslin,O.Quereux,C.(2010).**How did icontract humain papillomavirus(HPV) ?. *Gynécologie obstétrique et fertilité*,38,199-204.
- Gunther,V.Alkatout,I.Lez,C.Altarac,S.Fures,R.Cupic,H.Persec,Z.Hrgovic,Z.Mundhe nke,C (2012).** Malignant Melanoma of the Urethra: A Rare Histologic Subdivision of Vulvar Cancer with a Poor Prognosis.*Case report obstet gynecology*,2012,385-175.

**Guo,L.Liu,S.Zhang,S.Chen,Q.Zhang,M.Quan,P.Sun,XB(2016).**survie au cancer de l'œsophage lié papillomavirus humain. Une revue systématique et méta-analyse,95(46),53-18.

**Gustafson,LW.Gade ,M.Blaakaer,J(2014).** Vulval cancer and HPV vaccination in recurrent disease.Clinical case report, 2(6),243-246.

## **H**

**Hantz,S.Alain,S.Denis,F(2010).**Diagnostique des infections à papillomavirus :état des lieux et perspectives.mt pédiatrie,13(1).

**Harwood,CA.Surentheran,T.McGregor,JM.Spink,PJ.Leigh,IM.Breuer,J.Proby,CM(2000)** Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals.J Med Virol,6(3),289-297.

**Heard,I(1997).** Infection à papillomavirus et séropositivité pour le VIH.The New England Journal of Medicine,337, 133-139.

**Hernandez,BY.Wilkens,LR.Zhu,X.McDuffie,K.Thompson,P.Shvetsov,YB.Ning,L.Godman,MT (2008).** Circumcision and Human Papillomavirus Infection in Men: A Site-Specific Comparison.Journal of infectious diseases,197(6),787-794

**Horvath,C.Boulet,G AV.Renoux,VM .Delvenne,PO.Boger ,JP (2010).** Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview.Virology,7,11.

**Hugo De Vuyst,H. Clifford,GM. Nascimento,MC. Madeleine,MM. Franceschi,S (2008).** Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. International journal cancer,124(7),1626-1636.

**Huh,KW.Zhou,X.Havakawa,H.Cho,JY.Libermann,TA.Jin,J.Harper,JW.Munger,K.(2007)** Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Cullin 2 Ubiquitin Ligase Complex, Which Contributes to Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor.J Virol,81(18),9737-9747.

**Huraux ,MJ.Nicolas,JC.Lafeuille,HP.Agut,H(2003).**Traité de virologie médicale.ESTM Paris.

## **I**

**Iftner A., Klug SJ., Garbe C., Blum A., Stancu A., Wilczynski SP., Iftner T. (2003).** The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Research*. 63:7515-9.



**INCa (2011).** Les traitements du cancer invasif du col de l'utérus. Collection Guides patients Cancer info.

**J**

**Jacob,MV .deRoda Husman,AM.van denBrule,AJC.SnidjersnPJF. denBrule, AJC.**

**Snidjers.PJF.Meijer,CJLM.Walboomers,JMM(1995).** Group-Specific Differentiation

between High- and Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes by General Primer-Mediated PCR and Two Cocktails of Oligonucleotide Probes .Journal of clinical microbiology,33,901-905 .

**Jean Nesson,E(2007).** Profils génétiques de lignées cellulaires humains modélisés en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires. Thèse de doctorat publiée, Université Henri Poincaré-Nancy1, France.

**K**

**Kelly,L.Stratton,MD.Culkin,DJ(2016).** A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer.Oncology journal,30(3),245-249.

**Khenchouche,A. Sadouki ,N.Boudriche,A .Houali,H. Graba,A.Ooka,D. Bouguermouh,A (2013).** Human Papillomavirus and Epstein-Barr virus co-infection in Cervical Carcinoma in Algerian women. Virology journal,10,340.

**Klug,SJ.Ancu Molijn,A. Schopp, B Holz,B.Iftner,A .Quint,W.Snijders,PJF. Petry,KU. Kjær,SKG. Munk,M. Iftner,T(2008).** Comparaison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types .Journal of Medical Virology,80,1264–1274.

**Kulasingam, S.L., Hughes, J.P., Kiviat, N.B., Mao, C., Weiss, N.S., Kuypers, J.M. et al (2002).** Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. JAMA, 288, 1749–1757.

**L**

**Lazarczyk,N.Cassonnet,P.Pons,C.Jacob,Y.Favre,M.(2009).** the EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses :a new insight in to the pathogenesis of humain papillomavirus infections .Microbiol mol biol ,73,348-370.

**Le Faou,A(2012)** .Précis de virologie humaine .Wolters kluwer France,Paris.233.

- Lee,SS.Vigliotti,VS.Vigliotti,JS.Pappu,S(2007).** Routine génotypage du papillome humain par séquençage de l'ADN dans les laboratoires hospitaliers communautaires.Nfect Cancer Agent,2,11.
- Lee,MS.Park,LS.Norwitz,ER.Koo,JM.Oh,IH.Park,JW.Kim,SM.Kim,YH.Park.CW.Song,YS (2013).** Risk of Vertical Transmission of Human Papillomavirus throughout Pregnancy: A Propective Study.PLoS One, 8(6), e66368.
- Leto,MdGP .Junior,GFdS .Porro,AM .Tomimori,J(2011).** Human papillomavirus infection :etiopathogenesis , molecular biology and clinical manifestations .Anais Brasileiros de dermatologia ,86 .
- Libert,MH(1994).**Les papillomavirus et le cancers géntaux : interet du dépistage et de l'éradication.Progrés en urologie,4,491-498 .
- Liu,SS.Leung,RCY. Chan,KKL.Cheung,ANY.Ngan,HYS(2010).** Evaluation of a Newly Developed GenoArray Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Assay and Comparison with the Roche Linear Array HPV Genotyping Assay. Journal of Clinical microbiology,48(3),758-764.
- Louie,K.Didelot,MN.Damay ,A.Nagot,Mayaud,P.Segondy,M(2008).** Human papillomavirus and associated cancers: epidemiological aspects. Revue Francophone des Laboratoires,405, 27-34.
- Lowe,H.Panda,D.Rose,S.Lensen,T.Hughes,WA.Tso,FY.Angeletti,PC (2008).** Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1.Virology journal, 5:150.
- Lowe,HC.Argent,MI.Brown,BJ.Leng,CY.Blas,MM.Gravitt,PE.Woo ,YL(2015).** Comparison of HybriBio GenoArray and Roche Human Papillomavirus (HPV) Linear Array for HPV Genotyping in Anal Swab Samples.Journal of Clinical microbiology,53(2),550-556.
- Lowy,DR. Schiller,J (2012).** Reducing HPV-associated Cancer Globally. Cancer Prev Res (Phila),5(1),18-23.

## M

- Maréchal,V(2006).** Southern blot et northern blot. Encyclopédie Médico-Biologique, 0330,60-90. Maréchal V. Southern blot et northern blot. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Encyclopédie Médico-Biologique, 90-60-0330, 2006.
- Maurin,J(1985).**Virologie médicale .Flammarion médecine scieces ,Paris.

- Mboumba Bouassa,RS.Prazuck,T.Lethu,T.Meye,JF.Bélec,L (2017).** Cancer du col de l'utérus en Afrique subsaharienne : une maladie associée aux papillomavirus humains oncogènes, émergente et évitable. *Médecine et Santé Tropicales*,27(1).
- McBride,A (2013).**The papillomavirus E2proteins.*Virology*,445(1-2),57-79.
- Missouli,N. Hmissa,S.Trabelsi,A. AT Noura,Y.Frappart,L.Mokni,M.Korbi,S ( 2010).** Prévalence des infections à papillomavirus (HPV) dans les lésions précancéreuses et cancéreuses du utérin en Tunisie. *Anal de biologie clinique*,68(3), 297-303.
- Molden T., Kraus I., Skomedal H., Nordstrom T., Karlsen F. (2007).** PreTect HPVProofer:realtime detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human molecular biolugu and disease association .*Reviews in medical virology* , 25 , 2-23 .
- Monge,M(2007).**Cancérologie et biologie marqueurs tumoraux organe par organe.
- Monsonogo ,J (2006).**Infection à papillomavirus . Springer-Verlag France, Paris.
- Monsonogo,J (2007).**traité des infections et pathologies génitale à papillomavirus.Springer-Verlag France,Paris.
- Monsonogo,J (2008).** Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus. Springer Science & Business Media,France,p 544.
- Morbini,P.Benazzo,M(2016).**Human papillomavirus and head and neck carcinomas fucos on evidence in the babel of published data. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*,36(4),249-258.
- Mougin ,CH .Bernard ,B.Lab,M(1997) .**Biologie des infections a papillomavirus I.Characteristique générale.John Libbey,55 .*Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer.*
- Mougin,C.Bernard,B.Lab,M(1998).**Biologie des infections à papillomavirus .II. Leur rôle dans la carcinogénese du col utérin.*Annales de biologie clinique*,56 (1),21-28.
- Mougin,Ch.Hmbey,O.Gay,C.Riethmuller,D.(2000).** Papillomavirus humains, cycle cellulaire et cancer du col de l'utérus. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*,29,p13.
- Mougin,C.Nicoliera,M.Decrion-Barthoda,A.(2008).**HPV et cancers :mécanismes de l'oncogène.*Revue Francophone des Laboratoires*.405, 23.
- Mougin,CH.Humbey,O.Gay,C.Riethmuller,D(2009) .** Papillomavirus humains, cycle cellulaire et cancer du col de l'utérus .*Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*,29,13-20.

**Mullis, K. B. (1990).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.

**Munger , K.Howley,PM.(2002).** Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *virus Res*,89(2),213-28.

**Munoz,N.Bosch,FX.deSanjosé,S.Herrero,R.Castellasqué,X.Shah,KV.Snijders,PJ.Meijer,CJ(2003)**Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer . *The New England Journal of Medicine*,348(6) :518-527 .

**Munoz,N.Castellsaque,X .de Gonzalez,AB.Gissmann,L(2006).**Chapter1 :HPV in the etiology of human cancer .*Vaccine*,24 Suppl 3 :S3/1-10.

## N

**Nahet A, Boublenza L, Hassaine H, Masdoua N, Prétet J, Belglaiiaa , Mougin C (2016).** Le génotypage d'ADN d'HPV : une étude de cancers ano-génitaux, de cancers des VADS et de cancers cutanés dans la population de l'ouest algérien. Détection d'HPV dans différents cancers dans la population de l'ouest algérien.

**Nani,S . Benallal,M. Hassoune,S.Kissi,D.Maaroufi,A (2013).** **Participation des médecins généralistes de la province de Benimellal (Maroc) dans le dépistage de cancer de col de l'utérus.***The pan African medical journal*,14,152.

**Nazarenko ,I. Kobayashi ,L.Giles ,J. Fishman ,C. Chen ,G.Lorincz,A(2008).** A novel method of HPV genotyping using Hybrid Capture sample preparation method combined with GP5+/6+ PCR and multiplex detection on Luminex XMAP. *J Virol Methods*, 154 ,76-81.

**Nyitray,A(2008).** Anal cancer and human papillomaviruses in heterosexual men.*Curr Oncol*,15(5),204-205.

## O

**Oh Y, Bae SM, Kim YW, Yongtaek Oh,Su Mi Bae,Yong-Wan Kim,Ho-Sun Choi,3 Gye-Hyun Nam,4Se-Jun Han,5 Choong Hak Park,Younglae Cho,7 Byoung-Don Han1 and Woong Shick Ahn(2007).** Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types. *Cancer Sci*, 98 , 549-54.

**OMS(2007).** La lutte contre le cancer du col de l'utérus. Organisation mondiale de santé.

**OMS (2015).** Papillomavirus humain (HPV) et cancer du col de l'utérus. Organisation mondiale de santé.

**Orth,G(2006).** Genetics of epidermodysplasia verruciformis : Insights into host defense against papillomavirus. *Semin Immunol*, 18(6),362-374.

**Ozbun,MA. Meyers,C(1998).**Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b.*J Virol*,72(4),2715-2722.

**P**

**Palefsky JM, Rubin M (2009).** The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2009;36(1):187-200.

**Parkin,DM(2006).** The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002.*Int J Cancer*, 118(12), 3030-3044.

**Pasquier,C.Bertagnoli,S.Messud-P,F.Izopet ,J(2005).***Virologie humain et animale.* Dunod,Paris.

**Pasternak,JJ (2003).** *Genétique moléculaire .1<sup>ère</sup> édition*

**Peitsaro,P.Johansson,B.Syrjanen,S.(2002).** Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique.*J Clin Microbiol*,40(3),886-891.

**Pereira,R .Hitzeroth,II.Rybicki,E(2009).** Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses.*Arch Virol*,154,187-197 .

**Peyrot,S.Brochard,G .Le Bacle,C(2013).**Risques infectieux des fumées laser : exemple des papillomavirus humains .*Références en santé au travail* ,135 .

**Pfeffer,J. Taar,JP. Bienvenu,L. Zerah,S(2008).** La nouvelle génération des tests HPV.mt *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie*,10 (5),343-348 .

**Pouppart,A(2005).**Infections anogénitales a papillomavirus chez l’homme :diagnostic et prise en charge.Thèse de doctorat :pharmacie :Université Henri poincare-Nancy I.

**Pretet,JL.Charlot,JF.Mougin,C.(2007).**Virologiques et cancérogènes aspects de HPV.*Bull Acad Natl Med*,191(3),611-23.

**R**

**Rafaramino,F.et Ratsimba,HNR (2015).** Une étude rétrospective sur le cancer de l’ovaire avec un recule médian de 42 mois. *The pan African medical journal*, 20,211.

**Raherinantenaina,F. Rakotomena, SD. Hasiniatsy,NRE. Rakototiana,FA. Ramqvist,T.**

**Dalianis,T(2010).** Oropharyngeal Cancer Epidemic and Human Papillomavirus.Emerging infectious diseases, 16(11), 1671–1677.

**Riethmuller,D (2010).** L'infection à papillomavirus humain :aspects gynécologiques.John libbey, 13(1).

**Riethmuller,D . Seilles ,E.(2000).**Immunité muqueuse du tractus génital féminin et mécanismes d'évasion des papillomavirus.Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologique de la Reproduction,29(8),p.729.

**Rombaldi,R.Serafini,E.Mandelli,J.Zimmermann,E.Losquiavo,K(2008).** Transplacental transmission of Human Papillomavirus.Virology J,5,106.

## S

**Salati,SA.Al Kadi,A(2012).**Anal cancer – a review.International Journal of Health Sciences,6(2),206-230.

**Sancho-Garnier,H (2013).** Epidémiologie des cancers gynécologique : uterus ,ovaire ,vulve et vagin. Elsevier Masson SAS.

**Sando,Z.Fouogue,JT.Fouelifack,YF.Fouedjio,JH.Telephore Mboudou,E.Oyono Essame,JL (2014).** Profil of breast and gynecological cancers in Yaounde-Cameroon. The pan African medical journal, 17, 28.

Sapp,M.Bienkowsk-Haba,M(2009). **Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus.FEBS J ,276(24),7206-7216**

Saraiya,M.Unger,ER.Thompson,TD.Lynch,CF.Hernandez,BY (2015). **US Assessment of HPV Types in Cancers: Implications for Current and 9-Valent HPV Vaccines. Journal of the National Cancer Institute,107(6).**

**Schiller,J.Day,PM.Kines,RC(2010).**Current understanding of the mechanism of HPV infection.Gynecol Oncol ,118,S12-S17.

**Segondy,M.(2010).**Papillomavirus et immunodépression.médecine thérapeutique / pédiatrie,13.

**Selinka,HC.Girolou,T.Nowak,T,Christensen,ND.Sapp,M.(2003).** Further Evidence that Papillomavirus Capsids Exist in Two Distinct Conformations.Virol J ,77,12961-12967.

**Stevens,A et Lowe,J(2006).**Histologie humaine 3eme édition .ELSEVIER.Paris .p368 .

**Stroup,AM.Harlan,LC.Trimbe,EL(2008).**Demographic,Clinical,and Treatment Trends Among Women Diagnosed with Vulvar Cancer in the U.S.Gynecology oncology,108(3),577-583.

## T

**Tanko,MN.Kavembe,MA.Cainelli,F.Vento ,S (2012).** Malignant Tumours of the Genital Tract among Batswana Women. Ghana medical journal, 46(3),142-146

**Touboul E, Lefranc JP, Deniaud-Alexandre E et Tranbaloc P(2001).** Tumeurs du vagin et lésions apparentées. Encycl Méd Chir (Editions Scientifique et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Gynécologie, 530-A-1013 p.

**Trottier,H .Franco,EL(2006) .**The epidemiology of genital human papillomavirus infection. Vaccine,24,1-15 .

**Turkay,DO.Vural,C.Savan,M.Gurbuz,Y(2016).** Détection du virus du papillome humain dans les tumeurs œsophagiennes et gastroesophageal jonction: Une étude rétrospective en temps réel la réaction en chaîne de la polymérase dans une expérience instutional de la Turquie et de l'examen de la littérature. Pathology res pract,212(2),77-82.

#### U

**Ure AE, Forslund O (2014)** Characterization of Human Papillomavirus Type 154 and Tissue Tropism of Gammapapillomaviruses. PLoS ONE 9(2): e89342.

#### V

**van Beurden,M1. ten Kate, FJ. Smits,HL. Berkhout ,RJ de Craen, AJ. van der Vange, N.Lammes, FB. ter Schegget,J(1995).** Multifocal vulvar intraepithelial neoplasia grade III and multicentric lower genital tract neoplasia is associated with transcriptionally active human papillomavirus. Cancer,75(12),2879-84.

**Vaubourdolle,M(2013).**Infectiologie.Walters Kluwer SA.Paris.

#### W

**Walker,F.Borne,H.Darai,E(2001).**HPV et lésions cervicales ,vaginales et vulvaires.Le courrier de colo-proctologie(II),2.

**Wentzensen N., Vinokurova S., von Knebel Doeberitz M. (2004).** Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Research*. 64: 3878–3884.

**William,T .Creasman,MD.Jerri Linn Phillips,MA.Herman,R.Menck,MBA(1998) .**The national cancer data base reporton cancer of the vagina.Cancer,83(5),1033-1040.

**Wilson,VG.Ouest,M.Woytek,K.Rangasamy,D(2002).**Papillomavirus E1 proteins : form , function , and features.Virus Genes,24,275-290.

**Wright,HL.Moots,RJ.Buchnall,RC.Edwards,SW (2010).** Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. Rheumatology,49(9),1618-31.

**X**

**Xu,B.Chotewutmontri,S.Wolf,S.Ursula,K.Schmitz,M.Durst,M.Schwarz,E(2013).** Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas.Published online,10,1371.

**Y**

**Yoon, C., Kim, K., Park, S., and Cheong, S (2001).** Alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 283 ,668–73.

**Z**

**Zaravinos,A .Mammas,IN.Sourvnos,G.Spandidos,DA(2009).** Molecular detection of human papillomavirus (HPV).*Int J Biol Markers*,24(4),215-222.

**Zhai,K.Ding,J.Shi,HZ(2015).** HPV and Lung Cancer Risk: A meta-analysis. *journal of clinical virology*,63,84-90.

**Zheng,ZM et Baker,CC(2006).** Papillomavirus genome structure ,expression,and post-transcriptional regulation.*Front Biosci*,11,2286-22302 .

**Zitouni,M.Amoukrane,F.CherfBouzida,F.Grangaud,JP.Hafed,H.Hammouda,D.Kessis, H.L’hadj,M.Mahiddine,A.Mansouri,B.Mekkaoui,S.Mesbah,S(2014).** Comité National Chargé du Suivi de la Lutte contre le Cancer.ANDS.

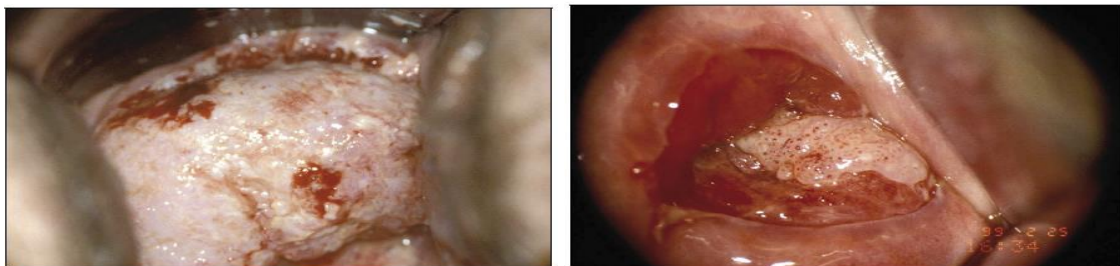
**Zur Hausen H. (2009).** The search for infectious causes of human cancers : where and why. *Virology* ; 392:1-10.



# ANNEXES

**Annexe1 : Classification et pathologies des HPV (Bernard *et al.*, 2010).**

Genre	Espèce	Type	Risque/Pathologie
Alpha-Papillomavirus	01	HPV 32, 42	BRM, lésions orales ou génitales
	02	HPV 3, 10, 28, 29, 77, 78, 94, 117	BRM, lésions cutanées, muqueuses
	03	HPV 61, 62, 72, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 102, 114	BRM, lésions muqueuses
	04	HPV 2, 27, 57	Verrues vulgaires
	05	HPV 26, 51, 69, 82	HRM, lésions muqueuses
	06	HPV 30, 53, 56, 66	HRM, lésions muqueuses
	07	HPV 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85, 97	HRM, lésions muqueuses
	08	HPV 7, 40, 43, 91	BRM, lésions cutanées, muqueuses
	09	HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	HRM, lésions muqueuses
	10	HPV 6, 11, 13, 44, 74	BRM, condylomes acuminés
	11	HPV 34, 73	HRM, lésions muqueuses
	12	HPV 54	BRM, lésions muqueuses
	13	HPV 71, 90, 106	BRM, lésions muqueuses
Bêta-Papillomavirus	01	HPV 5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25, 36, 47, 93, 98, 99, 105, 118, 124	lésions cutanées bénignes, parfois malignes
	02	HPV 9, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80, 100, 104, 107, 110, 111, 113, 120, 122	lésions cutanées bénignes, parfois malignes
	03	HPV 49, 75, 76, 115	lésions cutanées bénignes
	04	HPV 92	lésions cutanées bénignes
	05	HPV 96	lésions cutanées bénignes
Gamma-Papillomavirus	01	HPV 4, 65, 95	lésions cutanées
	02	HPV 50	lésions cutanées
	03	HPV 48	lésions cutanées
	04	HPV 60	lésions cutanées
	05	HPV 88	lésions cutanées
	06	HPV 101, 103, 108	lésions cutanées
	07	HPV 109, 123	lésions cutanées
	08	HPV 112, 119	lésions cutanées
	09	HPV 116	lésions cutanées
	10	HPV 121	lésions cutanées

**Annexe 2 : Cancer épidermoïde et adénocarcinome du col utérin (Mosonego, 2007)**

**Annexe 3 : Tableau :** Classifications des lésions épidermoïdes du col utilisées en cytologie et histologie (Sanchau-Garnier, 2013)

Classification cytologique		Classification histologique	
Papanicolaou	Bethesda	OMS	Système CIN
Classe I	Normal	Normal	Normal
Classe II	ACS, ACG	Atypie cellulaire	Atypie cellulaire
Classe III	LSIL	Dysplasie légère	CIN1
Classe III	HSIL	Dysplasie modérée	CIN2
Classe III	HSIL	Dysplasie sévère	CIN3
Class IV	HSIL	Carcinome <i>in situ</i>	CIN3
Classe V	Carcinome invasif	Carcinome invasif	Carcinome invasif

ACG : atypie cellulaire glandulaire; ACS : atypie cellulaire malpighienne; HSIL : lésion intra-épithéliale de haut grade (*high grade squamous intraepithelial lesion*); LSIL : lésion intra-épithéliale de bas grade (*low grade squamous intraepithelial lesion*).

**Annexe 4 :** Probabilités de régression, de persistance et d'évolution des CIN (Ostor,1993).

Lésion	Régression	Persistance	Progression vers une CIN supérieure	Progression vers un cancer invasif
CIN 1	57%	32%	11%	1%
CIN 2	43%	35%	22%	5%
CIN 3	32%	< 56 %	—	> 12 %

**Annexe5 :** Le cancer de vulve ( Monsonogo,2007)



**Annexe 6 : Les constituants de kit Amplicor.**

- **ATL** (Tampon de lyse tissulaire) : Ethylène Diamine Tétra Acétique EDTA, sulfate de dodecyle et de sodium SDS.

- **PK** (protéinase K) : protéinase K, album Tritirachium protéinase sérine

- **CAR** (ARN porteur) : ARN de synthèse (protège l'ADN)

- **AVE** (tampon d'élution) : eau sans RNA se, azide de sodium (anti bactérien)

Il sert de diluant pour le CAR et en étant neutre il permet la séparation d'ADN de la silice.

- **AL** (Tampon de lyse) : hydrochlorure de guanidine

- **CLM** (Colonnes QIAamp<sup>®</sup> MinElute<sup>®</sup>) ; sous forme de minitube contenant à la base une membrane de silice) ;

- **AW2** (Tampon de lavage) : Tampon de Tris-HCL, azide de sodium

- **Témoin HPV positif** : Tampon de Tris-HCl, EDTA, azide de sodium, ADN plasmidique non infectieux (d'origine microbienne) contenant une séquence d'HPV 16, ADN plasmidique non infectieux (d'origine microbienne) contenant une séquence de bêta globine humain.

- **Témoin HPV négatif** : Tampon de Tris-HCl, EDTA, azide de sodium.

- **HPV MMX** (Mélange réactionnel HPV) :

- Tampon de Tris, chlorure de potassium,
- ADN polymérase AmpliTaq<sup>®</sup> Gold (enzyme thermorésistante d'origine microbienne catalyse l'amplification de l'ADN),
- Enzyme AmpErase (uracile-N-glycosylase)
- dNTP: dATP, dCTP, dGtp, dUTP,
- Amorces (biotynilées), azide de sodium,

- **HPV MgCl<sub>2</sub>** (Chlorure de magnésium HPV) : Chlorure de magnésium, colorant amarante, azide se sodium.

- **HPV MWP** (Microplaque pour HPV), microplaque équipée de sondes d'ADN pour HPV: 12 barrettes de microplaque à 8 puits.

- **BG MWP** (Microplaque pour béta globine), microplaque équipée de sondes d'ADN pour béta globine (B\_PC03): 12 barrettes de microplaque à 8 puits.
- **DN** (Solution de dénaturation); hydroxyde de sodium EDTA, Bleu de thymol
- **HPV HYB** (Tampon d'hybridation HPV); solution de phosphate de sodium, solubilisant, thiocyanate de sodium
- AV-HRP** (conjugué avidine-peroxydase de raifort) : Tampon de Tris HCl, conjugué Gammaglobuline bovine (d'origine mammifère), Phénol, conservateur ProClin<sup>β</sup>.
- **SUB A** (substrat A); solution de citrate, peroxydase d'hydrogène, conservateur ProClin<sup>®</sup>
- **SUB B** (substrat B) : Tétraméthylbenzidine (TMB), Diméthylformamide (DMF)
- **STOP** (réactif d'arrêt) : acide sulfurique
- **10 x WB** (concentré 10x de lavage) : tampon de phosphate, Chlorure de sodium, EDTA, détergent, conservateur ProClin<sup>®</sup>.

**Annexe 7 : Tableau** : Interprétation des résultats d'Amplicor

<b>HPV A450</b>	<b>βglobine A450</b>	<b>Interprétation</b>
< 0.2	≥ 0.2	ADN du HPV à haut risque (HR) non détecté
< 0.2	< 0.2	Résultat non valide. L'ADN du HPV HR, si présent, n'a pas pu être détecté.
≥ 0.2	N'importe lequel	ADN de HPV à haut risque détecté. L'échantillon est positif quant à la présence d'HPV HR

