

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

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

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par

KHOUANI ABIA

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En BIOLOGIE

Option : Microbiologie

Thème

**Etude du profil épidémiologique des cancers des voies aérodigestives
supérieures au service d'épidémiologie et identification du
papillomavirus humain à partir de biopsies**

Soutenu le 21-06-2017 devant le jury composé de :

Président	Malek. F.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen
Examinatrice	Chabni N.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen
Examinatrice	Triqui C.	Maitre assistante A	Université de Tlemcen
Encadreur	Boublenza L.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen

Année universitaire 2016-2017

Dédicace



*A la mémoire de mon cher papa,
Que dieu le tout puissant vous accueille dans son éternel paradis et vous accorde sa clémence et sa miséricorde.*

*A la plus belle perle du monde... ma tendre mère,
En témoignage de votre affection, votre sacrifices et votre précieux conseils qui mon conduit à la réussite dans tous ce que je fais, je t'aime maman..,*

*A ma plus chère tante RAHMA,
Vous êtes ma deuxième maman, je t'aime plus fort..,*

*A mes chers frères IHEB et RADOUANE,
Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A ma petite et aimable sœur BESMA,
Que dieu tout puissant, vous donne santé et bonheur. je t'aime très fort..,*

*A mes très chères et merveilleuse amies
Que je l'aime profondément, MALIKA, SHEHERAZADE, KHADIJA, IKRAM,
IMENE, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité, je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de prospérité et beaucoup de succès.*

*A tous mes proches
A tous ceux qui mon aidé afin de réaliser ce travail, et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

Remerciement

Je remercie tout d'abord, ALLAH, le tout puissant de m'avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science et de la connaissance. Et de m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.

Ce travail a été effectué au laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAAAB) et au laboratoire de Biologie moléculaire de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.

*Je tiens à remercier en premier lieu Mon maitre et encadreur de mémoire : **DR. L. BOUBLENZA**, maitre de conférence classe A à l'université de Tlemcen pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail*

J'ai eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et j'ai trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui ma reçu en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance.

Votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous.

Vous êtes et vous serez pour moi l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.

Veillez, cher Maitre, trouvé dans ce modeste travail l'expression de ma haute considération, de ma sincère reconnaissance et de mes profonds respects.

Dr MALEK, maitre de conférence classe A à l'université de Tlemcen

Je vous remercie pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider mon jury, Soyez assurée de mon grand respect.

Mon maitre et juge de thèse, professeur TRIQUI, Maitre assistante classe A à l'université de Tlemcen

Vous avez accepté très spontanément de faire partie de mon jury. Vous me faite l'honneur de juger ce modeste travail. Je vous remercie pour votre qualité d'enseignement ainsi que pour vos qualités humaines. Votre compétence et votre culture scientifique n'ont cessé de susciter ma

grande admiration durant mon passage dans votre service. Veuillez trouver ici, professeur, l'expression de mes sincères remerciements.

Dr CHABNI, maitre de conférence classe A à l'université de Tlemcen

Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, merci de m'avoir présenté de l'aide et d'informations qui fait partie intéressante de mon mémoire. Veuillez trouver ici, Professeur, l'expression de mon profond respect.

*Je n'oublie pas de remercier vivement docteur **MASDOUA NABILA**,
Je ne le remercierai jamais assez pour son soutien, ses conseils judicieux et son aide précieuse,
merci infiniment*

*Je remercie par la même occasion docteur **NAHET AMIRA**, et à tous les membres du
laboratoire de recherche **LAMAB** sous la direction de professeur **MOUSSA
BOUDJEMAA**.*

A toute personne qui de près ou de loin a contribué à la réalisation de ce travail

ملخص

فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) هو المسؤول عن ما يقرب 100% من سرطانات عنق الرحم . في الأونة الأخيرة ظهرت هذه الفيروسات كما أنها السبب في حدوث بعض الأورام علو مستوى المسالك الهوائية الهضمية العلوية (VADS) ، وخاصة سرطان الخلايا الحرشفية في البلعوم والتي ارتبطت بشكل تقليدي مع استهلاك التبغ و / أو الكحول. الهدف من هذه الدراسة هو من جهة، إجراء دراسة تذكيرية وبائية لسرطانات المسالك الهوائية الهضمية العلوية التي سجلت بين عامي 2012 و 2016 في ولاية تلمسان. و من جهة أخرى، الكشف عن الحمض النووي لفيروس الورم الحليمي البشري من خلال شرائح الأنسجة المدرجة في البارافين عن طريق تقنية AMPLICOR و تقنية PCR ستة وعشرون خزعة خضعت للكشف عن الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين بتقنية Amplicor و PCR . تم الكشف عن HPV واحد على مستوى اللوزتين.

في تلمسان، وخلال فترة 5 سنوات (2012 حتى 2016) سجلنا بعد دراسة الخصائص الوبائية لتسعمائة و ستة وستون (966) شخص مصاب بالسرطان على مستوى المسالك الهوائية الهضمية العلوية أعلى نسبة كانت سنة 2014 بثلاث مئة حالة/سنة) , أغلبها كانت عند الذكور بنسبة 75.36% , بالإضافة الى الانتشار الأوسع لسرطان تجويف الفم (66.25%) , مع تسجيل أكبر معدل (29.40%) لحدوث سرطان VADS عند الفئة العمرية [60-69]. معظم الدراسات تؤكد أن السرطانات الناجمة عن فيروس الورم الحليمي البشري أفضل للتنبؤ بالسرطان مقارنة مع تلك التي تحدث بعوامل أخرى غير الفيروس حيث أن بعض الدراسات أكدت أن نسبة العيش بالنسبة للمصابين بالسرطان بسبب الفيروس تكون أكبر ب 60% الى 80% وهذا ما يفسر أهمية الكشف المبكر للإصابة بالفيروس لتكثيف العلاج بما في ذلك تنفيذ علاجات أخف ضررا على مرضى هذا السرطان الناجمة عن فيروس الورم الحليمي البشري.

الكلمات المفتاحية: فيروس الورم الحليمي البشري – سرطان - VADS خزعة – PCR -AMPLICOR

Résumé

Les Papillomavirus Humains (HPV) sont responsables de près de 100% des cancers du col utérin. Récemment, ces HPV sont apparus comme étant aussi la cause de certaines tumeurs des voies aéro-digestives supérieures (VADS), et particulièrement des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx qui ont été traditionnellement liées qu'avec la consommation du tabac et/ou d'alcool.

L'objectif de cette étude est d'une part, de réaliser une étude rétrospective du profil épidémiologique des cancers des VADS enregistrés entre 2012 et 2016 dans la Wilaya de Tlemcen et d'autre part, de détecter l'ADN des HPV à partir des coupes tissulaires incluses en paraffine par le Kit Amplicor et par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) classique.

A Tlemcen, et durant une période de cinq ans (de 2012 jusqu'à 2016), 966 patients atteints de cancers de VADS ont été colligés avec un pic en 2014 (35.20%) soit une moyenne de 340 cas/an et une prévalence du cancer de la cavité buccale (66.25%), une prédominance masculine (75.36%), ainsi que le plus grand taux d'incidence des cancers de VADS est pour la tranche d'âge de [60-69] , il était de 29.40%.

Vingt-six biopsies ont fait l'objet de la détection d'ADN d'HPV par les techniques de détection moléculaire Amplicor et PCR classique. Un seul HPV a été détecté au niveau des amygdales parmi les cas des cancers de VADS analysés

Dans la majorité des études, les tumeurs HPV+ sont de meilleur pronostic que les tumeurs HPV- dont certains suggèrent que le statut HPV+ réduirait de 60 à 80 % le risque de décès lié au cancer ce qui explique l'importance de la détection précoce de ces virus afin de mettre en place des traitements moins lourds et moins invasifs chez les patients HPV positifs.

Mots clés : HPV – cancer des VADS – Biopsie paraffinée – Amplicor – PCR

Abstract

Human papillomaviruses (HPV) are responsible for nearly 100% of cervical cancers. Recently, these HPVs have also appeared to be the cause of certain tumors of the upper aerodigestive tract (UAT), and particularly squamous cell carcinomas of the oropharynx that have been traditionally related only to the consumption of tobacco or alcohol.

The objective of this study is to carry out a retrospective study of the epidemiological profile of cancers of VADS recorded between 2012 and 2016 in the Wilaya of Tlemcen and, on the other hand, to detect HPV DNA from Tissue sections included in paraffin by the Amplicor Kit and by the polymerase chain reaction (PCR).

In Tlemcen, and for a period of 5 years (from 2012 to 2016), we recorded after a study of the epidemiological profile of 966 patients with tumors of UAT, A peak in 2014 with 340 cases / year and a prevalence of oral cancer (66.25%), a male predominance (75.36%), and a prevalence of oral cavity cancer (66.25%), Thus, the highest rate (29.40%) incidence of VADS cancers is for the age group [60-69].

Twenty-six biopsies have been studied In order to detect HPV DNA by Amplicor molecular detection techniques and conventional PCR. One HPV was detected in the tonsils of cases of UAT cancers analyzed.

In the majority of studies, positive HPV tumors have a better prognosis than negative HPV tumors, some of which suggest that HPV + status would reduce the risk of cancer death from 60 to 80%, which explains the importance of early detection of these Viruses in order to implement less heavy and less invasive treatments in HPV positive patients.

Keywords: HPV - UAT cancer - paraffin biopsy - Amplicor test - PCR



TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION..... 1

Synthèse bibliographique

Chapitre1 : les papillomavirus humains

1. Historique	3
2. Présentation générale des Papillomavirus.....	4
2.1 Présentation phylogénétique de papillomavirus.....	4
2.2 Structure des papillomavirus.....	5
2. 2. 1. La capsid.....	5
2. 2. 2. Organisation génomique.....	6
2. 3 Classification des papillomavirus humains.....	7
2. 3.1. Classification des papillomavirus humains basée sur la séquence génomique	7
2. 3.2. Classification des papillomavirus humains basée sur le tropisme.....	7
2. 3.3. Classification des papillomavirus humains basée sur le potentiel oncogène.....	7
3. Cycle viral du papillomavirus.....	8
3. 1 Entrée et décapsidation du virus.....	8
3. 2 Réplication de l'ADN viral et maintenance du stade <non productif> de l'infection.....	9
3. 3 Prolifération cellulaire.....	9
3. 4 Phase productive de l'infection.....	9
4. Intégration et carcinogénèse.....	10
5. Modes de transmissions du virus.....	11
5. 1 Transmission horizontale.....	11
5.1.1 Transmission par voie sexuelle.....	11
5.1.2 Transmission par voie orale.....	11
5.1.3 Transmission par contact indirect.....	12

5.2 Transmission verticale.....	12
6. Clairance virale / Latence virale.....	12
7. Réponse immunitaire anti-HPV.....	12
8. HPV et échappement au système immunitaire.....	13
9. Vaccin contre le papillomavirus humain.....	14

Chapitre 2 : les lésions des VADS associées à l'HPV

1. Anatomie des voies aérodigestives supérieures.....	15
2. Epidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures	15
3. Association HPV- cancers des voies aérodigestives (VADS).....	16
3.1 HPV et cancer de la cavité buccale.....	17
3.1.1 lésions bénignes de la cavité buccale.....	18
3.2. Lésions malignes de la cavité buccale	18
3.3 HPV et cancer du pharynx : particularité de l'oropharynx	19
3.4 Papillomatose respiratoire récurrent (PRR) ou papillomatose laryngée	20
4. Facteurs de risque du cancer des VADS autres le papillomavirus humain.....	20
4.1. Facteurs exogènes	20
4.1.1. Le tabac	20
4.1.2. L'alcool	21
4.1.3. Facteurs nutritionnels	21
4.1.4. Facteurs environnementales	21
4.2. Facteurs endogènes	22
4.2.1. Facteurs génétiques	22
4.2.2. L'immunodépression (particularité des patients HIV positif).....	22

Chapitre 3 : outils moléculaires de la détection des HPV

1. Détection de l'ADN des papillomavirus humains.....	23
1.1. Le test Hybrid Captur 2® (Qiagen/Digene).....	23
1.2. PCR (Polymerase chain reaction).....	24
1.3. Amplicor HPV Test ® (Roche Diagnostics)	24
2. Génotypage des papillomavirus humains	26
2.1. Génotypage par séquençage.....	26

2.2. PCR et puces d'ADN.....	26
2.3. Technologie Luminex®.....	26
3. Quantification de l'ADN HPV : PCR en temps réel.....	27
4. Dosage des ARNm E6/E7.....	27
4.1. Le Kit NucliSENS Easy Q® HPV.....	27
4.2. Le Kit Aptima® HPV Assay.....	28
5. Détection de la protéine P16.....	28

PARTIE EXPERIMENTALE

I .METHODOLOGIE

1. Etude du profil épidémiologique des cancers des VADS dans la région de Tlemcen.....	29
1.1. Objectifs.....	29
1.1.1. Objectif principal.....	29
1.1.2. Objectifs spécifiques.....	29
1.2. Type de l'étude.....	29
1.3. Population cible.....	29
1.4. Limite d'étude.....	29
1.5. Source d'information.....	29
1.6. Analyse des données.....	29
2. Recherche d'ADN d'HPV à partir des cancers des VADS par deux techniques de détection moléculaire	30
2.1. Objectif	30
2.2. Lieu d'étude.....	30
2.3. Matériel et méthodes.....	30
2.3.1 Prélèvement.....	30
2.3.2. Déparaffinage.....	30
2.3.3. Détection de l'ADN d'HPV par la technique Amplicor HPV Test ®.....	31
a. Extraction d'ADN.....	31
b. Amplification.....	32
c. Détection	33
2.3.4. Détection de l'ADN d'HPV par la technique de PCR conventionnelle.....	36
a.Extraction d'ADN d'HPV par la technique Salting Out.....	36
b.Amplification de l'ADN cible par PCR conventionnelle.....	37
c. L'électrophorèse sur gel d'agarose	38
d.Lecture du gel d'agarose.....	40

I. Résultats

1. Résultats de l'étude du profil épidémiologique des cancers des VADS dans la Wilaya de Tlemcen.....	42
1.1. Répartition des cancers des VADS par année.....	42
1.2. Répartition des cancers des VADS selon les tranches d'âge.....	43
1.3. Répartition des cancers des VADS selon le sexe.	43
1.4. Répartition des cancers des VADS selon la localisation des tumeurs.....	44
1.5. Répartition des cancers du pharynx selon la localisation de tumeurs.....	45
2. Résultats de la recherche d'HPV à partir des cancers des VADS	45

II. Discussion

1. Discussion du profil épidémiologique des cancers des VADS dans la wilaya de Tlemcen	48
2. Discussion de la recherche d'HPV à partir des cancers des VADS par les techniques de détection moléculaire.....	49

Conclusion et perspectives	51
---	-----------

Références bibliographiques.....	53
---	-----------

Annexe

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADC : Adénocarcinome.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique

BPV : Bovine papillomavirus

CEVADS : Carcinome Epidermoïdes des voies aérodigestives supérieures

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CRPV : Cottontail rabbit papillomavirus

ELISA : Dosage d'immuno-absorption par enzyme liée

E : Early

FEH : Focal Epithelial Hyperplasia

HC-II : Hybrid Capture 2

HLA I : Human Leukocyte Antigen de classe *I*

HLA II : Human Leukocyte Antigen de classe *II*

HNC : Carcinome de la tête et du cou

HNSCC : Carcinome épidermoïdes de la tête et du cou

HPA : Hybridization Protection Assay

HPV : Papillomavirus humain

HPV-BR : Papillomavirus humains à bas risque

HPV-HR : Papillomavirus humains à haut risque

IARC : International Agency for Research on Cancer

ICTV : Comité international sur la taxonomie des virus

INCA : Institut National du Cancer

L : Late

LCR : Long Control Region

LPO : Lichen plan oral

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

NASBA : Nucleic Acide Sequence Based Amplification

OPSCC : carcinome épidermoïdes de l'oropharynx

pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain REACTION

POF : Papillomatose Orale Floride

pRb : Protéine de rétinoblastome

PRR : Papillomatose respiratoire récurrente

p16 : Protéine 16

p53 : Protéine 53

SCC : Carcinome Epidermoïdes

TAP-1 : Transporter Associated Protein-1

TMA : Transcription Mediated Amplification

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

VADS : Voies Aéro-digestives Supérieures

VLP : Virus-like particules

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

WHO : World Health Organisation

Liste des figures

Figure 1 : Classification des papillomavirus humains et animaux sur la base de la séquence du gène codant la protéine majeure de la capsid L1	5
Figure 2 : Représentation schématique de la capsid des HPV	5
Figure 3 : L'organisation circulaire de l'épisome d'ADN du papillomavirus humain.....	7
Figure 4 : Infection et cycle de vie des HPV	10
Figure 5 : Dérégulation du cycle cellulaire induit par les HPV.....	11
Figure 6 : Les voies aéro-digestives supérieures.....	15
Figure 7 : Hybridation en phase liquide.....	24
Figure 8 : Principe d'Amplior HPV test.....	25
Figure 9 : Principe de génotypage par technique Luminex.....	26
Figure 10 : Les réactifs du mélange réactionnel (a) et les deux témoins d'HPV (b).....	32
Figure 11 : Thermocycleur programmé pour l'amplification d'HPV.....	33
Figure 12 : Virage de couleur vers le jaune après addition des réactifs et les extraits dans les puits de la microplaque.....	33
Figure 13 : Placement des barrettes dans l'incubateur programmé.....	34
Figure 14 : Les réactifs pour réaliser la PCR.....	34
Figure 15 : Placement des tubes dans le thermocycleur programmé pour l'amplification d'HPV.....	35
Figure 16 : L'écoulement du gel d'agarose (1.5%) dans le plateau de moulage équipé de peigne.....	37
Figure 17 : Le tampon de charge déposé dans une boîte de peigne.....	38
Figure 18 : Le remplissage des puits du gel d'agarose.....	39
Figure 19 : Lecture du gel d'agarose sur la table UV.....	40
Figure 20 : Répartition des cancers de VADS par année.....	40
Figure 21 : Répartition des cancers de VADS selon les tranches d'âge.....	41
Figure 22 : Répartition des cancers de VADS selon le sexe.....	42
Figure 23 : Répartition des cancers de VADS selon la localisation de la tumeur.....	43
Figure 24 : Répartition des cancers de pharynx selon la localisation de la tumeur.....	44
Figure 25 : La méduse d'ADN obtenue après extraction.....	44
Figure 26 : profil d'électrophorèse après l'amplification par PCR	45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Manifestations cliniques des principaux types d'HPV cutanés et muqueux.....	8
Tableau 2 : Amplification des HPV dans les cancers des VADS de différentes localisations.....	46

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer constitue la maladie incontestablement la plus redoutée et elle est assimilée à un véritable fléau moderne (**plan national cancer 2015-2019**). À travers le monde, environ deux millions de nouveaux cas de cancer surviennent annuellement et sont attribuables à des infections. Un tiers de ces cancers (32,5 %) seraient attribuables spécifiquement aux papillomavirus humains (HPV), correspondant à environ 610000 nouveaux cas rapportés en 2008 (**Ferlay et al., 2010**). Les cancers liés à HPV représentent en effet 5% de la totalité des cancers et augmentent pour certains d'entre eux (**Stanley, 2012**).

Les HPV sont des petits virus à ADN double brins qui appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. Ils ont un tropisme électif pour les épithéliums pluristratifiés tels que la peau ou les muqueuses. L'infection à HPV est l'une des infections sexuellement transmissible (IST) les plus fréquentes au monde (**Stanley, 2006**). Sur la base de leur potentiel oncogénique au niveau du col utérin, ces virus ont été classés en HPV à haut risque (HR) oncogène ou à bas risque oncogène (BR) [(**Munoz et al., 2003**) ; (**De Villiers et al., 2004**)]. Les lésions associées aux HPV-HR sont généralement bénignes mais une part non négligeable d'infection peut aboutir à un cancer (**Stanley, 2012**).

En dehors de la sphère génitale, les papillomavirus humains (HPV) sont responsables d'infections des voies aéro-digestives supérieures (VADS) dont l'histoire naturelle est mal comprise (**Beby-Defaux et al., 2011**). En marge des manifestations bénignes (papillomes, verrues, condylomes), connues depuis longtemps, les HPV dits "à haut risque oncogénique" sont impliqués dans la survenue d'une fraction des cancers des VADS (**Roncin et al., 2009**), plus particulièrement dans les tumeurs malignes de l'oropharynx.

Le diagnostic virologique des infections à HPV repose sur des techniques de biologie moléculaire. À ce jour, près de 200 tests moléculaires permettant la recherche des acides nucléiques des HPV-HR sont commercialisés dans le monde (**Poljak et al., 2016**).

Dans la première partie de notre étude, nous allons développer les caractéristiques biologiques des papillomavirus humains notamment leur cycle viral, le mécanisme d'intégration et la carcinogénèse. Puis, en deuxième chapitre nous étudierons les voies aérodigestives supérieures (VADS) et les cancers associées : l'évolution de l'épidémiologie de ces cancers seuls et en association avec HPV, ainsi que les facteurs de risque. Enfin, nous ferons le point sur les techniques moléculaires récentes de détection de ces virus.

L'objectif de la seconde partie de notre travail est de réaliser une étude du profil épidémiologique des cancers des VADS dans la Wilaya de Tlemcen durant la période 2012-2016. Ainsi qu'une recherche des Papillomavirus humains par deux techniques moléculaires : la technique Amplicor® test et la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) conventionnelle sur des prélèvements des cancers des VADS.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les papillomavirus humains

1. Historique

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

-En 1907, Ciuffo démontra la nature virale des lésions verruqueuses humaines, après s'être inoculé un broyat stérile de verrues vulgaires filtré sur la porcelaine (**Ciuffo, 1907**).

-En 1933, Shope et Hurst ont isolé l'ADN de CRPV (Cottontail Rabbit Papillomavirus) à partir d'une verrue de lapin, mettant en évidence le lien entre les papillomes cutanés observés chez les lapins et une infection virale (**Shope, 1933**).

-En 1934, Rous a démontré que les papillomes cutanés chez le lapin peuvent évoluer vers un carcinome après une longue période de latence (**Rous, 1934**).

-En 1949, Les particules virales responsables des verrues humaines ont été mises en évidence par Strauss (**Strauss et al., 1950**).

-Durant les années 1960 et 1970, les données épidémiologiques montrent que la maladie est transmise par contact sexuel, ainsi la mise en évidence de l'existence de plusieurs types d'HPV (**Carcopino et al., 2011**).

-En 1974, Herald zur Hausen *et al* ont prouvé l'existence des HPV dans les lésions génitales (condylomes acuminés et cancers). Dix ans plus tard, la découverte des HPV spécifiques dans les biopsies du col utérin a été faite [(**zur Hausen, 1974**) ; (**Boshart et al., 1984**)].

-Entre 1980 et 1982, l'isolation des HPV de types 6 et 11 à partir de l'analyse de biopsies de verrues génitales et de papillomatoses laryngées (**Carcopino et al., 2011**).

-En 1983, la mise en évidence de la présence de Papillomavirus Humains (HPV) dans des lésions épidermoïdes de la cavité buccale par une équipe finlandaise (**Syrjanen et al., 1983**).

-Entre 1987 et 1990, la mise en évidence à la fois des modifications cellulaires dues à E6 et E7 par des expériences sur des cellules de rongeurs et des kératinocytes humains, ainsi que l'interaction de l'oncoprotéine E6 avec la protéine p53 [(**Werness, 1990**) ; (**Carcopino et al., 2011**)].

-En 1991, le développement de vaccin anti HPV à partir de pseudo particules virales (VLP) de la protéine L1 de HPV16 (**Carcopino et al., 2011**).

En 1992, la mise en évidence de l'interaction de l'oncoprotéine E7 avec la protéine du rétinoblastome pRb (**Dyson et al., 1992**).

-En 1995, l'IARC (International Agency for Research on Cancer) classe les HPV16 et 18 comme agents carcinogènes chez les humains (**IARC, 1995**).

Les papillomavirus humains

-Dans les années 2000, la démonstration de l'efficacité de la vaccination anti-HPV : la vaccination monovalente anti-HPV16 en 2002, la vaccination bivalent anti HPV16 et 18 en 2004, la vaccination quadrivalent anti-HPV16, 18, 6 et 11 en 2005 (Carcopino et al., 2011).

-De nombreux travaux ont confirmé l'hypothèse d'une oncogenèse d'origine virale dans les voies aéro-digestives supérieures (Gillison et al., 2000).

-En 2008, Harald zur Hausen a eu le prix Nobel pour sa découverte que le papillomavirus humains (HPV) est le responsable du cancer du col de l'utérus (Carcopino et al., 2011).

2. PRESENTATION GENERALE DE PAPILOMAVIRUS

2.4.présentation phylogénétique de Papillomavirus

Les papillomavirus avaient été à l'origine groupés ensemble avec les Polyomavirus dans la famille : *Papoviridae*. En raison de grandes différences en termes de séquences nucléiques et d'organisation génomique, le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) a séparé l'ancienne famille des *Papovaviridae* en deux nouvelles familles : les *Papillomaviridae* et les *Polyomaviridae* (Pérez-Losada et al., 2006). Les papillomavirus humains sont des virus très anciens qui ont évolué parallèlement à l'hôte qu'ils infectent, c'est pourquoi, la nomenclature pour les désigner consiste à rajouter au suffixe PV (Papillomavirus), l'abréviation désignant l'hôte infecté dérivé du terme anglais tels HPV (Humain papillomavirus), BPV (Bovine papillomavirus) (Rebrikov et al., 2002).

La famille des Papillomavirus regroupe 16 genres et chaque genre se compose d'une ou de plusieurs espèces de Papillomavirus, et elle regroupe plus de 200 génotypes [(Jung et al., 2004) ; (Rahimy, 2014)]. Au sein des 16 genres, 5 correspondent aux Papillomavirus Humains, ce sont les genres alpha, bêta, gamma, mu et nu. (De Villiers, 2004).

L'arbre phylogénétique ci-dessous (figure 1) est construite en se basant sur la séquence de la protéine majeure de la capsid (L1) qui est très conservée au cours de l'évolution chez les différents types de Papillomavirus :

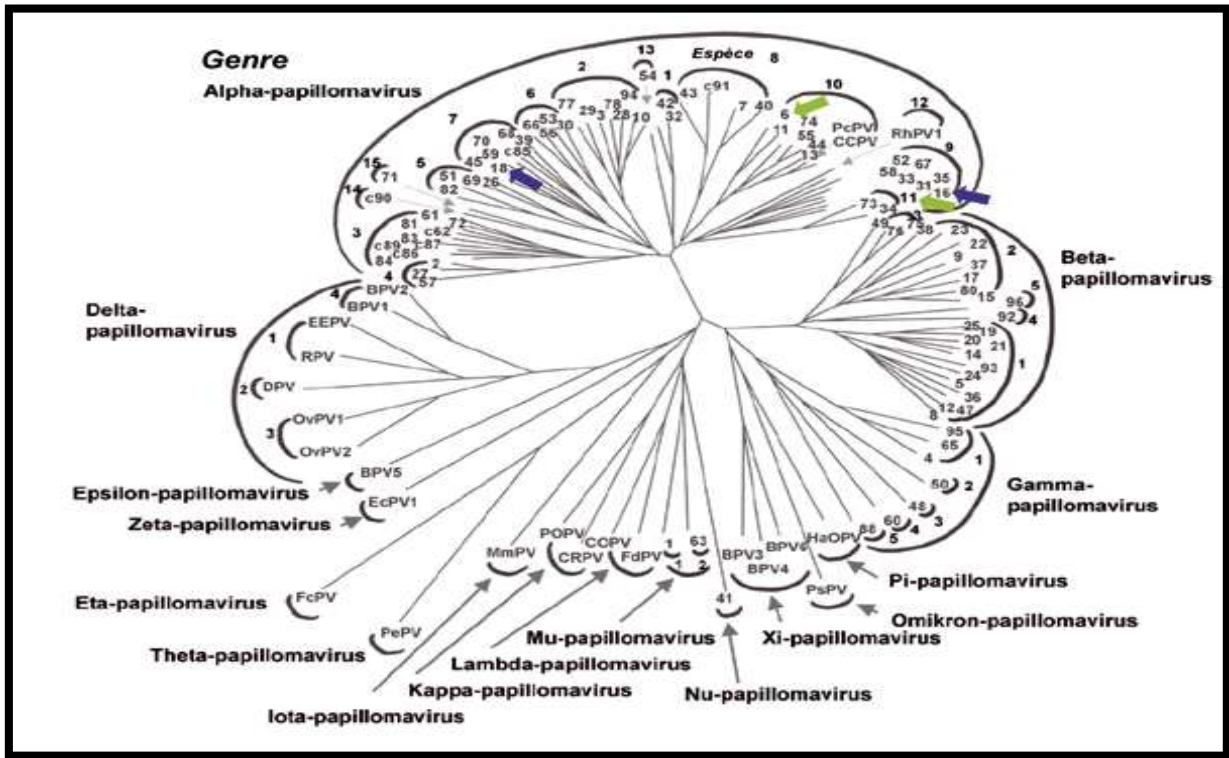


Figure 1 : Classification des papillomavirus humains et animaux sur la base de la séquence du gène codant la protéine majeure de la capsid L1 (De Villiers, 2013)

2.5. Structure du virus

Les papillomavirus sont des virus nus, de petite taille mesurant entre 45 et 55 nm de diamètre [(WHO ,2007) ; (Morshed *et al.*, 2014)]

2.5.1. la capsid

La capsid des HPV, à symétrie icosaédrique comporte 72 capsomères, chacun est formé de 5 protéines majeures (L1) et une molécule L2 (protéine mineure) [(Baker *et al.*, 1991) ;(Buck *et al.*,2008) ;(Pereira *et al.*,2009)] (figure 2)

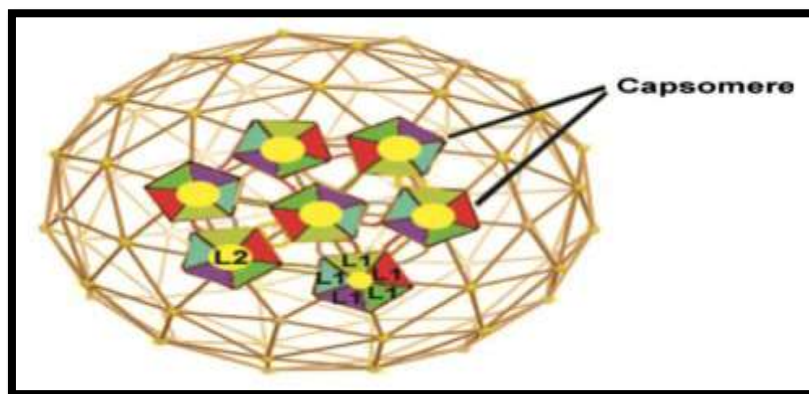


Figure2 : Représentation schématique de la capsid des HPV (Malik *et al.*, 2013)

2.5.2. organisation génomique

Le génome des papillomavirus humain est un ADN circulaire double brin constitué d'environ 8000 paires de bases dont un seul brin est codant. Il comporte trois régions distinctes qui sont :

- a. **une région précoce (Early)** : traduite précocement, et se divise en 6 régions (E1 à E7) (**Monsonogo, 2006**).
 - ◆ La protéine E1: active la réplication de l'ADN viral.
 - ◆ La protéine E2: Elle intervient à la fois dans la réplication (dont l'activation implique une synergie avec E1) et la modulation de la transcription virale (une activité transcriptionnelle s'exerçant négativement sur E6 et E7 (**Prétet et al., 2007**)).
 - ◆ La protéine E3 : pas de fonctions connues.
 - ◆ La protéine E4 : maturation de virion.
 - ◆ La protéine E5 : stimulation de la prolifération cellulaire.
 - ◆ La protéine E6 : protéine oncogène qui provoque la dégradation de la protéine P53.
 - ◆ La protéine E7 : protéine oncogène qui provoque la dégradation de la protéine pRb (protéine de rétinoblastome) (**Monsonogo, 2006**).
- b. **Une région tardive L (Late)** : traduite tardivement, englobe les gènes codants pour les deux protéines structurales (L1 et L2) qui forment la capsid (**Bernard et al., 2010**) :
 - ◆ La protéine L1 : protéine structurale majeure de la capsid indispensable à la formation des particules virales vides ressemblant à des capsides et dénommées VLP (Virus-Like Particles) qui se lient au récepteur de la cellule hôte (**Bishop et al., 2007**). Cette protéine L1 est hautement conservée entre les papillomavirus (**Monsonogo, 2006**) et constitue la source d'antigènes pour le développement de tests sérologique ELISA et pour la production de vaccin [(**Muñoz, 2006**) ; (**Alain et al., 2010**)].
 - ◆ La protéine L2 : protéine structurale mineure de la capsid, moins conservée que la protéine L1. Cette protéine permet en association avec la protéine L1, l'assemblage du virus et la stabilisation de la capsid (**Monsonogo, 2006**).
- c. **une région non codante de régulation LCR (Long Control Region) ou URR (Upstream Regulatory Region)** : est constituée des promoteurs et des séquences dérégulation, réplication et transcription, cette région est localisée entre L1 et E6 (**Monsonogo, 2006**) (**Figure 3**)

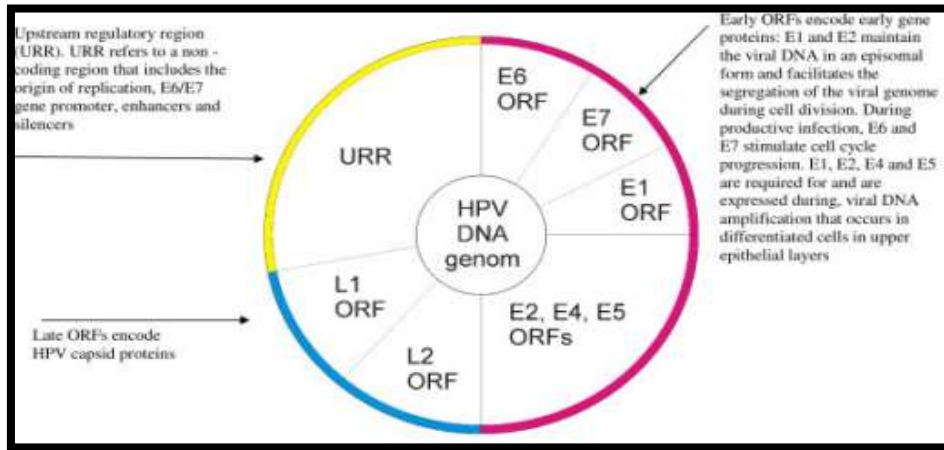


Figure 3: L'organisation circulaire de l'épisode d'ADN du papillomavirus humain (Bonnez, 2002)

2.6. Classification des papillomavirus humains

Leur classification est basée sur leur séquence génomique, leur tropisme ou sur leur pouvoir oncogène (Quelavoine, 2014).

2.6.1. Classification basée sur la séquence génomique

C'est la séquence nucléotidique du gène L1 qui sert de base à la classification des Papillomavirus Humains. Pour qu'un nouveau type d'HPV soit reconnu, il faut que le génome complet du virus ait été séquencé et que sa séquence L1 présente une divergence de plus 10% avec la séquence L1 du type connu le plus proche génétiquement (Segondy, 2008).

2.6.2. Classification basée sur le tropisme

Les papillomavirus humains sont également classés en fonction de leur tropisme muqueux ou cutané (Pretet, 2007).

Les papillomavirus humains à tropisme muqueux appartiennent au genre alpha-papillomavirus et se localisent au niveau des muqueuses ano-génitales, ainsi qu'au niveau des muqueuses orales et respiratoires.

Les papillomavirus humains à tropisme cutané appartiennent aux genres bêta-papillomavirus, gamma-papillomavirus, aux genres nu-papillomavirus et mu-papillomavirus, et sont responsables d'affection de la peau (Segondy, 2008).

2.6.3. classification basée sur le potentiel oncogène

Le pouvoir oncogène des HPV concerne essentiellement les HPV à tropisme muqueux, cette classification étant basée sur le risque de cancer du col de l'utérus.

Les papillomavirus humains

Il y a des HPV dits à « haut risque » oncogène (HPV HR pour high-risk) responsables des lésions précancéreuses et malignes, en immortalisant les kératinocytes humains (Morshed et al., 2014) et des HPV dits à « bas risque » oncogène (HPV LR pour low-risk) responsables de lésions bénignes et presque jamais dans les cancers; (Monsonogo, 1996) (Tableau 1).

Tableau N° 1 : Manifestations cliniques des principaux types d'HPV cutanés et muqueux (Monsonogo, 2006)

		Types d'HPV les plus fréquents	Autres types d'HPV moins fréquents	Expression clinique
HPV cutanés		1, 2, 3, 4, 10	26 à 29, 38, 41	Verrues plantaires
		5, 8	9, 10, 12, 14, 15, 17, 19 à 25	Epidermodysplasie verruciforme
		5, 8, 14, 17, 20		Carcinomes épidermoïdes
HPV muqueux	HPV - BR	6, 11	42 à 45	- Condylomes acuminés - Papillomes laryngés, conjonctivaux, buccaux
	HPV - HR	16, 18	31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	- Cancer du col utérin et lésions précurseurs - Carcinomes : pénis, vulve, vagin, anus

- Les co-infections avec plusieurs types d'HPV ne sont pas rare (20 à 30%). Les associations entre HPV à haut risque et à bas risque dans les lésions cancéreuses sont également fréquentes et certaines associations préférentielles ont été décrites (HPV-16 et 52, HPV-16 et 68, HPV-18 et 6/11) (Beaudin et al., 2014).

3. Cycle viral des Papillomavirus

Les cellules cibles des HPV sont les kératinocytes (Morshed et al., 2014). Le cycle de vie des HPV se déroule dans l'épithélium malpighien (Bouvard et al., 2009) dont il ne peut se produire que dans les cellules épithéliales différenciées [(WHO et IARC, 2007) ; (Morshed et al., 2014)]. Quatre étapes caractérisent le cycle de vie des papillomavirus qui sont

3.1. Entrée et décapsulation du virus

Les récepteurs utilisés par le virus pour entrer dans la cellule sont spécifiques des HPV. Des héparines sulfates permettent la fixation primaire du virus sur la membrane cellulaire, puis une intégrine provoque l'entrée du virus dans la cellule [(Monsonogo, 2008) ; (Alain et al., 2010) ; (Malik et al., 2013)]. Cette liaison dépend uniquement de L1 (Malik et al., 2013). Le virus est alors internalisé par endocytose puis décapsidé et l'ADN viral est transloqué au niveau du noyau des kératinocytes basaux qui serait facilité par la protéine mineure de capsid L2

[(Doorbar, 2005) (Malik *et al.*, 2013)]. Dans les cellules basales infectées, le génome viral est sous forme épisomale (Bouvard *et al.*, 2009).

3.2.Réplication de l'ADN viral et maintenance du stade « non-productif » de l'infection

La réplication du génome viral se fait dans les cellules basales de l'épithélium au cours de la phase S du cycle cellulaire, les protéines précoces E1 et E2 provoquent la multiplication limitée du génome viral dans les cellules souches, permettant d'obtenir 50 à 100 copies d'ADN viral par cellule [(Monsonogo, 2008) ; (Alain *et al.*, 2010)].

Une caractéristique de l'infection par HPV est sa persistance à long terme sur plusieurs mois voire années, ce qui nécessite le maintien du génome viral au-delà de multiples divisions cellulaires sans intégration dans le génome de la cellule hôte, sous le contrôle des protéines virales précoces E1 et E2 (Monsonogo, 2008).

3.3.prolifération cellulaire

Les cellules infectées par un papillomavirus humain subissent une phase de prolifération intense, induite par les protéines virales E6 et E7, lors de leur migration vers les couches supra-basales de l'épithélium, et le processus de différenciation est ainsi retardé (Doorbar, 2005).

3.4.Phase productive de l'infection

Dans les couches les plus superficielles, les protéines de capsid L1 et L2 permettent l'empaquetage de l'ADN viral, les virions ainsi formés desquament et se lysent à la surface de l'épithélium, permettant la diffusion des virus qui peuvent infecter de nouvelles cellules.

Les protéines de structure sont exprimées uniquement dans les cellules exprimant E4 et dans des tissus où la phase d'amplification est terminée (Doorbar *et al.*, 1997). La protéine E4 va favoriser la libération des virus via la désorganisation de la lamina nucléaire (Flores et Lambert, 1997).

L'infection productive aboutit à la production d'un très grand nombre de particules virales, favorisant la dissémination de l'infection (Alain *et al.*, 2010) (Figure 4)

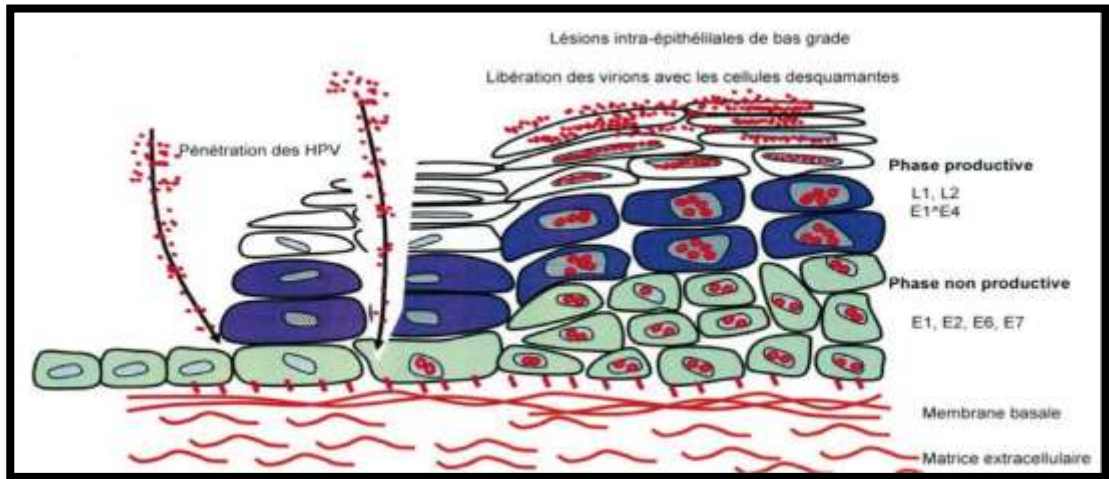


Figure 4 : Infection et cycle de vie des HPV (Mougin *et al.*, 2008)

4. intégration et carcinogénèse

L'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte ne peut être réalisée que par les HPV à haut risque, elle nécessite la linéarisation du génome viral au niveau des protéines E1 et E2, conduisant à des anomalies d'expression d'E2 (absence d'expression, protéine tronquée, protéine inactive) qui n'inhibe alors plus l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7. C'est l'expression continue et concomitante d'E6 et E7 qui est à l'origine de l'immortalisation et de la transformation des cellules infectées (**Monsonogo, 2008**). Cette intégration est un événement « terminal » dans le cycle de ces virus, car une fois leur génome intégré, la multiplication virale ne peut plus avoir lieu (**Roncin *et al.*, 2009**).

E6 a la capacité d'inactiver p53, interrompant ainsi les fonctions d'activation de la réparation des lésions de l'ADN et d'induction de l'apoptose des cellules transformées médiées par p53 (**Guihard *et al.*, 2012**). E7 induit quant à elle la dégradation de pRb, ne permettant plus l'arrêt du cycle cellulaire.

Lors d'une infection "oncogène", une dérégulation de l'expression d'E6 et E7 est observée dans la lame basale de l'épithélium, entraînant l'abrogation des points de contrôle du cycle cellulaire (**Boyer *et al.*, 1996**).

D'autre part, il a été montré que la protéine E5 est impliquée dans le processus de transformation tumorale, elle est capable d'altérer l'expression des molécules de CMH I à la surface des cellules épithéliales infectées ; ceci ayant pour conséquence une diminution de la réponse cellulaire anti-HPV médiée par les lymphocytes T cytotoxiques et à l'origine de la clairance du virus (**Badoual *et al.*, 2015**).

La cancérogenèse virale induite par les HR-HPV est connue selon le modèle du cancer du col utérin. Il semble que ce modèle soit applicable à la cancérogenèse des VADS, puisque l'on y retrouve également une dégradation de p53 par la protéine virale E6 et une inactivation de pRb médiée par E7 [(Boyer *et al.*, 1996) ; (Antonsson *et al.*, 2015)].

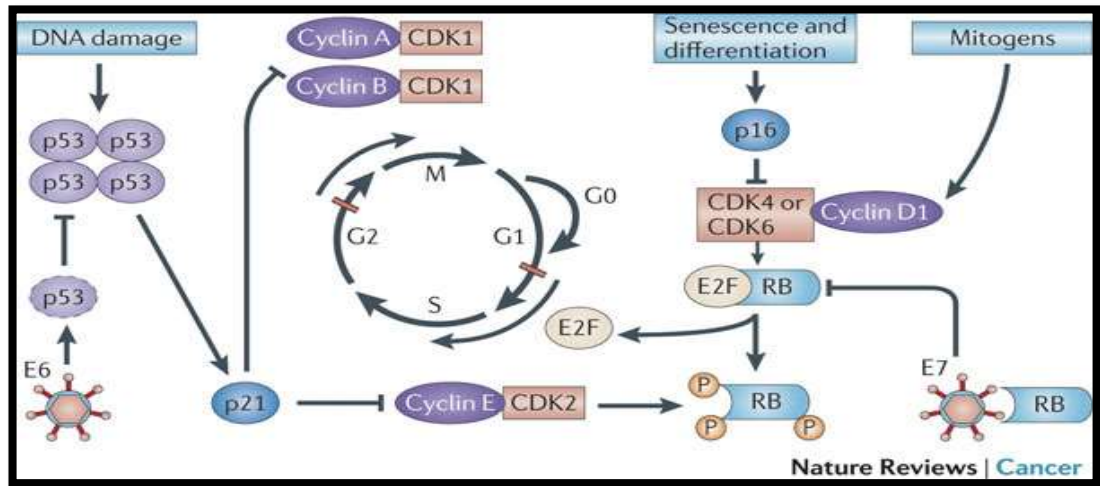


Figure 5: Dérégulation du cycle cellulaire induit par les HPV (Schwarz *et al.*, 1985)

5. Mode de transmission :

5.1. transmission horizontale

Les HPV sont essentiellement transmis par contact direct, de peau à peau, peau à muqueuse ou de muqueuse à muqueuse [(Bouvard *et al.*, 2009) (Alain *et al.*, 2010)], mais également par contact indirect avec des surfaces contaminées (Alain *et al.*, 2010). Ils sont hautement transmissibles (Trottier *et Burchell*, 2009).

5.1.1. transmission par voie sexuelle

Le HPV est le virus le plus fréquemment transmis par voie sexuelle (Morshed *et al.*, 2014). L'infection génitale par HPV se transmet principalement par contact génital, généralement par le biais des rapports sexuels, mais aussi par d'autres contacts intimes, génito-génital ou oro-génital [(Kjaer *et al.*, 2001) ; (Markowitz *et al.*, 2014)].

5.1.2. Transmission par voie orale

une transmission orale-orale du HPV est également possible par différentes manières telles que les contacts oro-génitaux, les baisers ou l'auto-inoculation [(Beby-Defaux *et al.*, 2011) ; (Morshed *et al.*, 2014)].

5.1.3. transmission par contact indirect

Le papillomavirus humain peut également être transmis à travers les baisers ou par les mains souillées de la mère ou encore avec des surfaces ou objets contaminés [(Mougin et al., 2006) ; (Beby-Defaux et al., 2011)].

Il est possible que des équipements médicaux réutilisables étant en contact avec des zones infectées par HPV deviennent contaminés et contribuent à la transmission du virus (Ryndock et Meyers, 2014).

5.1.4. Transmission verticale

La transmission non sexuelle des HPV a été suggérée pour la première fois en 1956, chez un enfant né d'une mère atteinte de condylomes acuminés et qui a développé une papillomatose laryngée quelques mois après sa naissance (Hajek, 1956). En 2009, Rombaldi et ses collaborateurs étayaient cette possibilité et prouvent que la transmission du HPV est possible au niveau intra-utérin ou lors de l'accouchement (Rombaldi et al., 2009). Le taux de transmission des HPV serait plus important lors d'un accouchement par voie basse que lors d'une césarienne (Rombaldi et al., 2008).

6. Clairance virale / Latence virale

Dans la majorité des cas (80 à 90 %), l'infection productive à HPV régresse sous l'effet de la réponse immunitaire et ne persiste pas assez longtemps pour entraîner une dérégulation du cycle cellulaire et une accumulation d'anomalies génétiques. Ce phénomène s'appelle la clairance virale. Elle s'observe en 3 à 6 mois pour les HPV BR et en 12 à 18 mois pour les HPV HR.

Dans certains cas, la régression de l'infection à HPV peut ne pas aller jusqu'à la clairance virale. L'ADN viral persiste alors dans les cellules de la lame basale sans se répliquer, ni s'intégrer au génome cellulaire. L'infection devient « silencieuse », on parle de latence virale. Il existe cependant un risque de réactivation à distance, en cas de modification de l'immunité, notamment cellulaire (infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), traitements immunosuppresseurs) (Chenouard, 2016).

7. Réponse immunitaire anti-HPV

Lors d'une infection naturelle par les HPV, il existe une immunité basée d'une part sur la production d'anticorps neutralisants qui s'opposent à la pénétration du virus dans les cellules

cibles, et d'autre part sur une réponse immunitaire cellulaire s'opposant à l'extension des lésions existantes et à leur transformation (**Hantz et al., 2003**).

Après pénétration du virus dans le kératinocyte, les antigènes viraux peuvent alors être présentés à la surface de ces cellules sous forme de peptides de petite taille (8 à 11 acides aminés) en association avec les molécules CMH de classe I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) ou de peptides de plus grande taille (13 à 25 acides aminés) en association avec les molécules HLA de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) présentes sur les kératinocytes infectés. La réponse lymphocytaire paraît varier en fonction du stade de la lésion et du risque oncogénique du HPV infectant (**Monsonogo, 2007**). On distingue :

- la réponse immunitaire à médiation humorale, basée sur l'induction d'anticorps neutralisants dirigés contre les protéines structurales L1 et L2,
- la réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigée contre les protéines précoces du virus (protéines E) et permettant la destruction des cellules infectées et des virus, ainsi que la régression des lésions associées (**Luxton et al., 2003**).

8. HPV et échappement au système immunitaire

Bien que l'entrée du HPV induit l'activation d'une réponse immunitaire anti-HPV, mais ce virus a la capacité de masquer sa présence au système immunitaire, grâce à un large éventail de propriétés :

- ✓ L'absence de phase virémique et la formation des virions uniquement au niveau des cellules épithéliales différenciées les plus externes réduit fortement l'exposition du virus au système immunitaire de l'hôte. Le cycle viral de l'HPV étant non lytique, il n'y a pas de cytokines pro-inflammatoires libérées au niveau du siège de l'infection, ou très peu, avec comme conséquence une faible migration et activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (**Stanley, 2008**).
- ✓ l'HPV, présent au niveau des cellules tumorales, provoque grâce à sa protéine E5 une diminution de l'expression de la calnexine, impliquée dans la formation du complexe CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité I), et de la protéine TAP-1 (Transporter Associated Protein-1) qui assure la migration du complexe jusqu'à la membrane plasmique (**Leykauf et al., 2004**). Ce mécanisme permet de limiter la quantité de peptides viraux couplés aux molécules CMH de classe I exposés à la surface des cellules et, ainsi, une reconnaissance plus difficile des cellules infectées par les lymphocytes T

(Stanley *et al.*, 2007). les oncoprotéines E6 et E7 diminuent la production de certaines cytokines et chémokines comme l'IL-8, l'IL-18 ou la molécule MCP-1, impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires (Kanodia *et al.*, 2007).

9. Vaccins contre le papillomavirus humain

Les vaccins contre le HPV les plus efficaces ont été mis au point à la suite de techniques d'ADN recombinant pour produire un aspect de la particule virale, mais sans génome. Le gène L1 (ou L1 et L2) du génome viral a été sous-cloné dans des microorganismes tels que la levure ou le Baculovirus où les protéines L1 sont surexprimées (Malik *et al.*, 2013). Ces protéines s'auto-assemblent spontanément en VLP avec une confirmation qui ressemble à celle des virions authentiques (Joura *et al.*, 2007). Les VLP sont hautement immunogènes et induisent des titres élevés d'anticorps polyclonaux lorsqu'ils sont administrés à des sujets animaux et humains (Malik *et al.*, 2013).

Du fait que l'infection à HPV oropharyngée est largement associée à des comportements sexuels, la diminution de la prévalence de l'infection génitale par le vaccin pourrait indirectement réduire l'incidence de l'infection par le HPV par voie orale, indépendamment de l'effet direct potentiel du vaccin sur l'infection oropharyngée du HPV (Chai *et al.*, 2015).

Deux versions de vaccins VLP contre le VPH de type L1 sont maintenant disponibles dans de nombreux pays à travers les différents systèmes de soins de santé :

- ✓ Le vaccin quadrivalent appelé Gardasil, comprend les VLP des quatre grands HPV muqueux: HPV-16 et HPV-18 et HPV-6 et 11.
- ✓ Le vaccin Bivalent appelé Cervarix, comprend des VLP de seulement deux types de HPV : HPV-16 et 18.

Les deux vaccins sont administrés sous forme de trois injections intramusculaires sur une période de six mois (Gardasil aux mois 0, 2 et 6 et Cervarix aux mois 0, 1 et 6) (Malik *et al.*, 2013).

Chapitre 2 : Lésions des VADS associées à l'HPV

1. Anatomie des voies aéro-digestives supérieures (VADS)

Les voies aérodigestives supérieures (VADS) sont constituées de la partie haute des systèmes digestif et respiratoire. Ils comprennent ainsi : **(figure 6)**

1.1.la cavité orale

Elle est constituée par les lèvres rouges, la langue mobile, le plancher buccal et le palais **(Beby-defaux et al., 2011)**.

1.2.Le pharynx

Le pharynx est un conduit musculo-membraneux qui se divise en trois régions : Le nasopharynx (cavum), l'oropharynx (comprend : base de langue - voile du palais -amygdales palatines) et l'hypopharynx **(Dubrulle et al., 2010)**.

1.3.Le larynx

Il est divisé en trois étages : Supra-glottique, glottique et sous-glottique **(Lescanne et al., 2004)**.

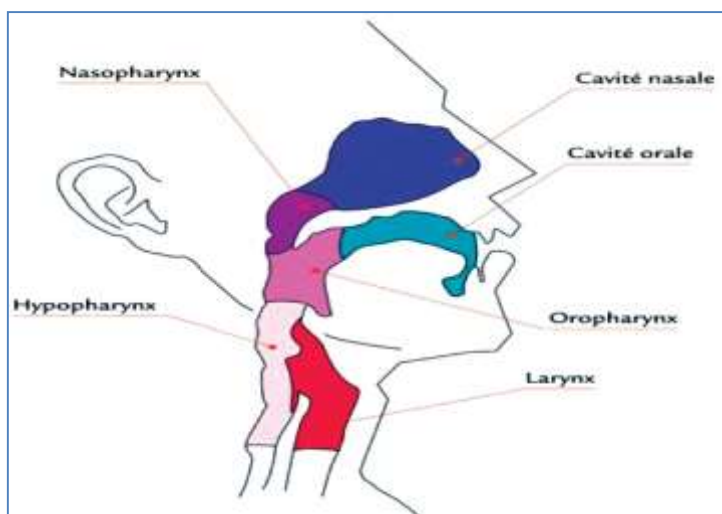


Figure 6 : Les Voies Aéro-digestives supérieures (Beby-defaux et al., 2011)

2. Epidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS)

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) regroupent les tumeurs de la cavité buccale, des lèvres, du pharynx et du larynx **(Chelimo et al., 2013)**.

l'incidence des cancers des voies aérodigestives supérieures dans le monde est classée dans le 6^{ème} rang **(Magné et al., 2016)** dont une dominance de carcinomes épidermoïde avec un taux de 58 à 90% suivis par les lymphomes et en derniers les adénocarcinomes **(Lafond et**

al., 2010). Ces cancers sont particulièrement fréquents en France : 16000 nouveaux cas par an de cancers des VADS ont été estimés en 2008 et en terme de mortalité en 2005, ces cancers se situent au 5ème rang chez l'homme, ils sont responsables de 5000 décès chaque année. Ils sont principalement masculins. (**Bélot et al., 2008**).

En 2012, 2030 cas ont été enregistrés en Malaisie correspondant à l'incidence nationale du cancer du nasopharynx (cavum) la plus élevée au monde (**Globocan, 2012**).

Les taux d'incidence des cancers du larynx sont variables d'un pays à l'autre :

- Les plus fortes incidences du cancers laryngés sont retrouvées en Europe, où ils sont plus fréquents en Europe du Sud particulièrement en Espagne (La région basque en Espagne par exemple, a une incidence de 20/100,000) et en Italie (**Thomas et al., 2011**). En France, 3 322 nouveaux cas estimés en 2012 (**Binder-Foucard et al., 2013**).
- C'est un cancer rare aux Etats Unis, 12373 nouveaux cas ont été estimés en 2012 représentant 0,77% seulement de l'ensemble des cancers dont 79,22% chez des hommes, correspondant à 1,18% seulement de l'ensemble des cancers masculins [(**Globocan, 2012**) ; (**Siegel et al., 2012**)].

3. Association HPV- cancer des voies aérodigestives supérieures

Le lien de causalité entre l'infection par le papillomavirus humain (HPV) et le développement de carcinomes de la tête et du cou (HNC) en particulier dans l'oropharynx sont de plus en plus solidement établi. A la fin des années 90, dans une revue de la littérature, **Franceschi et al., 2000** suspectent une association entre les infections par le papillomavirus humain et les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) [(**Franceschi et al., 2000**) ; (**Kreimer et al., 2005**)].

La majorité des cancers des VADS induits par HPV sont des carcinomes épidermoïdes (CE) localisés préférentiellement au niveau de l'oropharynx dont sa prévalence est 36% pouvant dépasser 50% surtout dans la localisation tonsillaire. La prévalence rapportée est de 23,5% pour les cancers de la cavité orale et de 24% dans les cancers laryngés (**Dufour et al., 2012**).

Le HPV-16 était le type le plus fréquemment détecté : il était présent dans 30,9% des SCC (Carcinome épidermoïde) oropharyngés, 16,0% dans les SCC oraux et 16,6% dans les SCC laryngés, il représentait donc 86,7% de tous les SCC oropharyngés positifs pour le HPV. Le HPV-18 était le deuxième type le plus fréquent, il est présent dans 8 % et 3,9% des SCC

oraux et laryngés respectivement, mais n'était présent que dans 1,0% des SCC oropharyngés (Kreimer et al., 2005).

Un rôle carcinogène a déjà été attribué à des HPV à bas risque, notamment dans l'évolution de papillomatose respiratoires récurrentes, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent peu décrits [(Lin et al., 2010) ; (Huebbers et al., 2013)].

Le taux de prévalence des carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures (CEVADS) induits par HPV a été estimé à 25,6% dans le monde mais il est variable selon les régions géographiques (Gillison et al., 2014) :

- ✓ En Europe du Nord et de l'Ouest ce taux est 39% et 38% en Europe de l'Est
- ✓ En Amérique du Nord, il est de 56%.
- ✓ En Japon, il est de 52%
- ✓ En Australie, il est de estimé à 45%

3.1. HPV et cancer de la cavité buccale

Le HPV est connu pour contaminer la cavité buccale des individus en bonne santé. La muqueuse buccale normale peut servir de réservoir pour de nouvelles infections à HPV et / ou comme source de lésions associées à des HPV récurrentes (Prabhu et Wilson, 2013). La présence d'HPV dans les tissus néoplasiques de la cavité buccale varie de 14% à 91%.

-Des voies multiples pour la transmission du HPV à la cavité buccale peuvent exister :

- la transmission sexuelle : Le sexe oral est un mode bien connu de transmission du HPV à la cavité buccale. L'acquisition orale du HPV a été jugée plus positivement associée au nombre de partenaires sexuels oraux récents et de baisers ouverts que le nombre de partenaires sexuels vaginaux. Les rapports indiquent également que les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes ont un risque élevé de développer une infection par le HPV par voie orale [(D'Souza et al., 2009) ; (Ragin et al., 2011)].
- l'auto-infection et rarement de la transmission périnatale du nouveau-né pendant son passage dans un canal de naissance infecté de la mère [(Edwards et Carne, 1998) ; (Kreimer et al., 2004)]

3.1.1. Lésions bénignes de la cavité buccale

a. Papillome buccal

Le papillome constitue la tumeur épithéliale de la muqueuse buccale la plus fréquente, de l'ordre de 1/250 individus. C'est une prolifération bénigne de l'épithélium malpighien, il est associé à HPV 6 ou 11 dans plus de 50% des cas, mais il peut également être causé par HPV 2, 4, 7, 10, 16, 32 et 40. Il atteint de manière égale les hommes et les femmes et il peut survenir à tout âge mais il est habituellement diagnostiqué entre 30 et 50 ans. La présence de ces lésions peut être influencée par le tabagisme, des infections coexistantes immunodéprimantes, des carences alimentaires et des changements hormonaux [(Eversole, 2000) ; (Dridi et al., 2004) (Lewis, 2009) ; (Misir et al., 2013) ; (Babaji et al., 2014)]

b. Verrue vulgaire

Lésions de verrue vulgaire orale résultent généralement de l'auto-inoculation du virus à partir de lésions sur les doigts causée essentiellement par les HPV 2 et 4, mais qui peut aussi être associée aux HPV 1, 3, 6, 10 et 40 apparaissant comme un nodule rond à ovale de couleur blanche dû à leur importante kératinisation de surface [(Eversole, 2000) ; (Prabhu et Wilson, 2013)].

c. Condylome acuminé

Le condylome acuminé apparaît comme une masse exophytique asymptomatique, à large base sessile dans la majorité des cas de couleur rose ou blanche (Lewis, 2009), induit généralement par les HPV 6 et 11 (pour 90% d'entre eux) mais ils peuvent aussi être causés par les HPV 2, 53 et 54 [(Beby-Defaux et al., 2011) ; (Prabhu et Wilson, 2013)]

d. Hyperplasie focale épithéliale (Maladie de Heck)

L'hyperplasie épithéliale focale (FEH pour Focal Epithelial Hyperplasia), est une maladie bénigne relativement rare de la muqueuse buccale (Prabhu et Wilson, 2013). La FEH est associée aux HPV 13 et 32 (Saïd et al., 2013), son évolution est chronique et asymptomatique (Douvier et Dalac, 2004).

3.1.2. Lésions malignes de la cavité buccale

a. Papillomatose Orale Floride (POF)

La papillomatose orale Floride est caractérisée par des plaques blanches végétantes, en «chou-fleur» sur la muqueuse orale du sujet âgé, similaires à des carcinomes verruqueux. Les infections de la muqueuse orale avec un HPV, notamment ceux à haut risque oncogène, sont

un facteur de risque indépendant pour la survenue d'un cancer spinocellulaire orale (**Milleret *al.*, 2001**)

b. Leucoplasie

La leucoplasie est la lésion potentiellement maligne la plus fréquente de la cavité buccale localisée surtout sur la joue (37%) et la langue (23%) (**Prades *et al.*, 2004**). Les HPV de types 16 et 18 ont été identifiés dans des lésions de leucoplasie (**Prabhu et Wilson, 2013**).

c. Lichen plan buccal (LPB)

Le lichen plan oral est un trouble inflammatoire chronique cutanéomuqueux à médiation immunitaire (**Prabhu et Wilson, 2013**). L'ADN du HPV a été identifié dans 15,4% des lésions de Lichen plan oral (**Ostwald *et al.*, 2003**)

d. Carcinome épidermoïde

Le carcinome épidermoïde est une tumeur épithéliale maligne. Il représente plus de 90% des cancers de la cavité buccale et plus généralement des voies aéro-digestives supérieures (VADS) [(**Blanchard *et al.*, 2014**) ; (**Dufour *et al.*, 2012**)]. Le carcinome épidermoïde de type basaloïde est le plus souvent associé à une infection par HPV (**Badoual *et al.*, 2015**)

3.2. HPV et cancer du pharynx : Particularités pour l'oropharynx

L'infection par le papillomavirus humain au niveau des voies aéro-digestives supérieures se fait préférentiellement au niveau de l'oropharynx, par ordre de fréquence, le virus siège principalement dans la région amygdalienne (loge amygdalienne, pilier antérieur, pilier postérieur) puis dans la base de la langue et enfin dans la paroi postérieure. Comme dans les cancers du col de l'utérus, le HPV-16 est le génotype le plus fréquemment retrouvé dans les cancers de l'oropharynx avec une prévalence de 86,7% [(**kreimer *et al.*, 2005**) ; (**de Sanjose *et al.*, 2010**)].

L'association épithélium malpighien - épithélium pavimenteux donne aux amygdales des caractères histologiques proches de ceux du col de l'utérus au niveau de la zone de jonction endocol-exocol qui est elle aussi, une zone de fragilité mécanique. Cette similitude entre col de l'utérus et oropharynx peut expliquer la localisation préférentielle des papillomavirus Humains à ce niveau. (**Schlecht *et al.*, 2005**). De plus, les épithéliums du col utérin et de l'oropharynx dérivent du même feuillet embryonnaire, ainsi les cytokines produites par le tissu tonsillaire

peuvent affecter la transcription des HPV et favorisent la transformation cellulaire (**Ernoux NeufCoeur et al., 2009**). Les trois facteurs de risque connus du cancer de l'oropharynx sont :

- Une consommation régulière de tabac. Ce risque persiste même plusieurs années après l'arrêt du tabac.
- Une consommation régulière d'alcool, surtout en association avec une intoxication tabagique.
- Une infection ancienne, asymptomatique et souvent non connue par le patient par un virus de la famille des papillomavirus humains (**INCA, 2012**).

Un article publié par D'souza en 2007 pour une étude cas-témoins de papillomavirus humain et cancer de l'oropharynx a été en mesure d'obtenir comme résultat que l'association entre le cancer de l'oropharynx et le virus a été fortement augmentée chez les patients non consommateurs du tabac ni d'alcool qui étaient séropositifs pour HPV-16 (**D'souza et al., 2007**).

3.3. Papillomatose respiratoire récurrente (PRR) ou Papillomatose laryngée

Les lésions de la papillomatose respiratoire récurrente (PRR) ou papillomatose laryngée ont l'aspect de tumeurs exophytiques, sessiles ou pédonculées (**Beby-Defaux et al., 2011**). Les HPV isolés dans ces lésions sont des types 6 et 11.

Deux tiers des enfants avec une papillomatose laryngée ont une mère qui avait, pendant la grossesse ou l'accouchement, des condylomes génitaux. Une infection latente à HPV de la muqueuse laryngée explique les récurrences de ces lésions et peut-être les cas observés à l'âge adulte, bien que dans ces cas, une contamination sexuelle soit possible (**Boquet et Bagot., 2004**).

4. Facteurs de risques des cancers des VADS autres que le papillomavirus humain

5.1. facteurs exogènes

5.1.2. Le tabac

le risque de développer un cancer est déterminé par la dose de l'agent carcinogène, la durée d'administration et l'intensité de l'exposition [(**Andre et al., 1995**) ; (**Marandas, 2004**)]. La mortalité par cancers des VADS et de l'œsophage est 7 fois plus élevée chez les fumeurs de cigarettes que chez les non-fumeurs et elle est 3 fois plus élevée chez les ex-fumeurs que chez les non-fumeurs. Comparés aux non-fumeurs, les fumeurs de pipe ou de cigare ont également un risque augmenté de cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx. Par ailleurs, la proportion de décès par cancer des VADS directement attribuables aux

effets du tabagisme chronique est de l'ordre de 89% pour les hommes et de 58% pour les femmes (**Parkin et al., 1994**).

Même si la corrélation entre infection à HPV et cancer chez les non-fumeurs et/ou non-alcooliques semble relativement bien établie, un certain nombre d'études donnent des résultats contradictoires quant à un éventuel effet synergique de l'alcool ou du tabac avec une infection à HPV [(**Schwartz et al., 1998**) ; (**Herrero et al., 2003**)].

5.1.3. L'alcool

Près de 2 milliards d'adultes consomment régulièrement des boissons alcoolisées, avec une consommation quotidienne moyenne de 13 g d'éthanol (environ une boisson). La consommation d'alcool provoque des cancers de la cavité buccale, du pharynx, du larynx, de l'œsophage, du colorectum, du foie et du sein féminin (**Baan et al., 2007**). Le risque de cancer augmente régulièrement avec la dose d'alcool pur contenu dans les boissons alcoolisées, sans effet de seuil (**Hill, 2000**). Le tabac et l'alcool agissent séparément et en synergie ensemble (**Blot et al., 1988**). Le mécanisme exact par lequel l'alcool provoque une transformation maligne des cellules épithéliales des VADS n'est pas encore élucidé (**IARC, 2004**).

5.1.4. facteurs nutritionnels

Les gens qui consomment des quantités suffisantes de fruits et de légumes frais ont un risque réduit de 50% à développer un carcinome épidermoïde de l'oropharynx(OPSCC) (**Warnakulasuriya, 2009**). A l'inverse, l'apport insuffisant de légumes et des fruits accroît le risque de ce cancer. Les effets protecteurs des fruits et légumes peuvent être dû à leurs propriétés anti-oxydantes (**Boussen et al., 2005**).

Les carences vitaminiques, notamment en Vitamine A (Vit A) (**Wald, 1987**), vitamine B (**Meley et Barthelmé, 1987**) et C (**Block et al., 1991**) liées à une alimentation mal équilibrée, faciliteraient la survenue des cancers d'une façon générale.

5.1.5. Facteurs environnementales

L'exposition aux poussières de bois et de cuir dans un cadre professionnel constitue également un facteur de risque reconnu pour les cancers des sinus. Le fait d'être exposé à certaines substances, comme l'amiante, le goudron et le nickel, semble également favoriser leur apparition (**Hans et Brasnu., 2010**).

4.2. Facteurs endogènes

4.2.1 Facteurs génétiques

Un article publié par **Califano et al. en 1996** a porté une idée qui a été confirmée ensuite en 2001 par Forastier et son équipe, que la progression des anomalies génétiques et épigénétiques dans des clones cellulaires est à l'origine des carcinomes malpighiens des voies aéro-digestives supérieures (VADS) [(**Califano et al., 1996**) ; (**Forastier et al., 2001**)].

3.2.2. Immunodépression (particularité des patients HIV positifs)

Un déficit de l'immunité cellulaire prédispose au développement des tumeurs liées aux HPV (**Boquet et al., 2004**) dont la prévalence des infections par ces derniers est accrue chez les patients séropositifs pour le VIH (**Goodman et al., 1987**). Les lésions s'étendent plus vite et le nombre de carcinomes invasifs est plus élevé (**Chopra et Tyring., 1997**). Ainsi, l'infection au HPV est plus persistante chez les personnes séropositives pour HIV (**Zizipho et al., 2010**) Récemment, un certain nombre d'études descriptives ont démontrés une association entre l'infection par le virus du papillome humain et l'acquisition du VIH (**Houlihan et al.,2012**) dont l'impact de ce dernier sur l'immunité cellulaire (destruction des cellules T CD4+) du patient HIV-positif rend le HPV plus dangereux chez ces personnes (**Denny et al., 2012**).

Chapitre 3 : OUTILS MOLECULAIRES DE LA DETECTION DES HPV

1. Détection de l'ADN des papillomavirus humains

La détection des HPV émerge comme un biomarqueur nécessaire pour distinguer les tumeurs de meilleur pronostic et envisager le choix d'un traitement le mieux adapté possible. Elle est indispensable à réaliser au cours d'études visant à comparer l'efficacité des traitements (Beby-Defaux *et al.*, 2011).

Le HPV ne peut pas être cultivé efficacement et la performance des tests sérologiques est médiocre c'est pourquoi le diagnostic de l'infection par papillomavirus humains est presque entièrement basée sur des outils moléculaires (Kleter *et al.*, 1999). Avant l'ère des technologies d'amplification : Southern blot, dot Blot, filtre in situ, et des dosages d'hybridation in situ utilisant des sondes spécifiques du type HPV pour détecter et génotyper le HPV (Melchers *et al.*, 1988). Cependant, l'applicabilité était limitée en raison de la faible sensibilité, de la faible spécificité, ou des deux ou en raison de l'exécution complexe des techniques et du faible potentiel d'implémentation automatisée, ce qui est nécessaire pour traiter un grand nombre d'échantillons cliniques (Maaiké *et al.*, 2005).

De nouvelles techniques d'amplification, telles que la PCR, l'amplification basée sur des séquences d'acides nucléiques et la réaction en chaîne de la ligase, et les progrès dans les techniques anciennes, y compris l'hybridation liquide (par exemple, la capture hybride) (Cox *et al.*, 1995) ont révolutionné le potentiel de dépistage moléculaire du HPV.

1.1. Le test Hybrid Capture 2® (Qiagen/Digene)

Le test Hybrid Capture 2 (HC-II) est un test d'hybridation liquide, relativement rapide, fiable, reproductible, non radioactif, basé sur la formation d'hybrides ARN/ADN capturés à la surface d'une microplaque bien revêtue d'anticorps spécifiques d'hybrides ARN/ADN. Les hybrides immobilisés sont ensuite mis à réagir avec des anticorps conjugués à la phosphatase alcaline spécifiques des hybrides ARN/ADN et détectés avec un substrat chimio-luminescent. Il permet de détecter 18 types de HPV répartis en catégories à haut risque (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) et à faible risque (types 6, 11, 42, 43 et 44). La sensibilité de ce dosage est très similaire à celle de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) [(Clavel *et al.*, 1998); (Peyton *et al.*, 1998); (Riethmuller *et al.*, 1999) ; (Castle *et al.*, 2004)] (figure 7)

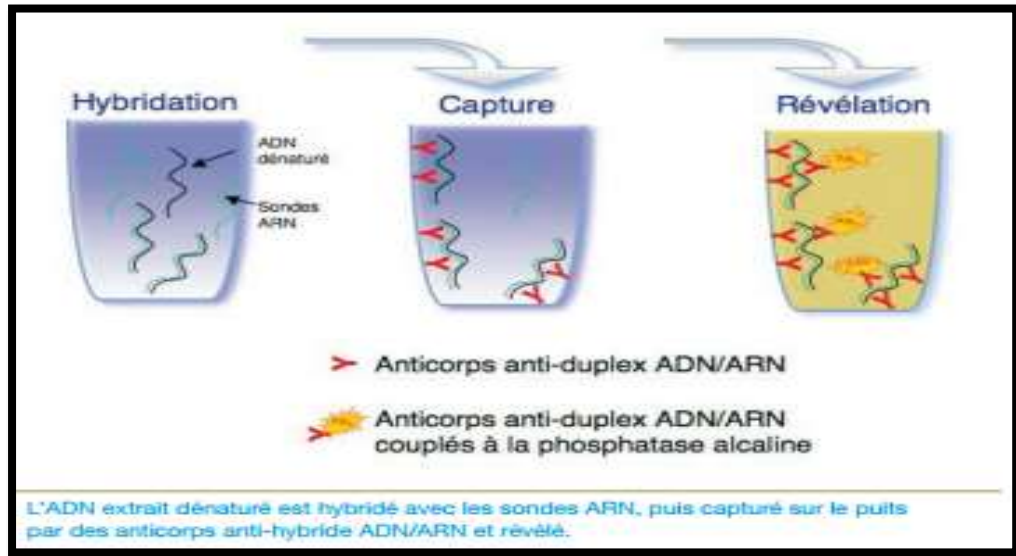


Figure 7: Hybridation en phase liquide (Olliera et Giordanengo , 2008).

1.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR a été mise au point en 1986 par Mullis et collaborateurs ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1993 (Huyben *et al.*, 2009). Elle permet une amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible en utilisant des amorces (primers) consensus, ce qui résout le problème de la faible quantité d'ADN viral présente dans les échantillons biologiques. Par ailleurs, c'est une technique sensible, rapide et partiellement automatisable, adaptable à l'utilisation en diagnostic

Les produits de PCR peuvent être facilement détectés par la technique standard d'électrophorèse en gel d'agarose ou hybridés avec des sondes spécifiques qui seront mis en évidence par une méthode immuno-enzymatique [(Akoum et Venne, 2002) ; (Dalstein *et al.*, 2007)].

1.3. Amplicor HPV Test ® (Roche Diagnostics)

En 2003, une nouvelle technique basée sur la PCR, le Roche AMPLICOR HPV Test, a été lancée. Ce test est capable de détecter 13 types de HR-HPV : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 avec une évaluation simultanée de la présence du gène de β -globine humaine comme témoin positif. Ce test pourrait, en principe, être utilisé à des fins de dépistage (Maaike *et al.*, 2005).

Le principe de ce test est le suivant :

Outils moléculaires de la détection des HPV

- a. Extraction d'ADN des papillomavirus humains et cellulaire en lysant des échantillons dans des conditions de dénaturation à des températures élevées en présence de protéinase K. suivi d'une purification de l'acide nucléique obtenu dans des colonnes avec une membrane à base de silice en utilisant un traitement sous vide.
- b. Amplification par PCR des séquences cibles par des amorces biotinylées formant des amplifiats de 165 pb.
- c. Dénaturation chimique des amplicons pour former un ADN monocaténaire suivi d'une réaction d'hybridation avec des sondes spécifiques sur microplaques
- d. détection colorimétrique à température ambiante dans l'obscurité puis une mesure immédiate de l'absorbance se fait à l'aide d'un lecteur de plaque de micro-puce automatisé (Sandri et al., 2006)

Ces 2 techniques de détection de l'ADN des HPV sont très utilisées pour le dépistage des infections génitales à papillomavirus humain [(Sandri et al., 2006);(Clavel et al., 2001)] (Figure 8).

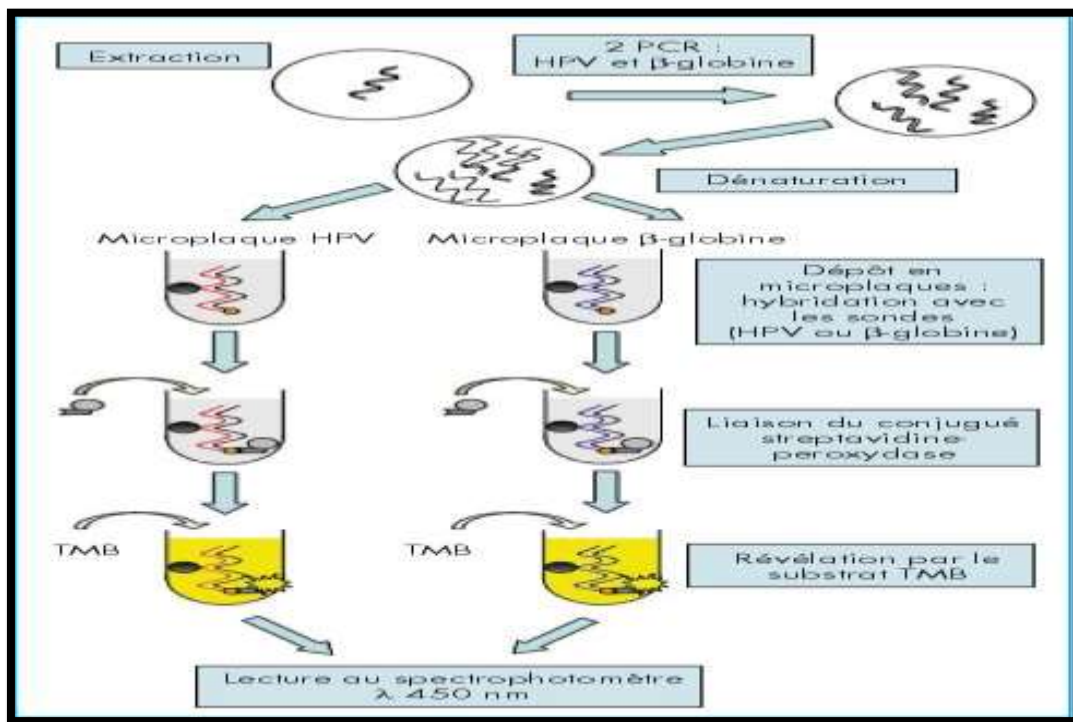


Figure 8 : Principe de Amplificor® HPV Test (Roche Diagnostics)

2. Génotypage des papillomavirus humains

2.1. Génotypage par séquençage

C'est la méthode de référence puisque c'est la séquence complète de la région L1 qui définit les différents génotypes d'HPV. Cependant, en routine, le génotypage est réalisé à partir d'une plus courte séquence, celle des amplicons : région variable suivant le type qui sera alignée avec des séquences de référence des différents génotypes d'HPV. Cette méthode permet de détecter le génotype d'HPV majoritaire, présent dans le prélèvement, mais peut difficilement diagnostiquer les infections multiples (Ollier et Giordanengo, 2008).

2.2. PCR et puces à ADN :

La technologie des puces, en constante évolution, permet le dépôt de nombreux spots d'oligonucléotides sur une surface très réduite. Ainsi, elle permet de multiplier les spots pour un même type HPV, généralement au moins trois par génotype. La lecture est automatisée, à l'aide d'un système de lecture optique (Dalstein et al., 2007).

2.3. Technologie Luminex® :

Un test de génotypage par la technologie Luminex® est commercialisé : HPV Genotyping LQ (Digene®), il permet la détection et le génotypage de 18 HPV de haut risque (Geraets et al., 2009).

Le principe repose sur l'utilisation de microbilles de polystyrène couplées à des sondes oligonucléotidiques spécifiques de chaque génotype d'HPV. 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 2 lasers permettant de détecter simultanément des réactions multiples dans un même tube (Oh et al., 2007) (Figure 9).

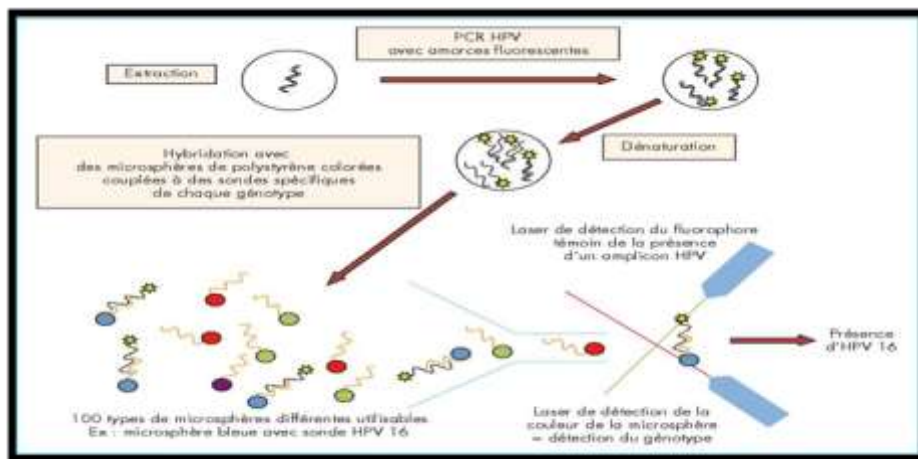


Figure 9 : Principe de génotypage par technique Luminex

3. Quantification de l'ADN HPV : PCR en temps réel

Le principe d'amplification utilisé par la PCR en temps réel est le même que celui de la PCR conventionnelle, c'est le système de détection des produits d'amplification qui diffère : on ajoute au couple d'amorces un marqueur fluorescent du matériel amplifié, soit un intercalant de l'ADN (non spécifique de la cible), soit une sonde spécifique marquée par un fluorophore. La fluorescence émise sera proportionnelle à la quantité de cible présente dans le milieu réactionnel. L'appareillage, couplant un thermocycleur à un fluorimètre, permet alors de mesurer la fluorescence à chaque cycle d'amplification, et de tracer ainsi la courbe exponentielle de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles. La PCR en temps réel possède des avantages considérables par rapport à la PCR conventionnelle : rapidité, disparition de l'étape post-PCR d'analyse des amplifiats, volumes réactionnels réduits (**Dalstein et al., 2007**).

4. Dosage des ARNm E6/E7

Il n'y a pas de consensus concernant la détection des HPV dans les cancers des VADS. La détection des ARNm E6/E7 est vraisemblablement la recherche la plus pertinente pour classer les tumeurs en HPV positif. La détection de l'inhibiteur du cycle cellulaire p16 par immunohistochimie, conséquence de l'expression de la protéine virale E7, est moins spécifique (de 7 à 16 % des tumeurs des VADS sont HPV négatif et p16 positive) mais présente un intérêt en complément à la détection de l'ADN viral (**Beby-Defaux et al., 2011**).

Le rôle des protéines oncogènes E6 et E7 est clairement démontré dans la carcinogenèse induite par les papillomavirus c'est pourquoi la détection des ARNm E6-E7 peut être un marqueur intéressant pour apprécier le risque d'évolution vers une lésion cancéreuse.

4.1. Le kit NucliSENS Easy Q® HPV

Utilise la technologie NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) dont le principe repose sur une amplification isotherme utilisant l'action simultanée de trois enzymes (transcriptase inverse, ARN polymérase et RNase) (**Riethuller et al., 2004**). L'amplification des ARNm est alors détectée en temps réel grâce à des sondes fluorescentes spécifiques. Ce kit permet la détection qualitative des ARNm E6/E7 de 5 papillomavirus de haut risque séparément : HPV 16, 18, 31, 33 et 45. L'avantage de cette technique est que toutes les étapes sont réalisées dans un même tube ce qui limite le risque de contamination [(**Burger et al., 2010**) ; (**Dessaigne, 2011**)].

4.2. Le Kit Aptima® HPV Assay

Permet la détection des ARNm de 14 HPV à haut risque oncogène sans les géotyper. Ce test implique trois étapes principales, qui se déroulent dans un seul tube: la capture de la cible; Amplification de la cible par la technique d'amplification TMA (Transcription Mediated Amplification) (Kacian *et al.*, 1995) et détection des produits d'amplification (amplicon) par la technique HPA (Hybridization Protection Assay) qui utilise une sonde ADN spécifique marquée avec un détecteur moléculaire émettant un signal chimioluminescent : l'ester d'acridinium (Arnold *et al.*, 1989).

L'avantage de ces deux techniques est que toutes les étapes sont réalisées dans un même tube ce qui limite le risque de contamination (Burger *et al.*, 2010).

5. La détection de la protéine p16 :

P16 est un inhibiteur de la kinase dépendant de la cycline qui inhibe la phosphorylation du pRb et bloque la progression du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G1 à S. La perte de l'expression de p16 par délétion, mutation ou hyperméthylation est fréquente dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (HNSCC). Cependant, l'inactivation fonctionnelle de pRb par la protéine E7 du HPV entraîne une surexpression de p16, ce qui en fait un marqueur substitutif pour le VPH (Kumar *et al.*, 2008).

PARTIE PRATIQUE

MÉTHODOLOGIE

1. Etude du profil épidémiologique des cancers cutanés dans la région de Tlemcen

1.1. Objectifs

1.1.1. Objectif principal

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

1.1.2. Objectifs épidémiologiques

Etudier la répartition des cancers des VADS :

- ✓ Par année sur une période de 2012 à 2016
- ✓ Selon l'âge des patients
- ✓ Selon le sexe des patients
- ✓ Selon la localisation de la tumeur

1.2. Type de l'étude

Cette partie de travail se focalise sur une étude rétrospective descriptive s'étalant sur une période déterminée de cinq ans (2012 à 2016), limitée autour d'une aire géographique (wilaya de Tlemcen).

1.3. Population cible

Tous les patients résidents à la wilaya de Tlemcen, ayant présenté un cancer d'une (ou de plusieurs) zones des voies aérodigestives supérieures diagnostiqué et/ou pris en charge au CHU de Tlemcen entre le 1 janvier 2012 et le 31 décembre 2016.

1.4. Limite de l'étude

Dans notre étude, nous n'avons pas pris en considération les facteurs de risque de cancers des VADS (la consommation d'alcool ou du tabac ou l'agent viral HPV) vue de non disponibilité de ces informations au niveau du service.

1.5. Source d'information

L'ensemble des données a été fournis au niveau du service de l'épidémiologie de CHU de Tlemcen.

1.6. Analyse des données

L'analyse statistique a été configurée sur Microsoft Excel® 2007, les tableaux et les graphiques ont été configurés sur Microsoft Excel® 2013.

2. Recherche d'ADN d'HPV à partir des cancers des VADS par deux techniques de détection moléculaire

2.1. Objectif

L'objectif de cette étude est de détecter l'ADN d'HPV à partir des tumeurs des voies aérodigestives supérieures par deux méthodes de détection moléculaire d'ADN d'HPV :

- ✓ Amplicor HPV Test ® (Roche Diagnostics)
- ✓ PCR conventionnelle

2.2. Lieu d'étude

Le déparaffinage de biopsie et la recherche d'HPV par la technique du test Amplicor® HPV et par la technique de PCR conventionnelle ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE), ainsi que le laboratoire de biologie moléculaire (faculté de SNV-STU).

2.3. Matériel et méthodes

2.3.1. Prélèvement

Des prélèvements tissulaires d'une collection de LAMAABE de Docteur Nahet Amira récoltés sous forme de pièces biopsiques à partir du service d'anatomopathologie de CHU de Tlemcen et des anatomopathologies privées ont été utilisés pour réaliser cette étude.

Une biopsie consiste à retirer un échantillon de tissu cellulaire pour l'examiner. Elle est réalisée par un chirurgien au bloc opératoire ou par un médecin spécialiste.

Les tissus sont mous, il faut donc leur donner une consistance solide. C'est le principe de l'inclusion en paraffine qui consiste à infiltrer et à enrober les tissus à examiner avec de la paraffine (**Tabet Aoul, 2016**). L'inclusion est précédée de deux étapes essentielles : une fixation afin de conserver les structures des tissus et éviter l'autodigestion et la putréfaction des tissus, et une étape de déshydratation qui consiste à faire pénétrer la paraffine au sein du tissu (**Sabri, 2016**).

2.3.2. Déparaffinage des tissus fixés et inclus en paraffine

Dans chaque tube contenant les coupes tissulaires, 900 µl de toluène, et 100 µl d'alcool (éthanol) 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 de 12000 tours/min. Après centrifugation le surnageant est jeté.

Un volume de 900 µl d'éthanol absolu est ensuite ajouté au culot suivi d'une agitation manuelle pendant 10 min et une centrifugation pendant 5min à vitesse de 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.

Les culots déparaffinés obtenus vont être suspendus dans l'eau ultra pure et utilisés dans la recherche d'ADN d'HPV.

2.3.3. Détection de l'ADN d'HPV par la technique Amplicor HPV Test ®

👉 Mode opératoire

a. Extraction d'ADN

- Etiqueter un tube eppendorf de 1.5 ml pour chaque échantillon et témoin.
- Ajouter 80 µl du tampon ATL dans chaque tube.
- Vortexer chaque échantillon et témoin pendant 10 secondes et ajouter 250 µl de chacun aux tubes correspondants.
- Ajouter 20 µl de la protéinase K (PK) dans chaque tube, boucher les tubes, mélanger au vortex pendant 15min.
- Dissoudre le CAR lyophilisé dans le tampon d'élution (AVE) puis vortexer 10 secondes.
- Préparer le tampon actif en ajoutant l'ARN protecteur (CAR) reconstitué à AL (pour 1ml de CAR ajouter 100ml de tampon AL).
- Ajouter 250 µl du tampon actif dans chaque tube, puis incuber à 70°C pendant 15 min.
- Une fois que l'incubation est terminée, ajouter 300 µl d'éthanol. Laisser incuber à température ambiante pendant 5 min, puis mélanger dans la centrifugeuse par impulsion à la vitesse de rotation maximale.
- Retirer les Colonnes QIAamp® MinElute® (CLM), et placée chacune dans un tube dit rallonge de colonne.
- Transférer le lysat présent dans chaque tube dans le CLM correspondant. Laisser incuber pendant une minute.
- Centrifuger les tubes + CLM par impulsion à une vitesse maximale pour que les impuretés descendent et l'ADN se fixe sur le filtre en silice.
- En utilisant un aspirateur, aspirer les déchets qui sont passés dans le tube.
- Ajouter 30 ml d'éthanol au tampon de lavage AW2.
- Ajouter 700 µl du mélange AW2 + éthanol dans chaque CLM. Laisser incuber 1 minute puis centrifuger et aspirer les déchets passés dans le tube à déchets.

-Ajouter 700 μ l d'éthanol dans chaque CLM. Laisser incuber 1 minute. Centrifuger et éliminer les impuretés par aspiration.

-Centrifuger 3 minutes à vitesse maximale. Ouvrir les tubes et laisser sécher 15 minutes, pour que l'éthanol s'évapore.

-Jeter les tubes à déchets et mettre chaque CLM dans des tubes eppendorf.

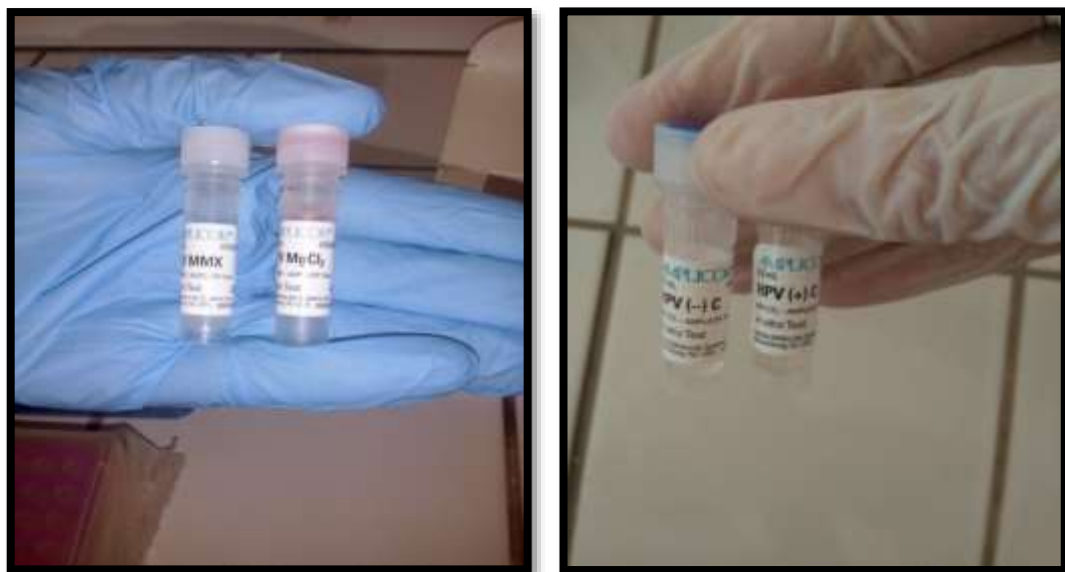
-Ajouter 120 μ l d'AVE (tampon d'éluion) dans chaque CLM. Laisser incuber à température ambiante pendant 5 min puis centrifuger à la vitesse de rotation maximale pendant 1 min. l'eau est neutre, elle permettra donc la libération de l'ADN dans l'eppendorf.

-Retirer puis jeter les CLM des ensembles et boucher les tubes eppendorfs.

b. Amplification

-préparer le mélange réactionnel actif : 22.32 μ l du MMX (mélange contenant de la taq polymérase, amorces biotinylés pour l'ADN HPV-HR et pour l'ADN de β globine, dNTPs et eau) + 2.68 μ l du $MgCl_2$ (contenant un colorant rose afin de confirmer visuellement son ajout au MMX). Sachant que pour 1 tube, on prépare 22.32 μ l de MMX + 2.68 μ l de $MgCl_2$

Déposer 25 μ l de ce mélange dans des tubes puis ajouter 25 μ l de chaque extrait et le témoin dans le tube approprié en changeant chaque fois l'embout de la micropipette (*Figure 10*)



(a) : les réactifs MMX, $MgCl_2$

(b) : les témoins HPV+, HPV-

Figure 10 : les réactifs du mélange réactionnel (a) et les deux témoins d'HPV (b)

-Placer les extraits et témoins préparés dans le plateau d'amplification puis placer celui-ci dans le bloc du thermocycleur. Programmer le thermocycleur (programme HPV Amplicor) (**figure 11**) :

- 50°C → 2 minutes pour l'activation de l'enzyme
95°C → 9 minutes pour la dénaturation initiale.
95°C → 30 secondes pour dénaturation. }
54°C → 45 secondes pour l'hybridation } 40 cycles
72°C → 30 secondes pour l'élongation }
72°C → 10 minutes pour l'élongation finale
- Une étape à 4°C à l'infinie peut être ajouté.



Figure 11 : Thermocycleur programmé pour l'amplification d'HPV

La β -globine : c'est un gène cellulaire attestant la qualité de l'échantillon (cellularité suffisante)

c. Détection

-Dès qu'on retire les échantillons et les témoins, 50 μ l de dénaturant (DN) sont ajoutés dans les tubes. Laisser 10 minutes à température ambiante pour permettre une dénaturation complète.

-Prendre le nombre adéquat de barrettes de microplaque et les placer dans le cadre de la microplaque en intercalant les barrettes de HPV et celles de β globine

Remarque : les barrettes utilisées sont déjà revêtues des sondes d'ADN pour l'HPV et des sondes d'ADN pour la β globine.

-Ajouter dans chaque puits de la microplaque 100 μ l du milieu favorisant l'hybridation (HPV-HYB).

-Déposer 25 μ l d'amplicon dénaturé de chaque échantillon dans les puits (25 μ l dans les puits d'HPV et 25 μ l dans les puits de la β globine). 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) (**Figure 12**). Couvrir la microplaque avec son couvercle. Laisser incuber 1 heure à 37° C afin de favoriser l'hybridation (**Figure 13**)

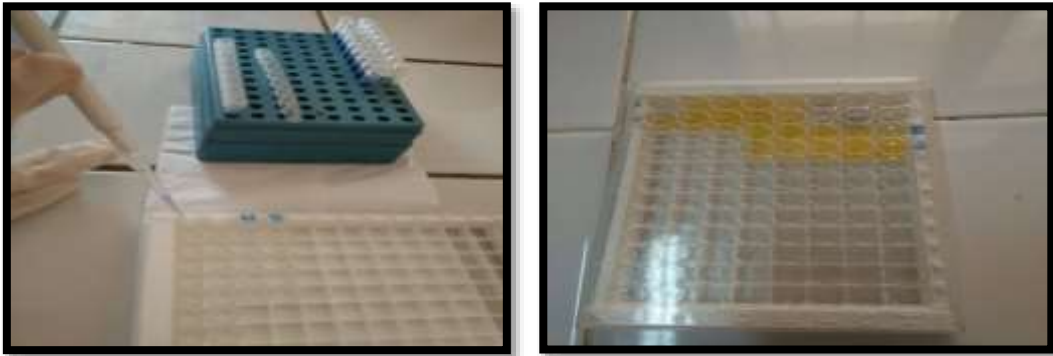


Figure 12: virage de couleur vers le jaune après addition des réactifs et les extraits dans les puits de la microplaque



Figure 13: Placement des barrettes dans l'incubateur programmé

- Préparer la solution de lavage : mettre 1 volume de WB (concentré 10x de lavage) à 9 volumes d'eau distillée (sachant que pour chaque barrette 40 ml de solution de lavage est préparé).
- Rincer la microplaque 5 fois avec la solution de lavage.
- Vider le contenu de la microplaque puis remplir chaque puits de la microplaque avec la solution de lavage. Laisser tremper pendant 30 secondes. Vider ensuite la microplaque et la tapoter pour l'égoutter. Répéter cette étape encore 4 fois. Laisser sécher à la température ambiante.
- Ajouter 100 µl de AV-HRP (conjugué avidine peroxydase de raifort) dans chaque puits de la microplaque. Couvrir la plaque avec son couvercle. Laisser incuber 15 min à 37°C.

Remarque : l'avidine conjuguée à la peroxydase de raifort assure la liaison de la biotine contenu dans les amplicons biotynilés (amorces biotynilés).

-Préparer le substrat actif en mélangeant 2 ml de substrat A (SUB A) et 0.5 ml de substrat B (SUB B)

-Ajouter 100 µl de substrat actif dans chaque puits. Laisser la coloration se développer pendant 10 minutes à température ambiante dans l'obscurité

-Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (acide sulfurique). L'absorbance est mesurée à 450 nm par le spectrophotomètre de microplaque. Suivant la notice de Roche diagnostic, les valeurs A_{450} HPV et A_{450} β globine du témoin négatif doivent être inférieures à 0.2, tandis que celles du témoin positif doivent être supérieures à 1, et pour les extraits, toute valeur de l'absorbance supérieure ou égale à 0.2 désigne un résultat positif. Toute valeur de l'absorbance inférieure à 0.2 désigne un résultat négatif (**Roche Diagnostic, 2006**).

Remarque

Au cours de ce travail l'étape d'extraction du kit Amplicor n'a pas été réalisée, vu le manque de certains matériel, les étapes suivantes ont été réalisées à partir des extraits d'ADN d'une collection de LAMAABE de docteur Nahet Amira

2.3.4. Détection de l'ADN d'HPV par la technique de PCR conventionnelle

☞ Mode opératoire

a. Extraction de l'ADN d'HPV par la technique Salting Out

✓ Principe

C'est une méthode d'extraction d'acide nucléique basée sur l'utilisation du solvant non organique le NaCl. Elle permet une déshydratation suivie d'une précipitation d'ADN par de l'éthanol puis repris en suspension.

✓ Protocole

-Après l'étape du déparaffinage, 200 µl de tampon de lyse plus 20 µl protéinase K sont ajoutés. Les tubes sont ensuite vortexés.

- Incuber les tubes dans un bain marie à 56 °C pendant une nuit.

- Ajouter 200 µl de NaCl 6M dans chaque tube.
- centrifuger 10 minutes à 4000 tours.
- Récupérer 500 µl de surnageant dans un autre tube, et y ajouter 1000 µl d'éthanol absolu froid (-20°C). Mélanger et centrifuger à 14000 tours pendant 8 minutes.
- Ensuite jeter le surnageant et garder le culot et y ajouter 500 µl du tampon de lavage (l'éthanol 70%). Jeter le surnageant. et laisser le culot sécher à température ambiante.
- Ajouter 20 µl d'eau ultra pure et vortexer le mélange (ou ajouter 20 µl du Tampon TE pour la conservation à -20 °C).

b. Contrôle de qualité d'ADN par spectrométrie

- Diluer les tubes contenant l'ADN au 1/100 ; ensuite le spectrophotomètre doit être ajusté avec le blanc (cuve d'eau ultra pure).
 - Les échantillons ont été versés dans la cuve, tube après l'autre.
 - Les lectures étaient effectuées à 260 nm. La même opération est réalisée à 280nm.
- Le rapport des $A_{260/280}$ optimal, garant de la pureté de l'extraction, est situé entre 1,8 et 2.

c. L'amplification de l'ADN cible par PCR conventionnelle

✓ Principe

La quantité d'ADN récupéré lors de l'extraction est trop faible pour être considérée comme un échantillonnage représentatif. Afin de comparer ou d'étudier l'ADN extrait, celui-ci doit donc être amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (**Huybens *et al.*, 2009**).

Protocole

Pour une réaction, le mélange réactionnel (*figure 14*) de 45 µl est constitué de :

- 10 µl de mix de Qiagen (MQ) qui est constitué de tampon de polymérase, 1x MgCl₂ (1.5millimol), les dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates) à 0,2 millimol.
- 1 µl de l'amorce MY11
- 1 µl de l'amorce MY09
- 0.2 µl de la hot star Taq polymérase
- 32.8 µl d'eau distillée stérile pour obtenir un volume final de 45µl.

Pour plusieurs réactions, il faut multiplier par le nombre d'échantillons.



Figure 14 : les réactifs pour réaliser de la PCR

-Dans des tubes en barrettes numérotés, on met 45 μ L du mélange réactionnel. Ensuite 5 μ l de chaque extrait d'ADN est ajouté en respectant l'ordre des tubes (l'ADN est laissé en dernière étape, pour des raisons de précaution de contamination). Placer les échantillons et les témoins dans le bloc du thermocycleur Programmé comme suit (*figure 15*) :

- 95°C \longrightarrow 15 minutes pour la dénaturation initiale.
 - 95°C \longrightarrow 30 secondes pour la dénaturation.
 - 53°C \longrightarrow 45 secondes pour l'hybridation.
 - 72°C \longrightarrow 1 minutes pour l'élongation
- } 40 cycles
- (Permettre le fonctionnement de la Hot star « la Taq polymérase ».
- 72°C \longrightarrow 5 minutes pour l'élongation finale.

Une étape à 4°C à l'infinie peut être ajouté.

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



Figure 15 : Placement des tubes dans le thermocycleur programmé pour l'amplification d'HPV

d. L'électrophorèse sur gel d'agarose (1.5%)

✓ Objectif

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés en fonction de leur longueur (taille) par électrophorèse sur gel d'agarose. Il s'agit d'une analyse qualitative.

✓ Principe

L'ADN chargé négativement et sous un champ électrique migre vers l'anode à travers les mailles de l'agarose. Les molécules d'ADN se séparent selon leurs tailles : plus elles sont grandes, plus elles sont retenues et, moins elles migrent vite (**Somma et Querci, 2005**).

✓ Protocole

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée de façon standard pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN.

- préparation du tampon TAE (0.5X)

Le TAE est une solution tampon de migration utilisée en électrophorèse sur gel d'agarose des acides nucléiques. Il est composé de Tris, d'acide acétique et d'EDTA, généralement à pH 8,0. Le tampon TAE (0.5X) est préparé à partir de la solution mère TAE (10X).

- préparation du gel d'agarose (1,5%) dans le tampon TAE (0.5X)

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 microonde (agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange).
- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devient possible de saisir le flacon à main nue (environ 60°C).
- Avant de le faire couler, ajouter 10 µl du BET (Bromure d'ethidium) dans 50 ml du gel.

REMARQUE : Le Bromure d'Ethidium (BET) est fortement cancérigène. Il doit être manipulé avec précaution

- Couler le gel dans le plateau de moulage (**figure 16**), équipé de peignes qui permet de marquer l'empreinte des puits de dépôt de l'ADN, en évitant les bulles d'air
- Laisser le gel se solidifier à température ambiante



Figure 16: l'écoulement du gel d'agarose (1.5%) dans le plateau de moulage équipé de peigne

- Retirer alors délicatement et bien verticalement les peignes.
- Placer le gel dans la cuve à électrophorèse, les puits disposés côté cathode.
- Verser le tampon TAE (0,5×) dans la cuve à électrophorèse jusqu'à ce que le gel soit recouvert de quelques mm de tampon.
- Mélanger 6 μ l d'échantillon avec le tampon de charge (bleu de bromophénol +glycérol+le xylène cyanol) sur une boîte de pétrie en changeant l'embout de la micropipette à chaque prélèvement (*figure 17*)



Figure 17 : le Tampon de charge déposé dans une boîte de pétrie

- Remplir les puits (**figure 18**) en faisant attention à ne pas déchirer le fond du gel.



Figure 18 : le remplissage des puits du gel d'agarose

- Déposer 5 μ 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 15 min.

e. Lecture du gel d'agarose :

Après migration, placer le gel sur une table à UV (ou transilluminateur) (**figure 19**) pour visualiser les différentes bandes d'ADN. L'utilisation d'une visière de protection est fortement conseillée afin de limiter l'exposition des yeux et la peau au rayonnement ultraviolet.

Le résultat obtenu sur le gel peut être photographié à l'aide d'un appareil photo ou grâce à l'utilisation d'un logiciel conçu pour l'analyse de gel. Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose représentent une analyse qualitative de l'échantillon. Les résultats positifs sont caractérisés par la présence de bandes, ce qui témoigne de l'obtention de fragments. Le témoin positif aide à identifier le poids moléculaire attendu. Aucune bande ne doit être visible pour le témoin négatif de la PCR et du témoin négatif de l'extraction. Dans ce cas, cela témoigne de l'absence de contamination lors de la PCR et de l'extraction



Figure 19 : Lecture du gel d'agarose sur la table UV

RÉSULTATS

II. RESULTATS

1. Résultats de l'étude du profil épidémiologique des cancers des VADS dans la Wilaya de Tlemcen

Cette étude portée sur l'analyse des données statistiques des cancers des voies aérodigestives supérieures entre janvier 2012 jusqu'à décembre 2016 fournis par le service de l'épidémiologie du CHU de Tlemcen, nous a permis d'estimer la place des cancers de VADS dans la Wilaya de Tlemcen ainsi de contribuer à l'évaluation de ces cancers en fonctions de certains paramètres.

1.1. Répartition des cancers des VADS par année

Neufs cent soixante-six (966) cas de cancers des VADS ont été enregistrés entre 2012 et 2016 dans la Wilaya de Tlemcen. Le taux des cancers des VADS varie pendant les cinq années d'étude. Un pic a été enregistré en 2014 avec 35.20%. Une forte diminution a été décrite en 2016 avec un taux de 6,73% (**figure 20**).

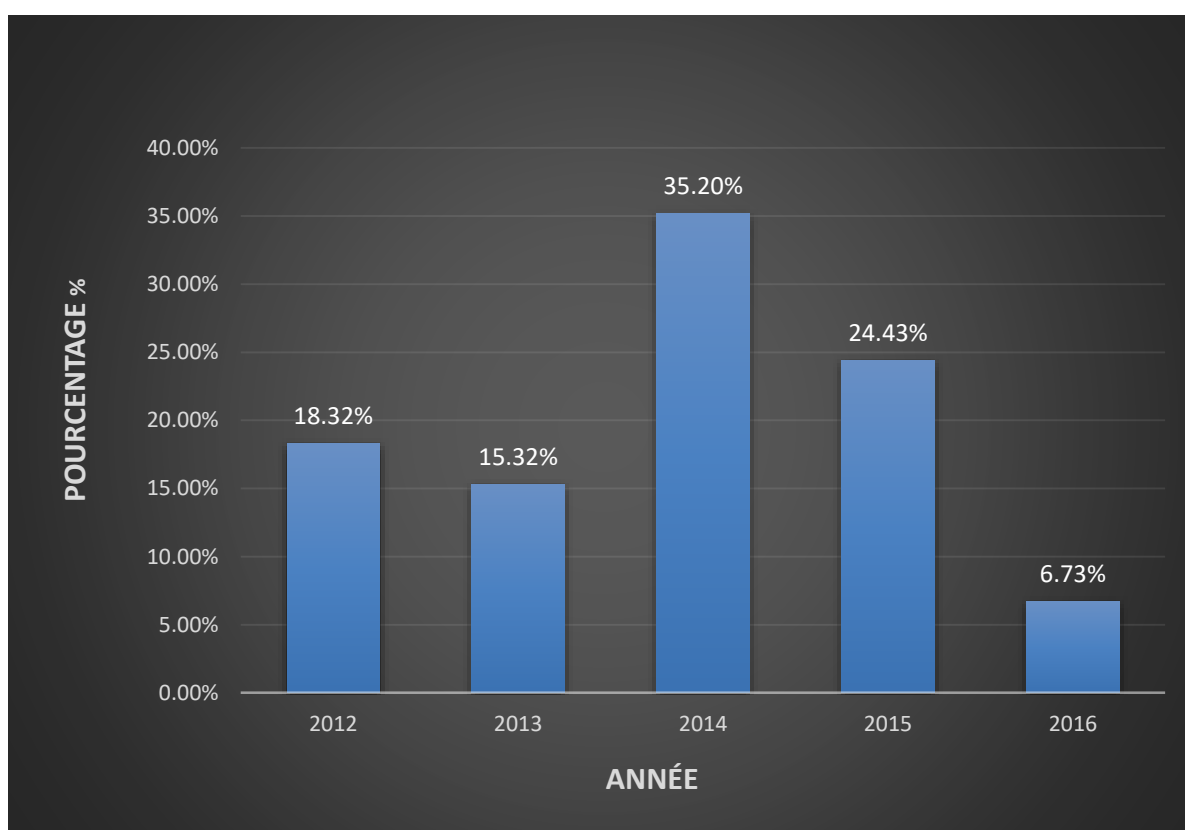


Figure 20 : Répartition des cancers des VADS dans la Wilaya de Tlemcen entre 2012 et 2016

1.2. Répartition des cancers des VADS selon les tranches d'âge

L'âge de notre population d'étude variait entre 1 et 99 ans avec un âge moyen de 50 ans. Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 21**. Une augmentation continue s'observe selon l'âge, où plus de la moitié des cancers des VADS a été observée chez les patients âgés de 60 ans et plus (57,76%) avec un pic dans la tranche d'âge [60-69] par 29.40%. Ce qui a été constaté, aussi, c'est l'enregistrement des cas de cancers des VADS chez les patients de moins de 30 ans avec un pourcentage de 3,11%

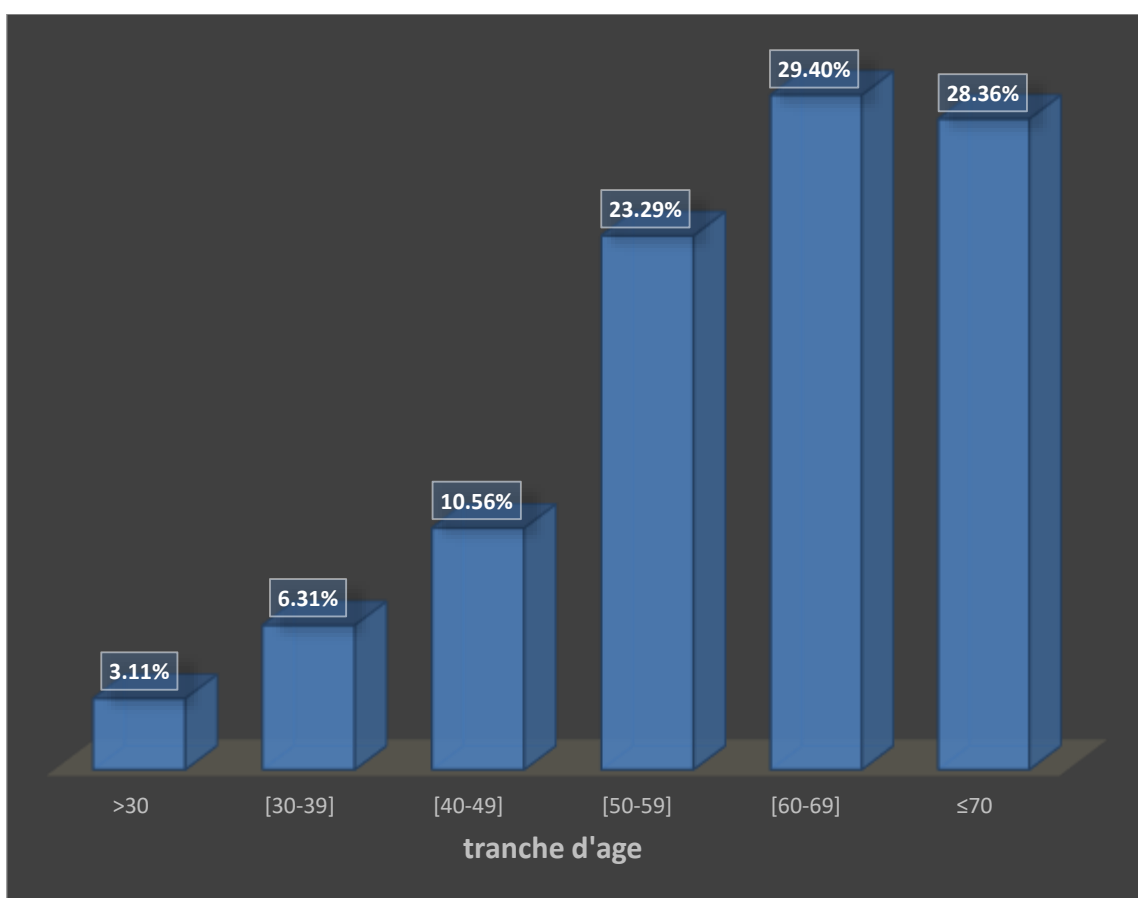


Figure 21 : Répartition des cancers des VADS selon les tranches d'âge

1.3. Répartition de cancers des VADS selon le sexe

Les cancers de VADS sont nettement plus représentatifs dans le sexe masculin avec un pourcentage de 75% (3/4) contre 25% chez les femmes (1/4) avec un sexe ratio de 3.06 (**figure 22**).

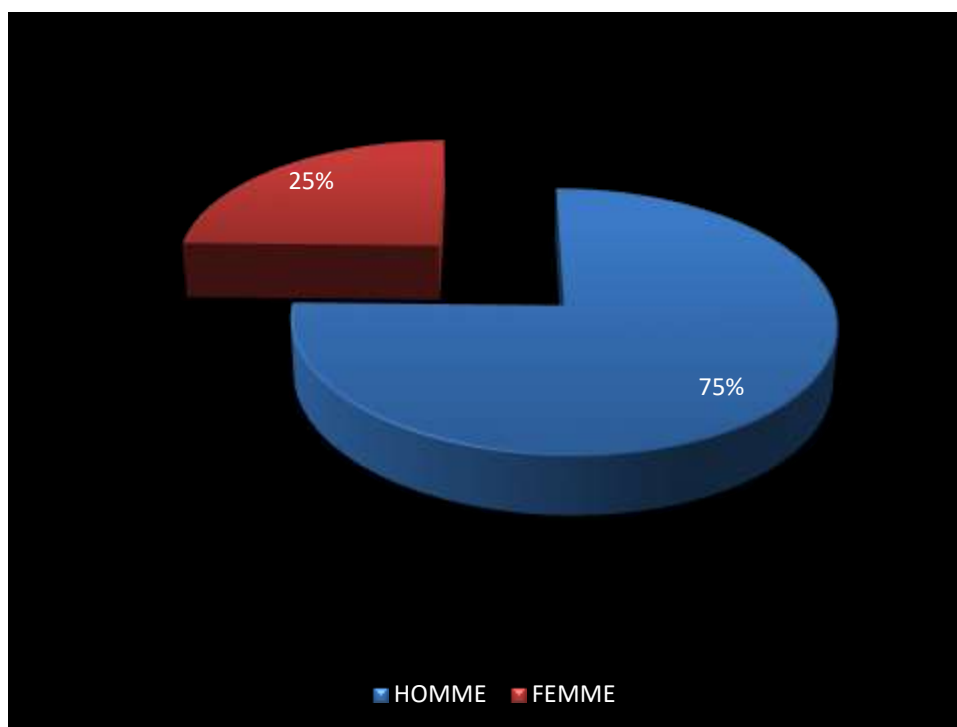


Figure 22 : Répartition de cancers des VADS selon le sexe

1.4. Répartition de cancers des VADS selon la localisation des tumeurs

Les cancers des voies aérodigestives supérieures regroupent l'ensemble des cancers du pharynx, du larynx et de la cavité orale. Selon notre étude, le cancer de la cavité orale représente le cancer le plus fréquent avec un pourcentage de 66.25%, suivi par le cancer de pharynx avec un pourcentage de 22.08% et enfin le cancer de larynx avec le plus faible pourcentage enregistré (11.80%) (figure 23).

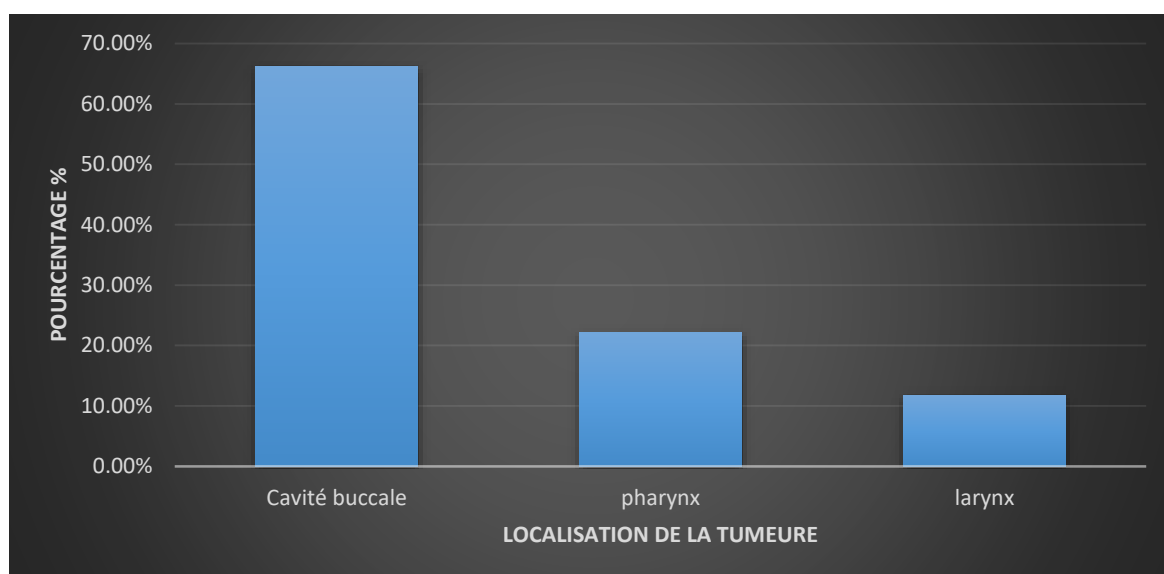


Figure 23 : Répartition de cancers des VADS selon la localisation des tumeurs

Le cancer de pharynx englobe plusieurs types de cancers représentés dans la **figure 24** : 73.58% (156/212) est le pourcentage enregistré pour le cancer de rhinopharynx (cavum), c'est le plus fréquent. Suivis par le cancer de l'oropharynx qui est en deuxième position avec 2.48% (24/212). Les pourcentages des cancers des fosses nasales et celui de l'hypopharynx (sinus) enregistrés sont respectivement 1.55% et 1.76%.

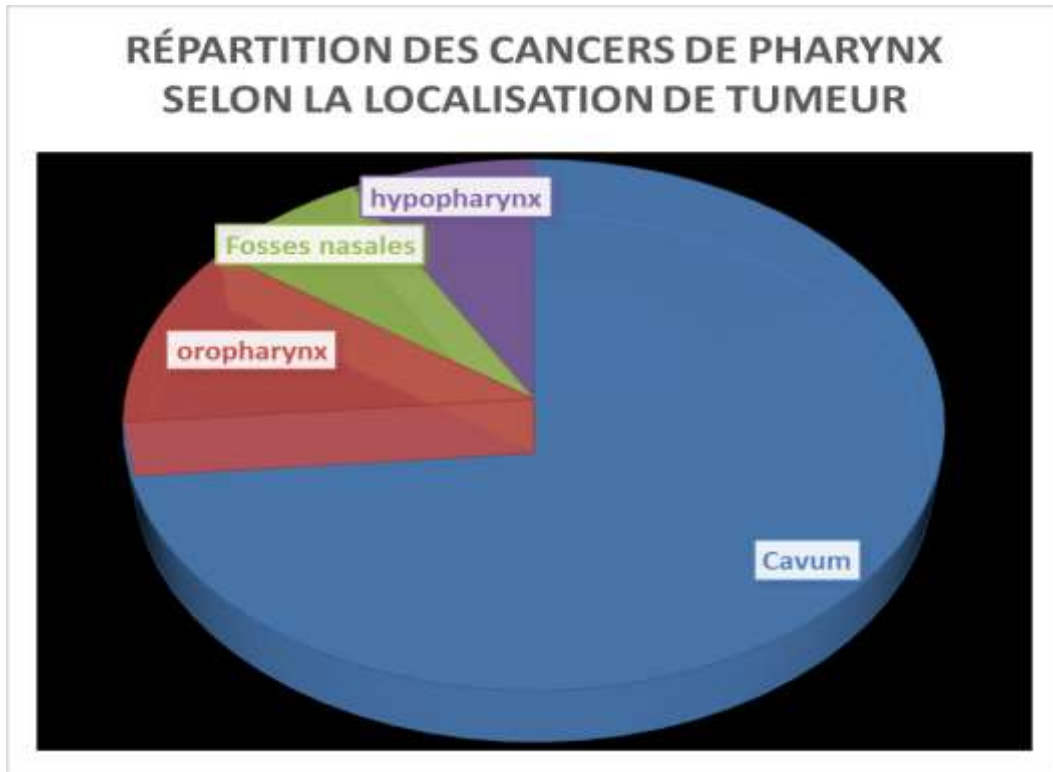


Figure 24: Répartition de cancers de pharynx selon la localisation des tumeurs

2. Résultats de la recherche d'HPV à partir des cancers des VADS

L'extraction d'ADN par la technique salting out nous a permis de visualiser la méduse d'ADN (**figure 25**).



Figure 25 : la méduse d'ADN obtenu après extraction

Le contrôle de la qualité de l'ADN par spectrophotométrie a confirmé la bonne qualité de l'ADN car le ratio 260nm/280nm était compris entre 1,8 et 2 pour la majorité des prélèvements.

Le test Amplicor et la révélation sur gel d'agarose (**figure 26**) indiquant la présence de bandes pour les résultats positifs, étaient cohérents avec les résultats de Docteur **Nahet Amira** réalisés dans un laboratoire à l'étranger et qui ont donné les résultats suivants (**Tableau 6**).



Figure 26 : profil d'électrophorèse après l'amplification par PCR.

(M : marqueur de poids moléculaire, E1, E2, E3 : extraits d'ADN d'HPV-HR, T+ : témoin positif, T- : témoin négatif)

Tableau 6 : Amplification des HPV dans les cancers des VADS de différente localisation (Nahet et al., 2016)

Localisation	Nombre	Age moyen (extrêmes) en année 55(40-70)	Histo-pathologie	HPV positifs	%
Cancer des amygdales 10 hommes	10		4 lymphomes	1	10
			5 CE	0	
			1 ADC	0	
Cancer du larynx 8 hommes /4 femmes	12		5 CE	0	
			7 ADC	0	
Cancer des lèvres 4 femmes	4		3 CE	0	
			1 ADC	0	

Cette étude a porté sur une recherche d'HPV dans des cancers des VADS. Dont une forte dominance été marqué chez le sexe masculin avec 69.23% par rapport au sexe féminin (30.77%). L'âge moyen des patientes dans cette étude était de 55 ans, avec des extrêmes d'âge de 40 et 70 ans.

Parmi les 26 prélèvements :

- 38% (10/26) prélèvement des amygdales dont 4 lymphomes, 5 carcinomes épidermoïdes et 1 adénocarcinome pris de sexe masculin ;
- Et 46% (12/26) de larynx avec 67% (8/12) à partir des hommes et 33% (4/12) sont des femmes. Dont 58% (7/12) sont de type adénocarcinomes (ADC) et 42% (5/12) sont des carcinomes épidermoïdes (CE) ;
- 15% (4/26) de prélèvements des lèvres dont trois quart (3/4) sont des carcinomes épidermoïdes et un quart (1/4) est un adénocarcinome, ces prélèvements ont été pris tous de sexe féminin.

-La présence d'un seul HPV a pu être démontrée, ce qui représente 4% (1/26) des cancers des VADS avec une localisation au niveau de l'oropharynx (amygdales).

DISCUSSION

Discussion

1. Discussion du profil épidémiologique des cancers des VADS dans la wilaya de Tlemcen

Cette étude nous a permis d'évaluer le développement des cancers de VADS entre 2012 jusqu'à 2016. Une fréquence des cancers des VADS a été enregistrée en 2014 suivie d'une forte diminution décrite en 2016 avec un taux de 6,73%.

Après traitement des résultats, une fréquence des cancers des VADS été observée chez les patients âgés de 60 ans et plus, où plus de la moitié a été observée dans cette tranche de population (57,76%). **Rakotoarison et al., (2010)** situe la survenue des cancers des VADS autour de la soixantaine.

La prédominance masculine des cancers des VADS été nettement marquée dans notre étude avec 75.36%. Ce qui concorde avec les résultats de la littérature. Les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) survenant principalement chez les hommes (**Bessede et David, 2002**)

Une fréquence des cancers de la cavité buccale de 66.25% a été détectée de la totalité des cancers des VADS suivi par le cancer du pharynx. Les cancers de la cavité buccale et du pharynx sont parmi les plus fréquents dans le monde et occupent la 11ème place dans la population mondiale, ce qui correspond à 3% des cas de cancer incidents dans le monde (**Ferlay et al., 2010**), ainsi, d'après une analyse systématique réalisée par Kreimer et ces collaborateurs de 60 études éligibles de 26 pays, Cinq mille quarante-six (5046) cas de carcinome épidermoïde (SCC) ont été identifiés. Ceux-ci incluaient 2 642 cas de la cavité buccale, 969 cas de l'oropharynx et 1 435 cas du larynx (**Kreimer et al., 2005**). A l'échelle mondiale, les principaux facteurs de risque sont la consommation de tabac et d'alcool (**IARC, 2004**)

Cent cinquante six (156) cas de cancers du nasopharynx (cavum) (qui appartient au cancer du pharynx) ont été enregistrés sur la période d'études, correspondant à 16.15% des cancers des VADS. Il représente le deuxième cancer des VADS dans notre série, après le cancer de la cavité buccale.

Sur le plan épidémiologique, le cancer du nasopharynx est un cancer spécifique qui se distingue par sa répartition géographique en zone à haut risque, zone à risque intermédiaire et

zone à faible risque, et ses distributions ethniques particulières (Loriot *et al.*, 2009). L'incidence du cancer du nasopharynx en Algérie est intermédiaire, elle est de 5.5/105 habitants pour le sexe masculin et de 3/105 habitants pour le sexe féminin (Salhi 2009). 446 cas de cancer du nasopharynx ont été notifiés à Sétif, sur une période de 10 ans, dont 70% des cas sont observés chez des patients de sexe masculins, faisant de ce cancer le troisième cancer masculin (Le cancer à Sétif 1986-2010). En Tunisie, Le cancer du nasopharynx représente le premier cancer des voies aéro-digestives supérieures (VADS) (Maalej, 1995). Le cancer du cavum est rare en Europe de l'Ouest et au États-Unis, mais dans le monde, il est le plus fréquent si on parle des cancers des voies aéro-digestives supérieures (Kochbati *et al.*, 1997).

2. Discussion des résultats de Recherche d'HPV à partir des cancers des VADS

Concernant la recherche d'ADN d'HPV, les résultats obtenus dans cette étude, montre que l'importance de la présence du papillomavirus humain dépend de la localisation de la tumeur. Parmi les dix prélèvements des amygdales (10/26), l'HPV est présent dans 10% (1/10) de ces prélèvements dont le type histologique de la tumeur est un carcinome épidermoïde. Cela pourrait être expliqué du fait que les amygdales sont riches en îlots lymphoïdes. Ces organes lymphoïdes comportent comme le col de l'utérus, de profondes invaginations (cryptes) qui favoriseraient la rétention des particules virales et la capture d'antigènes (Lescaille *et al.*, 2011). Selon la littérature, environ 25 % des cancers des VADS ne sont pas dus à des agents étiologiques bien reconnus comme l'alcool ou le tabac. Les très nombreuses études épidémiologiques et expérimentales effectuées depuis plus de 20 ans permettent d'incriminer le virus HPV. Sur les 650 000 nouveaux cas annuels de cancer des VADS, environ 150 000 pourraient donc être imputés au virus HPV. Il est intéressant de noter que, en fonction des études réalisées, l'ADN de l'HPV est détecté dans des proportions allant de 10 à 100 % dans les cancers des VADS (Weinberger *et al.*, 2006). Ces disparités s'expliquent en grande partie par l'utilisation de méthodologies de sensibilités très différentes, la taille de l'échantillonnage et la localisation des tumeurs étudiées (Rocin *et al.*, 2009). Une méta-analyse de Kreimer et ces collaborateurs sur les données publiées jusqu'alors sur les cancers O.R.L. pour lesquels la recherche des papillomavirus a été effectuée par PCR, les données concernant 5046 biopsies ont été analysées : la prévalence de biopsies positives pour l'HPV est de 36% pour les carcinomes de l'oropharynx, 24% pour les carcinomes de la

cavité buccale et du larynx. Cette étude montre également des disparités géographiques : en Amérique du Nord et en Asie, 47% des carcinomes de l'oropharynx sont HPV positifs contre seulement 28% en Europe. Ces disparités peuvent s'expliquer par des différences de distribution des facteurs de risque autres que l'infection par HPV selon les pays (**Kreimer et al., 2005**). Les HPV-HR sont impliqués dans 25% des cancers de l'oropharynx en moyenne et dans au moins 50% des cancers de l'amygdale. HPV-16 est le génotype le plus fréquemment détecté dans ces cancers (**Robert, 2016**). Selon certains auteurs, il semblerait que les cryptes amygdaliennes puissent jouer le rôle de réservoir du virus HPV [(**Syrjanen,2004**) ;(**Hammarstedt, 2006**)]. Il a également été démontré que le génotype 16 de l'HPV était ultradominant, puisqu'il est retrouvé dans 86,7 % des carcinomes de l'oropharynx, les génotypes 18, 31 et 33 se partageant les pourcentages restants (**Roncin et al., 2009**).

Dans notre étude, le type histo-pathologique majoritaire des cancers des VADS est à 50% (13/26) des carcinomes épidermoïdes. Selon la littérature, 25,6% des cancers des VADS induits par HPV sont des carcinomes épidermoïdes (CE), localisés au niveau de l'oropharynx (OP) préférentiellement et par ordre d'incidence, les amygdales et la base de la langue (**Gillison et al., 2000**). Il est plus élevé aux Etats-Unis, atteignant jusqu'à 72% dans certains états (**Pornet et al., 2012**). En Europe, ce taux varie de 20 à 55%. En France en 2012, environ 11 316 nouveaux cas estimés dont 71 % survenant chez l'homme (**Sass et al., 2006**).

L'absence d'HPV dans les autres localisations de VADS étudiées à l'exception des amygdales montre la présence d'autres facteurs de risque tels que la consommation de tabac et d'alcool, une mauvaise hygiène bucco-dentaire, l'exposition à certains toxiques (amiante, goudron, nickel) qui semble favoriser ces cancers, l'inhalation de cannabis et d'opium est à l'origine de survenue de cancers des VADS, notamment chez des patients de moins de 40 ans (**Hans et Brasnu, 2010**), la poussière de ciment ainsi, certaines habitudes alimentaires (consommation excessive d'aliments salés, carence en vitamines) ...etc .Les taux d'incidence de ces cancers varient largement et sont plus rencontré dans les régions géographiques où le tabagisme et la consommation d'alcool sont populaires (**Parkin et Bray,2006**). Bien que le HPV soit accepté comme un facteur étiologique de ces types de cancers, Le tabagisme, la mastication et la consommation d'alcool sont les principaux facteurs de risque pour les carcinomes épidermoïdes de La tête et du cou (**Kreimer et al., 2005**)

CONCLUSION ET
PERSPECTIVE

Conclusion et perspectives

Chaque année, environ 20 000 nouveaux cas de cancer des VADS sont diagnostiqués, dont plus de 80 % chez les hommes. La plupart de ces cancers sont des Carcinomes de type épidermoïdes (**Magné *et al.*, 2016**)

Au niveau de la Wilaya de Tlemcen entre 2012-2016, les cancers de VADS ont enregistré leurs plus fort taux en 2014 avec 35.25%, le type plus fréquent été celui de la cavité buccale. Le sexe masculin est le plus touché par ces cancers (75.36%) et sont observés le plus souvent chez les patients âgés de 60 ans est plus Ce qui est en accord avec la littérature.

La détection d'HPV par les techniques moléculaires a montré sa présence au niveau des amygdales, la zone la plus fortement infectée par le papillomavirus humains selon la littérature (**Kreimer *et al.*, 2005**).

De nombreux éléments, tant épidémiologiques que moléculaires, amènent à considérer les cancers des VADS HPV+ comme une sous-population bien individualisée : le mécanisme à l'origine de la carcinogenèse est différent de celui provoqué par des agents cancérigènes classiques (tabac et alcool) et le pronostic vital semble meilleur (**Roncin *et al.*, 2009**).

La détection des HPV émerge comme un biomarqueur nécessaire pour distinguer les tumeurs de meilleur pronostic et envisager le choix d'un traitement le mieux adapté possible. Elle est indispensable à réaliser au cours d'études visant à comparer l'efficacité des traitements. C'est prioritairement au cours de ces situations que la virologie médicale aura un rôle déterminant à jouer (**Beby-Deffaux *et al.*, 2011**), principalement dans les choix thérapeutiques de différents cancers.

Des techniques complémentaires sont nécessaires pour améliorer la prédictivité, notamment, la quantification des HPV qui pourrait donner une idée du risque de persistance du virus ; le dosage des ARNm E6/E7 qui sont le reflet de l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire ou encore le dosage de la protéine p16 dont l'élévation est un marqueur de l'inactivation du contrôle du cycle cellulaire médié par les HPV-HR, ce qui pourraient également apporter des éclaircissements (**Ang *et al.*, 2010**), notamment pour les oncologues et les radiothérapeutes qui pourraient dans un futur proche amenés à modifier leurs pratiques (**Badoua *et al.*, 2015**).

Pour compléter ce travail, il serait intéressant :

Conclusion et perspectives

- ✓ Consolider le registre des centres hospitaliers par des informations sur le caractère éthylo-tabagique du patient atteints de cancer des VADS afin d'étudier le lien HPV-consommation alcool et/ ou tabac.
- ✓ D'augmenter l'échantillonnage dans les futures recherches afin d'obtenir des meilleurs résultats et pour mieux comprendre le lien de causalité entre l'HPV et les cancers des VADS.
- ✓ Effectuer le génotypage pour déterminer la distribution des types d'HPV dans les différentes localisations des voies aérodigestives supérieures.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AKOM, E., VENNE, S. (2002).** L'infection au virus du papillome humain (HPV). Recension des écrits et consultation d'experts dans une perspective de santé publique. Quebec: Institut national de santé publique du Quebec
2. **ALAIN, S., HANTZ, S., DENIS, F. (2010).** Papillomavirus : les virus et la physiopathologie de l'infection .Service de bactériologie-virologie-hygiène, Hopital Dupuytren, CHU de Limoges, vol.12,pp.1-17.
3. **ANDRE, K., SHRAUB, S., MERCIER, M., BONTEMPS, P (1995).** Role of alcohol and Tobacco in the aetiology of head and neck cancer : a case-control study in the Doubs, region of France. Oral Onc Eur J Cancer, vol. 31, pp 301-309.
4. **ANG, K,K., HARRIS, J., WHEELER, R., WEBER, R., ROSENTHAL, D,I., NGUYEN-TAN, P,F., WESTRA, W,H., CHUNG, C,H., JORDAN, R,C., LU ,C., KIM, H., AXELROD, R., SILVERMAN, C,C., REDMOND, K,P., GILLISON, M,L. (2010).** Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. N Engl J Med. , vol. 363, pp.24-35.
5. **ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE,** Volume. 55, numéro 6, Novembre - Décembre 1997
6. **ANTONSSON, A., NEALE, R,E., BOROS, S., LAMPE, G., COMAN, W,B., PRYOR, DI., PORCEDDU, S,V., WHITEMAN, D,C. (2015).** Human papillomavirus status and p16(INK4A) expression in patients with mucosal squamous cell carcinoma of the head and neck in Queensland, Australia. Cancer Epidemiol, vol. 39, pp. 174-81.
7. **AOUBA, A., et al.,** Mortality data in France: the main causes of death in 2008 and trends since 2000. Bull Epiémiol Hebd, 2011. 22
8. **ARNOLD, L, J., HAMMOND, P, W., WIESE W. A., NELSON, N, C. (1989).** Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. Clin Chem, vol. 35, pp. 1588-1594.
9. **BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE, Y., et al. (2007).** Carcinogenicity of alcoholic beverages. Lancet Oncol , vol 8,pp. 292–93.
10. **BABAJI, P., SINGH, V., CHAURASIA, V,R., MASAMATTI, V,S., SHARMA, A,M. (2014).** Squamous papilloma of the hard palate. Indian J Dent, vol. 5, pp. 211–213.
11. **BADOUAL,C.,TARTOUR,E.,ROUSSEL,H.,BATS,A,S.,PAVINE,J.,PERNOT,S., WEISS,L.,S,I MOHAMED, A., THARIAT, J., HOFFMANN, C., PERE, H.**

- (2015). Impact de l'HPV (Humain Papilloma Virus) dans les carcinomes autres que gynécologiques. *La Revue de médecine interne*, vol. 36, pp.540-547.
12. **BEAUDIN, S., NASPETTI, M., MONTIXI, C. (2014).** Les papillomavirus humains : actualisation des Dossier scientifique à destination des enseignants), France
13. **BEBY-DEFAUX, A., DUFOUR, X., AGIUS, G. (2011).** Infections à papillomavirus humains (HPV) des voies aéro-digestives supérieures (VADS), vol. 434, pp. 65–75.
14. **BERNARD, H,U., BURK, R,D., CHEN, Z., VAN DOORSLAER, K., ZUR HAUSEN, H., DE VILLIERS, EM. (2010).** Classification des papillomavirus (PV) basée sur 189 types de PV et proposition d'amendements taxonomiques, vol. 401, pp. 70-9.
15. **BELOT A., VELTEN M., GROSCLAUDE P., BOSSARD N., LAUNOY G., REMONTET L., ET AL. (2008).** Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005. Saint-Maurice (Fra): Institut de veille sanitaire, pp. 132.
16. **BEN SLAMA, L. (2009).** Carcinomes des lèvres. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, vol. 110, pp. 278-283
17. **BEN YAHIA, S. (2013).** Profil épidémiologique des cancers des VADS au Maghreb. Rapport de 2ème congrès Maghrébin de la MAFOS .
18. **BERANGER. (2011).** Détection moléculaire des papillomavirus humains dans les tissus sains et tumoraux des cancers de l'oropharynx. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, UNIVERSITE JOSEPH FOURIER, France.
19. **BESSEDE J,P., N, DAVID. (2002).** dans *Cancers : prévention et dépistage* ; N. Tubiana- Mathieu; Ed. Masson, pp.152-164
20. **BLANCHARD, D., RAME, J,P., LOUIS, M,Y., GERY, B., FLORESCU, C., RAUCOURT, D., et al. (2014).** Cancer de l'oropharynx. *Bull Cancer*, vol. 101, pp. 429–437.
21. **BLOMBERG, M., NIELSEN, A., MUNK, C., KJAER, S, K (2010).** Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*, vol. 129, pp.733-41
22. **BOCQUET, H., BAGOT, M. (2004).** Lésions tumorales bénignes associées aux papillomavirus humains. *EMC - Dermatologie*. 1-10.
23. **BONNEZ, W.** Papillomavirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds.). *Clinical virology*. 2nd edition. Washington D.C.: ASM Press; 2002. pp. 557-596.

24. **BOUSSEN, H., BOUAOUINA, N., MOKNI-BAIZIG, N., GAMOUDI, A., CHOUCANE, L., BENNA, F., LADGHAM, A. (2005).** Les carcinomes du nasopharynx : données actuelles, *Pathologie Biologie*, vol. 53, pp. 45-51.
25. **BOSHART, M., GISSMANN, L., IKENBERG, H., KLEINHEINZ, A., SHEURLEN, W., ZUR HAUSEN, H. (1984).** A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer, vol. ; 3, pp. 1151-7.
26. **BOUVARD, V., BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE, Y., SECRETAN, B., GHISSASSI, F, E., ET AL., (2009).** A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The lancet oncology*, vol. 10, pp. 321-322.
27. **BOYER, S,N., WAZER, D,E., BAND, V. (1996).** E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway *Cancer Res*, vol. 56, pp. 4620-4.
28. **BUCK, C,B., CHENG, N., THOMPSON, C,D., LOWY, D,R., STEVEN, A,C., SCHILLER, J,T., TRUS, B,L. (2008).** Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol.*, vol. 82, pp. 5190-7.
29. **BURGER, E, A., KORNOR, H., KLEMP, M., LAUVRAK, V., KRISTIENSEN I, S. (2010).** HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol*, vol. 120, pp. 430-8.
30. **BINDER-FOUCARD, FLORENCE., BELOT, AURELIEN., DELAFOSSE, PATRICIA., REMONTET., WORONOFF, ANNE-SOPHIE., BOSSARD, NADINE. (2013).** Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012 ; Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim ; Partie 1 – Tumeurs solides.
31. **BISHOP, B., DASGUPTA, J., KLEIN, M., GARCEA, R,L., CHRISTENSEN, N,D., ZHAO, R., CHEN, X,S., BIOL CHEM, J. (2007).** Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies, vol. 282, pp. 31803-11.
32. **CALIFANO, J., VAN DER RIET, P., WESTRA, W., NAWROZ, H., CLAYMAN, G., PIANTADOSI, S., CORIO, R., LEE, D., GREENBERG, B., KOCH, W., SIDRANSKY, D. (1996).** Genetic progression model for head and neck cancer : implications for field cancerization , vol. 56, pp. 2488-92.

33. **CARCOPINO, X., HENRY, M., OLIVE, D., BOUBLI, L., TAMALET, C. (2011).** Détection et quantification des infections génitales à papillomavirus humains : conséquences virologiques, épidémiologiques et cliniques. *Médecine et maladies infectieuses*, vol.41, pp.68-79.
34. **CASTLE, P, E., M, C, WHEELER., SOLOMON, D., SCHIFFMAN, M., PEYTON, C, L. (2004).** Interlaboratory reliability of hybrid capture 2, vol. 122, pp. :238–245.
35. **CHAI, RC., LAMBIE, D., VERMA, M., PUNYADEERA, C. (2015).** Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers, vol, pp. 596-607.
36. **CHATURVEDI, A, K., ENGELS, E, A., ANDERSON, W, F., GILLISON, M, L. (2008).** Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States, vol. 26, pp. 612-9.
37. **CHELIMO, C., WOULDES, TA., CAMERON, LD., ELWOOD, JM. (2013).** Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect*, vol. 66, pp. 207-17.
38. **CHENOUEAU R (2016).** le test HPV urinaire proposé comme alternative au frottis cervico-utérin suivi virologique et gynécologique à deux ans d'une première campagne de dépistage (étude capu2). Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine qualification en biologie médicale. Université Anges, France.
39. **CHOPRA, K,F., TYRING, S,K. (1997).** The impact of the human immunodeficiency virus on the human papillomavirus epidemic. *Arch Dermatol* , vol. 133, pp. 629–633.
40. **CIUFFO, G. (1907).** Innesto positivo con filtrato di verruca vulgare. *G Ital Mal Venereol*, vol. 48, pp. 12-7.
41. **CLAVEL, C., MASURE, M., BORY, J,P., PUTAUD, I., MANGEONJEAN, C., LORENZATO, M., NAZEYROLLAS, P., GABRIEL, R., QUEREUX, C., BIREMBAUT, P. (2001).** Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer*, vol. 84, pp. 1616-23.
42. **COX, J, T., LORINCZ, A, T., SCHIFFMAN, M. H., SHERMAN, M. E., CULLEN A., KURMAN R. J. (1995).** Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am. J. Obstet. Gynecol*, vol. 172, pp. 946–954.
43. **COWPPLI-BONY, A., UHRY, Z., REMONTET, L., GUIZARD, A,V., VOIRIN, N., MONNEREAU, A., BOUVIER, A,M., COLONNA, M., BOSSARD, N.,**

- WORONOFF, A.S., GROSCLAUDE, P. (2016).** Survie des personnes atteintes de cancer en France, 1989-2013. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 1 – Tumeurs solides – Programme partenarial Francim/HCL/InVS/INCa.
- 44. DALSTEIN V., BRIOLAT J., BIREMBAUT P. ET CLAVEL C. (2007).** Méthodes de PCR. Apport de l’Amplicor et du génotypage. In : Monsonogo J. Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus. Springer France Paris 47-52.
- 45. DE VILLIERS, E.M., FAUQUET, C., BROKER, T.R., BERNARD, H.U., ZUR HAUSEN, H. (2004).** Classification of papillomaviruses, Vol. 324, pp. 17-27.
- 46. DE SANJOSE, S., QUINT, W, G., ALEMANY, L., GERAETS, D, T., KLAUSTERMEIER, J, E., LLOVERAS, B., ET AL. (2010).** Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, vol. 11, pp. 1048-56.
- 47. DENNY, L.A., FRANCESCHI, S., DE SANJOSE, S., HEARD, I., MOSCICKI, A.B., PALEFSKY, J., (2012).** Human Papillomavirus, Human Immunodeficiency Virus and Immunosuppression. *Vaccine, Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases*, vol.30, pp. 168–174.
- 48. DESSAIGNE B. (2011).** Détection moléculaire des papillomavirus humains dans les tissus sains et tumoraux des cancers de l’oropharynx. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier.
- 49. DOORBAR J., FOO C., COLEMAN N., MEDCALF L., HARTLEY O., PROSPERO T., NAPHTHINE S., STERLING J., WINTER G., GRIFFIN H. (1997).** Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*, vol. 238, pp. 40–52.
- 50. DOORBAR, J. (2005).** The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, vol.32, pp.7-15.
- 51. DOUVIER, S., DALAC, S. (2004).** Infections à papillomavirus. *EMC-Maladies infectieuses*, vol. 1, pp. 235-261.
- 52. DRIDI, M., EJEIL, A.L., VI-FANE, B., GODEAU, G. (2004).** Papillome buccal : présentation d’un cas clinique. *Revue d’odontostomatologie*, vol. 33, pp. 111-117.
- 53. D’SOUZA, G., AGARWAL, Y., HALPERN, J., BODISON, S., GILLISON, M.L. (2009).** Oral sexual behaviours associated with prevalent oral human papillomavirus infection. , vol. 199, pp. 1263–1269.

- 54. DUBRULLE, F., CHEVALIER, D. (2010).** Imagerie en cancérologie du larynx et de l'hypopharynx. Elsevier Masson, vol. 10, pp. 151-64.
- 55. 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, vol. 129, pp. 32-38.
- 56. DYSON, N., GUIDA, P., MUNGER, K., HARLOW, E. (1992).** Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Journal Virology*, vol. 66, pp. 6893-6902.
- 57. EDWARDS, A., CARNE, C. (1998).** Oral sex and the transmission of viral STIs. *Sex Transm Infect*, vol. 74, pp. 6-10.
- 58. ELAINE, M., SMITH, JUSTINE, M., RITCHIE, KURT., SUMMERSGILL, F., JENS, P., KLUSMANN, JOHN, H., LEE., DONGHONG, WANG., THOMAS, H., HAUGEN., LUBOMIR, P., TUREK. (2004).** Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers, vol. 108, pp. 766 - 72.
- 59. ERNOUX NEUFCEUR, P., ARAFA, M., DELVENNE, P., SAUSSEZ, S. (2009).** Implication des papillomavirus humains dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. *Bulletin cancer*, vol. 96, pp. 1-10.
- 60. EVERSOLE, L.R. (2000).** Papillary lesions of the oral cavity: relationship to human papillomaviruses. *J Calif Dent Assoc*, vol. 28, pp. 922-927.
- 61. FERLAY, J SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. (2010).** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *Globocan 2008. Int J cancer*, vol. 127, pp. 2893-917.
- 62. FLORES E.R. ET LAMBERT P.F. (1997).** Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol*, vol. 71, pp. 7167-7179.
- 63. FORASTIERE, A., KOCH, W., TROTTI, A., SIDRANSKY, D. (2001).** Head and neck cancer, vol. 345, pp. 1890-1900.
- 64. FOURET, P., MONCEAUX, G., TEMAM, S., LACOURREYE, L., ST GUILY, JL. (1997).** Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 123, pp. 513-6.
- 65. FRANCESCHI, S., MUNOZ, N., BOSCH, X.F., SNIJDERS, P.J., WALBOOMERS, J.M. (1996).** Human papillomavirus and cancers of the upper

aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* , vol.5, pp.567 – 75.

66. **FRANCESCHI, S., MUNOZ, N., SNIJDERS, P., J. (2000).** How strong and how wide is the link between HPV and oropharyngeal cancer? , vol. 356, pp. 871–2.
67. **GOLAS, S, M. (2007).** Trends in palatine tonsillar cancer incidence and mortality rates in the United States. *Community Dent Oral Epidemiol*, vol. 35, pp.98-108.
68. **GERAETS, D, T., HEIDEMAN, D, A., DE KONING, M, N., SNIJDERS, P, J., VAN ALEWIJK, D, C., MEIJER, C, J., ET AL. (2009).** High-throughput genotyping of high-risk HPV by the digene HPV Genotyping LQ Test using GP5+/6+-PCR and xMAP technology, vol. 46, pp.21-6.
69. **GOODMAN, D,S., TEPLITZ, E,D., WISHNER, A., KLEIN, R,S., BURK, P,G., HERSHENBAUM, E. (1987).** Prevalence of cutaneous disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related complex, vol.17, pp.210–220.
70. **GILLISON, M, L., CASTELLSAGUE, X., CHATURVEDI, A., GOODMAN, M, T., SNIJDERS, P., TOMMASINO M., ET AL. (2014).** Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int. J. Cancer*, vol.134, pp.497–507.
71. **GLOBOCAN (2012).** Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, <http://globocan.iarc.fr/>
72. **GILLISON, M, L., KOCH, W, M., CAPONE, R, B., SPAFFORD, M., WESTRA, W, H., WU, L., ET AL. (2000).** Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers, vol. 92, pp.709-20.
73. **GUIHARD, S., JUNG, A,C., NOEL, G. (2012) .** High- risk human papillomavirus associated oropharynx squamous cell carcinomas: clinical, biological implications and therapeutical perspectives. *Cancer Radiother*, vol.16, pp. 34-43.
74. **GUPTA, S., JAWANDA, M,K. (2015).** Oral Lichen Planus : An Update on Etiology, Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis and Management. *Indian J Dermatol*, vol.60, pp.222-229.
75. **GRINSPAN, D., ABULAFIA, J. (1979).** Oral Florid Papillomatosis (verrucous Cercinoma). *Int J Dermatol*, vol.18, pp.608-622.
76. **HAJEK, E. (1956).** Contribution to the etiology of laryngeal papilloma in children. *J Laryngol Otol*, vol.70, pp.166-8.

- 77. HAMMARSTEDT, L., LINDQUIST, D., DAHLSTRAND, H., ROMANITAN, M., DAHLGREN, L, O., JONEBERG, J., ET AL.(2006).** Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer*, vol.119, pp.2620-3.
- 78. HANTZ, S., ALAIN, S., DENIS, F. (2005).** Vaccins anti-papillomavirus et prévention du col de l'utérus, vol.34, pp.745-53.
- 79. HANS, S., BRASNU, D. (2010).** Cancers ORL : conduite à tenir et traitement. *Traité de médecine Akos*. Paris: Elsevier Masson SAS.
- 80. HAQUE MR, ABDULLAH M, ALAUDDIN M, et al. (2002).** Carcinoma of the larynx: topographical distribution. *Mymensingh Med J*, vol. 11, pp. 15-21.
- 81. HERRERO, R, CASTELLSAGUE, X, PAWLITA, M et al. (2003).** Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer*, vol.95, pp.1772-83.
- 82. HILL C. (1999).** Alcool et risques de cancer, vol. 1, pp. 46-49.
- 83. HOULIHAN, C,F., LARKE, N,L., WATSON-JONES, D., SMITH-MCCUNE, K,K., SHIBOSKI, S., GRAVITT, P,E., SMITH, J,S.; KUHN, L., WANG, C., HAYES, R. (2012).** Human papillomavirus infection and increased risk of HIV acquisition. A systematic review and meta-analysis, vol.26, pp. 2211–2222.
- 84. HUEBBERS, C, U., PREUSS, S,F., KOLLIGS, J,VENT J., STENNER, M., WIELAND, U.,ET AL. (2013).** Integration of HPV6 and down regulation of AKR1C3 expression mark malignant transformation in a patient with juvenile-onset laryngeal papillomatosis, vol.8, pp.5727-28.
- 85. HUYBENS, N., HOUEIX, J., LICOIS, D., MAINIL, J., MARLIER, D. (2009).** Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces the Epizootic Rabbit Enteropathy, vol. 17, pp. 185-193.
- 86. IARC. (1995).** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: human papillomaviruses. Vol. 64. Lyon (France).
- 87. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004**
- 88. - INSTITUT NATIONAL DU CANCER, 2012**
- 89. JOURA, E,A., LEODOLTER, S., HERNANDEZ-AVILA, M., WHEELER, C,M., PEREZ, G., KOUTSKY, L,A., GARLAND, S,M., HARPER, D,M., TANG, G,W., FERRIS, D,G., STEBEN, M., JONES, R,W., BRYAN, J., TADDEO, F,J., BAUTISTA, O,M., ESSER, M,T., SINGS, H,L., NELSON, M., BOSLEGO, J,W.,**

- SATTLER, C., BARR, E., PAAVONEN, J. (2007).** Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials, vol. 369, pp.1693–1702.
- 90. JUNG, W,W., CHUN, T., SUL, D., HWANG, K, W., KANG, H, S., LEE, D,J., HAN, I, K. (2004).** Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol*, vol.42, pp. 255–266.
- 91. KACIAN, D,L., FULTZ, T,J., (1995).** Nucleic acid sequence amplification methods. U. S. Patent, vol. 5, pp.399-491.
- 92. KANODIA, .S, FAHEY, L,M., KAST, W,M.(2007).** Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*, vol.1, pp.79-89.
- 93. KJAER,SK ., CHACKERIAN, BRYCE., VAN DEN BRULE JC., EDITH I, SVARE., GERSON PAULL., JAN M,M, WALBOMERS., JOHN, T., SCHILLER, JOHANNES, E., BOCK., MARK, E., SHERMAN, DOUGLAS, R., LOWY., CHRIS, LM . (2001).** High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, vol. 10, pp. 101-106.
- 94. KLETER, B., VAN DOORN, L, J., L. SCHRAUWEN, A., MOLIJN, S., SASTROWIJOTO, J., TER SCHEGGET, J., LINDEMAN, B., TER HARMSEL, M., BURGER., QUINT, W. (1999).** Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol*, vol. 37, pp.2508–2517.
- 95. KUMAR, R., SINGH, S., ANDSINGH, O, V. (2008).** Bioconversion of lignocellulosic biomass : Biochemecal and molecular perspective, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, vol.35, pp. 377-391.
- 96. KOCHBATI, L., ESCHWEGE, F., BOURHIS, J., et al. (1997).** Carcinomes de l'oropharynx des sujets âgés. *Cancer/Radiothérapie*, vol.1, pp. 598-99.
- 97. KREIMER, A, R., CLIFFORD, G, M., BOYLE, P., FRANCESCHI, S. (2005).** Human Papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 14, pp. 467-475.
- 98. LAFOND, C., POINTREAU, Y., DEBELLEIX, C., DENIS, F., CALAIS, G., BOURHIS, J., THARIAT, J. (2010).** Cancer de l'oropharynx. *Cancer/Radiothérapie*, vol. 14, pp. 34-42.

- 99. LASKARIS GEORGE. (2007).** Atlas de poche des maladies buccales. France : Flammarion Médecine-Sciences. 370p.
- 100. LE CANCER A SETIF 1986-2010,** Algérie ; Incidence, tendances, survie, 2012.
- 101. LEFEBVRE, J, L., CHEVALIER, D. (2005).** Cancers du larynx. EMC-Oto-rhino-laryngologie, vol. 2, pp. 432-457.
- 102. LESCAILLE, G., DESCROIX, V., AZERAD, J . (2011).**Papillomavirus and Head and Neck Cancer. Rev Stomatol Chir Maxillofac, vol. 112, pp. 160-163.
- 103. LESCANNE, E., PONDAVEN, S., BOUETEL, V., BAKHOS, D., LESAGE, V., MORINIÈRE, S. (2004).** Diagnostic des dyspnées laryngées de l'enfant. EMC-Oto-rhino-laryngologie, vol. 1, pp. 187-198.
- 104. LEWIS, D,M (2009).** Verrucous oral lesions: possibly not so innocuous after all. Squamous papilloma. J Okla Dent Assoc, vol. 100, pp. 18–20.
- 105. LEYKAUF, K., SALEK, M., SCHLÜTER, H., LEHMANN, W., ALONSO, A. (2004).** Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5- transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. J Gen Virol, vol. 85, pp.1427–31.
- 106. LIN, H,W., RICHMON, J,D., EMERICK, K,S., DE VENECIA, R,K., ZEITELS, S,M., FAQUIN, W,C., ET AL. (2010).** Malignant transformation of a highly aggressive human papillomavirus type 11-associated recurrent respiratory papillomatosis. Am J Otolaryngol, vol. 31, pp. 291-6.
- 107. LUXTON, J,C., NATH, R., DERIAS, N., HERBERT, A., SHEPHERD, P, S. (2003).** Human papillomavirus type 16-specific T cell responses and their association with recurrence of cervical disease following treatment. J Gen Virol, vol.84, pp.1063-70.
- 108. MAAIKE, A, P, C., VAN HAM, JUDITH, M, J, E., BAKKERS, GONNEKE, K. ,HARBERS, WIM, G, V., QUINT, LEON, F, A, G., MASSUGER AND WILLEM, J,G, MELCHERS. (2005).** Comparison of Two Commercial Assays for Detection of Human Papillomavirus (HPV) in Cervical Scrape Specimens: Validation of the Roche AMPLICOR HPV Test as a Means To Screen for HPV Genotypes Associated with a Higher Risk of Cervical Disorders. J. Clin. Microbiol, vol. 43, pp. 2662-2667 .
- 109. MALIK, H., KHAN, F,H., AHSAN, H., (2013).** Human papillomavirus: current status and issues of vaccination. Arch Virol, vol. 159, pp. 199-205.

110. **MARKOWITZ, L.E., DUNNE, E.F., SARAIYA, M., CHESSON, H.W., CURTIS, C.R., GEE, J., ET AL. (2014).** Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), vol.63, pp.1– 30.
111. **MARANDAS, P. (2004).** Cancers des voies aéro-digestives supérieures. Données actuelles. Issy-les-Moulineaux. Masson, Collection ORL, vol. 1, pp. 10-11.
112. **MELCHERS, W, J., HERBRINK, P, W, G., QUINT, J, M., WALBOOMERS., MEIJER C, J., LINDEMAN, J. (1988).** Prevalence of genital HPV infections in a regularly screened population in The Netherlands in relation to cervical cytology. J. Med. Virol, vol. 25, pp.11–16.
113. **MILLER, C,S., JOHNSTONE, B,M. (2001).** Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis 1982-1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,vol.91, pp.622–635
114. **MISIR, A.F., DEMIRIZ, L., BARUT, F. (2013).** Laser treatment of an oral squamous papilloma in a pediatric patient: a case report. J. Indian Soc Pedod Prev Dent, vol.31, pp.279–281.
115. **MONSONEGO, J. (1996).** Papillomavirus et cancer du col de l'utérus , médecine/sciences 1996 ; 12 : 733-44
116. **MONSONEGO, J. (2006).** Infections à Papillomavirus. Etat des connaissances, pratiques et prévention vaccinale, Paris, Springer
117. **MONSONEGO, J., (2008).** Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus. France : Springer Verlag. 528 p.
118. **MOUGIN, C., LINGZHAO, M., DALSTEIN, V. (2006).** Histoire naturelle des infections à papillomavirus,La revue du praticien,vol.56.
119. **MORSHEDE, K., POLZ-GRUSZKA, D., SZYMANSKI, M., POLZ-DACEWICZ, M. (2014).** Human Papillomavirus (HPV) Structure, epidemiology and pathogenesis.Otolaryngol Pol, vol. 68, pp. 213–219
120. **MUNOZ, N., BOSCH, F,X., DE SANJOSE, S et al. (2003).** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med, vol. 348, pp. 518-27.
121. **NASMAN, A., ATTNER , P., HAMMARSTEDT, L., DU J., ERIKSSON, M., GIRAUD, G., et al. (2009).** Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? Int J Cancer, vol. 125, pp.362-6.

122. **OH, Y., BAE, S.M., KIM, Y.W., et al. (2007).** Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types, vol. 98, pp.549-54.
123. **OLLIER, L., GIORDANENGO, V . (2008).** Méthodes de detection et d'identification des -HPV. Revue francophone des laboratoires, vol. 405, pp. 51-55.
124. **OSTWALD, C., RUTSATZ, K., SCHWEDER, J., SCHMIDT, W., GUNDLACK, K., BARTEN, M. (2003).** Human papillomavirus 6, 11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign lesions. Med Microbiol Immunol, vol.192, pp.145–148.
125. **PARKIN D.M., PISANI ,P., LOPEZ, A,D., MASUYER, E. (1994).** At Least on in seven cases of cancer is caused by smoking. Global Estimates for 1985. Int J Cancer, vol. 59, pp. 494-504.
126. **PARKIN, D, M. ET BRAY, F. (2006).** Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine, vol.24, pp.11-25.
127. **PEREIRA, J, M., TARRE, R, M., MACEDO, R., REZENDE, C,DE P., ALVES, B, J, R., URQUIAGA, S., BODDEY, R,M. (2009).** Productivity of *Brachiaria humidicola* pastures in the Atlantic forest region of Brazil as affected by stocking rate and the presence of a forage legume. Nutrient cycling in agroecosystems, vol. 83, pp. 179-196.
128. **PEYTON, C. L., M. SCHIFFMAN, A. T. LORINCZ, W. C. HUNT, I. MIELZYNSKA, C. BRATTI, S. EATON, A. HILDESHEIM, L. A. MORERA, A. C. RODRIQUEZ, R. HERRERO,M. E. SCHERMAN., C, M, WHEELER. (1998).** Comparison of PCR- and hybrid capture-cased human papillomavirus detection systems using multiple cervical collection strategies. J. Clin. Microbiol, vol.36, pp.3248–3254.
129. **PEREZ-LOSADA, M., CHRISTENSEN, R. G., MCCLELLAN, D. A., ADAMS, B. J., VISCIDI, R. P., DEMMA, J. C. & CRANDALL, K. A. (2006).** Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts, vol.80, pp. 5663–5669.
130. **POLJAK, M., KOCJAN, B,J., OSTRBENK, A., SEME, K. (2016).** Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. Journal of Clinical Virology, vol.76, pp.3–13.
131. **PORNET, C., DELPIERRE, C., DEJARDIN, O., GROSCLAUDE, P., LAUNAY, L., GUITTET, L., LANG, T., LAUNOY, G. (2012).** Construction of an adaptable European transnational ecological deprivation index : the French version. J Epidemiol Community Health, vol.66, pp.982-9.

- 132. PLAN NATIONAL CANCER 2015-2019, ALGERIE**
- 133. PRABHU, S,R., WILSON, D,F. (2013).** Human papillomavirus and oral disease -emerging evidence: a review. *Aust Dent J*, vol. 58, pp. 2–10.
- 134. PRADES,J M., SCHMITT , T., TIMOSHENKO, A. (2004).** Cancers de la langue.EMC-Oto-rhino-laryngologie, vol. 1, pp. 35-55.
- 135. PRETET J-L., SAUNIER, M., MO L-Z., MOUGIN, C (2007).** Biologie, l’essentiel pour le clinicien in Monsonogo J.Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus. Springer-Verlag, Paris ,pp.3-10.
- 136. QUELAVOINE, A. (2014).** Prévalence des HPV chez les patientes séropositives et séronégatives au VIH : étude de cas au chu-hospices civils de Lyon (étude capu2). Thèse pour le diplôme d’état de docteur en pharmacie. UNIVERSITE CLAUDE BERNARD, FRANCE
- 137. RAHIMY, R. M. L. (2014).** Portage des génotypes à haut risque du papillomavirus humain chez des adolescentes sexuellement actives de la ville d’Ouagadougou. Thèse de doctorat. Université d’Ouagadougou, Ouagadougou.
- 138. RAGIN, C., EDWARDS, R., LARKINS-PATTIGREW, M., et al. (2011).** Oral HPV infection and sexuality: a cross-sectional study in women. *Int J Mol*, vol.12, pp.3928–3940.
- 139. RAKOTOARIVONY, A,E., RAKOTOARISON,R,A., RAZANAKOTO, F,A., RAKOTO, A., RAKOTO, F,A. (2014).** Tumeurs malignes de la cavité buccale et du pharynx : étude sur 11 ans au Centre Hospitalier de Soavinandriana, Antananarivo.Rev. méd. Madag. , vol. 4, pp. 432-437.
- 140. READ, A., DONNAI, D. (2009).** Génétique médicale, de la bilioie à la pratique clinique. de boeck, France.
- 141. REBECCA, S; DEEPA, N, A,J. (2012).** Cancer Statistics 2012; CA Cancer J Clin 2012 American Cancer Society, vol.62, pp.10–29.
- 142. REBRIKOV, D,V., BOGDANOVA, E,A., BULINA, M,E., LUKYANOV, S,A. (2002).** A new planarian extrachromosomal virus-like element revealed by subtractive hybridization. *Mol Biol*, vol.36, pp.813–820.
- 143. ROBERT F (2016).** Détection des HPV à haut risque comme alternative pour les femmes non adhérentes au dépistage cytologique du cancer du col utérin : Etude pilote sur l’acceptabilité et la faisabilité de l’auto-prélèvement vaginal et du prélèvement urinaire. THÈSE POUR LE DIPLÔME D’ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE et

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE.
Université de Poitiers, France.

144. **RICARDO, J.H., VASQUEZ SANJUAN, K., FORTICH MESA, N. (2011).** Hyperplasia epitelial focal. Tratamiento conservador con acido tricloroacético :Focal epithelial hyperplasia : Conservative treatment with trichloroacetic acid. CES Odontol, vol.24, pp. 67-70.
145. **ROMBALDI, R., SERAFINI, E., MANDELLI, J., ZIMMERMANN, E., LOSQUIAVO, K. (2008).** Transplacental transmission of Human Papillomavirus. Virol J 5 (2008), 106.
146. **ROMBALDI, R.L., SERAFINI, E.P., MANDELLI, J., ZIMMERMANN, E., LOSQUIAVO, K.P. (2009).** Perinatal transmission of human papilomavirus DNA, vol. 6, pp. 83.
147. **RONCIN, L., TOUZALIN, A., FLEURY H. J. (2009).** Papillomavirus humains et tumeurs des voies aérodigestives supérieures. La lettre de l'Infectiologue, vol. 1, pp. 19-27.
148. **ROUS, P., BEARD, J.W. (1934).** Carcinomatous changes in virus-induced papillomas of the skin of the rabbit, vol. 32, pp.578-80.
149. **RIETHMULLER, D., RAMANAH, R., PRETET, J.L. ET MOUGIN, C. (2008).** Integrating HPV testing for primary screening ? J Gynecol Obstet Biol Reprod ; 37:S139-51.
150. **RYNDOCK, E.J., MEYERS, C. (2014).** A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? Expert Rev Anti Infect Ther, vol. 12, pp.1165–1170.
151. **SABRI, S. (2016).** Recherche de papillomavirus dans des lésions cancéreuses des voies aéro-digestives supérieures. Mémoire pour le Diplôme de MASTER EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE Option : Microbiologie. UNIVERSITE de ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN, Algérie.
152. **SALHI B, MEZIANI A, et al. (2009).** Le cancer indifférencié du cavum chez l'enfant et l'adolescent de l'est algérien à propos de 284 cas traités au centre hospitalier universitaire IBN BADIS de constantine, résultats à long terme : abstracts/cancer/radiotherapie.13 :644-697.
153. **SANDRI, M, T., LENTATI, P., BENINI, E., DELL'ORTO P., ZORZINO, L., CAROZZI F, M., et al. (2006).** Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. J Clin Microbiol, vol.44, pp.2141-6.

- 154. SAID, A.K., LEO, J.C., FEDELE, S., PORTER, S.R., (2013).** Focal epithelial hyperplasia-an update. *J Oral Pathol Med*, vol. 42, pp. 435–442
- 155. SASS, C., MOULIN, J.J., GUEGEN, R., ABRIC, L., DAUPHINOT, V., DUPRE, C., GIORDANELLA, J.P., GIRARD, F., GUENOT, C., LABBE, E., et al. (2006).** Le score Epices : un score individuel de precarite. Construction du score et mesure des relations avec des donnees de sante, dans une population de 197 389 personnes, vol.18. Laxou : SFSP.
- 156. SCHLECHT, N, F. (2005).** Prognostic value of human papillomavirus in the survival of head and neck cancer patients: an overview of the evidence. *Oncol Rep*, vol.14, pp.1239-47.
- 157. SCHWARTZ, S,M., DALING, J,R., DOODY, D,R ET AL. (1998).** Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*, vol.90, pp.1626-36.
- 158. SEGONDY, M. (2008).** Classification des papillomavirus (HPV). *Rev Francoph Lab*, vol.38, pp. 23-25.
- 159. SHARMA, R., SHARMA, A.K., JAIN, S., BHAGALIA, S.R., AGRAWAL, V. (2012).** Oral Verruca Vulgaris: A Rare Case Report. *Clin Dent*, vol. 6, pp. 18–21.
- 160. SHOPE, R. (1933).** Infectious papillomavirus of rabbits. *J Exp Med*, vol. 58, pp. 607-24.
- 161. SOMMA, M. ET QUERCI, M. (2005)** Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Electrophorèse sur gel d'agarose. Organisation mondiale de la sante. **P 3.**
- 162. SINGH, A,A., CHAITRA,T,R., KULKAMI,A,U. (2013).** Oral squamous papilloma. *Int J Stomatol Occlusion Med*, vol.6, pp.106-9.
- 163. SMAILL, F. (2013).** Etude des cancers les plus fréquents, en Algérie, traité par chimiothérapie, en 2008 et 2009 : étude EPIONCO, santé-MAG N°21
- 164. STANLEY, M. (2006).** Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, vol.24, pp.16-22.
- 165. STANLEY, M,A., PETT, M,R., COLEMAN, N. (2007).** HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* , vol.35, pp.1456-60
- 166. STANLEY, M. (2012).** Perspective: Vaccinate boys too. *Nature*, vol.48, pp10.
- 167. STEENBERGEN, R,D., HERMSEN, A,J., WALBOOMERS, J,M., JOENJE, H., ARWERT, F, MEIJER, C,J., et al. (1995).** Integrated human

papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. *Cancer Res* , vol.55, pp.5465–71.

- 168. SYRJANEN, K,J., et al. (1983).** Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg*, vol.2, pp. 147-53.
- 169. SYRJANEN S.(2004).** HPV infections and tonsillar carcinoma.*J Clin Pathol*;57(5):449-55.
- 170. TABET AOUL, S, S. (2016).** Recherche du papillomavirus humain dans des lésions cancéreuses cutanées. Mémoire pour le Diplôme de MASTER En BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE Option : Microbiologie Appliquée. UNIVERSITE de TLEMCEN, Algérie
- 171. THOMAS, M., DRINNAN, B., NATESH, H., MEHANNA, T., JONES, V., PALERI. (2011).** Open conservation partial laryngectomy for laryngeal cancer: A systematic review of English language literature, *Cancer Treatment Reviews*, vol. 38, pp.203-11.
- 172. TROTTIER, H., BURCHELL, A.N. (2009).** Epidemiology of mucosal human, vol. 12, pp.291-307.
- 173. WALBOOMERS, J,M., JACOBS, M,V., MANOS, M,M., ET AL. (1999).** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, vol.189, pp.12– 9.
- 174. WENZEL, K., SAKA, B., ZIMMERMANN, R., GUNDLACH, K.K.H., BARTEN, M., GROSS,G. (2003).** Malignant conversion of florid oral and labial papillomatosis during topical immunotherapy with imiquimod. *Med Microbiol Immunol*. 192(3), 161–164.
- 175. WARNAKULASURIYA, S. (2009).** Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, vol.45, pp.309–16.
- 176. WEINBERGER PM, YU Z, HAFFTY BG ET AL. (2006).** Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus: associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis.*J Clin Oncol*;24(5):736-47.
- 177. WERNESS,B,A.,LEVINE,A,J.,HOWLEY,P,M. (1990).** Association of humain papillomavirus types 16 and 18 E6 protein with p53.science,vol.248,pp.76-79.
- 178. WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (2007).** Human papillomaviruses. France : WHO Press. IARC, 2007. Human papillomaviruses, Vol 90, pp. 678.

- 179. ZARAA INES, S., BEN TAAZAYET, I., DAKHLI, I., CHELLY, MOURAD M, ZITOUNA, M., BEN OSMAN, A. (2013).** Carcinome épidermoïde des lèvres: A propos de 30 cas, LA TUNISIE MEDICALE - Vol 91, pp.148-153.
- 180. ZUR HAUSEN, H., MEINHOF, W., SCHREIBER, W., BORNKAMM, G,W. (1947).** Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors : nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus, vol.13, pp. 650-6.
- 181. ZIZIPHO, Z, A., MBULAWA, D, J., MARAIS, L, F., JOHNSON,A., B, DAVID, C., ANNA-LISE, W. (2010).** Influence of human immunodeficiency virus and CD4 count on the prevalence of human papillomavirus in heterosexual couples, vol.91, pp. 3023–3024.

ANNEXES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXE 1 : Lésions de la cavité buccale



(a)



(b)

Papillome buccal : (a) localisé sur la lèvre inférieure (Singh et *al.*, 2013)

(b) localisé sur le bord antérieur de la langue (Laskaris George, 2007)



(a)



(b)

(a) : Multiples condylomes acuminés sur la gencive palatine (Laskaris George, 2007)

(b) : Hyperplasie épithéliale focale de la muqueuse jugale (Ricardo et *al.*, 2011)



(b)



(c)



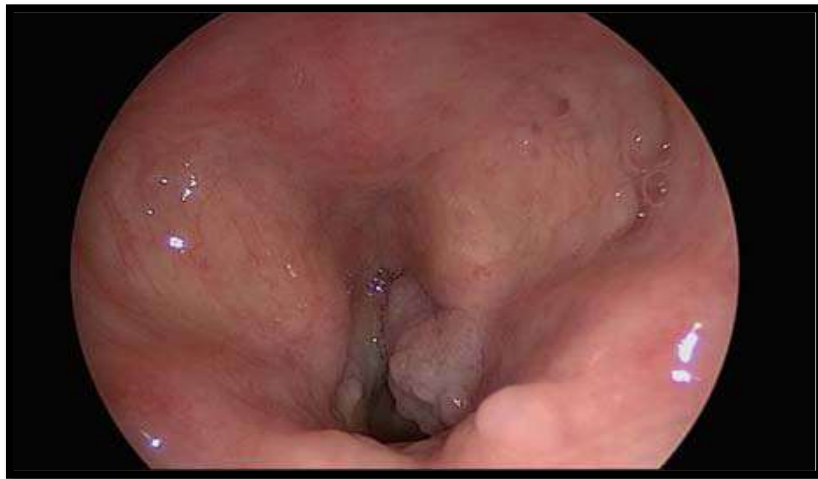
(d)

(a) : Lésion végétante (**Grinspan et Abulafia, 1979**)

(b) : Leucoplasie homogène (**Laskaris George, 2007**)

(c) : Lichen plan papulaire du bord latéral de la langue (**Gupta et Jawanda, 2015**)

(d) : Carcinome épidermoïde HPV-positif présentant une érythroplasie diffuse du palais mou et de la région amygdalienne gauche (**Chi et al., 2015**)



Papillomatose laryngé droite (Beby-Defaux *et al.*, 2011).

ANNEXE 2 : Principales caractéristiques des tests HPV commercialisés (Béranger, 2011)

Type de test		Détection par un mélange de sondes		Génotypage				ARNm E6/E7		
Nom		Hybrid Capture 2®	Amplicor HPV Test ®	Linear Array Genotyping Test®	INNO-LiPA Genotyping Extr®	Papillo Check®	Clart ® HPV2	HPV Genotyping LQ®	NucliSENS Easy Q® HPV	Aptima® HPV Assay
Fabricant		Digene	Roche Diagnostics	Roche Diagnostics	Innogenetics	Greiner Bio One	Genomica	Digene	Biomérieux	Gen Probe
technique	amplification	-	PCR avec amorces PGMY09/11	PCR avec amorces PGMY09/11	PCR avec amorces SPF10	PCR	PCR	PCR	NASBA	TMA
	hybridation	En phase liquide avec sondes ARN	sur microplaque	inverse sur bandelettes	inverse sur bandelettes	sur lame de plastique	sur fond de tube	sur microbilles de polystyrène		
	Détection	Chimio-luminescence	Colorimétrique	Colorimétrique	Colorimétrique	Fluorescence	Colorimétrique	Fluorescence	Sondes fluorescentes de type Beacon	HPA sondes chimioluminescentes
Région cible		Génome entier	L1	L1	L1	E1	L1	L1	E6/E7	E6/E7
HPV détectés	13 HPV de haut risque	13 HPV de haut risque	15 HPV de haut risque	18 HPV de haut risque	17 HPV de	18 HPV de	18 HPV de	5 HPV de haut risque	14 HPV de haut risque	

Annexes

	16,18,31,33,35,39,46,51,52,56,58,59 et 68 ou 5 HPV de bas risque 6, 11, 42,43,44	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82 3 HPV à haut risque potentiel 26, 53 et 66 19 HPV de bas risque 6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69-72, 81, 83, 84, IS39 et 89	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82 7 HPV de bas risque 6, 11, 40, 43, 44, 54 et 70 3 HPV non classés 69, 71 et 74	haut risque 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82 7 HPV de bas risque 6, 11, 40, 42-44, 70	haut risque 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 17 HPV de bas risque 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70-72, 81, 83-85, 89	haut risque 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82	16, 18, 31, 33, 45	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
--	--	--	---	--	--	---	--	--------------------	--

ANNEXE 3 : Caractéristiques des différents systèmes d'amorces a large spectre disponibles pour l'amplification par PCR des HPV (**Dalstein et al., 2007**)

Nom du système d'amorces	Zone cible du génome viral	Taille moyenne de l'amplicon
MY09/11 et PGMY09/11	L1	450 pb
Test Amplicor® (Roche Diagnostics)	L1	165 pb
GP5+/GP6+	L1	150 pb
SPF10	L1	65 pb

PARTIE PRATIQUE

ANNEXE 4 : Matériels des techniques de détection moléculaire à partir des cancers de VADS

-Matériels de la technique AmpliCor HPV Test ®

➤ Les accessoires en plastiques

- Micropipettes
- Les embouts
- Barrettes
- Eprouvette
- Plateau d'amplification

➤ L'équipement

- Vortex
- Tubes eppendorf
- Tubes Falcon
- Centrifugeuse
- Tubes dit rallonge de colonne
- Aspirateur
- Thermocycleur
- Spectrophotomètre de microplaque
- Filtre en silice

➤ Consommables

- 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
- Eau ultra pure.
- Éthanol à 70%.
- CAR** (ARN protecteur) : ARN de synthèse (protège l'ADN).
- Ethanol absolu
- NaCl 6M
- AVE** (Tampon d'élution) : eau sans RNase, 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® MinElute®) : 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 microbien) contenant une séquence d'HPV 16, ADN plasmidique non infectieux (d'origine microbien) 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[®] Gold (enzyme thermorésistante d'origine microbienne catalyse l'amplification de l'ADN).
*Enzyme AmpErase (uracile -N-glycosylase)
- d NTP** : dATP, dCTP, dGTP, dUTP
*Amorces (biothynilées), azide de sodium.
- HPV MgCl₂** (Chlorure de magnésium HPV) : Chlorure de magnésium, colorant amarante, azide de sodium.
- HPV MWP** (Microplaque pour HPV), microplaque équipée de sondes d'ADN pour HPV : 12 barrettes de microplaques à 8 puits.
- BG MWP** (Microplaque pour bêta globine), microplaque équipée de sondes d'ADN pour bêta globine (B_PC03) 12 barrettes de microplaque à 8 puits.
- DN** (Solution de dénaturation HPV) : hydroxyde de sodium EDTA, Bleu de thymol.
- AV-HRP** (conjugué avidine-peroxydase de raifort) : Tampon de Tris-HCL, conjugué Gammaglobuline bovine (d'origine mammifère), phénolo, conservateur ProClin[®]
- HPV-HYB** (Tampon d'hybridation HPV) : solution de phosphate de sodium, solubilisant, thocynate de sodium.
- SUB A** (substrat A) : solution de citrate, peroxydase d'hydrogène, conservateur ProClin[®]
- SUB B** (substrat B) : tétraméthylbenzidine (TMB), Diméthylformamide (DMF).
- STOP (réactif d'arrêt) : acide sulfurique.
- 10×WB** (concentré 10×de lavage) : Tampon de phosphate, chlorure de sodium, EDTA, détergent, conservateur ProClin[®]

-Matériels de la PCR conventionnelle

➤ Les accessoires en plastiques

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Les cuves | <input type="checkbox"/> Les embouts |
| <input type="checkbox"/> Barrettes | <input type="checkbox"/> Peigne |
| <input type="checkbox"/> Micropipettes | <input type="checkbox"/> Boite de pétrie |

➤ L'équipement

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Mixer Vortex | <input type="checkbox"/> Tubes dit bombés |
| <input type="checkbox"/> Thermocycleur | <input type="checkbox"/> Une balance à précision |
| <input type="checkbox"/> Micro-ondes | <input type="checkbox"/> Electrophorèses gel d'agarose |
| <input type="checkbox"/> Table à UV | <input type="checkbox"/> spectrophotomètre |
| <input type="checkbox"/> Centrifugeuse | |

➤ Réactifs

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| ➤ Eau ultra pure. | ➤ Tampon de lavage (éthanol à 70%). |
| ➤ Protéinase K. | ➤ Ethanol absolu |
| ➤ Hot Star Taq polymérase | |
| ➤ NaCl 6M | ➤ Mix de Qiagen |
| ➤ Eau ultra pure | |
| ➤ Amorces MY11 | |
| ➤ Amorces MY09 | |
| ➤ Eau distillée | |
| ➤ Marqueur du poids moléculaire | |
| ➤ BET | |
| ➤ Tampon de charge | |

ANNEXE 5 : Données épidémiologiques du cancer des VADS au niveau du service d'épidémiologie de Tlemcen (2012-2016)

1/ Répartition des cancers des VADS selon la localisation des tumeurs

Localisation de la tumeur	Cavité buccale	pharynx	larynx
Nombre de patients	640	212	114
Pourcentage %	66.25%	22.08%	11.8%

2/ Répartition des cancers des VADS par année

Années	2012	2013	2014	2015	2016
Nombre de patients	177	148	340	236	65
Pourcentage%	18.32%	15.32%	35.20%	24.43%	6.73%

3/ Répartition de cancers des VADS selon le sexe

Sexe	Homme	Femme
Nombre de patients	728	238
Pourcentage %	75.36%	24.64%

4/ Répartition des cancers de VADS selon l'âge

L'AGE	>30	[30-39]	[40-49]	[50-59]	[60-69]	≤70
Nombre de patients	20	61	102	225	284	274
Pourcentage%	3.11%	6.31%	10.56%	23.29%	29.40%	28.36%

5/ répartition des cancers de pharynx selon la localisation de tumeurs

Localisation de la tumeur	Cavum	oropharynx	Fosses nasales	hypopharynx
Nombre de patient	156	24	15	17
Pourcentage%	73.58%	11.32%	7.1%	8.02%

Annexe 6 :

Centre Hospitalier Universitaire Tediini Damerdji
Service d'Epidémiologie et de Médecine Préventive

REGISTRE DU CANCER DE TLEMCCEN

1. N° de matricule :

2. Source d'information :
 01. CHU Tlemcen, service de..... / / /
 30. Hôpital public de.....
 50. Laboratoire privé 60. Clinique privée
 40. CNASSAT 70. Réseaux 99. Inconnue

3. Dossier médical :

4. Nom :

5. Prénoms :

6. Sexe :

7. Date de naissance :

8. Lieu de naissance :

9. Age :

10. Adresse exacte :

11. Profession :

12. Date de diagnostic :

13. Base de diagnostic : 0. Certificat de décès uniquement 1. Clinique seulement
 2. Clinique/Imagerie 3. Chir/Autopsie exploratrice
 4. Marqueurs tumoraux spécifiques 5. Cytologie/Examen cellulaire
 6. Histopathologie métastase 7. Histopathologie primitive
 8. Autopsie/Histologie 9. Inconnue

14. Localisation : / / / /

15. Morphologie : / / / / / / /

16. Stade de diagnostic : 1. Local 2. Locorégional 3. Métastase 9. Indéterminé

17. Suivi : 1. Vivant 2. Décédé 3. Etranger 9. Inconnu

18. Date de suivi :

Nom du Médecin résident :

