

*UFR Médecine, Hôpital Maison Blanche de Reims  
École Doctorale Sciences Technologiques et Santé  
Année 2006*

# **Etude du rôle des papillomavirus humains dans la cancérogenèse des voies aéro-digestives supérieures**

## **THÈSE**

Présentée et soutenue publiquement  
Le 5 décembre 2006  
par

**Cyrille COISSARD**

Né le 6 mars 1979 à Charleville-Mézières (Ardennes)

En vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ de CHAMPAGNE-ARDENNE  
Spécialité SCIENCES de la VIE et de la SANTÉ**

### **Composition du Jury :**

- Rapporteurs :** Pr. Christiane MOUGIN, Université de Franche-Comté, Besançon  
Pr. Joseph ABECASSIS, Centre de Lutte contre le Cancer Paul Strauss, Strasbourg
- Président :** Pr. André CHAYS, Université de Champagne-Ardenne, Reims
- Membres invité :** Pr. Jean LACAU SAINT GUILY, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- Directeurs de thèse :** Pr. Marie-Danièle DIEBOLD, Université de Champagne-Ardenne, Reims  
Pr. Christine CLAVEL, Université de Champagne-Ardenne, Reims

## **REMERCIEMENTS**

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein de l'unité INSERM UMR-S 514 « Dynamique cellulaire et moléculaire de la muqueuse respiratoire » (Université de Reims Champagne-Ardenne) dirigée par le Professeur Edith Puchelle, et du Laboratoire Pol Bouin (CHU de Reims), dirigé par le Professeur Philippe Birembaut. Je tiens à les remercier sincèrement pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires durant ces 3 années.

Je remercie vivement le Professeur Christine Clavel pour avoir dirigé ce travail. Je la remercie également pour sa passion, sa rigueur et son esprit critique.

Je remercie également le Professeur Marie-Danièle Diebold d'avoir accepté la codirection de cette thèse et pour son éclairage anatomo-pathologique.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur Christiane Mougin et à Monsieur le Docteur Joseph Abecassis pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et avoir consacré leur temps à l'analyse et à la critique de ce travail.

Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs André Chays et Jean Lacau Saint Guily pour avoir accepté de siéger dans le jury de cette thèse.

Je remercie chaleureusement ceux qui m'ont accompagné tout au long de ce travail : le Docteur Véronique Dalstein, le Docteur Jenny Briolat, ainsi que Guillaume Besson, Isabelle Putaud, Christelle Mangeonjean et Marie Martin.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe 2 pour l'aide qu'ils m'ont apportée et particulièrement, les Docteurs Myriam Polette et Arnaud Bonnomet.

Ces années ont été régulièrement éclairées par les sourires (et les bonbons) des techniciennes, des secrétaires et des ASH du deuxième étage de Pol Bouin. Merci à tous.

Merci à mes parents, mes frères et mes amis pour avoir été là et pour m'avoir supporté.

Enfin, merci à toi, Charlotte pour ta compréhension et ton soutien. Merci pour ces presque trois années à tes côtés et pour toutes celles à venir...

## SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	9
<i>PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE</i>	12
<b>1. Cancers des voies aero-digestives supérieures (VADS)</b>	13
<b>1.1. Rappels anatomiques des VADS</b>	13
<b>1.1.1. Rhino-pharynx</b>	13
<b>1.1.2. Oro-pharynx</b>	13
<b>1.1.3. Hypo-pharynx</b>	16
<b>1.1.4. Trachée et poumons</b>	16
<b>1.1.4.1. Trachée</b>	16
<b>1.1.4.2. Poumons</b>	17
<b>1.2. Muqueuses des VADS</b>	19
<b>1.2.1. Epithélium respiratoire</b>	19
<b>1.2.2. Epithélium pavimenteux stratifié ou malpighien</b>	21
<b>1.3. Mécanismes de la cancérogenèse des VADS</b>	25
<b>1.3.1. Cancérogenèse multi-étapes</b>	25
<b>1.3.2. Champ de cancérisation</b>	26
<b>2. Epidémiologie des cancers des VADS</b>	29
<b>3. Carcinomes épidermoïdes du pharynx</b>	33
<b>3.1. Amygdale</b>	36
<b>3.2. Langue</b>	37
<b>3.3. Facteurs de risque principaux</b>	38
<b>3.3.1. Effets cancérogènes du tabac</b>	38
<b>3.3.2. Effets cancérogènes de l'alcool</b>	41
<b>3.3.3. Autres facteurs</b>	42
<b>4. Les papillomavirus humains (HPV) facteurs de risque potentiels des cancers des VADS</b>	43
<b>4.1. Arguments en faveur d'un rôle des HPV au niveau des VADS des cancers des VADS</b>	44
<b>4.2. Aspects virologiques</b>	48
<b>4.2.1. Classification et structure des HPV</b>	48
<b>4.2.2. Structure et organisation génomique des HPV</b>	54
<b>4.2.3. Oncoprotéines virales</b>	57
<b>4.2.3.1. E6 et ses fonctions</b>	57
<b>4.2.3.2. E7 et ses fonctions</b>	61
<b>4.2.3.3. Les autres gènes précoces : E1, E2, E4 et E5</b>	66
<b>4.3. HPV et cancer du col de l'utérus</b>	70
<b>4.3.1. Cycle viral</b>	70
<b>4.3.2. Histoire naturelle de l'infection à HPV liée à l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus</b>	75

<b>4.3.3.</b> Transmission du virus à l'hôte	77
<b>4.3.4.</b> Facteurs influençant l'évolution de l'infection à HPV-HR	78
4.3.4.1. Facteurs viraux	78
4.3.4.2. Facteurs liés à l'hôte et à l'immunité	80
4.3.4.3. Facteurs environnementaux	82
<b>5. Cancers des VADS et cancer du col dans le cadre de l'infection à HPV : convergences et divergences</b>	82
5.1. Introduction	82
5.2. Prévalence des HPV	83
5.3. Facteurs de risque	84
5.4. Considérations histologiques et mécanistiques	84
5.5. Considérations mécanistiques	87
<i>DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS</i>	90
Publication N°1	91
Publication N°2	94
Résultats complémentaires	97
<i>TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES</i>	109
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	125
<i>ANNEXES</i>	155

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AP1</b>	<i>Activator Protein 1</i>
<b>APC</b>	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messager
<b>ATP</b>	Adénosine 5'-triphosphate
<b>AV-p53</b>	Adénovirus exprimant une p53 sauvage
<b>BaP</b>	benzo(a)pyrène
<b>BEP</b>	<i>Immortalized Human Bronchial Epithelial cell line</i>
<b>Blk</b>	une protéine de la famille des src kinases
<b>BPV</b>	<i>Bovine Papillomavirus</i>
<b>Brd4</b>	<i>Bromodomain containing protein 4</i>
<b>CBP</b>	<i>CREB Binding Protein</i>
<b>CD</b>	<i>Conserved Domain</i>
<b>cdk</b>	<i>cyclin dependent kinase</i>
<b>C.H.U.</b>	<i>Centre Hospitalier Universitaire</i>
<b>CIN</b>	<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>
<b>CIRC</b>	Centre International de Recherche sur le Cancer
<b>CKI</b>	cdk Inhibitor
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>COPV</b>	<i>Canine Oral Papillomavirus</i>
<b>CRPV</b>	<i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i>
<b>Cys</b>	cystéine
<b>DCC</b>	Deleted in Colorectal Cancer

<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DPV</b>	<i>Deer Papillomavirus</i>
<b>E</b>	<i>Early region</i>
<b>E6-AP</b>	<i>E6-Associated Protein</i>
<b>EBV</b>	Virus d'Epstein-Barr
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>GADD</b>	<i>Growth Arrest on DNA Damage</i>
<b>HAP</b>	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
<b>HCII</b>	Hybrid Capture II®
<b>hDlг</b>	<i>human homolog of the Drosophila melanogaster tumor suppressor protein disc large</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
<b>HPV</b>	<i>Human Papillomavirus</i>
<b>HPV-BR</b>	HPV à bas risque oncogène
<b>HPV-HR</b>	HPV à haut risque oncogène
<b>H-ras</b>	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>hScrib</b>	<i>human homolog of the D. melanogaster tumor suppressor Scribble</i>
<b>HSIL</b>	<i>High grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
<b>HTE</b>	<i>Human Tonsillar Epithelial cell line</i>
<b>hTERT</b>	<i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IHC</b>	<i>Immuno-Histo-Chimie</i>
<b>IRF-3</b>	<i>Interferon Regulatory Factor-3</i>
<b>KDa</b>	kilo Dalton

<b>Kpb</b>	kilo paire de base
<b>k-ras</b>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>L</b>	<i>Late region</i>
<b>LCR</b>	<i>Long Control Region</i>
<b>LSIL</b>	Low grade Squamous Intraepithelial Lesion
<b>M</b>	critère de la présence éventuelle de métastases
<b>MALT</b>	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissues</i>
<b>N</b>	critère de la présence éventuelle d'adénopathies
<b>NASBA</b>	<i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>
<b>NES</b>	<i>Nuclear Export Sequence</i>
<b>NF1</b>	Neurofibromine 1
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
<b>NNK</b>	4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone
<b>NNN</b>	<i>N'</i> -nitrosonornicotine
<b>NOD/SCID</b>	<i>Non-obese Diabetic/Severe Combined Immune Deficiency</i>
<b>O.R.L.</b>	Oto-rhino-laryngologie
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OR</b>	<i>odds ratio</i>
<b>ori</b>	origine de réPLICATION
<b>OPV</b>	Ovine Papillomavirus
<b>PAS</b>	<i>Periodic Acid Schiff</i>
<b>PEI</b>	<i>Polyethylenimine</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PCR-SSCP</b>	<i>PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>

<b>POL</b>	Phase Ouvert de Lecture
<b>pRb</b>	protéine du Rétinoblastome
<b>PV</b>	Papillomavirus
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase-PCR
<b>siRNA</b>	<i>small interfering Ribonucleic Acid</i>
<b>Sp1</b>	<i>a GC box binding protein</i>
<b>STAG3</b>	<i>Stroma Antigen 3</i>
<b>SYCP2</b>	<i>Synaptonemal Complex Protein 2</i>
<b>T</b>	critère de la taille de la tumeur
<b>TACM1</b>	<i>Triticum aestivum subunit CM1 of alpha-amylase tetrameric inhibitor</i>
<b>URR</b>	Upstream Regulatory Region
<b>VADS</b>	Voies Aéro-Digestives Supérieures
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>YY1</b>	protéine ying-yang 1
<b>β-IFN</b>	interféron bêta

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Coupe sagittale médiane de la tête et rapports anatomiques des différentes cavités des voies aérodigestives supérieures.
- Figure 2 : Situation anatomique des amygdales et représentation schématique de l'anneau de Waldeyer.
- Figure 3 : Coupe histologique au niveau d'une bronche montrant la structure et la composition de l'épithélium respiratoire.
- Figure 4 : Coupe histologique à différents grossissements d'une amygdale palatine.
- Figure 5 : Modèle génétique de la cancérogenèse colo-rectale.
- Figure 6 : Proposition de modèle génétique de la cancérogenèse des VADS.  
Exemple de la formation d'un "champ de cancérisation".
- Figure 7 : Incidence et nombre de cas de décès pour différents cancers en France en 2002.
- Figure 8 : Incidence des cancers de la cavité buccale et du pharynx chez les hommes en Europe en 2002.
- Figure 9 : Arbre phylogénétique représentant la distance relative séparant la séquence L1 de 118 papillomavirus et pourcentage d'identité de la séquence L1 de ces 118 papillomavirus par genre, espèce, type et sous-type.
- Figure 10 : Structure de la capsid d'un papillomavirus humain.
- Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation génomique d'un papillomavirus humain.

Figure 12 : La protéine E6 des HPV-HR agit en synergie avec E7 pour la transformation des cellules épithéliales.

Figure 13 : La protéine E7 concourt à la transformation et à l'immortalisation des cellules épithéliales.

Figure 14 : Fonctions des oncoprotéines E6 et E7 et leurs interactions dans les étapes conduisant à l'immortalisation.

Figure 15 : Le cycle normal de l'infection par le papillomavirus humain.

Figure 16 : Odds ratio spécifiques des types d'HPV et intervalles de confiance dans les cancers du col.

Figure 17 : Histoire naturelle de l'infection à HPV oncogènes, liée à l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus.

Figure 18 : Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus.

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Classification TNM (2002) : cancer de l'oropharynx. Résumé du système TNM et correspondance avec la classification AJCC : attribution du stade.

Tableau 2 : Types de composés cancérigènes retrouvés dans le tabac.

Tableau 3 : Principales données concernant la prévalence des HPV dans les cancers des VADS en fonction de la localisation de la tumeur.

Tableau 4 : Haut risque E6.

Tableau 5 : Haut risque E7.

## **INTRODUCTION GENERALE**

Dans le monde, les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) représentent 5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers, notamment chez les hommes âgés de plus de 55 ans (Bray *et al.*, 2002 ; Ferlay *et al.*, 2004). La France, et plus particulièrement les régions de l'Est, présentent la plus haute incidence de cancers du pharynx dans le monde. En effet, ces cancers se situent au 4<sup>ème</sup> rang pour l'incidence et au 5<sup>ème</sup> rang pour la mortalité chez les hommes (Remontet *et al.*, 2003). La France est donc un pays à haut risque pour ce type de cancers.

Le traitement de ces cancers, majoritairement chirurgical, est extrêmement délabrant et entraîne de nombreux handicaps tant physiques que sociaux. Les cancers des VADS présentent de plus un fort taux de récurrence dû à leurs mécanismes de cancérisation particulier. Des études de plus en plus nombreuses semblent indiquer qu'un agent viral, le papillomavirus humain (HPV), pourrait être impliqué dans au moins un sous-groupe de ces cancers. Ces cancers HPV positifs seraient de meilleur pronostic et répondraient mieux à la radiothérapie. Une meilleure compréhension de leur étiologie est donc primordiale dans l'intérêt des patients.

Les HPV sont bien connus pour être responsables de la cancérogenèse du cancer du col de l'utérus (Walboomers *et al.*, 1999). Ainsi, le cancer du col de l'utérus est la première tumeur solide humaine d'étiologie virale. Si les mécanismes d'action des HPV dans le développement du cancer du col utérin sont maintenant bien élucidés, la réciproque est loin d'être vraie en ce qui concerne les cancers des VADS.

L'ensemble de notre travail est rapporté dans 3 parties.

La première partie est consacrée à une revue bibliographique des connaissances actuelles sur les cancers des VADS, leur possible lien étiologique avec les HPV ainsi que sur les mécanismes d'action des HPV qui pourraient être applicables à la cancérogenèse des VADS.

La seconde partie présente deux articles, le premier étudiant la prévalence et l'expression des HPV dans des cancers pulmonaires (Coissard *et al.*, 2005), le second analysant l'impact de la présence des HPV sur des marqueurs du cycle cellulaire dans des cancers de l'amygdale palatine (Coissard *et al.*, soumis). Nous rapportons ensuite des résultats complémentaires sur une étude des cancers de l'oropharynx et de la base de la langue, dans laquelle la présence et l'expression des gènes d'HPV sont confrontées aux données cliniques des patients correspondants.

Enfin, la troisième partie présente une discussion générale ainsi que les perspectives ouvertes par nos résultats.

## **PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE**

## 1. Cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS)

Les cancers des VADS sont majoritairement des carcinomes épidermoïdes, c'est-à-dire survenant au niveau de l'épithélium, intéressant une région anatomique incluant les fosses nasales, la cavité buccale, le pharynx et le larynx.

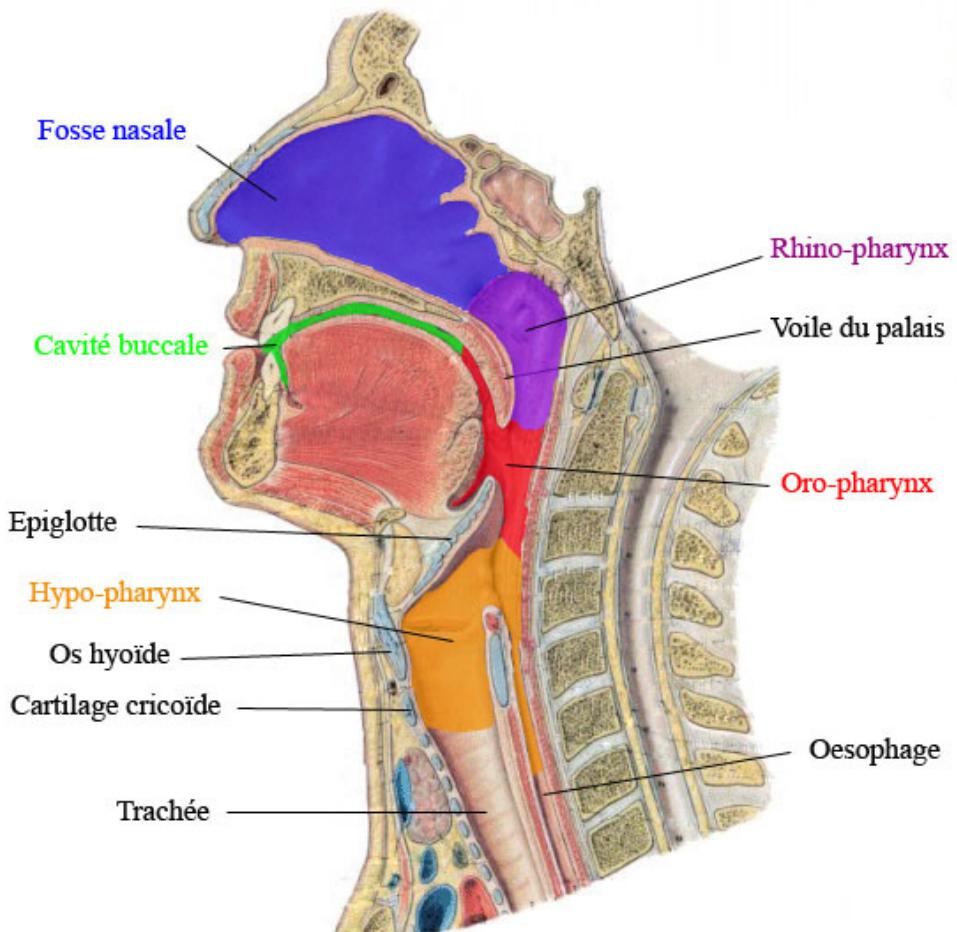
### 1.1. Rappels anatomiques des VADS

Les voies aéro-digestives supérieures ont deux fonctions principales : l'une alimentaire avec la prise d'aliments proprement dits et la déglutition, l'autre respiratoire avec notamment la phonation. Les VADS peuvent être séparées en différents compartiments (Figure 1). Le premier de ces compartiments est composé des deux fosses nasales, le second compartiment est le pharynx, constitué du rhinopharynx, de l'oro-pharynx et de l'hypo-pharynx comprenant le larynx et le laryngopharynx, vient ensuite la partie formée par l'œsophage cervical qui longe la trachée. Les fosses nasales sont au nombre de deux et séparée par la cloison nasale (Rouvière *et al.*, 1997a). Situées au niveau de la face, elles constituent l'orifice supérieur de l'appareil respiratoire.

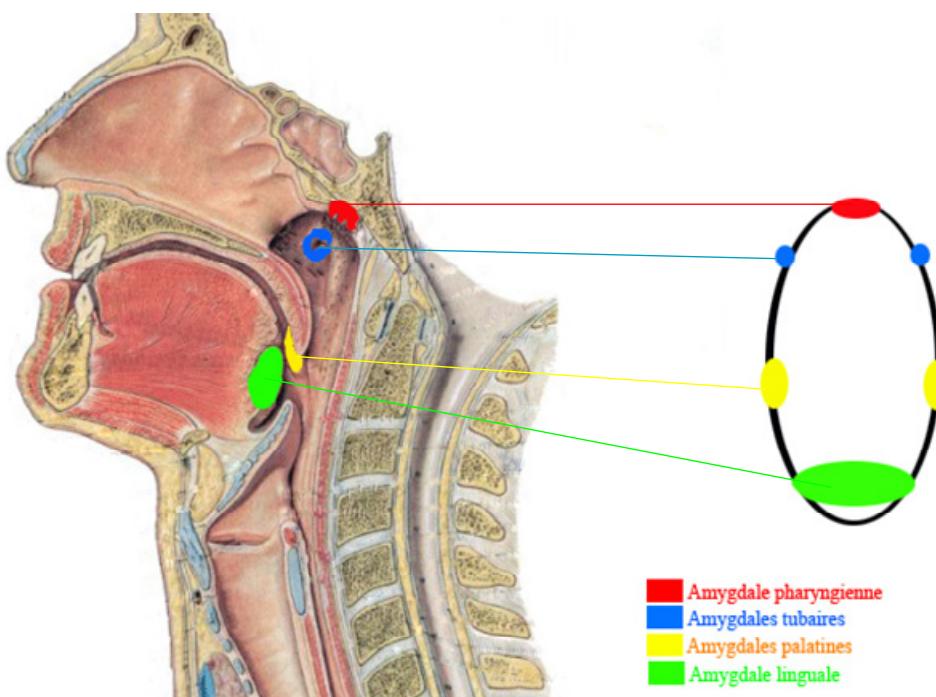
L'anatomie du pharynx est relativement complexe puisqu'elle n'intéresse pas un organe physiquement descriptible, mais un ensemble de cavités reliées entre elles dont l'armature musculo-membraneuse déformable est composée de membranes et de fibres musculaires striées.

#### 1.1.1. Rhino-pharynx

Il forme la partie supérieure du pharynx. Le rhino-pharynx est partiellement séparé de l'oro-pharynx et de la partie buccale par une cloison musculo-



**Figure 1 :** Coupe sagittale médiane de la tête et rapports anatomiques des différentes cavités des voies aéro-digestives supérieures.



**Figure 2 :** Situation anatomique des amygdales et représentation schématique de l'anneau de Waldeyer.

membraneuse mobile formant le voile du palais (Rouvière *et al.*, 1997a ; Dehesdin *et al.*, 1998). Il constitue en fait l'arrière-cavité des fosses nasales et forme une voie de passage pour l'air lors du processus de respiration (Figure 1).

### **1.1.2. Oro-pharynx**

La cavité moyenne du pharynx est limitée dans sa partie supérieure par le voile du palais et dans sa partie inférieure par le corps de l'os hyoïde. La face postérieure de l'oro-pharynx répond à l'arc antérieur de l'atlas, au corps de l'axis et à la troisième vertèbre cervicale. Il comporte deux faces latérales occupées, d'avant en arrière, par les piliers antérieurs du voile du palais, les amygdales palatines, les piliers postérieurs et par deux gouttières formant les angles latéraux du pharynx. Il s'ouvre en avant dans la cavité buccale en regard de la face dorsale de la langue (Rouvière *et al.*, 1997a ; Dehesdin *et al.*, 1998). Il est à noter que l'oro-pharynx, ou carrefour oro-pharyngé, est le seul compartiment jouant un rôle à la fois dans l'alimentation et dans la respiration (Figure 1).

D'autres éléments donnent à l'oro-pharynx une importance particulière au sein des VADS. En effet, les constituants du MALT (*mucosa-associated lymphoid tissues* ou tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) y sont particulièrement développés. Ces amas de tissu lymphoïde forment les amygdales. Il existe quatre paires d'amygdales, les amygdales palatines, les amygdales tubaires situées autour de l'orifice de la trompe d'Eustache, les amygdales pharyngiennes, aussi appelées adénoïdes ou végétations, qui se trouvent dans la paroi postérieure du rhinopharynx, et les amygdales linguales sur la face dorsale pharyngienne de la langue. En fait, ces différentes amygdales sont disposées en cercle autour de l'oro-pharynx et constituent une entité anatomique appelée anneau de Waldeyer (Perry *et al.*, 1998)

(Figure 2). En tant que tissus lymphoïdes, les amygdales réalisent une surveillance immunologique importante du fait de la situation de carrefour de l'oro-pharynx. Il constitue en effet une voie d'entrée naturelle dans l'organisme pour les substances étrangères ainsi que pour les pathogènes, viraux ou bactériens.

### **1.1.3. *Hypo-pharynx***

Partie inférieure du pharynx, l'hypo-pharynx est le lieu où les voies aériennes et digestives se séparent anatomiquement. Il est en effet constitué en avant par le larynx s'ouvrant sur la trachée, et en arrière par le laryngo-pharynx débouchant sur l'œsophage. Le larynx présente, de haut en bas, l'épiglotte, l'orifice supérieure du larynx et une saillie formée des cartilages arytenoïdes, cricoïdes et des muscles qui les recouvrent. Le larynx est l'organe de la phonation et constitue le début de l'appareil broncho-pulmonaire. Le laryngo-pharynx est, quant à lui, constitué de la partie supérieure de l'œsophage et répond en arrière aux quatrième, cinquième et sixième vertèbres cervicales (Figure 1) (Rouvière *et al.*, 1997a).

### **1.1.4. *Trachée et poumons***

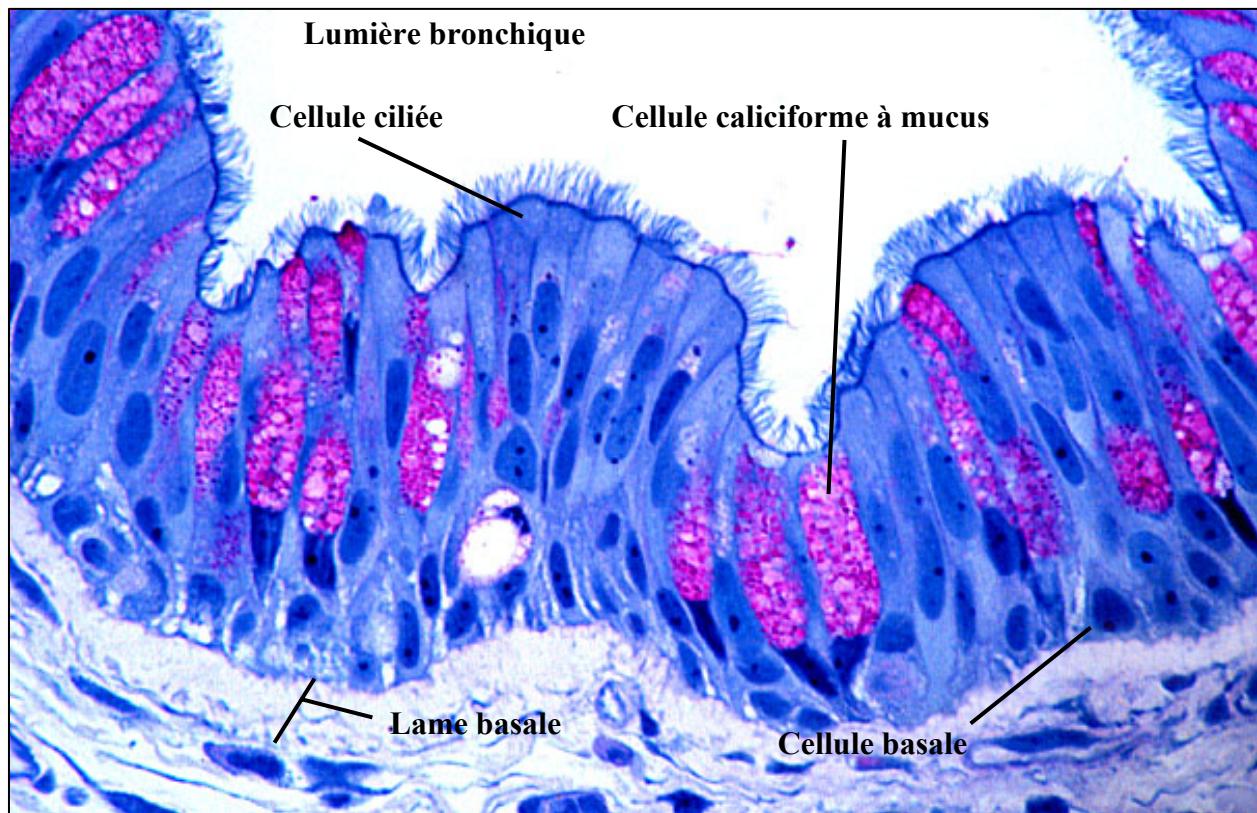
Trachée et poumons ne font pas partie des voies aéro-digestives supérieures *stricto sensu*. Néanmoins, ils constituent la plus grande partie des voies aériennes, et la trachée, qui fait directement suite au larynx, est en rapport constant avec l'organe digestif qu'est l'œsophage. De plus, trachée et poumons partagent des caractéristiques histologiques communes avec les structures précédemment citées.

#### **1.1.4.1. *Trachée***

La trachée est un conduit constitué de deux tuniques, l'une externe, fibromusculo-cartilagineuse, et l'autre interne, muqueuse. Elle se prolonge sur 12 centimètres chez l'homme et 11 chez la femme et mesure 12 millimètres de diamètre. Par sa face postérieure, la trachée est liée à l'œsophage par un tissu de plus en plus souple à mesure de la descente dans le thorax, ainsi que par des tractus musculo-élastiques. Elle se termine en une bifurcation donnant naissance aux deux bronches qui vont à leur tour se diviser en bronches et bronchioles (Rouvière *et al.*, 1997a ; Rouvière *et al.*, 1997b).

#### 1.1.4.2. Poumons

Les poumons sont les principaux organes de la respiration et peuvent présenter de grandes variations de volume. Ces variations dépendent notamment de la capacité du thorax et de l'état d'inspiration ou d'expiration. Malgré ces variations, le poumon droit est toujours plus volumineux que le poumon gauche, et présente deux scissures alors que le gauche n'en a qu'une. Chaque poumon possédant une face externe convexe, une face interne *quasi* plane, un sommet et une base, leur forme est généralement comparée à celle de la moitié d'un cône coupé en deux par un plan vertical. Ils sont, par ailleurs, délimités par trois bords, l'un, antérieur, l'autre, postérieur et un troisième, inférieur. Bien que variable d'un sujet à l'autre, le sommet du poumon s'élève de 2 à 3 centimètres au-dessus de la partie interne de la clavicule et sa partie la plus basse ne dépasse pas la septième côte (Rouvière *et al.*, 1997b).



**Figure 3 :** Coupe histologique au niveau d'une bronche montrant la structure et la composition de l'épithélium respiratoire (coloration : PAS).

## 1.2. Muqueuses des VADS

Une muqueuse est toujours composée de trois structures. Un épithélium de revêtement reposant sur une lame basale et un tissu conjonctif lâche, vascularisé et innervé, appelé chorion. L'épithélium et le chorion sont séparés physiquement par cette lame basale constituée de collagène de type IV et de laminine principalement. La structure de l'épithélium de revêtement et par extension, d'une muqueuse, reflète toujours la fonction de l'organe ou de la cavité qu'il tapisse. Ainsi, deux grands types d'épithéliums sont retrouvés au sein des différentes cavités qui composent les VADS : un épithélium respiratoire au niveau des voies de conduction aériennes et un épithélium de type épidermoïde au sein des voies ayant une composante digestive.

### 1.2.1. *Epithélium respiratoire*

L'épithélium respiratoire possède plusieurs caractéristiques. C'est un épithélium simple pseudostratifié, ce qui signifie qu'il ne présente qu'une seule assise cellulaire reposant sur la lame basale bien que toutes les cellules n'atteignent pas la lumière. Les noyaux cellulaires ne sont pas alignés les uns à côtés des autres, mais étagés sur la hauteur de l'épithélium et lui confèrent ainsi cet aspect "pseudo" stratifié. Cet épithélium est dit cylindrique car les cellules qui le composent sont plus hautes que larges. Elles possèdent de plus une polarité certaine, leur noyau étant situé à leur pôle basal. Enfin, la majorité des cellules qui le forme possèdent des cils vibratiles apicaux (Wheater *et al.*, 1988) (Figure 3).

Il est composé de trois types cellulaires principaux. La cellule basale n'atteint pas la lumière de la cavité que cet épithélium recouvre et son noyau est donc retrouvé dans le tiers inférieur de l'épithélium. Elle joue un rôle primordial dans la vie

de la muqueuse car certaines de ces cellules sont des cellules progénitrices capables de se différencier en tous les autres types cellulaires.

La cellule ciliée est la plus abondante de ce type d'épithélium. Grâce aux 200 à 300 cils vibratiles de son pôle apical, cette cellule est entièrement dévolue au fonctionnement de l'escalator muco-ciliaire, un système de clairance spécifique des voies de conduction. Une autre caractéristique remarquable de leur surface apicale est la présence de microvillosités s'insérant entre les cils vibratiles. Ces microvillosités sont un dispositif cytologique permettant d'augmenter la surface cellulaire et témoignent d'une zone d'échanges importante. Les cellules ciliées ont leur noyau localisé dans le tiers supérieur de leur cytoplasme et possèdent de nombreuses mitochondries, nécessaires au fonctionnement des cils vibratiles et des pompes ioniques membranaires, proches de leur pôle apical (Wheater *et al.*, 1988).

Le troisième type cellulaire retrouvé au sein d'un tel épithélium est la cellule caliciforme à mucus qui, comme son nom l'indique, a pour fonction de sécréter le mucus retrouvé tout au long de l'appareil respiratoire. Ces cellules possèdent un noyau situé à leur pôle basal, et un pôle apical dilaté, clair et rempli de grains de mucine, une variété de glycoprotéines qui apparaît bleu pâle en coloration azan (azocarmin-orange G-bleu d'aniline) (Wheater *et al.*, 1988 ; Kühnel, 1997).

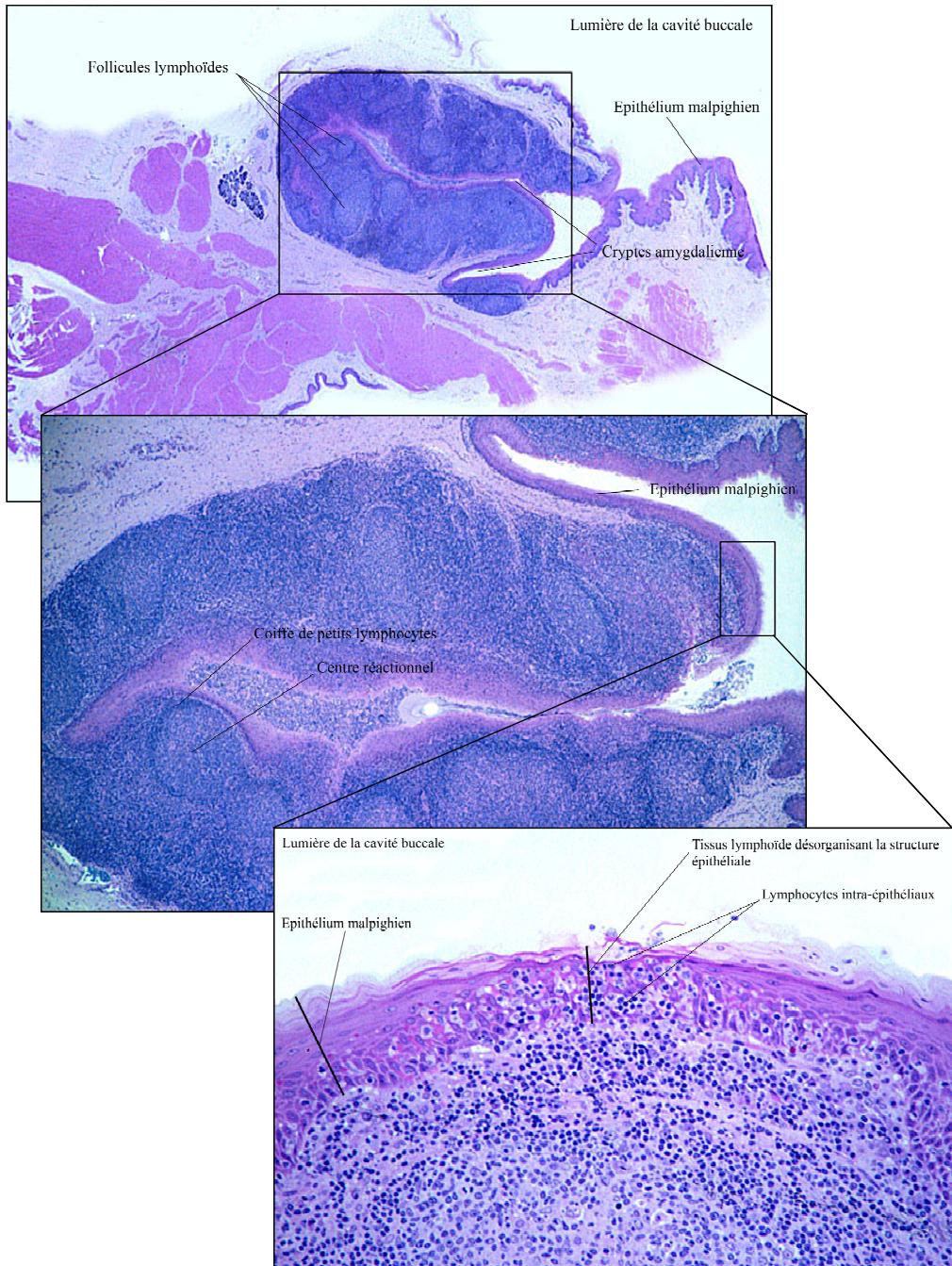
L'épithélium respiratoire tapisse toutes les voies de conduction aériennes depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles pulmonaires et notamment, le rhinopharynx, la trachée et les poumons. L'oro-pharynx et une partie de l'hypo-pharynx sont en contact non seulement avec l'air, mais aussi avec le bol alimentaire plus consistant et susceptible d'être plus agressif pour la muqueuse et n'est donc pas recouvert d'un épithélium de type respiratoire mais par un revêtement malpighien.

### **1.2.2. *Epithélium pavimenteux stratifié ou malpighien***

Contrairement à la muqueuse respiratoire, ce type d'épithélium ne présente jamais de cellules ciliées et est constitué de plusieurs assises cellulaires lui conférant son aspect stratifié. Depuis la lame basale jusqu'aux couches superficielles plus minces, ces assises cellulaires subissent de nombreux changements morphologiques et fonctionnels. Les cellules basales donnent naissance par mitoses successives aux cellules qui vont progressivement gagner la surface épithéliale. Les cellules basales sont très hautes par rapport à leur largeur, puis deviennent polygonales dans les couches intermédiaires et finissent par s'aplatir à la surface épithéliale. Au cours de cette progression et donc, de l'éloignement de la lame basale et du chorion, les cellules vont se différencier jusqu'à présenter des signes de dégénérescence. Les cellules dégénératives de la surface sont constamment remplacées par des cellules migrantes des couches plus profondes de l'épithélium. La surface épithéliale est donc régulièrement, entièrement renouvelée (Wheater et al., 1988).

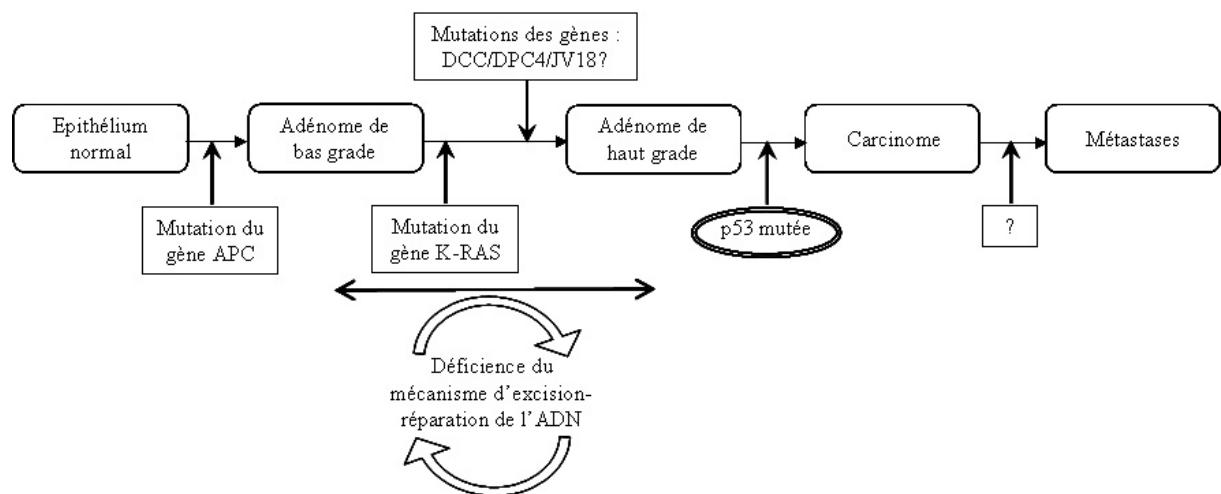
A l'inverse de l'épithélium respiratoire, la jonction de l'épithélium de type malpighien et du chorion *via* la lame basale est habituellement festonnée, ce qui a pour effet principal d'augmenter la cohésion entre celui-ci et les tissus conjonctifs sous-jacents. De plus, sa stratification en couches successives le rend beaucoup plus résistant à une abrasion modérée. En effet, la perte éventuelle de cellules de surface ne touche pas et n'a pas d'incidence sur les cellules basales ou le chorion. L'épithélium malpighien constitue le revêtement de la cavité buccale, de l'oropharynx et des voies digestives (Dehesdin et al., 1998 ; Wheater et al., 1988).

Il existe au niveau de l'oro-pharynx des structures particulières : les amygdales palatines. A sa base, l'amygdale est recouverte d'une capsule dense de



**Figure 4 :** Coupe histologique à différents grossissements d'une amygdale palatine (coloration : hématoxyline/bleu de toluidine-phloxinate).

tissu conjonctif qui la sépare du muscle sous-jacent (Kühnel, 1997). Elles sont constituées de masses importantes de tissu lymphoïde et recouvertes d'un épithélium de type malpighien. L'épithélium recouvrant les amygdales palatines s'invagine ensuite en profondeur environ 15 à 20 fois pour former les cryptes amygdaliennes. Les cryptes amygdaliennes sont bordées par du tissu lymphoïde contenant des follicules lymphoïdes présentant des centres réactionnels identiques à ceux retrouvés dans les ganglions lymphatiques (Figure 4). Enfin, la surface lumineuse de l'amygdale ainsi que l'entrée de la crypte sont recouvertes d'un épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé qui est peu infiltré par les lymphocytes (Perry *et al.*, 1998). En revanche, l'épithélium des cryptes peut être fortement infiltré par les lymphocytes qui le traversent et le désorganisent jusqu'à rendre toute structure épithéliale méconnaissable (Kühnel, 1997). Ainsi, lors de la reconnaissance des antigènes, les lymphocytes, macrophages et plasmocytes ont la capacité de traverser la lumière des cryptes *via* d'étroits passages entre les cellules épithéliales (Perry *et al.*, 1998) créant ainsi des zones de fragilité mécanique. Ces caractéristiques histologiques confèrent à l'épithélium recouvrant les amygdales palatines une moindre résistance à l'abrasion et à toutes autres sortes d'agressions, physiques, bactériennes, ou virales, que le reste de l'épithélium buccal. De plus, les zones de désorganisation épithéliale dues à l'infiltration lymphocytaire, jouxtant des zones où l'épithélium conserve sa structure, donnent aux amygdales des caractères histologiques similaires à ceux du col de l'utérus au niveau de la zone de jonction endocol-exocol qui est elle aussi, une zone de fragilité mécanique (Kühnel, 1997).



**Figure 5 :** Modèle génétique de la cancérogenèse colo-rectale (Adapté de Kinzler et Vogelstein, 1996).

### 1.3. Mécanismes de la cancérogenèse des VADS

#### 1.3.1. Cancérogenèse multi-étapes

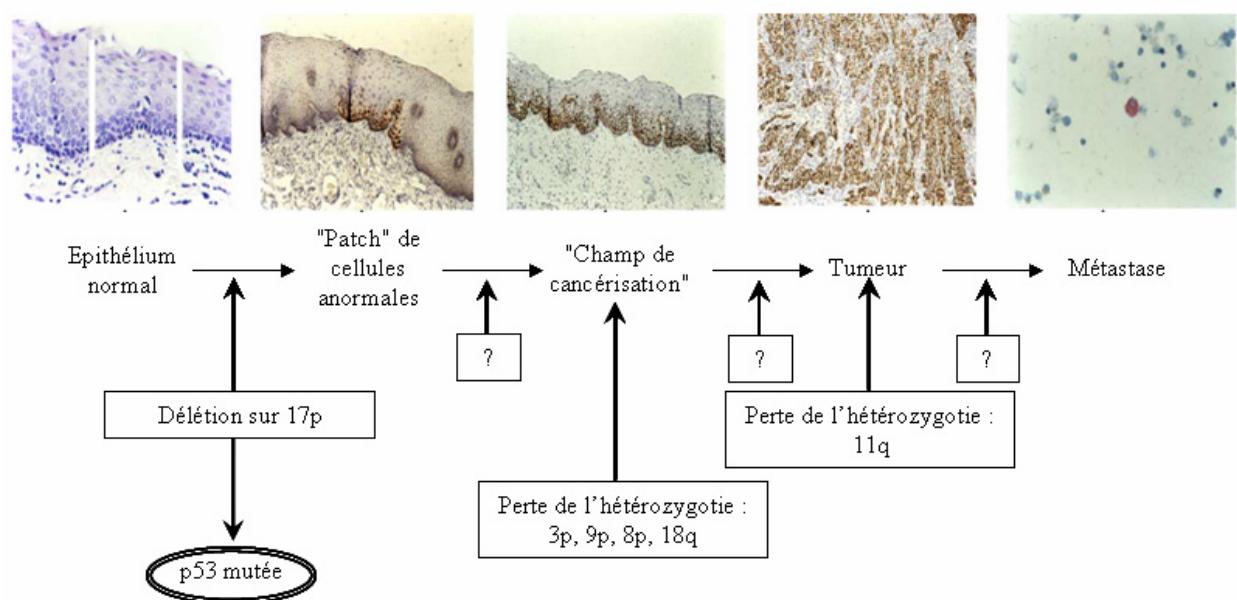
Il est désormais communément admis que la majorité des cancers ont une origine monoclonale (Fialkow, 1976 ; Garcia *et al.*, 2000), c'est-à-dire qu'une tumeur dérive d'un clone cellulaire unique. Le premier événement de la cancérogenèse est la transformation d'une cellule par mutations successives, survenant dans trois grandes familles de gènes : les gènes suppresseurs de tumeur, les oncogènes et les gènes responsables de l'homéostasie cellulaire (Hahn *et al.*, 1999). L'accumulation de ces anomalies génétiques devient alors irréversible, empêche les mécanismes intracellulaires de contrôle et de réparation de fonctionner et confère à ces cellules transformées un avantage de prolifération sur les cellules adjacentes. Les cellules ainsi transformées ont un comportement analogue à celui de cellules souches, notamment en ce qui concerne leur capacité de prolifération et d'autorenouvellement, elles peuvent aussi parfois subir un phénomène de différenciation aberrante (Reya *et al.*, 2001).

Néanmoins, le seul critère d'un nombre seuil de mutations pour déclencher un cancer n'est pas suffisant. En effet, dans un modèle largement accepté aujourd'hui, Kinzler et Vogelstein ont démontré le rôle déterminant de l'ordre d'apparition des mutations au sein d'un groupe de cellules pré-tumorales (Kinzler et Volgestein, 1996). C'est le modèle de la cancérogenèse multi-étapes. Cependant, parmi tous les cancers, il n'existe évidemment pas une séquence type d'événements mutationnels. Actuellement, la séquence la mieux définie est celle de la formation des cancers colo-rectaux (Figure 5). Concernant la séquence des cancers VADS, certains auteurs

ont déjà proposé leur propre modèle (Forastiere *et al.*, 2001 ; Braakhuis *et al.*, 2003). Hanahan et Weinberg vont plus loin et définissent les signes distinctifs caractérisant les cellules cancéreuses. Ces caractéristiques essentielles sont au nombre de six et consistent en i) la stimulation autocrine de la cellule par les facteurs de croissance, ii) l'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance, iii) la résistance à l'apoptose, iv) un potentiel de division cellulaire illimité, v) une angiogenèse soutenue et enfin, vi) une capacité d'invasion tissulaire et de formation de métastases (Hanahan et Weinberg, 2000). Selon ces mêmes auteurs, toutes les cellules cancéreuses acquièrent ces six propriétés, mais l'ordre et la redondance éventuelle de certaines d'entre-elles, peuvent varier en fonction des types de cancer.

### **1.3.2. Champ de Cancérisation**

Comme chez les patients atteints d'un cancer du poumon, il n'est pas rare de retrouver, chez ceux souffrant d'un cancer des VADS, de multiples lésions dysplasiques (non malignes) et/ou malignes, souvent à différents sites des VADS et ce, au cours de plusieurs années. De plus, l'apparition d'une deuxième localisation primitive, dans environ 20% des cas (Hunter *et al.*, 2005), généralement éloignée du site de la première tumeur diagnostiquée mais génétiquement liée à celle-ci (Braakhuis *et al.*, 2003 ; Brennan *et al.*, 1995), ainsi que l'exposition chronique de ces zones à des substances cancérigènes comme le tabac ou l'alcool, a conduit pour ces cancers des VADS à la théorie du "champ de Cancérisation", présentée pour la première fois par Slaughter en 1953 (Slaughter *et al.*, 1953). Ainsi après avoir examiné les caractéristiques histologiques de 783 patients, Slaughter *et al.* ont défini le champ de Cancérisation par 4 aspects : i) les cancers de la cavité buccale surviennent dans des régions où il existe de multiples zones de lésions pré-



**Figure 6 :** Proposition de modèle génétique de la cancérogenèse des VADS. Exemple de la formation d'un "champ de cancérisation". (D'après Braakhuis *et al.* 2005).

cancéreuses, ii) la tumeur est entourée de tissus histologiquement anormaux, iii) ces cancers consistent souvent en de nombreuses lésions indépendantes qui vont parfois fusionner et, iv) la persistance de tissu anormal après traitement chirurgical peut expliquer la survenue d'une seconde localisation primitive ou d'une récurrence locale. D'autre part en 2003, Braakhuis *et al.* (Braakhuis *et al.*, 2003) ont complété la notion de "champ de cancérisation" au niveau cellulaire comme étant l'existence d'une ou plusieurs zones contenant des cellules génétiquement modifiées, ayant une origine monoclonale mais ne présentant pas de comportement invasif ou métastatique caractéristique du cancer (Hanahan et Weinberg, 2000). Enfin, ce terme de "champ de cancérisation" a été utilisé cliniquement pour la description de processus néoplasiques multiples au sein de la muqueuse buccale, souvent en supposant que ces processus se développaient indépendamment les uns des autres (Braakhuis *et al.*, 2005) (Figure 6).

Il existe des signes montrant qu'une éventuelle récurrence d'une tumeur primitive au niveau des VADS dérive souvent, par mutations successives, d'un même "champ" de cellules normales exposées aux mêmes substances cancérigènes (Hunter *et al.*, 2005). De plus, certains changements génétiques caractéristiques d'une tumeur peuvent être retrouvés au sein de la muqueuse non tumorale qui l'entoure et ceci sur une distance pouvant aller jusqu'à 7 centimètres (Braakhuis *et al.*, 2003 ; Brennan *et al.*, 1995 ; Hunter *et al.*, 2005). La présence de ces mêmes altérations génétiques dans de multiples marges de résection de tumeur montre que certains cancers des VADS sont issus d'un même champ préexistant de la muqueuse ayant subi des modifications génétiques.

Ce concept de "champ de cancérisation" permet donc de distinguer 3 types de récurrences d'un cancer des VADS : i) la récurrence peut dériver directement de la

tumeur primitive : c'est alors une tumeur secondaire, une récurrence "vraie". ii) La tumeur primitive et la récurrence peuvent aussi partager un spectre d'altérations génétiques dont les éléments les plus anciens sont communs car ces tumeurs se sont développées au sein du même champ de la muqueuse génétiquement modifiée. iii) Enfin, cette récurrence peut être un second cancer avec une origine complètement indépendante de la première tumeur.

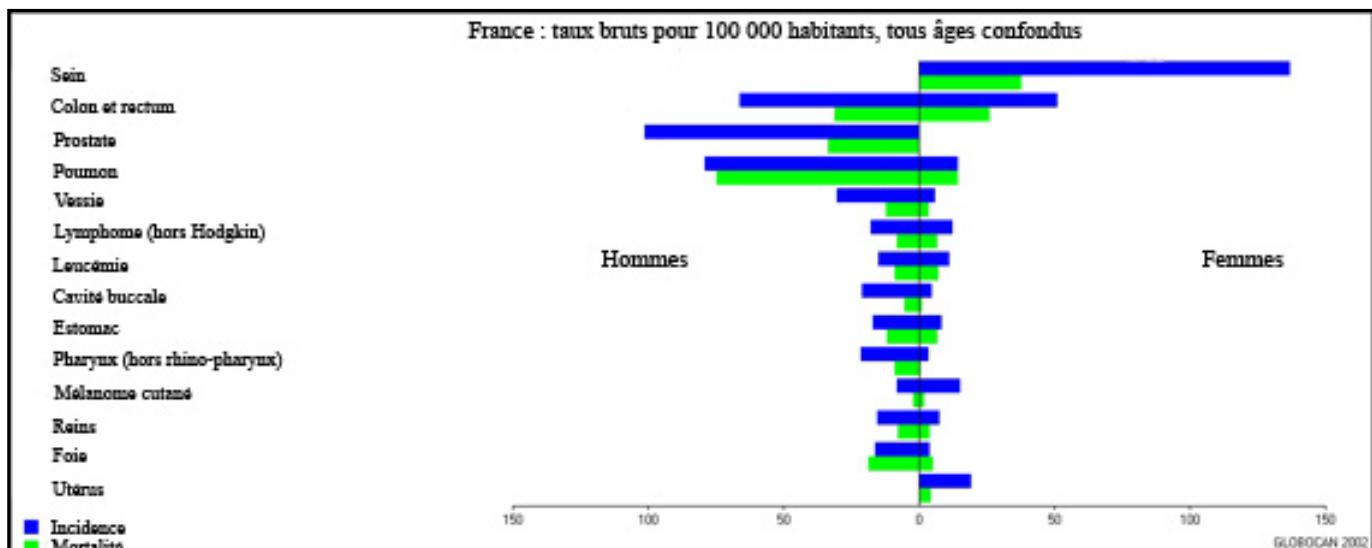
La distinction entre ces trois types de récurrence est très importante du fait du lien génétique pouvant exister entre différentes tumeurs. En effet, la connaissance de la taille du champ de cancérisation où une même mutation est retrouvée, devrait avoir un impact sur une éventuelle extension des marges de résection. De même, la connaissance de ce possible lien génétique entre deux tumeurs séparées dans le temps, pourrait déboucher sur de nouveaux schémas thérapeutiques et de suivi.

## 2. Epidémiologie des cancers des VADS

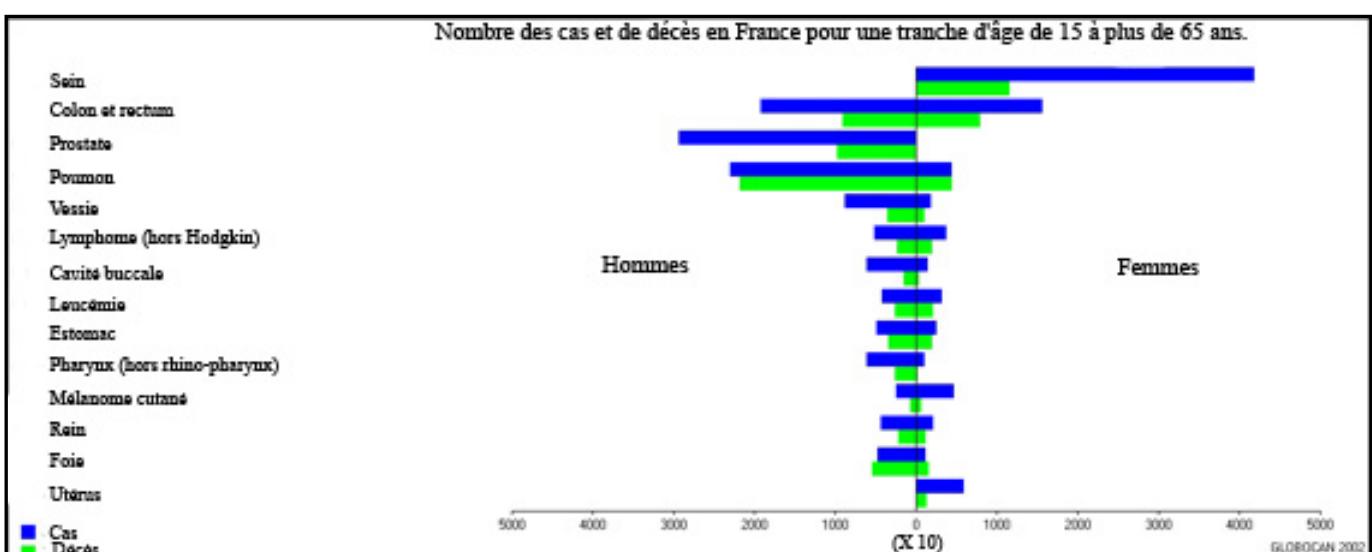
Dans le monde au cours de l'année 2000, plus de 10 millions de nouveaux cas de cancers ont été déclarés avec près de 7 millions de décès (Shibuya *et al.*, 2002). Parmi ces nouveaux cas de cancers, un quart se déclare en Europe où ils représentent 1,6 million de décès chaque année. Avec 377 000 nouveaux cas en 1995, le cancer du poumon reste la première cause de cancer en Europe. Si l'on prend en compte les cancers colo-rectaux et le cancer du sein, ces trois cancers sont à l'origine de 40% des nouveaux cas de cancers en Europe (Bray *et al.*, 2002).

Les cancers des VADS en représentent environ 5% et affectent majoritairement des hommes de plus de 55 ans. Les cancers des VADS peuvent être divisés en trois groupes. Le premier groupe affectant la cavité buccale, le pharynx et

A



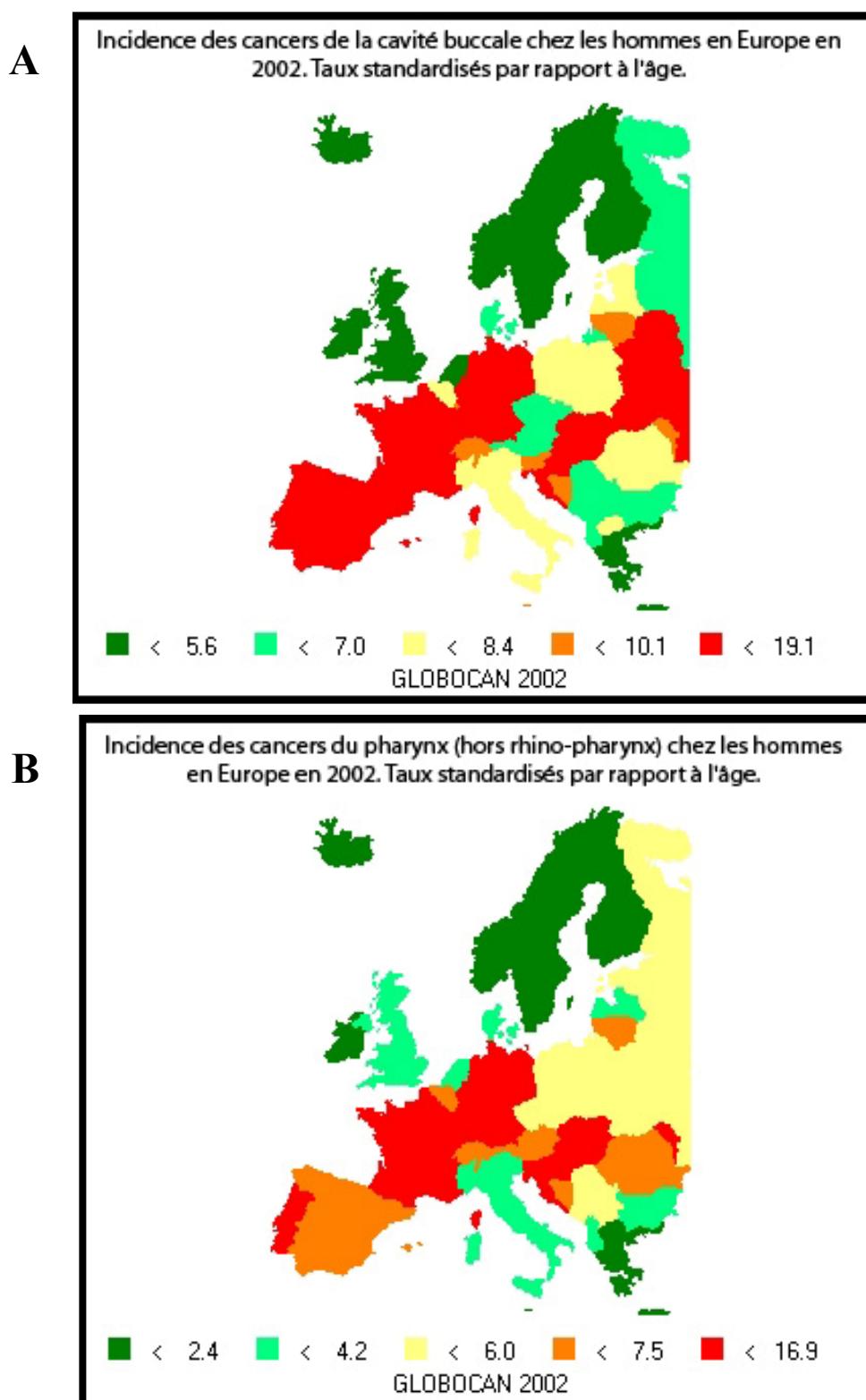
B



**Figure 7 :** Incidence (A) et nombre de cas et de décès (B) pour différents cancers en France en 2002 (d'après Ferlay J et al. GLOBOCAN 2002, version 2.0.).

le larynx, le second regroupant les cancers touchant les fosses nasales et les cavités nasosinusniennes, et enfin les cancers du rhino-pharynx représentant le troisième groupe. Les cancers touchant le rhino-pharynx sont relativement rares en Europe où l'on n'en dénombre que 4 000 nouveaux cas par an. Les cancers de la cavité buccale quant à eux représentent 2% des cas de cancers et regroupent les cancers des lèvres, de la langue, des glandes parotides, des gencives et du plancher de la bouche. Parmi les 36 000 nouveaux cas annuels de cancer du pharynx, 85% surviennent chez des hommes et la plus grande incidence européenne et même mondiale, de ces cancers est retrouvée en France où elle est de 29,6/100 000 hommes et de 2,2/100 000 femmes (Figures 7 et 8) (Bray *et al.*, 2002 ; Ferlay, *et al.*, 2004). Le plus haut taux combiné de cancers de la cavité buccale et de cancers du pharynx dans le monde est trouvé dans la partie nord de la France et plus particulièrement dans le département du Bas-Rhin, où il atteint une incidence de 49,4/100 000 hommes (Franceschi *et al.*, 2000). Ces cancers représentent 5 090 décès en France. Le cancer du pharynx se situe donc au 8<sup>ème</sup> rang des décès par cancer soit 3,4% de l'ensemble de ces décès.

En France, le nombre de cas cumulés des cancers de la lèvre, de la bouche, du pharynx et du larynx est de 16 855, portant les cancers des VADS au 4<sup>ème</sup> rang pour l'incidence chez l'homme et au 5<sup>ème</sup> rang pour la mortalité (Remontet *et al.*, 2003). De plus, du fait de leur mécanisme de cancérogenèse particulier, les cancers des VADS présentent un risque spécifique de localisations multiples concomitantes ou successives. Ainsi, une meilleure compréhension de l'étiologie de ces cancers ainsi que des mécanismes de cancérogenèse est nécessaire, notamment dans nos régions, car les traitements chirurgicaux de ces cancers sont extrêmement délabrant et handicapant tant au point de vue physique que psychologique et social.



**Figure 8 :** Incidence des cancers de la cavité buccale (A) et du pharynx (B) chez les hommes en Europe en 2002 (d'après Ferlay J et al. GLOBOCAN 2002, version 2.0.).

### 3. Carcinomes épidermoïdes du pharynx

Les cancers du pharynx, longtemps asymptomatiques, sont souvent déjà étendus au moment de leur diagnostic. Ces symptômes consistent généralement en des douleurs ou des gênes au niveau de la déglutition. La majorité des cancers du pharynx surviennent au niveau de l'oro-pharynx et concernent plus particulièrement les amygdales palatines et la base de la langue. Compte tenu du type de muqueuse recouvrant ces organes, plus de 90% des cancers de ces zones sont des carcinomes épidermoïdes (Forastiere *et al.*, 2001).

Un carcinome épidermoïde est une tumeur épithéliale maligne reproduisant de façon plus ou moins fidèle la structure d'un épithélium de type malpighien. Ce type de cancer peut présenter différentes formes : végétante, exophytique (faisant saillie à l'extérieur ou dans la lumière d'une cavité ou d'un conduit), ulcérée ou encore infiltrante avec la destruction et le remplacement des structures normales par du tissu tumoral. Ces carcinomes épidermoïdes peuvent être peu, moyennement ou bien différenciés selon leur ressemblance avec l'aspect d'un épithélium malpighien normal. Un carcinome épidermoïde bien différencié ressemble à un épithélium malpighien non-tumoral avec notamment des ponts d'union intercellulaires. Lorsqu'il est peu différencié, au contraire, il s'écarte nettement de l'aspect normal de l'épithélium, mais conserve néanmoins des caractéristiques permettant de le rattacher à ce type histopathologique comme, par exemple, la présence de travées très irrégulières. Un carcinome épidermoïde présentant un aspect intermédiaire aux deux précédents est dit moyennement différencié (Cabanne *et al.*, 1980). C'est l'examen histologique effectué sur une biopsie qui établit la nature et le diagnostic du cancer. Bien que cette distinction histologique soit nécessaire, elle ne donne que des

Tableau 1

Classification TNM (UICC 2002)		
Cancer de l'oro-pharynx		
T	Tx	La tumeur primaire ne peut pas être évaluée
	Tis	Carcinome <i>in situ</i>
	T0	Pas de signe de tumeur primaire
	T1	Tumeur inférieure ou égale à 2 cm dans sa plus grande dimension
	T2	Taille comprise entre 2 et 4 cm dans sa plus grande dimension
	T3	Tumeur supérieure à 4 cm dans sa plus grande dimension
	T4a	Extension au larynx, au muscle de la langue, au ptérygoïdien interne, au palais dure, ou à la mandibule
	T4b	Extension au ptérygoïdien externe, au rhino-pharynx, à la base du crâne, ou enveloppant la carotide
N	Nx	Les ganglions lymphatiques ne peuvent pas être évalués
	N0	Pas de signes d'atteinte ganglionnaire régionale
	N1	Adénopathie métastatique unique homolatérale inférieure ou égale à 3 cm
	N2a	Adénopathie métastatique unique homolatérale supérieure à 3 cm mais inférieure à 6 cm
	N2b	Adénopathies métastatiques multiples homolatérales inférieures ou égales à 6 cm
	N2c	Adénopathies bilatérales ou controlatérales inférieures ou égales à 6 cm
	N3	Adénopathie(s) métastatique(s) supérieure(s) à 6 cm
M	Mx	La présence de métastases à distance de la tumeur ne peut pas être évaluée
	M0	Absence de métastase à distance de la tumeur
	M1	Présence de métastases à distance de la tumeur

UICC : Union Internationale Contre le Cancer.

Résumé du système TNM et correspondance avec la classification AJCC. Attribution du stade						
	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3
T1	Stade I	Stade III	Stade IVa	Stade IVa	Stade IVa	Stade IVb
T2	Stade II	Stade III	Stade IVa	Stade IVa	Stade IVa	Stade IVb
T3	Stade III	Stade III	Stade IVa	Stade IVa	Stade IVa	Stade IVb
T4a	Stade IVa	Stade IVb				
T4b	Stade IVb					

Remarque : du grade I au grade IVb, le statut métastase est Mx ou M0. Quelque soit la taille de la tumeur et l'état d'invasion ganglionnaire, la présence de métastases à distance de la tumeur M1 indique automatiquement un grade IVc.

AJCC : American Joint Committee on Cancer staging and end results reporting.

indications limitées sur la démarche thérapeutique à suivre, car il n'existe pas à ce jour d'association significative entre le degré de différenciation et le pronostic.

Un autre facteur important dans la classification des cancers du pharynx est leur localisation anatomique. En effet, celle-ci a une influence considérable sur la clinique : des tumeurs survenant à différentes localisations ont des pronostics différents et différentes conséquences fonctionnelles. Une tumeur de l'hypo-pharynx, par exemple, de par sa situation anatomique proche d'une chaîne lymphatique, a plus de propension à former des métastases qu'une tumeur de la cavité buccale. On peut aussi citer l'exemple d'une tumeur du larynx qui métastasera rarement et dont le traitement de choix ne sera pas chirurgical mais basé sur les chimio- et radiothérapies afin de sauvegarder la fonction de phonation de cet organe.

La classification permettant un traitement adapté à l'extension de la tumeur et l'établissement d'un pronostic est la classification TNM de l'UICC (Union International contre le Cancer). Ce système est basé sur trois critères : la taille de la tumeur ainsi qu'une éventuelle invasion stromale (T), l'envahissement ganglionnaire (N), et la présence éventuelle de métastases à distance de la tumeur (M) (Tableau 1). Les différentes combinaisons de T, N et M sont résumées par un stade représentant les caractéristiques histologiques et physiopathologiques du cancer du cancer auquel il se réfère (Patel, 2005). Cette classification aide le clinicien au cours de trois étapes : l'établissement du diagnostic, la décision thérapeutique et enfin l'évaluation de l'efficacité du traitement.

Dans tous les cas, l'évaluation diagnostique et pronostique de ces cancers épidermoïdes repose essentiellement sur la clinique. Les trois principales stratégies thérapeutiques concernant ces cancers sont i) la chirurgie, ii) la radiothérapie et iii) la curiethérapie. Ces différents moyens thérapeutiques sont en général utilisés seuls

dans les formes limitées de cancer. Dans les formes étendues, mais curables, l'association thérapeutique est la règle, avec une prépondérance de l'association chirurgie-radiothérapie.

### **3.1. Amygdale**

Les cancers de l'amygdale sont les plus fréquents de l'oropharynx. Ces cancers sont à 90% de type épidermoïde et les 10% restants sont des lymphomes malins du fait de la richesse de cet organe en formations lymphoïdes (Leroux-Robert *et al.*, 1976). Les signes d'appels d'un cancer amygdalien sont souvent limités lors du premier examen et peuvent être trompeurs lorsqu'ils prennent la forme d'une otalgie ou encore discrets lors d'une gêne pharyngée unilatérale apparaissant à la déglutition. Néanmoins, ces signes doivent attirer l'attention du praticien chez l'homme d'une cinquantaine d'années consommant alcool et tabac afin d'éviter une extension profonde révélée par une hémorragie ou un trismus. L'envahissement ganglionnaire est très fréquent lors des cancers de l'amygdale, de l'ordre de 60% à 75% (Beutter et Pinlong, 1995), à cause du caractère très lymphoïde de ces structures et de la proximité des axes de drainage lymphatique de la tête et du cou. Ces cancers forment des métastases dans 5 à 15% des cas, préférentiellement au niveau des poumons, du foie et des os (Beutter et Pinlong, 1995). L'établissement du diagnostic repose sur l'examen de la biopsie, facilement réalisable et qui détermine le type histologique de la tumeur. Le traitement fait généralement appel à une chirurgie d'exérèse plus ou moins étendue ainsi qu'à un traitement chirurgical des aires ganglionnaires, si elles sont envahies. Il n'y a pas systématiquement de radiothérapie complémentaire dans ce type de tumeur, excepté lors d'adénopathies

multiples. Néanmoins, chirurgie et radiothérapie sont les bases de la thérapeutique des cancers de l'amygdale. Après traitement, des récidives tumorales sont observées dans 30% des cas, la majorité d'entre elles (90%) survenant dans les 2 ans. La survie observée à 5 ans varie en fonction du traitement mais surtout selon le T de la tumeur. Plus le T est élevé, plus la survie à 5 ans tend à diminuer. En général, la survie à 5 ans n'est pas très satisfaisante puisqu'elle varie de 30% à 50% seulement.

### **3.2. Langue**

Le cancer de la base de la langue est moins fréquent que celui de l'amygdale mais lui est néanmoins histologiquement lié. En effet, au niveau de la base de la langue se trouve l'amygdale linguale qui fait partie de l'anneau de Waldeyer (Figure 2). Il s'agit là encore dans la grande majorité des cas de cancers de type épidermoïde. Du fait de la structure lymphoïde de la base de la langue, les lymphomes malins peuvent aussi survenir à ce niveau. Les signes d'appel de ce type de cancer sont bien moins trompeurs que ceux du cancer de l'amygdale. Ils se manifestent par une dysphagie haute, une dysphonie ou encore une diminution de la protraction de la langue (Prades *et al.*, 2004). Malgré cette relative facilité d'identification, le diagnostic de cancer de la base de la langue est souvent réalisé tardivement par le praticien. Le diagnostic définitif repose encore une fois sur une biopsie réalisée au cours d'une laryngoscopie. Une radio-chimiothérapie est généralement préférée à une chirurgie d'exérèse très mutilante, laissant notamment de lourdes séquelles tant au niveau de la déglutition que de la phonation. Le pronostic des cancers de la base de la langue fait partie des plus sombres des

cancers des VADS. Ceci est en grande partie du fait de l'évolution insidieuse de ce type de cancer et de son caractère très lymphophile qui explique le grand nombre de métastases ganglionnaires découvertes dès le premier examen. En effet, ces cancers montrent un envahissement des chaînes lymphatiques dans 70% à 85% des cas (Prades *et al.*, 2004). Ces éléments expliquent la faible survie à 5 ans comparable à celle des cancers de l'amygdale : de 30% à 50%, ainsi qu'un nombre de récidives tumorales important.

### **3.3. Facteurs de risques principaux**

Les deux principaux facteurs de risque des cancers des VADS sont la consommation de tabac et d'alcool. Il est d'ailleurs classique de rappeler que dans certaines populations où ces deux consommations sont prohibées, comme chez les Mormons par exemple, l'incidence des cancers des VADS est très significativement diminuée (Grundmann, 1992 ; Lyon *et al.*, 1994).

#### **3.3.1. Effets cancérigènes du tabac**

La consommation de tabac a été reconnue comme facteur cancérigène par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC – IARC *International Agency for Research on Cancer*) dès 1986 (IARC Monographs Vol 38). Le tabac peut être consommé sous différentes formes à travers le monde, chiqué, mâché avec d'autres herbes et composants, prisé quand il est réduit en poudre, mais sous nos latitudes c'est sous sa forme fumée qu'il est *quasi* exclusivement utilisé sous forme de cigarettes, cigares ou pipes. Il a été montré que le risque de cancer lié au tabac dépendait à la fois de la quantité fumée (Moreno-Lopez *et al.*, 2000) et de la durée

Tableau 2

<b>Types de composés cancérogènes retrouvés dans le tabac</b>			
<b>Composés retrouvés dans la fumée du tabac brûlé</b>			
Classe chimique	Nombre de composés	Exemple	Quantité dans une cigarette (ng)
HAP	14	BaP Dibenz( <i>a,h</i> )anthracène	9 4
Nitrosamines	8	NNK NNN	123 179
Amines aromatiques	12	4-aminobiphényl 2-naphtylamine	1,4 10
Aldéhydes	2	Formaldéhyde Acétaldéhyde	16 000 819 000
Phénols	2	Catéchol	68 000
Hydrocarbures volatiles	3	Benzène 1,3-butadiène	59 000 52 000
Composés azotés	3	Nitrométhane	500
Autres composés organiques	8	Monoxyde d'éthylène Acrylonitrile	7 000 10 000
Composés inorganiques	9	Cadmium	132
<b>Total</b>	<b>61</b>		
<b>Composés retrouvés dans le tabac non brûlé</b>			
HAP	1	BaP	0,4-90
Nitrosamines	6	NNK NNN	1,89 8,73
Aldéhydes	2	Formaldéhyde Acétaldéhyde	1,6-7,4 1,4-7,4
Composés inorganiques	7	Cadmium	1,3-1,6
<b>Total</b>	<b>16</b>		

Ce tableau ne montre que des composés évalués par le CIRC. Adapté de Hecht 2003.  
HAP : hydrocarbure aromatiques polycyclique; BaP : benzo(*a*)pyrène; NNK : 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone; NNN : *N'*-nitrosonornicotine.

de l'histoire tabagique du patient (Lewin *et al.*, 1998). Qu'il soit fumé ou non, le tabac est composé de nombreux composés cancérigènes. Plus d'une soixantaine de ces composés a été identifiée dans la fumée du tabac et au moins 16 dans le tabac non fumé (Tableau 2) (IARC Monographs Vol 83 ; Hecht, 2003). Parmi ceux-ci, trois classes de composants semblent jouer un rôle particulièrement important au niveau cancérologique : i) les nitrosamines spécifiques du tabac (NNK et NNN), ii) les chaînes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, comme le benzo(a)pyrène et iii) les amines aromatiques avec le 4-aminobiphényle (Hecht, 2003). La nicotine, quant à elle, est la substance responsable de l'addiction à la consommation tabagique. C'est une substance toxique mais non cancérigène (Lefebvre *et al.*, 1996).

Lorsqu'il est fumé, le tabac exerce ses actions cancérigènes de trois manières. D'abord par brûlure chronique : bien que la température de la fumée inhalée décroisse rapidement de 850°C à la température corporelle, elle n'en constitue pas moins sur le long terme une agression thermique certaine (Lefebvre *et al.*, 1996). Le tabac agit ensuite par ses composants toxiques et irritants qui contribuent à fragiliser les muqueuses. Enfin, la dernière action du tabac est exercée par ses composants cancérigènes proprement dit. Ceux-ci agissent localement au niveau des cellules épithéliales et des cellules souches et favorisent la formation de ponts intra-chaîne au sein de l'ADN ce qui a pour effet de gêner la réPLICATION et de diminuer l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN (Johnson, 2001). Néanmoins, ceci n'est pas leur seul mode d'action. Les composés cancérigènes du tabac agissent aussi au niveau systémique par l'intermédiaire de leurs métabolites formés au cours de mécanismes de détoxicification. En effet, bien que paradoxale, l'action des deux principales enzymes de la détoxicification des produits tabagiques, le

cytochrome P450 et la glutathion-S-transférase, conduit à la formation d'aldéhydes cancérogènes (Lefebvre *et al.*, 1996 ; Hecht, 2003).

### **3.3.2. Effets cancérogènes de l'alcool**

Le principal composant de l'alcool est l'éthanol et n'est pas une substance reconnue comme étant cancérogène. En revanche, les boissons alcooliques peuvent contenir des substances cancérogènes comme les nitrosamines dans la bière (Marandas et Marandas, 2004) ou les esters de phorbol dans les apéritifs anisés (Lefebvre *et al.*, 1996). Bien qu'il existe des controverses pour déterminer si la consommation de certains alcools pourrait être plus dangereuse que d'autres (Brugere *et al.*, 1986 ; Blot, 1992), il est reconnu qu'une consommation excessive d'alcool joue un rôle dans la cancérogenèse de la cavité buccale (IARC Monographs Vol 44) et que le risque qui en découle est dose dépendant (Salaspuro, 2003). La consommation d'alcool favorise la survenue de cancers par différents mécanismes. En étant solvant d'autres produits cancérogènes (comme ceux présents dans le tabac, par exemple), il favorise leur pénétration dans la muqueuse et dans le sang. L'alcool induit par ailleurs une dérégulation du système enzymatique du cytochrome P450 (Marandas et Marandas, 2004). Il possède un pouvoir localement irritant et réduit la protection de la muqueuse par la salive en provoquant une atrophie de la glande parotide (Salaspuro, 2003). Toujours au niveau local, l'éthanol augmente la division et la régénération des cellules provoquant ainsi des zones d'hyper-prolifération cellulaire (Salaspuro, 2003). Enfin, de manière identique au tabac, l'éthanol agit aussi par l'intermédiaire de son principal métabolite, l'acétaldéhyde. Celui-ci est formé grâce à l'action de l'enzyme alcool déshydrogénase. Ce composé se retrouve dans le sang et peut donc agir au niveau systémique au sein d'un

individu. L'acétaldéhyde a été reconnu comme "carcinogénique possible" chez les humains (groupe 2B) par le CIRC (IARC Monographs Vol 71).

L'alcool est donc un carcinogène beaucoup moins puissant que le tabac, mais ces deux facteurs se retrouvent presque toujours associés chez les patients souffrants de cancers des VADS (Lefebvre *et al.*, 1996). Alors qu'une consommation unique de tabac ou d'alcool n'entraîne une augmentation du risque de cancer de la cavité buccale que de 2 à 4 fois, l'association de ces deux facteurs de risque conduit à une augmentation de ce risque multipliée par 13 (Castellsague *et al.*, 2004). Ceci est compatible avec l'idée que le tabac et l'alcool puissent agir de manière synergique dans la cancérogenèse des cancers des VADS. Ce qui conduit à un risque multiplié par 80 chez les gros consommateurs d'alcool et de tabac combiné (Bundgaard *et al.*, 1995).

### **3.3.3. Autres facteurs**

D'autres facteurs de moindre importance peuvent intervenir dans l'apparition de cancers des VADS. Quatre classes de facteurs ont été identifiées : i) les facteurs professionnels, ii) les facteurs nutritionnels, iii) l'état dentaire et enfin, iv) les facteurs viraux. Parmi les facteurs de risque professionnels, peuvent être cités l'exposition aux vapeurs de diesel, les brouillards d'huile, le nickel, le formaldéhyde et l'amiante notamment chez le sujet tabagique (Marandas et Marandas, 2004). Les facteurs nutritionnels comme des carences vitaminiques ou une anémie ferriprive, bien qu'associés à une augmentation des cancers VADS (La Vecchia *et al.*, 1997), sont encore discutés car ils pourraient être l'expression d'un contexte socio-économique ou la traduction des désordres générés par l'alcoolisme (Lefebvre *et al.*, 1996). Il en est de même concernant l'hygiène et l'état dentaire qui bien que statistiquement

associé avec un risque de cancer de la cavité buccale au Danemark, aux Etats-Unis et en Chine, ne semblent jouer aucun rôle en Europe (La Vecchia *et al.*, 1997) où il ne serait que le reflet d'une classe sociale défavorisée. Les facteurs viraux restent quant à eux assez obscurs. En effet, s'il n'y a pas de preuve de relation causale entre les adénovirus, les cytomégalovirus ou le virus d'Epstein-Barr et les cancers des VADS, leur ADN est néanmoins parfois retrouvé au sein de ces tumeurs (Marandas et Marandas, 2004 ; Lefebvre *et al.*, 1996). En revanche, une association étiologique beaucoup plus forte entre certains cancers des VADS et les papillomavirus humains (HPV) a été établie dès le début des années 80 par l'équipe de Syrjanen (Syrjanen *et al.*, 1983).

## **4. Les papillomavirus humains (HPV) facteurs de risque potentiels des cancers des VADS**

L'idée que des virus puissent jouer un rôle dans la cancérogenèse de certaines tumeurs des VADS n'est pas nouvelle. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est trouvé associé à la quasi-totalité des lymphomes de Burkitt (lymphomes malins non hodgkinien représentant plus de la moitié des lymphomes chez l'enfant et affectant les maxillaires) et à d'autres cancers beaucoup moins fréquents, ceux du rhinopharynx (Wolf et Seibl, 1984 ; Liebowitz, 1994 ; Goldenberg *et al.*, 2001 ; Burgos, 2005). Néanmoins au sein des VADS, les virus les plus fréquemment détectés dans de nombreuses localisations tumorales sont les HPV (Snijders *et al.*, 1997 ; Forastiere *et al.*, 2001).

#### **4.1. Arguments en faveur d'un rôle des HPV au niveau des cancers des VADS**

Les HPV sont présents dans de nombreuses lésions épithéliales avec ou sans caractère de malignité. Au niveau de la cavité buccale, on retrouve des papillomes et plus rarement des condylomes acuminés (Butler *et al.*, 1988 ; Syrjanen, 2003). Ces mêmes HPV sont également présents plus bas anatomiquement notamment au sein du larynx et des poumons où ils sont communément retrouvés en cas de papillomatose laryngée et de papillomatose récurrente respiratoire (Kashima *et al.*, 1996; Aaltonen *et al.*, 2002; Wiatrak *et al.*, 2004 ; Herrero, 2003 ; Major *et al.*, 2006).

Dès 1983 l'équipe de Syrjänen a émis l'hypothèse d'une possible implication des HPV dans les cancers de la cavité buccale (Syrjanen *et al.*, 1983 ; Syrjanen *et al.*, 1983). Au cours des années suivantes, cette relation des HPV avec la cancérogenèse au niveau des VADS s'est renforcée, amenant même à identifier la présence d'HPV comme un facteur de risque indépendant des cancers de la cavité buccale (Syrjanen, 2003). En effet dans une méta-analyse récente, Miller *et al* ont montré que les HPV étaient susceptibles d'être détectés près de 5 fois plus souvent dans les cancers de la cavité buccale que dans la muqueuse non tumorale (Miller et Johnstone, 2001). Dans le cas de cancers situés dans les VADS en dehors de la cavité buccale, la relation HPV et cancérogenèse est beaucoup moins claire. Ainsi, si de l'ADN d'HPV a pu être détecté au niveau de certains cancers du poumon (Bejui-Thivolet *et al.*, 1990 ; Yousem *et al.*, 1992 ; Bohlmeier *et al.*, 1998), sa prévalence varie néanmoins de 0 à 100% (Syrjanen, 2002), rendant un éventuel rôle des HPV difficile à établir dans ce contexte. Il en est de même concernant les

Tableau 3

## Principales données concernant la prévalence des HPV dans les cancers des VADS en fonction de la localisation de la tumeur.

SITE	Nombre de CANCERS	CANCERS HPV+	% HPV +	% HPV 16	% HPV 18	% HPV 6/11	TECHNIQUE UTILISEE	TYPE D'ARTICLE	ANNEE	AUTEUR	REFERENCE	
<b>VADS</b>	2133	597	28%	0-100%	55	16	13	toutes techniques confondues	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425
	2122	501	24%		82			PCR consensus et type-spécifique	RL	2004	Gillison ML	Semin Oncol 2004;31:744-754
<b>Total</b>	<b>4255</b>	<b>1098</b>	<b>26%</b>	<b>24-28%</b>								
<b>RHINO-PHARYNX</b>	2	0	0%				PCR consensus	AR	2000	Gillison ML	J Natl Cancer Inst 2000;92:709-720	
	322	70	22%				toutes techniques confondues	RL	2003	Syrjanen KJ	J Clin Pathol 2003;56:174-181	
	322	70	22%				toutes techniques confondues	RL	2005	Syrjanen S	J Clin Virol 2005;32S:S59-S66	
<b>Total</b>	<b>646</b>	<b>140</b>	<b>22%</b>	<b>0-22%</b>								
<b>CAVITE BUCCALE</b>	127	11	9%				Dot Blot	RL	1997	Sugerman PB	Oral Dis 1997;3:130-147	
	528	42	8%				ISH	RL	1997	Sugerman PB	Oral Dis 1997;3:130-147	
	120	11	9%				microscopie photonique	RL	1997	Sugerman PB	Oral Dis 1997;3:130-147	
	1895	222	12%				PCR	RL	1997	Sugerman PB	Oral Dis 1997;3:130-147	
	479	65	14%				SB	RL	1997	Sugerman PB	Oral Dis 1997;3:130-147	
	493	226	46%	18-78%	70	18	8	toutes techniques confondues	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425
	101	27	27%				PCR consensus	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	84	10	12%				PCR consensus	AR	2000	Gillison ML	J Natl Cancer Inst 2000;92:709-720	
	608	151	25%				ISH IP IF	RL	2001	Miller CS	Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:622-635	
	1150	362	31%				PCR	RL	2001	Miller CS	Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:622-635	
	331	88	26%				SB DB	RL	2001	Miller CS	Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001;91:622-635	
	766	30	4%		89		PCR consensus	IARC MS	2003	Herrero R	J Natl Cancer Inst 2003;95:1772-1783	
	6	4	67%				PCR consensus	AR	2005	Hoffmann M	Cancer Letters 2005;218:199-206	
	3459	1347	38%				toutes techniques confondues	RL	2005	Syrjanen S	J Clin Virol 2005;32S:S59-S66	
<b>Total</b>	<b>10147</b>	<b>2596</b>	<b>26%</b>	<b>4-67%</b>								
<b>ORO-PHARYNX</b>	50	15	30%				PCR consensus	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	60	34	57%				PCR consensus	AR	2000	Gillison ML	J Natl Cancer Inst 2000;92:709-720	
	142	26	18%		89		PCR consensus	IARC MS	2003	Herrero R	J Natl Cancer Inst 2003;95:1772-1783	
	519	185	36%				PCR consensus et type-spécifique	RL	2004	Gillison ML	Semin Oncol 2004;31:744-754	
	4	1	25%				PCR consensus	AR	2005	Hoffmann M	Cancer Letters 2005;218:199-206	
<b>Total</b>	<b>775</b>	<b>261</b>	<b>34%</b>	<b>18-57%</b>								
<b>AMYGDALE PALATINE</b>	35	23	66%				PCR consensus	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	38	16	42%	21-100%	69		toutes techniques confondues	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	216	110	51%				PCR consensus et type-spécifique	RL	2004	Gillison ML	Semin Oncol 2004;31:744-754	
	381	206	54%		76	2	PCR	RL	2004	Syrjanen S	J Clin Pathol 2004;57:449-455	
	51	15	29%		53	13	SB ISH	RL	2004	Syrjanen S	J Clin Pathol 2004;57:449-455	
	11	6	54%				PCR consensus	AR	2005	Hoffmann M	Cancer Letters 2005;218:199-206	
	432	221	51%				toutes techniques confondues	RL	2005	Syrjanen S	J Clin Virol 2005;32S:S59-S66	
<b>Total</b>	<b>1164</b>	<b>597</b>	<b>51%</b>	<b>29-66%</b>								

cancers de l'œsophage où une grande hétérogénéité dans la présence des HPV est là encore constatée que se soit au sein de populations géographiquement éloignées ou au sein de populations appartenant à la même zone géographique (Lambot *et al.*, 2000; Syrjanen, 2002; Zhou *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004 ; Souto Damin *et al.*, 2006 ; Gao *et al.*, 2006).

La plus grande prévalence des HPV est retrouvée pour les localisations oropharyngées (Mork *et al.*, 2001 ; Dahlstrom *et al.*, 2003 ; Herrero *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2004a; Syrjanen, 2005; Kreimer *et al.*, 2005a) où elle est située autour de 20 à 30% et plus particulièrement dans les cancers des amygdales palatines et de la base de la langue où cette prévalence peut atteindre 50% (Tableau 3) (Klussmann *et al.*, 2001 ; Strome *et al.*, 2002 ; Venuti *et al.*, 2004; Dahlgren *et al.*, 2004; Syrjanen, 2004; Syrjanen, 2005; Dahlstrand et Dalianis T, 2005). Les cancers des VADS contenant de l'HPV se distinguent du point de vue clinique car ils semblent être de meilleur pronostic (Li *et al.*, 2003 ; Dahlgren L *et al.*, 2004 ; Syrjanen, 2005 ; De Petrini *et al.*, 2006) ce qui pourrait être dû à une meilleure radiosensibilité (Dahlstrand et Dalianis T, 2005). C'est là l'une de leurs caractéristiques les plus importantes. La présence d'HPV au sein de ces cancers semble également les distinguer du point de vue phénotypique des cancers des VADS ne présentant pas d'HPV (Wilczynski *et al.*, 1998; Klussmann *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Gillison, 2004; Begum *et al.*, 2005; Weinberger *et al.*, 2006; El-Mofty et Patil, 2006). Cette distinction phénotypique repose notamment sur i) des différences histologiques avec la présence de koïlocytes dans certains cas (Xavier *et al.*, 2005), ii) des différences moléculaires comprenant des mutations de l'oncogène H-ras conduisant à son activation (Anderson *et al.*, 1994), une diminution de l'expression des protéines du

Tableau 3, suite.

SITE	Nombre de CANCERS	CANCERS HPV+	% HPV +	% HPV 16	% HPV 18	% HPV 6/11	TECHNIQUE UTILISEE	TYPE D'ARTICLE	ANNEE	AUTEUR	REFERENCE	
LANGUE MOBILE	85	2	2%	100			PCR consensus	AR	2004	Dahlgren L	Int J Cancer 2004;112:1015-1019	
BASE DE LA LANGUE	25	10	40%	70			PCR consensus	AR	2004	Dahlgren L	Int J Cancer 2004;112:1015-1019	
HYPHO-PHARYNX	56	6	11%				PCR consensus	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	21	2	9%				PCR consensus	AR	2000	Gillison ML	J Natl Cancer Inst 2000;92:709-720	
	24	7	30%				PCR consensus	AR	2005	Hoffmann M	Cancer Letters 2005;218:199-206	
Total	101	15	15%	9-30%								
LARYNX	150	16	11%				PCR consensus	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	454	113	25%	3-54%	66	9	toutes techniques confondues	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	86	16	19%				PCR consensus	AR	2000	Gillison ML	J Natl Cancer Inst 2000;92:709-720	
	19	5	26%				PCR consensus	AR	2005	Hoffmann M	Cancer Letters 2005;218:199-206	
	1252	313	25%				toutes techniques confondues	RL	2005	Syrianen S	J Clin Virol 2005;32S:S59-S66	
Total	1961	463	24%	11-26%								
ŒSOPHAGE	869	217	25%	0-60%	36	17	15	toutes techniques confondues	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425
	31	10	32%				PCR consensus	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	50	23	46%		9	48	PCR consensus	AR	2002	Matsha T	J Clin Pathol 2002;55:587-590	
	745	233	31%				FISH SB DB	RL	2002	Syrianen KJ	J Clin Pathol 2002;55:721-728	
	1485	341	23%				ISH	RL	2002	Syrianen KJ	J Clin Pathol 2002;55:721-728	
	2020	300	15%				PCR	RL	2002	Syrianen KJ	J Clin Pathol 2002;55:721-728	
Total	5200	1124	22%	15-46%								
POUMON	49	10	20%				PCR consensus	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425	
	279	19	7%	0-30%	27	27	20	toutes techniques confondues	RL	1997	Snijders PJF	Clin Dermatol 1997;15:415-425
	185	5	3%				HCII	RL	2002	Syrianen KJ	J Clin Pathol 2002;55:885-891	
	446	51	11%		43	39	43	ISH	RL	2002	Syrianen KJ	J Clin Pathol 2002;55:885-891
	1929	500	26%		59	50	22	PCR	RL	2002	Syrianen KJ	J Clin Pathol 2002;55:885-891
	30	4	13%		10	7	3	SB ME FISH DB	RL	2002	Syrianen KJ	J Clin Pathol 2002;55:885-891
Total	2918	589	20%	3-26%								

AR : Article de recherche; DB : Dot Blot; FISH : Hybridation fluorescente *in situ*; HCII : Hybrid Cature II®; IARC MS : IARC multicenter study; IF : Immuno-fluorescence; IP : Immuno-péroxydase; ISH : Hybridation *in situ*; ME : Microscopie électronique; RL : Revue de la littérature; SB : Southern Blot.

cycle cellulaire que sont la cycline D1 et la protéine pRb (Wiest *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2004), une expression accrue de la p16 (Hafkamp *et al.*, 2003; Wittekindt *et al.*, 2005; Dahlstrand *et al.*, 2005) et une *quasi* absence de mutations dans le gène de la p53 (Dai *et al.*, 2004 ; Braakhuis *et al.*, 2004).

A l'heure actuelle, il n'a pas été prouvé expérimentalement que les HPV soient capables d'infecter les cellules épithéliales des bronches, de la cavité buccale ou des amygdales palatines et d'y réaliser un cycle répliquatif complet. Pourtant des modèles animaux tendent à prouver que cela soit possible. Le COPV (*Canine Oral Papillomavirus*) infecte l'oro-pharynx des chiens et provoque des papillomatoses. Ces papillomatoses peuvent disséminer dans l'ensemble de l'organisme ou évoluer en cancer épidermoïde (Campo, 2002). Il existe également des arguments expérimentaux qui tendent à prouver que les HPV jouent un rôle dans le processus cancéreux d'une partie des cancers des VADS. En effet, il a été montré récemment que l'HPV de type 16 avait un impact sur la prolifération, l'adhérence et la morphologie des cellules de la lignée cellulaire CAL 27 issue d'un cancer épidermoïde de la cavité buccale (Kingsley *et al.*, 2006). Néanmoins, les HPV ne sont pas uniquement capable d'agir sur des lignées préalablement cancéreuses. Il existe de nombreux exemples de cellules normales ayant été transformées par un HPV et ensuite établies en lignées cellulaires stables. Parmi celles-ci, sont retrouvées les lignées BEP1, BEP2 et BEP3 qui sont issues de tissu épithéial bronchique (Willey *et al.*, 1991), des lignées issues de tissu trachéal (Yankastas *et al.*, 1993) et enfin des lignées provenant de tissu épithéial d'amygdale palatine comme les lignées HTE-114/K1, HTE-114/K2, HTE-114/K3 et HTE-114/B (Chen *et al.*, 2003). De plus, les HPV sont capables de provoquer des changements chromosomiques au sein de cellules épithéliales des VADS (Klingelhutz *et al.*, 2005)

et induisent une expression génétique différente dans les lignées ainsi transformées, en activant des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou en inhibant d'autres gènes impliqués dans les mécanismes apoptotiques par exemple (Ruutu et al., 2005).

## 4.2. Aspects virologiques

### 4.2.1. Classification et structure des HPV

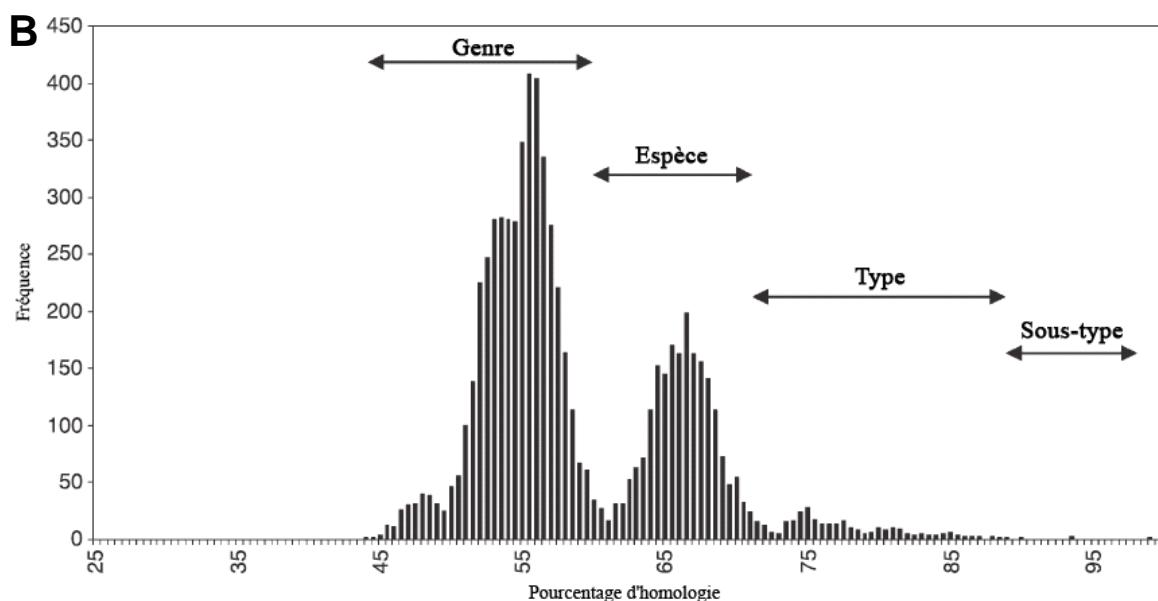
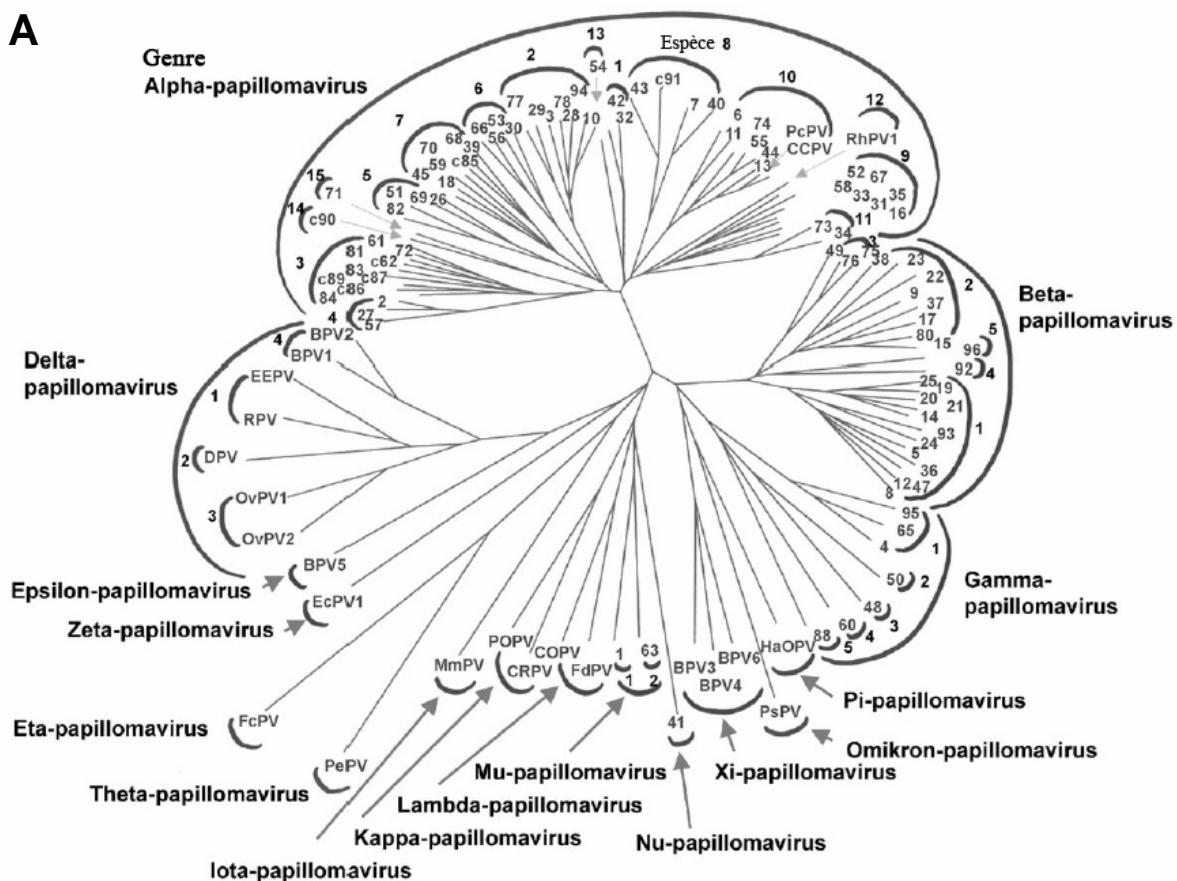
Les papillomavirus (PV) appartiennent à la famille des *Papillomaviridae* (de Villiers et al., 2004). Le terme de papillomavirus est formé du mot latin *papilla* signifiant bouton et du suffixe *oma* désignant un caractère tumoral. Ces virus sont très anciens et ont évolué parallèlement à leurs hôtes ce qui explique leur spécificité d'espèce. Les PV sont d'ailleurs identifiés par leur hôte naturel : HPV (humain), BPV (bovin) ou encore DPV (*deer*, cerf). Aujourd'hui, plus de 120 types de PV ont été décrits dont près de 100 qui infectent l'humain (de Villiers et al., 2004). Au-delà de leur spécificité d'espèce, les PV présentent aussi une forte spécificité tissulaire. Les PV sont épithéliotropes stricts et sont capables d'infecter soit les épithéliums cutanés, soit les épithéliums muqueux. Les HPV sont généralement classés en fonction de leur tropisme cutané ou muqueux (Van Ranst et al., 1992 ; Cossart et al., 1995 ; Chan SY et al., 1995 ; Birley HD et al., 1995).

Il existe de nombreux HPV à tropisme cutané et leur nombre pourrait encore être sous-estimé du fait de leur très faible pathogénicité (Antonsson et al., 2000). Ces HPV cutanés sont notamment responsables des verrues (HPV 1, 2 et 4) et conduisent à des lésions tout à fait bénignes. Un cas particulier est représenté par les HPV 5 et 8 associés à l'épidermodysplasie verruciforme. Cette maladie rare à

transmission autosomique récessive conduisant à des carcinomes cutanés précoces à partir de la 3<sup>ème</sup> décennie, est considérée comme un modèle de carcinose virale chez l'homme (Orth et al., 2001). En effet, elle implique à la fois des virus spécifiques et des facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux.

Les HPV à tropisme muqueux infectent les muqueuses ano-génitales (col de l'utérus, vagin, vulve, pénis, canal et marge anale) ainsi que les muqueuses oropharyngées. Ces HPV muqueux sont classés en fonction de leur pouvoir pathogène : les HPV non oncogènes dits à bas risque (HPV-BR) et les HPV oncogènes dits à haut risque (HPV-HR). Les HPV-BR, comme les HPV 6 et 11, sont retrouvés dans les condylomes génitaux et les HPV-HR, comme les HPV 16 et 18 sont impliqués dans le cancer du col de l'utérus. Certains des HPV muqueux ont un potentiel oncogénique encore mal défini (HPV 26, 53 et 66) et sont dits « potentiellement à haut risque » (Munoz et al., 2003). Ces différentes classifications sont surtout des classifications cliniques.

Une autre classification existe : la classification taxonomique. Elle repose sur des identités de séquences (pourcentage d'identité) c'est-à-dire une classification génotypique. Contrairement à la plupart des virus, il n'existe pas de classification sérotypique pour les HPV. Traditionnellement, les HPV sont classés en types, sous-types et variants (Bernard, 2005). Des études comparatives des gènes E6, L1 ou de l'ensemble E6-E7-L1 ont abouti à des résultats similaires et souvent identiques (de Villiers et al., 2004). Deux types d'HPV différents sont définis comme ayant moins de 90% d'identité dans leur séquence L1. Au sein d'un même type, les sous-types partagent 90% à 98% d'identité et les variants ont des différences d'identité inférieures à 2% dans leur séquence L1 et inférieures à 5% dans des régions moins conservées (Bernard, 2005 ; Bernard et al., 2006). Les variants, essentiellement



**Figure 9 :** Arbre phylogénétique représentant la distance relative séparant la séquence L1 de 118 papillomavirus (A) et pourcentage d'identité de la séquence L1 de ces 118 papillomavirus par genre, espèce, type et sous-type (B) (d'après de Villiers, 2004).

décrits pour l'HPV 16, permettent de distinguer des souches d'origine européenne (E), africaine (Af1 et Af2), asiatique (As), asiatique-américaine (AA) ou nord-américaine (NA) (Yamada *et al.*, 1997, Cruz *et al.*, 2004).

Cette classification taxonomique traditionnelle est néanmoins imparfaite. C'est pourquoi l'*International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) a établi une nouvelle classification taxonomique avec trois objectifs :

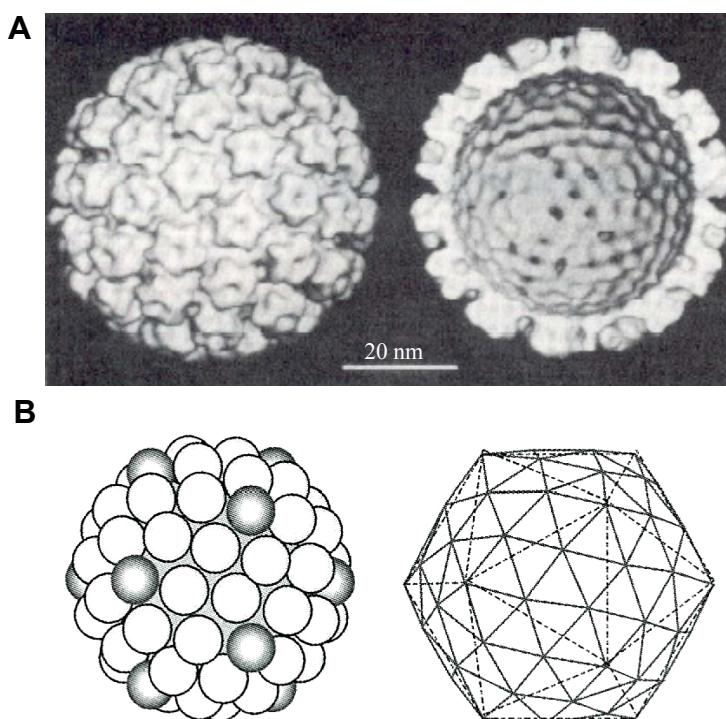
- i) cette classification doit établir la relation existant entre les types de PV ;
- ii) elle doit intégrer les termes de « genre » et d'« espèce » communément utilisés dans la classification systématique de tous les organismes biologiques et fréquemment appliqués aux virus;
- iii) elle doit intégrer la relation entre la classification taxonomique et les propriétés biologiques et pathologiques des virus (de Villiers *et al.*, 2004).

La comparaison des séquences du gène L1 identifie clairement 3 niveaux taxonomiques : le genre, l'espèce et le type (figure 9) qui sont définis ainsi :

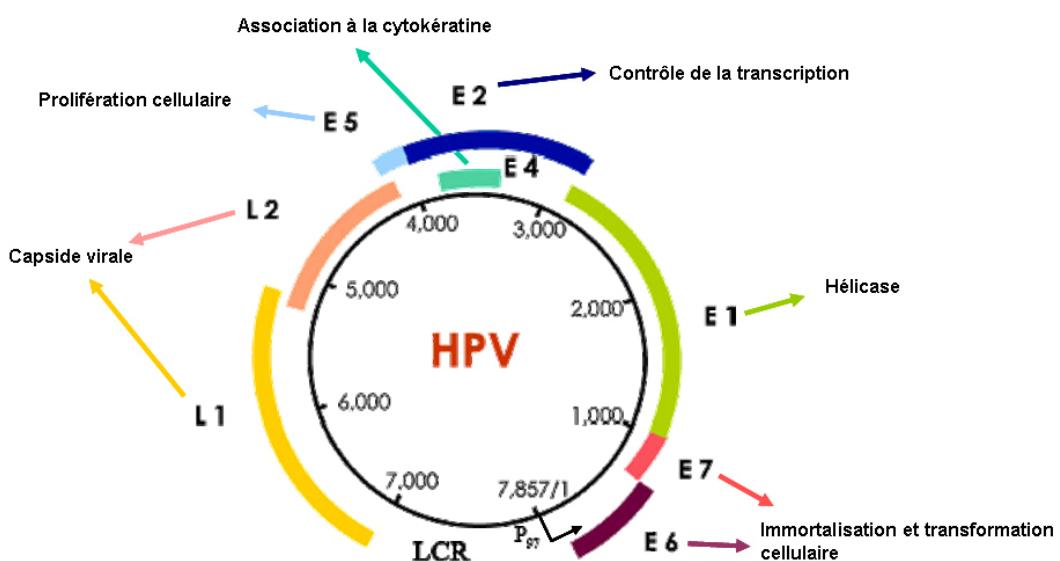
- i) différents genres partagent moins de 60% de leur séquence d'acides nucléiques.
- ii) les espèces au sein d'un même genre partagent entre 60% et 70% de leur séquence nucléique.
- iii) les traditionnels types d'HPV au sein d'une même espèce partagent entre 71% et 89% de leur séquence d'acides nucléiques.

Dans cette nouvelle classification, les définitions de sous-type et de variant restent inchangées.

Parmi les genres nouvellement déterminés, le genre alpha-papillomavirus est le plus important et compte des HPV muqueux et cutanés (figure 9). Le genre béta-papillomavirus inclue les HPV cutanés associés à l'épidermodysplasie verruciforme



**Figure 10 :** Structure de la capsid d'un papillomavirus humain. Reconstruction par cryoélectromicroscopie d'une particule d'HPV (A) et représentation schématique de la disposition des 72 capsomères et des axes de symétrie associés (B).



**Figure 11 :** Représentation schématique de l'organisation génomique d'un papillomavirus humain. La transcription se fait à partir du promoteur P<sub>97</sub>. Les phases ouvertes de lectures sont appelées E1 à E7 pour les protéines précoces et L1 et L2 pour les protéines tardives. La région LCR contient les éléments de la régulation de la réplication et de la transcription du génome viral (d'après Shah et Howley, 1996).

et le genre gamma compte exclusivement des HPV cutanés. Le genre delta-papillomavirus est également important quantitativement et ne comporte pas de PV infectant l'homme, mais le cerf (DPV), les ovins (OVPV) et les bovins (BPV). Enfin, les autres genres de papillomavirus regroupent les PV infectant d'autres animaux ainsi que des HPV rares.

#### **4.2.2. Structure et organisation génomique des HPV**

Les HPV sont des virus à ADN, non enveloppés, de petite taille (52 à 55 nm de diamètre) et à cycle non lytique. Leur capsidé virale à symétrie icosaédrique est composée de 72 capsomères (Figure 10) (Shah et Howley, 1996). Cette capsidé renferme une molécule d'ADN circulaire bicaténaire composée d'environ 7,9 Kpb. Malgré les différences de séquences pouvant exister entre chacun des types d'HPV, l'organisation du génome leur est commune. Ainsi, les phases ouvertes de lecture (POL) ou séquences codantes, sont situées sur un seul des brins de l'ADN viral (Chen *et al.*, 1982) et sont groupées en 2 régions distinctes : la région précoce E (*Early*) et la région tardive L (*Late*). Il existe également une troisième région non codante appelé LCR (*Long Control Region*) (Figure 11).

La région précoce E représente 50% du génome viral et est composée de 6 à 8 POL-E codant des protéines non structurales, impliquées dans la réPLICATION virale (E1 et E2), dans la régulation de la transcription (E2), dans la maturation des particules virales (E4) et dans le processus de transformation cellulaire (E5, E6 et E7) (Cossart *et al.*, 1995 ; Herrington, 1994).

La région tardive L code les protéines structurales constitutives de la capsidé virale : la protéine majeure de capsidé L1 et la protéine mineure de capsidé L2. Ces

Tableau 4

E6 HPV-HR	
<b>Propriétés</b>	<p>Protéine de 151 acides aminés.</p> <p>Possède deux domaines contenant chacun 2 motifs Cys-X-X-Cys de liaison au zinc.</p> <p>Contient dans sa partie C-terminale un motif X-(S/T)-X-(V/I/L)-COOH de liaison au domaine PDZ de certaines protéines impliquées dans l'inhibition de la prolifération cellulaire.</p>
<b>Fonctions</b>	Liaison à la p53 par le complexe formé avec l'ubiquitine ligase E6AP conduisant à sa dégradation <i>via</i> le protéasome.
Inhibition de l'apoptose	Inhibition de l'apoptose (liaison à Bak).
Immortalisation avec la coopération nécessaire de E7	Déstabilisation du cytosquelette d'actine (liaison à la Paxilline). Modulation de l'activité de petits promoteurs ne contenant que des séquences de la boîte TATA. Activation des télomérases ( <i>human telomerase reverse transcriptase hTert</i> ). Inhibition des interférons (niveau transcriptionnel). Augmente l'activité kinasique de cdc2 sur l'histone H1.
<b>Cibles connues ou potentielles <i>via</i> E6AP</b>	p53 Paxilline Bak
Protéines à domaine PDZ <i>via</i> E6AP	hDlg (human homolog of the <i>Drosophila melanogaster</i> tumor suppressor protein discs large) MUPP1 (a multi-PDZ domain protein) hScrib (human homolog of the <i>D. melanogaster</i> tumor suppressor scribble)
	HHR23A (human homolog of the yeast RAD23 protein involved in nucleotid excision-repair) Blk (famille des src kinases)

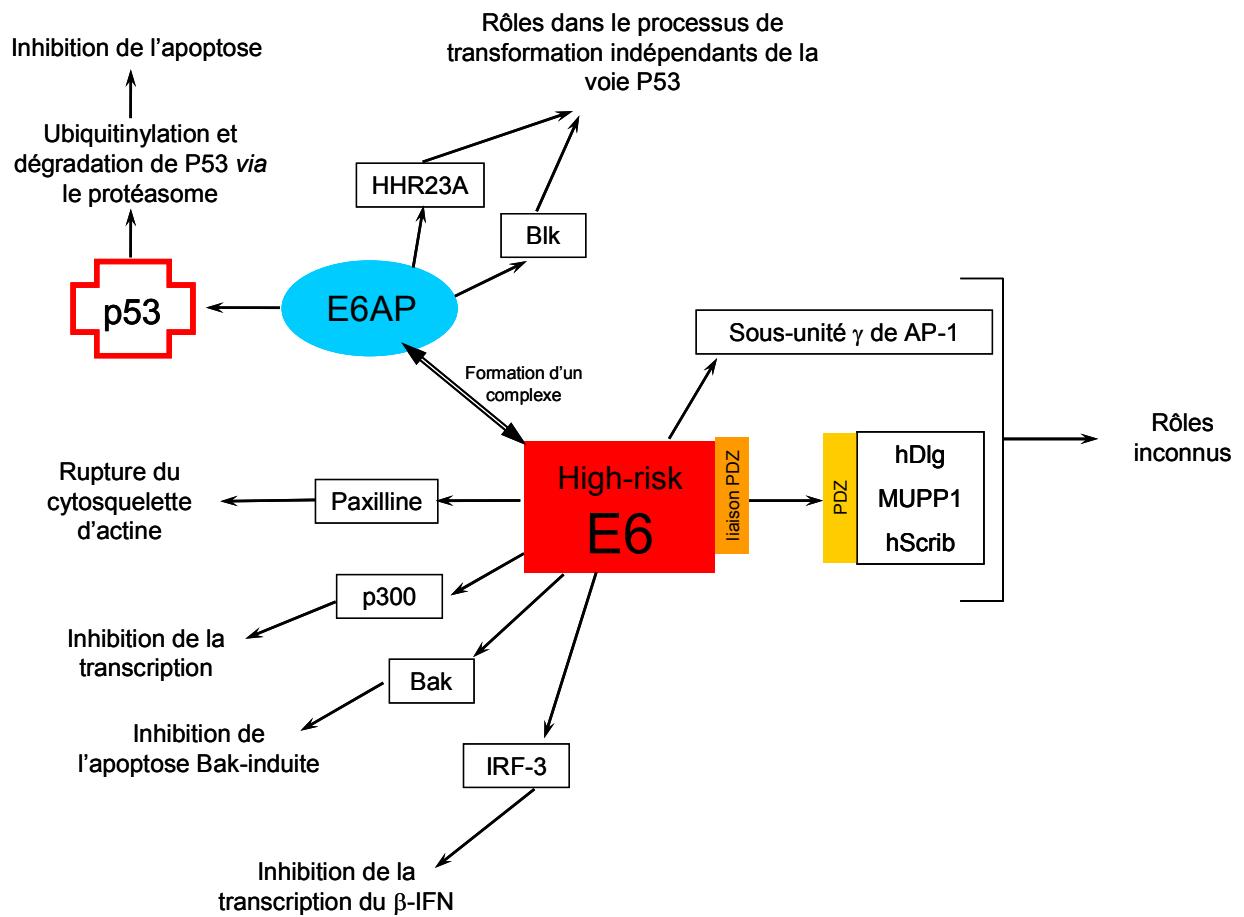
deux protéines sont exprimées exclusivement dans les cellules bien différenciées de la partie supérieure de l'épithélium lors d'une infection virale productive.

La région non codante LCR, qui peut être de taille variable et représenter 7 à 11% du génome viral, est située entre les séquences POL-L1 et POL-E6/E7. Elle est aussi appelée URR (*Upstream Regulatory Region*) car elle contient les promoteurs des gènes précoces (P97 pour HPV 16 et P105 pour HPV 18) ainsi que des séquences de régulation de la réplication et de la transcription de l'ADN viral (Cossart *et al.*, 1995). Les séquences régulatrices sont situées en *cis* en amont de ces promoteurs et contiennent des sites de fixation spécifiques de facteurs *trans*-régulateurs d'origine cellulaire ou virale. Parmi les facteurs cellulaires sont retrouvés les facteurs AP1, NF1, Sp1 et les récepteurs aux stéroïdes qui activent la transcription des gènes précoces, alors que les facteurs p53, YY1, Oct-1 et les récepteurs de l'acide rétinoïque l'inhibent. Ces facteurs présentent une spécificité cellulaire ou tissulaire qui contribue au tropisme des papillomavirus. La transcription des gènes précoces est aussi influencée par des facteurs d'origine virale et notamment la protéine E2 qui contrôle la transcription d'E6 et E7. Les POL-L1 et L2 sont contrôlées par des promoteurs situés en amont de leur position, comme P172 et dont l'activation semble être dépendante de l'état de différenciation cellulaire.

#### **4.2.3. Oncoprotéines virales**

##### **4.2.3.1. E6 et ses fonctions**

Le gène E6 est l'un des premiers gènes à être exprimé lors d'une infection à HPV (Sun *et al.*, 1997) et joue un rôle prépondérant dans l'immortalisation (Tableau 4). L'oncoprotéine E6 (E6) est riche en cystéine et contient 4 motifs Cys-X-X-Cys en forme de "doigt de zinc" qui lui permettent la liaison avec l'ADN cellulaire (Barbosa *et*



**Figure 12 :** La protéine E6 des HPV-HR agit, en synergie avec E7, pour la transformation des cellules épithéliales.

al., 1989). La protéine E6 est donc détectée dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme (Rapp et Chen, 1998). Il existe des différences importantes entre les oncoprotéines E6 des HPV-BR et celles des HPV-HR. En effet, en synergie avec l'oncoprotéine E7, E6 des HPV-HR est capable d'immortaliser des cellules épithéliales et des fibroblastes humains (Durst *et al.*, 1987 ; Munger, 1995 ; Rapp et Chen, 1998), alors que la protéine E6 des HPV-BR n'en est pas capable. Ceci est notamment dû à leur différence d'affinité pour la p53, E6 des HPV-HR ayant une affinité plus importante pour la p53 (Werness *et al.*, 1990; Li et Coffino, 1996). C'est cette capacité de liaison à la p53 ainsi que celle de la dégrader qui conduit à la prolifération cellulaire (Tidy et Wrede, 1992 ; Vousden, 1993 ; Munger, 1995) (Figure 12). La dégradation de p53 nécessite obligatoirement la présence de la protéine cellulaire E6-AP (*E6-Associated Protein*) qui est une ubiquitine ligase. E6 forme alors un complexe ternaire avec E6-AP et p53, liant des molécules d'ubiquitine sur la p53. Cette ubiquitylation de la p53 conduit à sa dégradation *via* le protéasome (Ciechanover *et al.*, 1994 ; Hochstrasser, 1995). La p53 est le produit d'un gène suppresseur de tumeur qui physiologiquement lors d'une anomalie génétique active la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, comme les gènes codant la p21 ou GADD (*Growth Arrest on DNA Damage*), et empêche ainsi la multiplication de cellules anormales (Levine, 1989). Il a également été montré que la p53 était capable d'induire l'apoptose dans les cellules dont le génome a été altéré de manière trop importante (Oren, 1992). Cette perte de l'activité de la p53 a pour conséquence la perte de la capacité de la cellule à induire l'apoptose et à réparer les lésions de l'ADN, générant une d'instabilité génétique et donc une augmentation du risque de transformation maligne. E6 évite également

l'apoptose en permettant la dégradation de deux protéines pro-apoptotiques, Bak et de Blk, par le même mécanisme.

Une autre fonction importante de E6 est sa capacité à activer hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) qui est la sous-unité catalytique de la télomérase (Klingelhutz *et al.*, 1996 ; Münger *et al.*, 2004). La diminution de la longueur des télomères à chaque cycle de division cellulaire est un mécanisme qui limite la capacité proliférative d'une cellule somatique normale. En revanche, certains types de cellules sont capables de subir un très grand nombre de divisions cellulaires et expriment alors la télomérase. C'est le cas des cellules souches par exemple. La télomérase est une ribonucléoprotéine qui synthétise des séquences répétées au niveau des télomères et qui freine donc leur érosion. L'expression ectopique de hTERT conduit à l'extension de la durée de vie de la cellule et facilite son immortalisation (Satyanarayana *et al.*, 2004). E6 active hTERT au niveau transcriptionnel (Veldman *et al.*, 2001) et contribue en synergie avec E7 à l'immortalisation des cellules épithéliales humaines (Klingelhutz *et al.*, 1996 ; Kiyono *et al.*, 1998).

L'oncoprotéine E6 possède aussi des fonctions oncogéniques indépendantes de l'inactivation de la p53 (Werness *et al.*, 1990). Elle interagit avec le complexe CBP/p300 (*CREB Binding Protein/p300*) qui est un co-activateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, la différenciation et le contrôle du cycle cellulaire (Ronco *et al.*, 1998). En se liant à ce complexe, E6 inhibe l'activité de divers promoteurs dont ceux modulés par NF-κB ce qui entraîne une hyperprolifération cellulaire dans les couches supra-basales de l'épithélium (Hu *et al.*, 1999) ainsi qu'une baisse de la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Une autre voie d'inhibition de la réponse immunitaire se fait par la

Tableau 5

E7 HPV-HR	
Propriétés	Cibles connues ou potentielles
Propriétés	Protéine de 98 acides aminés.
	Localisée principalement dans le noyau.
	Demie-vie très courte.
	Degradée par le protéasome.
	Peut former des homo-dimères <i>via</i> son domaine C-terminal.
	Peut lier des atomes de zinc grâce à 2 motifs Cys-X-X-Cys situés du côté C-terminal.
Fonctions  Transformation et immortalisation des cellules épithéliales	Peut être phosphorylée par la caséine kinase II (CK II).
	Induction de la synthèse d'ADN dans des cellules quiescentes.
	Liaison à pRb conduisant à la libération du facteur de transcription E2F et à la dégradation de pRb <i>via</i> le protéasome.
	Coopère avec l'oncogène <i>ras</i> pour la transformation de lignées primaires de cellules rénales de rat.
	Immortalisation <i>via</i> son domaine C-terminal.
	Duplication anormale des centrosomes conduisant à une instabilité chromosomique et à l'aneuploïdie.
	Transactivation de facteurs de transcription de la famille AP-1.

liaison de la protéine E6 avec l'IRF 3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) dont elle inhibe l'activité transcriptionnelle (Ronco *et al.*, 1998), la diminution de l'activation de la voie des interférons et plus particulièrement de celle l'interféron  $\beta$  (Wathelet *et al.*, 1998). E6 peut donc jouer un rôle dans l'échappement du virus à la veille immunitaire tout en établissant au sein de la cellule un environnement favorable à la réPLICATION virale (Rapp et Chen, 1998). E6 est également capable de se lier à la protéine paxilline qui participe à la cohésion des complexes d'adhérence focale au niveau des intégrines.

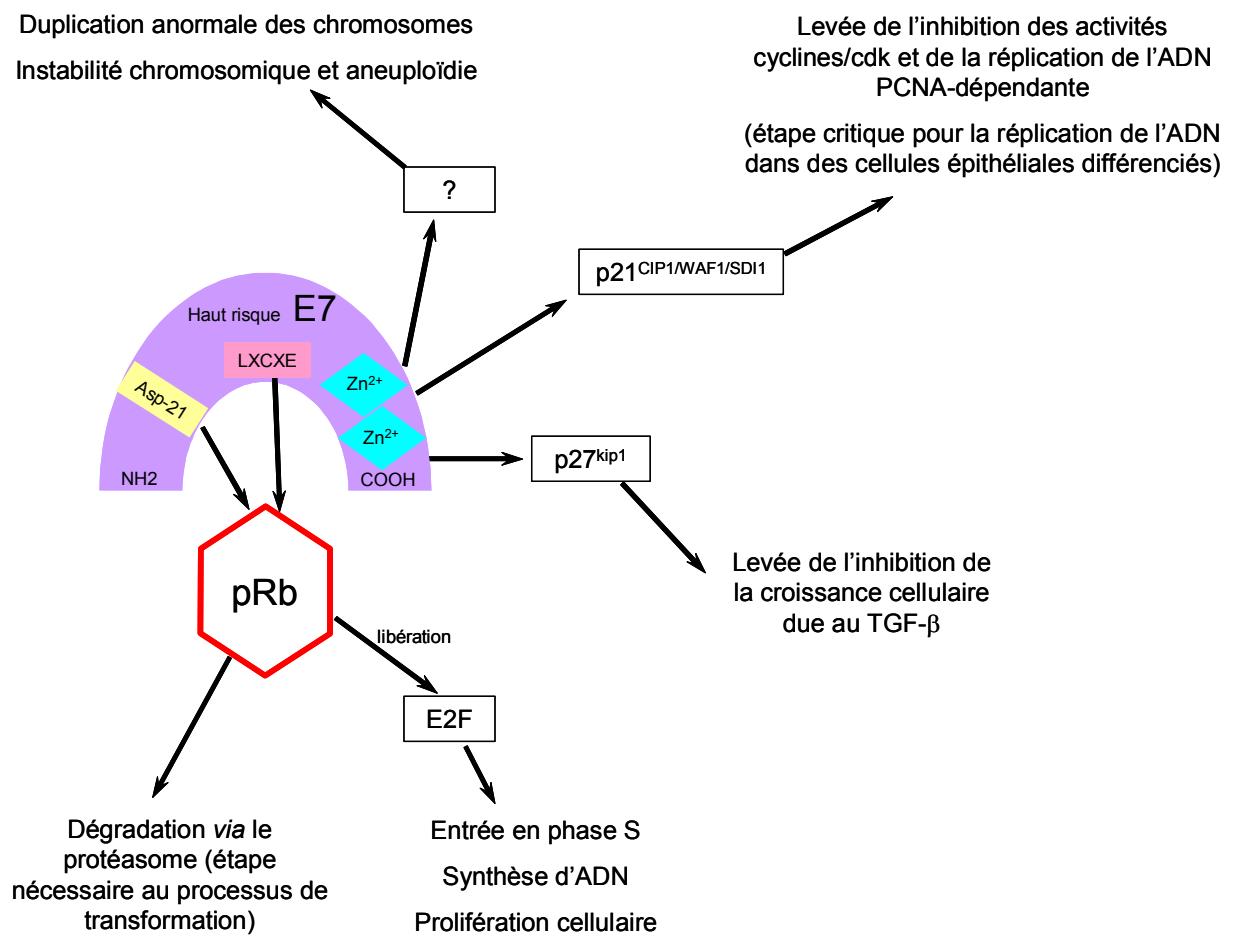
Les principales fonctions de l'oncoprotéine E6 peuvent donc être résumées ainsi :

- i) En installant une instabilité génique et par son effet anti-apoptotique E6 apparaît comme un important facteur endogène de progression tumorale.
- ii) En liant et en dégradant la p53, elle permet d'éviter le point de contrôle de l'intégrité génomique lors du passage de la phase G1 en phase S du cycle cellulaire.

#### 4.2.3.2. *E7 et ses fonctions*

L'oncoprotéine E7 est une phosphoprotéine localisée dans le noyau cellulaire qui ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et dont l'action passe par la formation de complexes avec des protéines impliquées dans la prolifération dont pRb ou encore la différenciation cellulaire. Lorsqu'elle est fortement exprimée, E7 est capable à elle seule d'immortaliser des cellules épithéliales humaines (Sedman *et al.*, 1991) (Tableau 5).

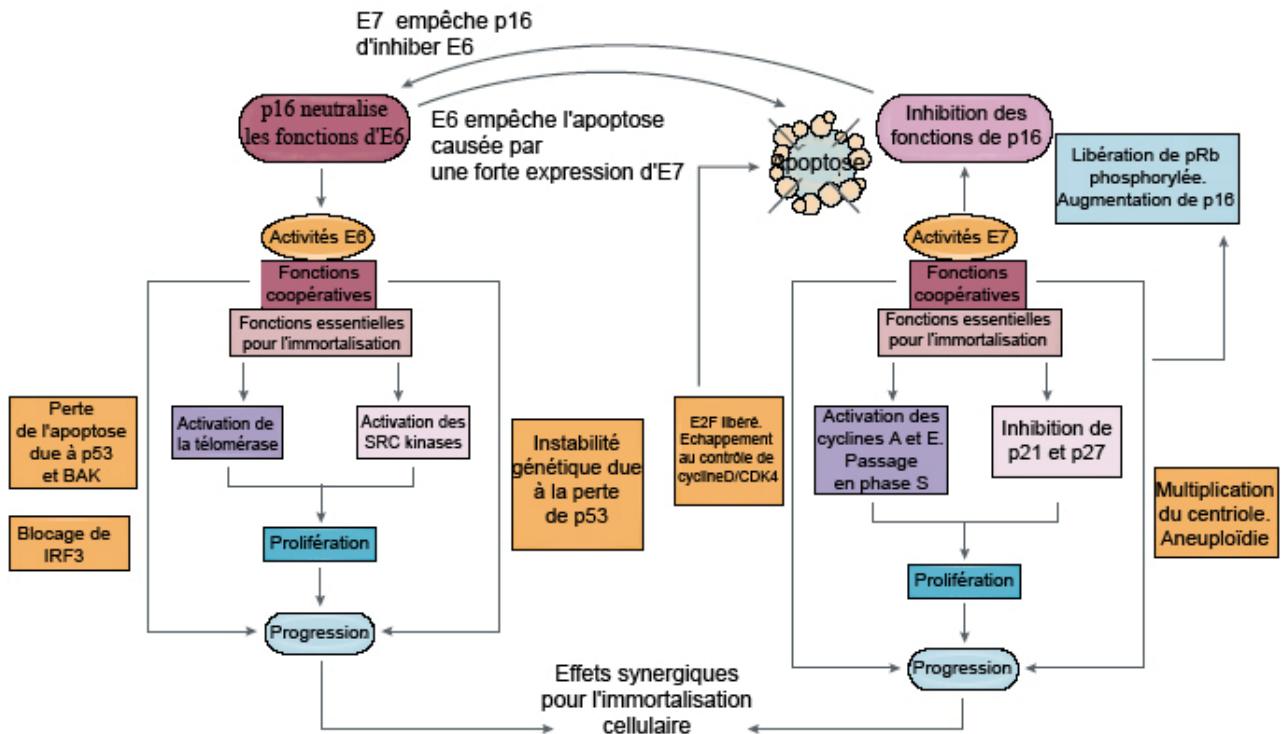
L'oncoprotéine E7 est constituée de deux régions principales : la région N-terminale et la région C-terminale, chacune d'entre elle étant constituée de différents domaines. La région N-terminale contient deux domaines très conservés, CD1 et CD2. Ces deux domaines sont essentiels aux propriétés transformantes de



**Figure 13 :** La protéine E7 des HPV-HR concourt à la transformation et à l'immortalisation des cellules épithéliales.

l'oncoprotéine E7 (Phelps *et al.*, 1988) et plus particulièrement le domaine CD2 car il contient le motif LXCXE de liaison à la protéine pRb (Figure 13) et aux protéines « de poches » p107 (active lors de la transition G1/S et en G2) et p130 (active lors de la transition G0/G1) apparentées à pRb (Dyson *et al.*, 1989 ; Chellappan *et al.*, 1991 ; Berezutskaya *et al.*, 1997; Münger *et al.*, 2001). Ce motif est très conservé parmi les HPV et est notamment retrouvé chez les HPV muqueux oncogènes et non-oncogènes. Le domaine CD2 possède également un site de phosphorylation par la caséine kinase II qui est essentiel puisque de la phosphorylation d'E7 dépend son activité transformante (Firzlaff *et al.*, 1989 ; Barbosa *et al.*, 1990 ; Münger *et al.*, 2001). La région C-terminale est constituée du domaine CD3 qui contient deux motifs en doigt de zinc (Barbosa *et al.*, 1989) impliqués dans la dimérisation de la protéine E7 ainsi que dans sa liaison à l'ADN (McIntyre *et al.*, 1993). Cette région C-terminale d'E7 qui joue un rôle dans la dissociation des complexes E2F/pRb (Huang *et al.*, 1993 ; Wu *et al.*, 1993), contribue également à l'immortalisation des cellules épithéliales humaines (Jewers *et al.*, 1992) et à lever le blocage du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN (Helt et Galloway, 2001).

L'oncoprotéine E7 induit la prolifération cellulaire grâce à sa liaison avec la protéine pRb (Dyson *et al.*, 1989). Cette liaison entraînerait la dégradation de pRb par un mécanisme dépendant du protéasome comme pour E6 (Wang *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2001). La protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome pRb est une protéine de régulation du cycle cellulaire dont l'activité dépend de son état de phosphorylation. Ainsi, la forme hypophosphorylée de pRb peut être considérée comme un inhibiteur de la prolifération cellulaire, car elle empêche l'entrée de la cellule en phase S (Hinds, 1995) et forme alors un complexe avec différents facteur de transcription E2F, dont E2F2. Lors du passage de la phase G1 du cycle cellulaire



**Figure 14 :** Fonctions des oncoprotéines E6 et E7 et leurs interactions dans les étapes conduisant à l'immortalisation. E6 active la télomérase et les SRC kinases et inhibe p53 et BAK. E7 inhibe pRb qui libère E2F et augmente l'expression de p16. E7 inhibe également l'activité de p16. E7 semble activer les cyclines A et E et inhibiter les CKI p21 et p27. E6 et E7 agissent en synergie pour l'immortalisation et la transformation (d'après zur Hausen, 2002).

à la phase S, pRb est phosphorylée par des kinases dépendantes des cyclines (cdk) et elle libère alors E2F qui va transactiver de nombreux gènes de la synthèse d'ADN et de la progression du cycle cellulaire (Münger, 1995 ; Vernell *et al.*, 2003). La liaison de E7-pRb entraîne la libération du facteur E2F2 quelle que soit l'étape en cours du cycle cellulaire et une prolifération cellulaire incontrôlée.

La libération d'E2F2 augmente la transcription du gène CDKN2A qui code la protéine p16(INK4A). La protéine p16 est un régulateur négatif du cycle cellulaire. p16 est un inhibiteur des cdk qui agit en se liant aux cdk 4 et 6 et qui empêche donc la formation des complexes cdk/cycline D actifs. E7 empêche cette inhibition de p16 en activant directement les cyclines A et E responsables de l'entrée en phase S. E7 est aussi capable de lever l'inhibition exercée par les inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines (CKI), comme la p27<sup>kip1</sup> (Zerfass-Thome *et al.*, 1996) ou la p21<sup>CIP1</sup> (Funk *et al.*, 1997 ; Jones *et al.*, 1997) sur le facteur de transcription E2F. Ceci lève d'une part l'inhibition de la croissance des cellules épithéliales induite par le TGFβ (Polyak, 1996) et le TNFα (Villa *et al.* 1992) due à la p27<sup>kip1</sup> et d'autre part l'inhibition de la cdk2 due à la p21<sup>CIP1</sup> durant la différenciation épithéliale (Missero *et al.*, 1995). De plus, en augmentant le nombre de centrioles, E7 induit aussi une aneuploïdie ce qui contribue à la tumorigénèse (Duensing *et al.*, 2001). Toutes ces propriétés permettent d'expliquer la capacité de l'oncoprotéine E7 à induire l'entrée du cycle cellulaire en phase S, permettant ainsi une synthèse d'ADN alors même que les cellules épithéliales sont différencierées (Figure 14) (Cheng *et al.*, 1995).

#### 4.2.3.3. Les autres gènes précoce : E1, E2, E4 et E5

La protéine E1 fait partie des protéines les plus conservées parmi celles codées par le génome viral, son poids moléculaire varie de 67,5 à 76,2 KDa selon le

type de papillomavirus (Thorner *et al.*, 1988 ; Ustav et Stenlund, 1991 ; Thorner *et al.*, 1993). Si la plupart des études concernent la protéine E1 du BPV1 (*bovine PV*), il existe une très grande homologie avec celle des PV humains permettant de dégager des propriétés similaires. Ainsi le domaine N-terminal de la protéine E1 contient un site de fixation à l'histone H1. Le domaine C-terminal comporte notamment un site de liaison à l'ATP et des domaines avec des activités ATPase-hélicase (Seo *et al.*, 1993) qui sont indispensables à la réPLICATION et au maintien du génome viral sous forme épisomale (Sedman *et al.*, 1997). E1 s'associe sous forme de dimère au niveau de la région *ori* (origine de réPLICATION) de la région LCR (Sun *et al.*, 1996 ; Chen et Stenlund, 1998) et forme un complexe initiateur de la réPLICATION en interagissant principalement avec l'ADN polymérase α (Park *et al.*, 1994 ; Masterson *et al.*, 1998 ; Conger *et al.*, 1999). E1 s'associe à la protéine E2 *in vivo* ce qui augmente son affinité pour l'origine de réPLICATION (Thorner *et al.*, 1993 ; Chen et Stenlund, 1998 ; Chen et Stenlund, 2000).

La protéine E2 est une protéine de 50 KDa retrouvée dans le noyau cellulaire. C'est également une protéine dont la structure est très conservée au sein des différents PV. Elle est composée de trois domaines fonctionnels distincts :

i) le domaine C-terminal assure la dimérisation de la protéine ainsi que sa liaison à l'ADN au niveau du motif *ori* (McBride *et al.*, 1988) ; ce domaine régule la réPLICATION du génome viral en association avec E1, mais inhibe par encombrement stérique la transcription des gènes précoces E6 et E7 (Tan *et al.*, 1992 ; Dong *et al.*, 1994 ; Demeret *et al.*, 1997),

ii) le domaine charnière, riche en proline, de taille variable selon les types PV (McBride *et al.*, 1989) comporterait une séquence de localisation nucléaire (Penrose *et al.*, 2000),

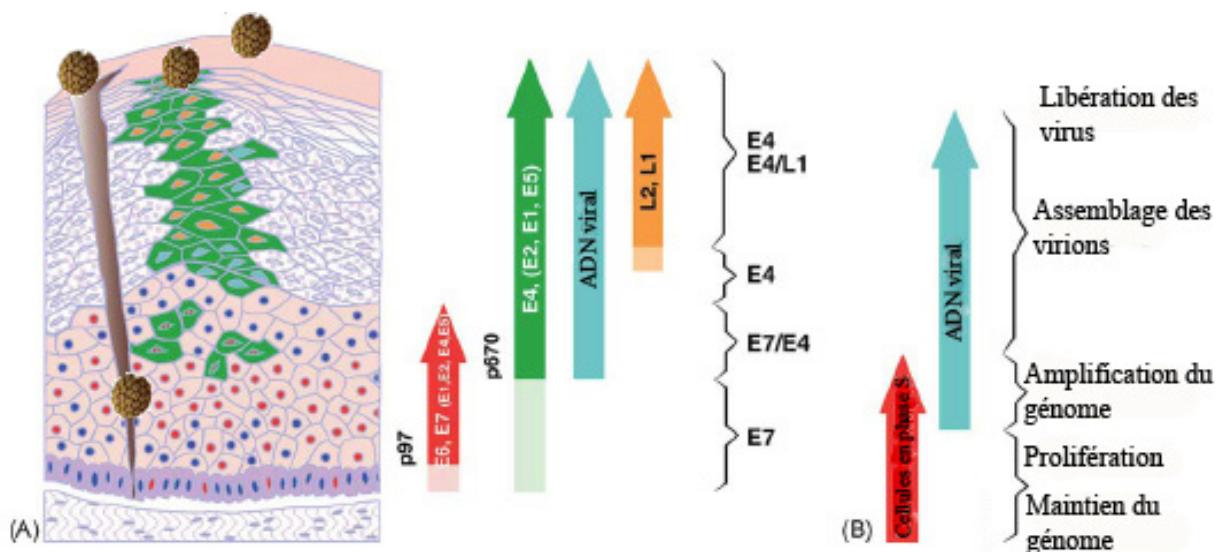
iii) le domaine N-terminal est responsable de l'initiation de la réPLICATION ou de l'activation de la transcription (Dostatni *et al.*, 1988 ; McBride *et al.*, 1989) ; ce domaine comporte également un site d'interaction avec une ubiquitine-ligase conduisant à sa dégradation par le système du protéasome (Bellanger *et al.*, 2001). Ce domaine est également capable d'intéragir avec la protéine Brd4 (*Bromodomain containing protein 4*) qui s'associe avec les chromosomes du fuseau mitotique. Ceci permet la co-localisation d'E2 de BPV 1 et d'HPV 16 avec le fuseau mitotique et l'attachement du génome viral aux chromosomes de l'hôte ce qui est indispensable au maintien des formes épisomales dans les cellules infectées (You *et al.*, 2004).

La protéine E2 des HPV-HR peut être relocalisée dans le cytoplasme cellulaire grâce à une séquence NES (*Nuclear Export Sequence*) qui est absente des protéines E2 des HPV-BR. La relocalisation cytoplasmique de E2 permet l'activation de la caspase 8 et conduit à l'induction de l'apoptose (Blachon *et al.*, 2005).

La protéine E2 joue donc un rôle essentiel dans le cycle viral en initiant la réPLICATION et en contrôlant la transcription des oncogènes viraux. Son inactivation est donc indispensable à une transformation maligne. Lors de l'intégration du génome viral au sein du génome de l'hôte, une partie du gène E2 est interrompue et souvent délétée entraînant l'absence de l'expression de E2 et donc l'absence de son activité pro-apoptotique d'une part, et l'absence de l'inhibition qu'elle pouvait exercer sur la transcription des protéines oncogéniques E6 et E7 d'autre part.

La protéine E4 peut représenter jusqu'à 30% des protéines virales exprimées dans la cellule (Doorbar *et al.*, 1989). La région qui code cette protéine est l'une des plus variables au sein des PV (Doorbar *et al.*, 1986). Cette protéine est différemment exprimée selon le type de PV : cutanés ou muqueux, ces derniers l'exprimant à plus faible taux (Crum *et al.*, 1990 ; Middleton *et al.*, 2003). E4 est exprimée durant la phase tardive du cycle viral en parallèle avec les protéines tardives. E4 contient les 5 acides aminés N-terminaux de la protéine E1, car elle est exprimée sous la forme d'une protéine de fusion E1^E4 de 17 KDa (Nasseri *et al.*, 1987 ; Doorbar *et al.*, 1988). Il existe deux autres formes mineures de 10 et 16 KDa qui sont obtenues par modifications post-transcriptionnelles et par clivage protéolytique (Brown *et al.*, 1996). Le rôle de la protéine E4 n'est pas encore complètement élucidé : elle faciliterait l'encapsidation du génome viral, mais surtout, par sa capacité de liaison à la cytokératine elle favoriserait la déstabilisation du cytosquelette (Doorbar *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2004). E4 semble aussi interagir avec des hélicases impliquées dans la stabilité des ARN et le contrôle de la traduction (Doorbar, 1996; Doorbar *et al.*, 2000) et avec le complexe cdk1/cycline B1 qu'elle séquestre dans le cytoplasme (Davy *et al.*, 2005) pouvant ainsi induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Davy *et al.*, 2002; Nakahara *et al.*, 2002 ; Knight *et al.*, 2004).

La protéine E5 est constituée de 2 domaines : i) un domaine N-terminal responsable de la localisation au niveau membranaire et des compartiments cytosoliques comme les endosomes, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Schlegel *et al.*, 1986 ; Oetke *et al.*, 2000), ii) un domaine C-terminal possédant une activité transformante chez le BPV1 (Sparkowski *et al.*, 1996), mais cette activité est très faible pour la protéine E5 des PV humains. Néanmoins, E5 peut



**Figure 15 :** Le cycle normal de l'infection bénigne par le papillomavirus humain. Cette infection peut se traduire par des changements morphologiques au niveau de l'épithélium tels que koïlocytose, papillomatose et parakératose qui sont toutes des lésions bénignes (adapté de Doorbar, 2005).

activer différents facteurs de croissance dont l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Piccini *et al.*, 1997) et le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (Hwang *et al.*, 1995) et déréguler ainsi la prolifération cellulaire (Fehrman *et al.*, 2003). Enfin, E5 d'HPV 16, comme celle des BPV 1 et 4, joue un rôle dans la diminution de la réponse immunitaire en inhibant l'expression des molécules du CMH de classe I. En effet, E5 inhibe l'acidification de l'appareil de Golgi ce qui permet la séquestration des molécules du CMH de classe I et empêche l'expression des épitopes viraux à la surface cellulaire (Ashrafi *et al.*, 2005).

### 4.3. HPV et cancer du col de l'utérus

#### 4.3.1. Cycle viral

Lors d'une infection naturelle, les HPV pénètrent dans l'épithélium spécifiquement au niveau des cellules basales à la suite d'un microtraumatisme ou d'une lésion tissulaire (Shah et Howley, 1996) (Figure 15). L'interaction virus-cellule qui en résulte se fait alors *via* un récepteur situé à la surface de la cellule cible.

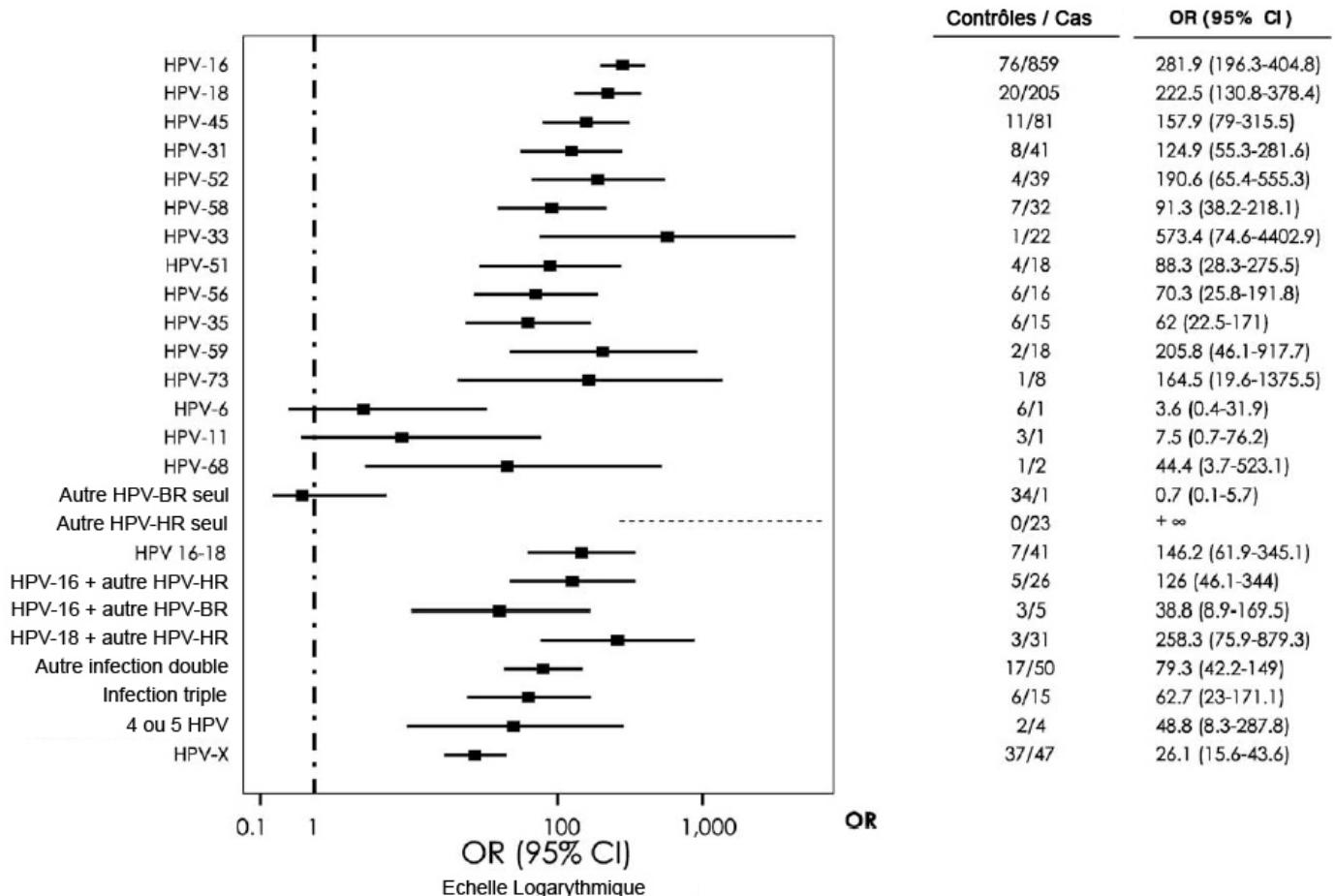
Même si la nature de ce récepteur est encore discutée aujourd'hui, il semble néanmoins que les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  ou  $\alpha 6\beta 4$  (pour l'HPV 6) (Evander *et al.*, 1997 ; McMillan *et al.*, 1999 ; Yoon *et al.*, 2001) ainsi que des résidus d'héparane-sulfate (HPV 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 58, 59 et 68) soient nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule (Joyce *et al.*, 1999 ; Combita *et al.*, 2001 ; Giroglou *et al.*, 2001 ; Rommel *et al.*, 2005). De plus, la laminine 5, sécrétée par les cellules épithéliales basales et/ou migrantes, peut se lier aux virions HPV. La laminine 5 est un composant des lames basales et est le ligand naturel des intégrines au niveau des hémi-desmosomes ( $\alpha 6\beta 4$ ). Elle est rapidement sécrétée aux frontières d'une lésion

épithéliale par les cellules épithéliales migrant vers le site lésionnel. Les HPV présents à ce niveau pourraient alors intéragir plus facilement avec ces cellules épithéliales en étant transférés, *via* la laminine 5, à l'intégrine  $\alpha 6$  (Culp *et al.*, 2006). L'internalisation du virus au sein de la cellule se fait alors par un mécanisme d'endocytose *via* des vésicules de clathrine (Bousarghin *et al.*, 2003 ; Day *et al.*, 2003) ou un système dépendant des cavéoles (Bousarghin *et al.*, 2003). Une fois dans le cytoplasme, le virus migre activement vers le noyau cellulaire grâce au réseau de microtubules et de filament d'actine du cytosquelette (Selinka *et al.*, 2002). Pour profiter de la machinerie cellulaire, le virus doit alors passer la membrane nucléaire. La capsid virale étant plus grande que le diamètre des pores nucléaire, elle est démantelée (Nelson *et al.*, 2002) et le génome viral encore lié aux protéines L1 et L2 est adressé au noyau grâce aux séquences de localisation nucléaire situées sur les protéines L1 et L2 (Touze *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 1994) et ferait intervenir un récepteur nucléaire (Nelson *et al.*, 2002). Dans le noyau, la réPLICATION de l'ADN des HPV est dépendante des enzymes de la cellule et se déroule en 3 phases distinctes : d'établissement, de maintien et d'amplification (Figure 15).

La phase d'établissement consiste en la multiplication limitée du génome viral dans sa forme épisomale à raison de 50 à 100 copies par cellules (Conger *et al.*, 1999 ; Longworth *et al.*, 2004). Cette phase d'établissement a lieu dans les couches basales de l'épithélium. Le nombre de copies virales peut alors être maintenu *quasi* constant pendant de nombreuses années (Stubenrauch et Laimins, 1999) lors des divisions cellulaires successives dans les couches basales et supra-basales. Dans la phase de maintien, le cycle viral est non productif, c'est-à-dire que seule les protéines précoces sont exprimées (Fuchs et Pfister, 1994). La troisième phase correspond à la phase d'amplification, phase productive du cycle viral qui dépend de

la différenciation des cellules épithéliales. Cette phase débute dans les cellules supra-basales par une réPLICATION du génome viral de 1000 à 10 000 copies par cellule ainsi que par une forte expression des protéines précoces. Les promoteurs des gènes tardifs sont activés dans les couches plus superficielles de l'épithélium et conduisent à l'expression des protéines L1 et L2 de la capsid permettant ainsi l'encapsidation du génome de l'HPV et la formation de nouveaux virions (Flores et Lambert, 1997). L'assemblage de ces nouveaux virions se déroule dans le noyau, c'est pourquoi la protéine L1 synthétisée dans le cytoplasme s'assemble en capsomères et est transloquée dans le noyau (Florin *et al.*, 2002). Il en est de même pour la protéine L2 qui, après sa translocation dans le compartiment nucléaire, est capable de recruter les capsomères de L1 d'une part et la protéine E2 lié au génome viral d'autre part (Day *et al.*, 1998). Les HPV ont un cycle non lytique, les virions matures nouvellement formés sont donc libérés dans le milieu extérieur au cours de la desquamation des cellules des couches les plus superficielles de l'épithélium (Figure 15).

L'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule de l'hôte ne fait pas partie du cycle normal du virus car elle empêche la production de nouveaux virions. Classiquement, on considère que l'ADN des HPV est maintenu sous forme épisomale dans les lésions précurseurs du cancer du col, alors qu'il est retrouvé intégré dans les lésions invasives (zur Hausen, 1989), ainsi que dans toutes les lignées cellulaires dérivant de cancer du col ou immortalisées par transfection avec de l'ADN d'HPV 16 ou 18 (Schwartz *et al.*, 1985). Aujourd'hui, l'intégration est considérée plutôt comme un événement précoce de la Cancérogenèse cervicale. Il existe également des formes mixtes où au sein de la lésion, les génomes viraux co-existent sous formes épisomales et intégrées.



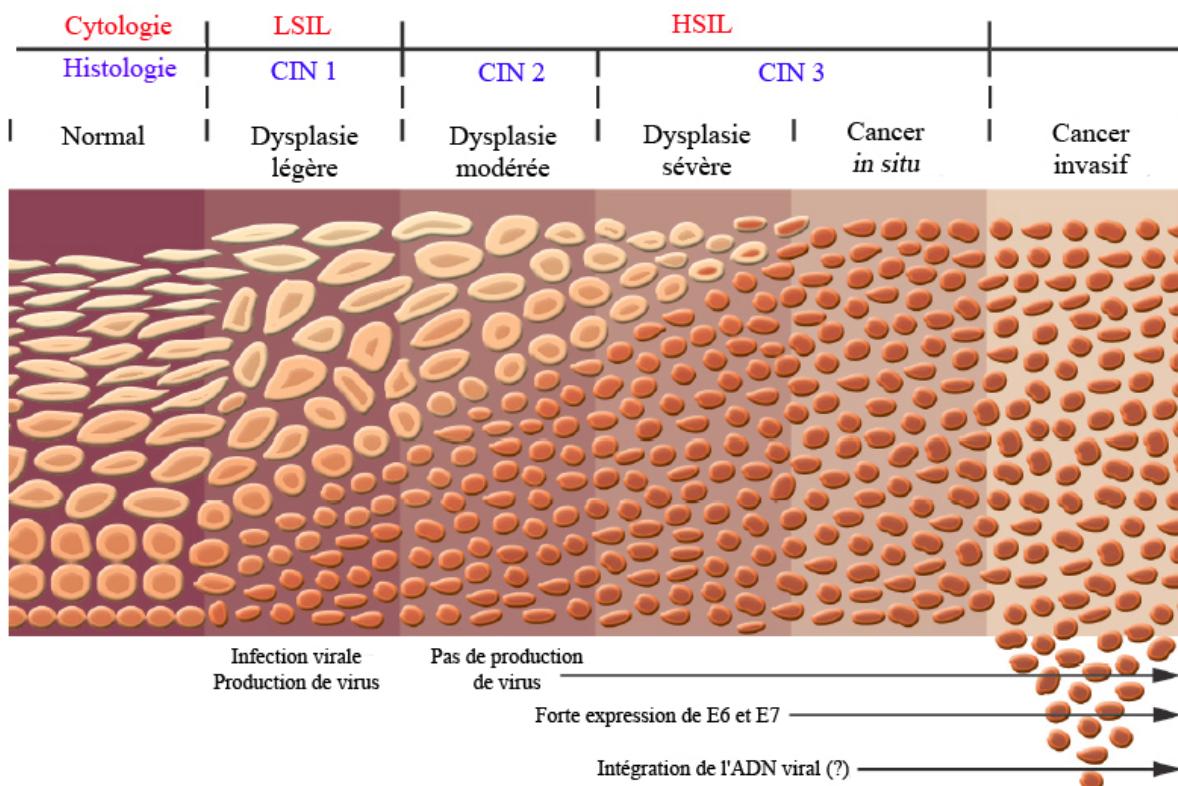
**Figure 16 :** Odds ratio (OR) spécifiques des types d'HPV et intervalles de confiance (CI) dans les cancers du col (épidermoïdes et adénocarcinomes). Les contrôles sont des sujets avec un résultat négatif pour la présence d'ADN d'HPV (d'après Munoz et al., 2006).

L'intégration est précédée par la linéarisation du génome viral suite à une rupture dans la région E1/E2, ce qui entraîne une perte d'expression de la protéine E2 qui ne régule donc plus la transcription des gènes transformants E6 et E7. La rupture du gène E2 se fait de manière aléatoire, l'analyse par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est donc complexe. Les techniques d'analyse de l'intégration s'améliorent mais restent encore imparfaites (Peitsaro *et al.*, 2002). L'intégration est considérée comme une étape importante dans la progression vers le cancer (Popescu et DiPaolo, 1990) et pourrait ainsi avoir un fort impact sur les étapes initiales de la transformation cellulaire, la stabilité du phénotype transformé et la progression tumorale (Syrjänen et Syrjänen, 2000).

#### **4.3.2. Histoire naturelle de l'infection à HPV lié à l'histoire**

##### ***naturelle du cancer du col de l'utérus***

Il est désormais clairement établi que le risque de développer un cancer, épidermoïde ou adénocarcinome, du col de l'utérus est étroitement lié à la présence d'HPV-HR, dont les plus fréquemment retrouvés sont les HPV 16, 18, 31, 33 et 45 (Schiffman et Brinton, 1995; Wallin *et al.*, 1999; Walboomers *et al.*, 1999 ; Munoz, 2000 ; Castellsague *et al.*, 2006 ; Munoz *et al.*, 2006). En présence d'HPV-HR, le risque de développer un cancer du col de l'utérus est multiplié par un facteur supérieur à 100 (Figure 16) (Bosch *et al.*, 1995 ; Munoz, 2000 ; Munoz *et al.*, 2006). Le cancer épidermoïde du col de l'utérus est la première tumeur solide humaine reconnue comme étant à quasiment 100% viro-induite. Les dysplasies cervicales ou néoplasies intra-épithéliales cervicales (CIN : *Cervical Intra-epithelial Neoplasia*) sont considérées comme les précurseurs de ce type de cancer.

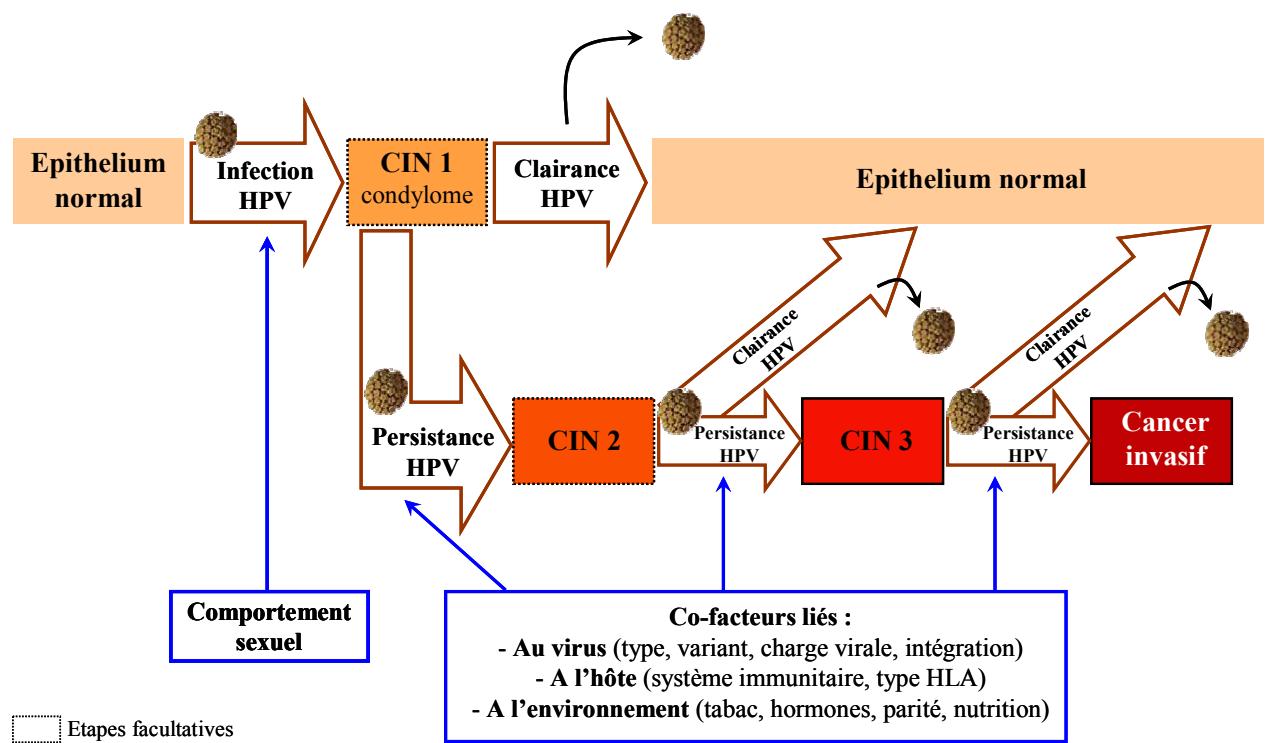


**Figure 17 :** Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus. Représentation schématique des différents grades de lésions cytologiques et histologiques du col de l'utérus (adapté de Lowy *et al.* 2006).

Ces CIN sont classées en trois groupes selon la hauteur de l'épithélium impliqué dans ces changements néoplasiques : les CIN1 concernent les épithélium dont seul le tiers inférieur est modifié, les CIN2 correspondent à des épithéliums dont les deux-tiers sont modifiés et enfin les CIN3 sont rencontrés lorsque toute la hauteur de l'épithélium est impliquée dans ces néoplasies (Richart, 1987) (Figure 17). S'il est communément admis que le cancer cervical résulte d'une progression sur plusieurs années (de 10 à 20 ans), du CIN1 au CIN3 puis vers un cancer (Barron et Richart, 1968), de récentes études ont mis en évidence des CIN3 qui n'étaient pas précédées de CIN 1ou 2 (Koutsy *et al.*, 1992 ; Woodman *et al.*, 2001). Ainsi, une nouvelle théorie tend à séparer les condylomes et CIN1 des CIN3, lésions monoclonales précancéreuses capables d'évoluer vers l'invasion (Koutsy *et al.*, 1992 ; Moscicki *et al.*, 1998) (Figure 18). La période nécessaire au développement d'une dysplasie sévère (CIN3) pourrait alors être de 1 ou 2 ans (Koutsy *et al.*, 1992 ; Woodman *et al.*, 2001).

#### **4.3.3. *Transmission du virus à l'hôte***

Les infections à HPV-HR se transmettent principalement par voie sexuelle, au contact d'un partenaire infecté et ce sont les comportements sexuels des deux partenaires qui vont représenter les facteurs de risque d'infection (Munoz *et al.*, 1996 ; Kjaer *et al.*, 1997). Le nombre de partenaires sexuels, l'âge au premier rapport (surtout pour la femme) et le changement récent de partenaire sont les 3 principaux facteurs de risque déterminants de l'infection ano-génitale à HPV. D'autres voies de contamination sont possibles comme les contacts oro-génitaux ou la transmission



**Figure 18 :** Histoire naturelle de l'infection à HPV oncogènes, liée à l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus (d'après Dalstein *et al.* 2003).

mère-enfant lors de l'accouchement par exemple. Les infections à HPV-HR peuvent s'étendre à l'ensemble des muqueuses ano-génitales, le virus se propageant également après desquamation de cellules infectées vers un autre épithélium muqueux. Enfin, au vu des connaissances actuelles, la transmission de ce type de virus par le sang (*via* une virémie) est peu probable (Howley, 1982; Howley, 1983; zur Hausen, 1996a; zur Hausen, 1996b; zur Hausen, 1996c).

#### **4.3.4. Facteurs influençant l'évolution de l'infection à HPV-HR**

Comme toute infection virale, l'évolution de l'infection à HPV-HR peut être influencée par différents facteurs. Certains sont liés au virus, d'autres à l'hôte ou encore à l'environnement (Figure 18).

##### **4.3.4.1. Facteurs viraux**

L'un des facteurs les plus évidents est la durée variable de cette infection. Généralement, une infection à HPV-HR disparaît en 8 à 18 mois sans forcément l'apparition d'une lésion. On parle alors de clairance de l'infection ou de régression lésionnelle (si une lésion existait). Différemment, la présence d'une infection à HPV-HR sur une période de 12 mois majore le risque de développer une lésion précancéreuse (Schlecht *et al.*, 2001). En effet, au-delà de la présence ponctuelle d'HPV-HR, c'est leur persistance au sein de l'hôte qui est considérée comme le facteur de risque principal du cancer du col de l'utérus (Ho *et al.*, 1995 ; Nobbenhuis *et al.*, 1999 ; Wallin *et al.*, 1999 ; Bory *et al.*, 2002) et même plus spécifiquement la persistance d'un ou plusieurs types d'HPV-HR (Kjaer *et al.*, 2002; Sigstad *et al.*, 2002 ; Dalstein *et al.*, 2003). Ainsi, l'HPV 16 est le plus fréquemment retrouvé associé au cancer du col utérin dans environ 54,6% des tumeurs (Clifford *et al.*,

2006). Certains variants de l'HPV 16 principalement sont aussi détectés dans des lésions de haut grade et des cancers et semblent présenter des risques variables. Le risque de développer une CIN3 serait ainsi plus important avec des variants non-européens de l'HPV 16 (Xi *et al.*, 2002). Ainsi en Colombie, les variants d'origine asiatique-américaine (AA) sont les plus fréquemment détectés dans les cancers invasifs du col utérin (Huertas *et al.*, 2006). Parmi les variants européens de l'HPV 16, le variant L83V (350G) est particulièrement retrouvé associé à un risque de persistance et/ou de progression de la lésion (OR de 3 et 6,2) respectivement (Grodzki *et al.*, 2006). Ces différences de potentiel pathogène entre variants pourraient être expliquées par des différences de régulation transcriptionnelle ou de composition en acides aminés des protéines virales conduisant à des modifications de leurs activités biologiques ou de leur capacité à induire une réponse immunitaire adaptée de la part de l'hôte (Syrjanen et Syrjanen, 2000).

D'autre part, le niveau de la charge virale semble aussi corrélér au risque de développer des lésions de haut grade (> CIN2+) (Schiffman *et al.*, 2000 ; Ylitalo *et al.*, 2000 ; Sherman *et al.*, 2002 ; Dalstein *et al.*, 2003 ; Moberg *et al.*, 2005 ; Monnier-Benoit *et al.*, 2006). Néanmoins, la valeur prédictive de la charge virale dans le devenir d'une infection à HPV-HR reste encore à élucider : certains auteurs trouvant une association entre forte charge virale déterminée par Hybrid Capture II® et apparition de lésions cervicales (Dalstein *et al.*, 2003), alors que d'autres non (Clavel *et al.*, 2001 ; Lorincz *et al.*, 2002). La relation entre la charge virale et le risque de lésion (pré)-cancéreuse semble être aussi fonction du type d'HPV-HR impliqué, les charges virales d'HPV 16 dans les cancers cervicaux étant généralement plus élevées que celles de l'HPV 18 (Moberg *et al.*, 2004). Le temps nécessaire au développement d'une lésion de grade CIN2-3 apparaît relativement

court dans le contexte d'une infection à HPV 16 ou 18. En effet sur une période de 36 mois et parmi les femmes infectées par l'un ou l'autre de ces types d'HPV, l'incidence cumulées des lésions de CIN2 est de 20%, celle des lésions de CIN3 est de 6,7% (Winer *et al.*, 2005) Il n'existe pas encore de recul suffisant concernant les autres types d'HPV-HR.

Un autre facteur viral pouvant influencer le déroulement d'une infection à HPV-HR est l'état physique du virus au sein de la cellule hôte et donc son degré d'intégration. Les formes intégrées et non intégrées (épisomales) pouvant coexister (Kalantari *et al.*, 2001; Peitsaro *et al.*, 2002), le degré d'intégration se définit comme le rapport entre le nombre de copies d'ADN viral intégrée et le nombre de copies totales d'ADN viral dans la cellule. Il a été montré que le degré d'intégration augmentait avec la sévérité de la lésion (Klaes *et al.*, 1999 ; Peitsaro *et al.*, 2002).

Il est assez difficile actuellement d'analyser le réel impact de l'un de ces facteurs (type HPV, variant, charge virale, intégration ou non) car ils sont *a priori* inter-dépendants. Un HPV-HR persistant dans une cellule voit sa probabilité de s'intégrer augmenter, comme une forte charge virale semble aussi augmenter le risque d'intégration. L'étude conjointe de ces facteurs viraux, sur des mêmes prélèvements d'une cohorte de femmes suivies, permettra d'établir l'histoire moléculaire de ces infections à HPV.

#### 4.3.4.2. Facteurs liés à l'hôte et à l'immunité

Les facteurs immuno-génétiques de l'hôte pouvant contrôler l'infection à HPV-HR sont multiples. Les facteurs déterminants de la réponse immunitaire et son efficacité vont ainsi jouer un rôle prépondérant. Les mécanismes immunitaires sont

complexes et variables. Il existe deux grands types de réponses immunitaires : la réponse immunitaire à médiation cellulaire (*via* les lymphocytes T cytotoxiques) ciblant E6 et E7 et celle à médiation humorale (*via* les anticorps ciblant L1 produits par les plasmocytes). Dans le cas de l'infection à HPV l'immunité est principalement à médiation cellulaire. Les sujets immunodéprimés, séropositifs pour le HIV ou encore greffés, présentent une prévalence de l'infection à HPV plus importante (Palefsky et Holly, 2003 ; Hagensee *et al.*, 2004; Chin-Hong et Palefsky, 2005; Hawes *et al.*, 2006). La variabilité immunitaire peut aussi provenir de la multiplicité des types d'HPV et de leurs mécanismes d'échappement (Wideroff *et al.*, 1995 ; Stern, 2005). Les protéines E6 et E7 des HPV-HR peuvent inhiber les voies de signalisation des interférons. Ainsi, E6 se lie à la protéine IRF3 et au complexe CBP/p300 et conduit à l'inhibition de la transcription de l'IFN- $\beta$ . E6 est également capable de diminuer la liaison de STAT-1 aux éléments de réponse à l'IFN ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'expression des IFN- $\alpha$  et - $\beta$  (Koromilas *et al.*, 2001 ; Nees *et al.*, 2001). Dans ce contexte, E7 a une activité inhibitrice de moindre importance, mais la co-expression d'E6 et E7 inhibe la voie de signalisation impliquant les interférons de manière plus efficace que E6 exprimée seule (Nees *et al.*, 2001). Un autre mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire implique la protéine E5 des HPV-HR. La protéine E5 des HPV-HR, tout comme celle de BPV 1, 2 ou 4, empêche l'expression des molécules du CMH de classe I en se liant à leurs chaînes lourdes et les séquestre au sein de l'appareil de Golgi (Campo *et al.* 2006 ; Marchetti *et al.*, 2006).

Les polymorphismes naturels ou les variations génétiques des gènes relatifs à l'immunité cellulaire sont également étudiés. Des recherches portent actuellement sur les molécules HLA (*Human Leucocyte Antigen*) (Hildesheim et Wang, 2002)

divisées en 2 classes principales : le complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH I) et le CMH II. Les molécules du CMH I et II, situées à la surface cellulaire, sont responsables de la présentation de l'antigène aux cellules effectrices de l'immunité cellulaire et présentent un taux important de polymorphismes. La qualité de la présentation d'un antigène donné et donc la qualité de la réponse immunitaire résultante, va dépendre de l'haplotype polymorphique du CMH qui le prend en charge. Actuellement, les deux voies principales de la recherche sur les HLA portent sur l'identification de facteurs de susceptibilité conditionnant la persistance des HPV d'une part, et la progression de la lésion vers un cancer d'autre part (Wang et Hildesheim, 2003). Les résultats disponibles à ce jour sont encore contradictoires. Concernant le CMH II, il semble exister une association entre les allèles DBQ\*0301-3, DRB1\*1501 et DBQ\*10602 et une augmentation du risque de développer un cancer du col. Néanmoins ces résultats restent peu significatifs et semblent dépendre des pays et des groupes éthniques des patientes étudiées (Hildesheim et Wang, 2002). En revanche, les haplotypes DRB1\*1301 et/ou DBQ1\*0603, codant des molécules ciblant L1 et L2, sont plus fortement identifiés comme jouant un rôle protecteur (Hildesheim et Wang, 2002 ; Wang et Hildesheim, 2003). Les résultats sont tout aussi complexes et contradictoires pour le CMH I. Certains auteurs définissent ainsi un rôle protecteur des haplotypes B15 et B44 et un rôle péjoratif pour d'autres comme B7 (Hildesheim et Wang, 2002). L'étude des haplotypes HLA reste encore complexe en raison du faible nombre de patientes testées et de l'importance du nombre des polymorphismes existants.

Parmi les autres co-facteurs de l'hôte, la parité (OR = 4 quand la parité est supérieure à 7), l'utilisation sur une longue durée de contraceptifs oraux ( $> 5$  ans) (OR = 1,4) et le tabagisme (OR de 2 à 5) jouent un rôle de co-facteurs qui

moduleraient le risque de progression d'une infection à HPV-HR vers une lésion (pré)-cancéreuse mais le risque est faible par rapport au risque propre oncogénique de l'HPV-HR (Castellsague et Munoz, 2003).

#### 4.3.4.3. *Facteurs environnementaux*

Certains facteurs environnementaux d'importance modérée sont décrits dans l'évolution de l'histoire naturelle des infections à HPV. Parmi ces facteurs, on retrouve un défaut d'hygiène, nutritif (facteurs vitaminiques...) et la présence concomitante d'autres infections sexuellement transmissibles, comme les infections à *Chlamydia trachomatis* (Castellsague *et al.*, 2002). Néanmoins, ces co-facteurs ne paraissent pas jouer de rôle prépondérant dans la carcinogenèse cervicale.

## 5. Cancers des VADS et cancer du col dans le cadre de l'infection à HPV : convergences et divergences

### 5.1. Introduction

Au cours des vingt dernières années, les HPV-HR ont été reconnus comme la cause nécessaire mais non suffisante des adénocarcinomes et des cancers épidermoïdes du col de l'utérus. Le rôle de ces HPV-HR a pu être clairement établi i) par la présence systématique de l'ADN de ces HPV-HR dans les tumeurs, ii) par l'expression des oncoprotéines E6 et E7 dans ces mêmes tumeurs, iii) par l'identification des propriétés transformantes de ces protéines, iv) par l'expression obligatoire de ces protéines pour le maintien du phénotype malin dans les lignées cellulaires de cancer du col utérin, v) par l'interaction des protéines E6 et E7 avec

des protéines cellulaires de régulation de la prolifération et enfin vi) par des études épidémiologiques identifiant l'infection à HPV comme le facteur de risque majeur dans le développement du cancer du col de l'utérus (zur Hausen, 2000). Des HPV-HR muqueux sont retrouvés dans environ 20% des tumeurs des VADS parmi lesquelles seules certaines localisations O.R.L. sont concernées (Paz *et al.*, 1997 ; Schwartz *et al.*, 1998 ; Gillison *et al.*, 2000). La cancérogenèse des VADS liée aux HPV-HR n'est pas aussi bien caractérisée que dans le col, les études épidémiologiques étant moins nombreuses et plus difficiles à réaliser. La complexité de ces études provient en partie de la difficulté d'obtenir des échantillons de qualité, car fixés au formol et inclus paraffine ou encore à cause du nombre insuffisant de tumorothèques pour une étude rétrospective. S'il existe des convergences entre la cancérogenèse du col et celle des VADS, les divergences sont nombreuses (Snijders *et al.*, 1997).

## 5.2. Prévalence des HPV

Les différents types d'HPV-HR muqueux retrouvés au sein de tumeurs du col de l'utérus et de tumeurs des VADS sont identiques (Paz *et al.*, 1997). Les HPV-HR les plus fréquemment retrouvés sont dans ces deux types de cancers, les HPV de type 16 et 18, avec une nette prédominance de l'HPV 16 (Herrero, 2003 ; Syrjanen, 2003).

La cancérogenèse du col et celle des VADS, plus particulièrement dans les amygdales palatines semble pouvoir partager une étiologie commune. Ainsi les patients souffrant d'un cancer ano-génital HPV-HR positif ont un risque de développer un cancer de l'amygdale multiplié par 4 (Frisch et Biggar, 1999 ;

Syrjanen, 2004). Néanmoins, ces données sont à prendre avec précaution du fait du faible nombre de patients étudiés. De plus, un tel lien n'est pas retrouvé dans tous les pays et notamment en Suède (Hemminki, 2000).

### 5.3. Facteurs de risques

Le facteur de risque principal d'acquérir une infection génitale à HPV est l'activité sexuelle. L'activité sexuelle n'est pas considérée comme facteur de risque en ce qui concerne les cancers des VADS (Schwartz *et al.*, 1998). Mais chez les maris de femmes ayant une infection à HPV associée à un cancer du col de l'utérus, on retrouve une augmentation d'un facteur 4 du risque de développer un cancer des amygdales (Frisch et Biggar, 1999 ; Syrjanen, 2004). Ceci pourrait indiquer que certains cancers des VADS puissent être en relation avec des pratiques sexuelles orales. Le manque d'études épidémiologiques dans ce domaine empêche à l'heure actuelle de confirmer cette hypothèse.

Le tabac est un facteur de risque général en cancérologie, mais *a priori* dans une moindre mesure dans les cancers du col de l'utérus que dans les cancers des VADS. Chez les fumeurs ou les personnes proches de fumeurs, on retrouve cependant des dérivés de la nicotine dans les sécrétions vaginales et dans le sperme. Il est indéniable que le tabagisme, ou plus largement la consommation de tabac (à priser ou à chiquer), est une des causes principales de cancer des VADS (IARC Monographs Vol 38 ; Lefebvre *et al.*, 1996 ; Lewin *et al.*, 1998 ; Moreno-Lopez *et al.*, 2000 ; Johnson, 2001 ; Hecht, 2003). Néanmoins, l'action tabagique dans les cancers des VADS HPV-HR positifs est loin d'être aussi claire. En effet, certaines études considèrent les HPV-HR comme un co-facteur du tabac (Schwartz *et al.*, 1998) où tabac et HPV-HR agiraient en synergie, alors que dans les pays d'Europe

du nord la majorité des tumeurs des VADS HPV-HR positives sont détectées chez des sujets n'ayant pas d'histoire tabagique (Syrjanen, 2004 ; Fakhry et Gillison, 2006).

Cette différence d'interaction entre tabac et HPV-HR dans les cancers du col utérin et les cancers des VADS semble indiquer que des mécanismes pathogéniques induits par les HPV-HR dans ces deux types de cancers ne seraient pas identiques.

#### **5.4. Considérations histologiques et immunologiques**

Le premier site de l'infection à HPV décrit est la jonction endocol-exocol dite zone de jonction ou encore zone de transformation (Meisels et Fortin, 1976; Purola et Savia E, 1977). La sensibilité de cette zone de jonction aux infections à HPV est due à sa fragilité histologique et mécanique. Cette zone est très sujette aux micro-érosions ou à des micro-traumatismes lors d'une activité sexuelle, de l'accouchement ou d'examens gynécologiques qui facilitent la mise en contact entre les HPV et les cellules basales épithéliales (Figure 15). Le même type de fragilité histologique et mécanique est retrouvée dans la trachée où l'épithélium malpighien laisse place à l'épithélium respiratoire.

L'épithélium du col utérin et celui de la cavité buccale et du pharynx sont histologiquement similaires, ce sont tous deux des épithéliums malpighiens pavimenteux pluristratifiés non kératinisés. Ils partagent la même origine embryologique (Schlecht, 2005), c'est pourquoi la présence des mêmes types d'HPV-HR dans ces deux localisations n'est pas surprenante (Paz *et al.*, 1997 ; Nair et Pillai, 2005). Tous ces épithéliums peuvent être exposés à l'action de substances cancérogènes environnementales conduisant principalement à des cancers de type

épidermoïde (Schlecht, 2005). En effet, comme le col utérin, les amygdales palatines, par exemple, sont situées à un carrefour entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme et peuvent subir des processus métaplasiques (Wilczynski, 1998 ; Nair et Pillai, 2005). De plus, les amygdales palatines ont une surface épithéliale accrue grâce à leurs cryptes et l'épithélium au sein de ces cryptes peut se trouver complètement désorganisé par l'infiltration lymphocytaire (Kühnel, 1997 ; Frisch et Biggar, 1999). Ceci pourrait faciliter l'accès des HPV aux cellules basales (Schlecht NF, 2005). Certaines zones amygdaliennes peuvent ainsi être considérées comme des zones de fragilité mécanique.

L'ensemble du tractus génital féminin est contrôlé par le système immunitaire et la zone de jonction est particulièrement impliquée dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Wira *et al.*, 2005a ; Wira *et al.*, 2005b ; Pudney *et al.*, 2005). Cette surveillance immunitaire est toutefois délicate. En effet, des facteurs environnementaux peuvent la perturber : les métabolites du tabac retrouvés dans les sécrétions vaginales par exemple affaiblissent localement cette surveillance immunitaire (Poppe *et al.*, 1995) en diminuant le nombre de cellules de Langherhans présentatrices d'antigènes et initiatrices de la réponse immunitaire (Nadais *et al.*, 2006). La situation est différente au niveau des VADS où, là aussi, la surveillance immunitaire est étroite mais où une telle zone de fragilité immunologique n'est pas retrouvée. En effet, l'amygdale palatine est un tissu lymphoïde, lieu de maturation des lymphocytes et à ce titre, un des acteurs majeurs de la réponse immunitaire du carrefour oropharyngé, semblant moins sensible aux facteurs environnementaux (Perry et Whyte, 1998).

## 5.5. Considérations mécanistiques

L'expression continue des oncoprotéines E6 et E7 est indispensable au maintien du phénotype malin dans le cancer du col de l'utérus (Dyson *et al.*, 1989 ; Werness *et al.*, 1990 ; Bosch *et al.*, 2002 ; Snijders *et al.*, 2006). Il en est de même au niveau d'un certain nombre de tumeurs des VADS où les oncoprotéines E6 et E7 exercent les mêmes fonctions (Snijders *et al.*, 1997 ; Riley *et al.*, 2003 ; Nair et Pillai, 2005 ; Strati *et al.*, 2006).

Actuellement, la différence fondamentale entre la Cancérogenèse cervicale et celle des cancers des VADS associés aux HPV-HR, concerne le pronostic clinique. En effet, un cancer des VADS HPV-HR positif semble être de meilleur pronostic que son homologue HPV-HR négatif (Li *et al.*, 2003 ; Braakhuis *et al.*, 2004 ; Syrjanen, 2004 ; Dahlstrand et Dalianis, 2005 ; Schlecht, 2005 ; Weinberger *et al.*, 2006). Ceci pourrait être dû à une absence de cancérisation en champs et/ou à une meilleure radio-sensibilité des cancers HPV-HR positifs. La sur-expression de p16(INK4A) induite par les HPV-HR pourrait jouer un rôle dans cette radio-sensibilité. Alcorta *et al* proposent ainsi un modèle de sénescence cellulaire *via* un processus multi-étapes nécessitant la sur-expression de p16 et p21. Mais l'événement majeur lors de la sénescence reste la sur-expression de p16 selon un mécanisme encore inconnu. En effet, p16 est un gène suppresseur de tumeur, participant à la sénescence cellulaire, qui peut d'ailleurs être retrouvé muté dans de nombreux types de tumeurs à la différence de p21 (Alcorta *et al.*, 1996). Ainsi, le pronostic le plus favorable est lié aux cancers HPV-HR positifs et pourrait donc être expliqué par le maintien de la

sénescence après la radiothérapie *via* la sur-expression de p16. Ceci expliquerait donc les différences d'évolution entre les tumeurs p16 positives et p16 négatives.

Il existe également au sein des VADS des tumeurs HPV-HR positives montrant des mutations dans le gène codant la p53 (*TP53*) (Dai *et al.*, 2004), ce qui n'est pas le cas dans le cancer du col. De plus, ces tumeurs HPV-HR positives et *TP53* muté semblent induire un mauvais pronostic tout comme les tumeurs HPV négatives (Kozomara *et al.*, 2005). Ceci sous-entend des différences dans les mécanismes fondamentaux de la Cancérogenèse HPV-HR induite. Ainsi, dans certains cancers de la cavité buccale, l'expression de la protéine p53, de pRb et de p16 serait indépendante de la présence des HPV-HR (Nemes *et al.*, 2006) et de récentes études O.R.L. identifient des différences significatives au niveau des interactions E6 et p53 (Malanchi *et al.*, 2004). Dans une autre étude, l'expression des protéines contrôlant le cycle cellulaire dans des cellules épithéliales de la cavité buccale, immortalisées par les gènes E6 et E7 de l'HPV 16 pourrait être perturbée *via* une signalétique cellulaire différente de celle du col : la présence d'E7 n'augmenterait pas l'expression de la p16 et l'expression d'E7 s'accompagnerait paradoxalement d'une augmentation des niveaux d'expression de la p53 et de la p21 détectés par immunocytochimie (Sdek *et al.*, 2006).

Enfin, l'étude de l'expression différentielle des gènes (RT-PCR, puces à ADN...) exprimés dans les cancers du col de l'utérus et les cancers des VADS associés ou non aux HPV-HR, devrait permettre de déterminer les caractéristiques de la Cancérogenèse HPV-HR induite. Ces différents cancers partagent de nombreuses modifications dans l'expression de leurs gènes (Ruutu *et al.*, 2002 ; Ruutu *et al.*, 2005 ; Pyeon *et al.*, 2006). Rodrigo *et al.* montrent dans les cancers du

larynx, de l'oro-pharynx et de l'hypo-pharynx, que des altérations géniques sont dépendantes de la localisation anatomique et suggèrent donc une biologie tumorale différente (Rodrigo *et al.*, 2001a). Dans l'oro-pharynx, Rodrigo *et al.* constatent une perte d'hétérozygotie du locus TP53 dans 67% des cas, une amplification de la région 11q13 dans 49% des cas et des oncogènes ERBB1 (14%) et MYC1 (5%). Cette amplification du locus 11q13 semble associée à une fréquence plus importante de métastases ganglionnaires et de récurrences (Rodrigo Tapia *et al.*, 2001b). D'autre part, Braakhuis *et al.*, dans des cancers de la cavité buccale et de l'oro-pharynx HPV-HR positives, montrent une perte d'hétérozygotie moins importante dans les régions chromosomiques 3p, 9p (comportant INK4A sur le locus 9p21) et 17p (pour le gène TP53) que dans les tumeurs HPV-HR négatives. Cette faible perte d'hétérozygotie survenant généralement précocement dans la cancérogenèse des VADS, permettrait de démontrer l'implication précoce et donc directe *a priori* des HPV dans le développement d'un sous-groupe de cancers des VADS (Braakhuis *et al.*, 2004). Ces résultats de Braakhuis suggèrent donc que dans le contexte d'une infection à HPV active, une perte d'hétérozygotie de ces loci n'est pas nécessaire pour le développement d'une tumeur. Les cancers épidermoïdes du col et des VADS associés aux HPV-HR montrent aussi une augmentation de l'expression de la p16 (Dahlstrand *et al.*, 2005 ; Wittekindt *et al.*, 2005) ainsi que de gènes associés à la progression du cycle cellulaire (Rosty *et al.*, 2005 ; Pyeon *et al.*, 2006). Une autre étude relate une différence significative de l'expression de 91 gènes dans les tumeurs HPV-HR positives de l'oro-pharynx avec l'existence d'un cluster de gènes sur-exprimés sur le bras long du chromosome 3 (3q24-ter) (Slebos *et al.*, 2006). On constate également dans les tumeurs HPV-HR positives, l'expression d'autres gènes spécifiques tels que ceux du testicule exprimés normalement exclusivement dans les

cellules méïotiques (SYCP2, STAG3 qui ont un rôle dans la formation des complexes synaptonémaux et dans la cohésion des bras de chromatine) ou à la surface des cellules germinales (TCAM1 qui est une molécule d'adhérence dans le testicule) (Rosty *et al.*, 2005 ; Pyeon *et al.*, 2006). Ces gènes pourraient à terme servir de marqueurs cellulaires. D'autres gènes ont au contraire leur expression diminuée par l'action des HPV-HR, il s'agit entre autres de gènes impliqués dans l'immunité et les voies des cytokines (Ruutu *et al.*, 2002 ; Ruutu *et al.*, 2005). Des différences d'expression génique entre les cancers cervicaux et des VADS associés aux HPV-HR existent, mais semblent refléter une spécificité tissulaire plus qu'une réelle différence de mécanisme cellulaire (Pyeon *et al.*, 2006). A l'heure actuelle le faible nombre d'études portant sur l'expression génique des cancers des VADS HPV-HR positifs ou négatifs ne permet pas de conclure sur ce dernier point.

## **SECONDE PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS**

**Publication N°1 :**

*Prevalence of human papillomaviruses in lung carcinomas : a study on 218 cases.*

**CJ Coissard**, G Besson, MC Polette, M Monteau, PL Birembaut, CE Clavel.

Modern Pathology 2006 ; 18 : 1606-1609

## Introduction à la publication N°1

La première localisation où nous avons recherché la présence d'HPV-HR a été le poumon. Une première étude au sein de notre laboratoire avait montré une prévalence des HPV-HR de 2,7% dans les cancers pulmonaires. Cette étude avait été réalisée sur 185 tumeurs congelées à l'aide du test Hybrid Capture II® utilisé en routine sur des frottis cervico-utérin (Clavel *et al.*, 2000).

Ici, nous avons sélectionné 218 tumeurs pulmonaires (126 cancers épidermoïdes, 80 adénocarcinomes, 11 cancers à grandes cellules et 1 carcinome atypique) conservées dans l'azote liquide. Cette série de tumeurs constituait à l'époque la plus importante de la littérature. La présence éventuelle de l'ADN d'HPV-HR et -BR a été recherchée *via* le système Line Blot Assay® (ROCHE), version prototype du kit ROCHE Linear Array® actuellement commercialisé. Cette méthode de détection consiste en une PCR suivie de l'hybridation des amplicons obtenus sur une bandelette de nylon à la surface de laquelle sont fixées les sondes de 37 HPV muqueux. Le nombre de copies virales par cellule humaine a été déterminé par PCR en temps réel. La présence d'ARNm de l'oncoprotéine E6 de l'HPV-HR 16 a également été recherchée par RT-PCR.

La présence d'HPV n'a été avérée que dans 4 cas, soit 1,8% des tumeurs pulmonaires analysées. Dans ces 4 cas, seul l'HPV-HR de type 16 a été détecté, avec une charge virale très faible de 1 copie virale pour  $10^3$  cellules humaines. Aucune expression des ARNm E6 de l'HPV-HR de type 16 n'a pu être mise en évidence. Ceci confirme la faible prévalence des HPV dans les cancers pulmonaires

et ne plaident pas en faveur d'une action induite par les HPV dans la cancérogenèse de ces cancers.

# Prevalence of human papillomaviruses in lung carcinomas: a study of 218 cases

Cyrille J Coissard<sup>1,2</sup>, Guillaume Besson<sup>2</sup>, Myriam C Polette<sup>1,2</sup>, Michel Monteau<sup>3</sup>, Philippe L Birembaut<sup>1,2</sup> and Christine E Clavel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR-S 514, Reims, France; <sup>2</sup>Laboratoire Pol BOUIN, Hôpital de la Maison Blanche CHU, Reims, France and <sup>3</sup>Polyclinique Courlancy, Reims, France

**High-risk human papillomaviruses (HPV) are largely implicated in the carcinogenesis of cervical carcinomas. Their role in bronchopulmonary carcinomas is still unclear. In the present study, we have explored 218 fresh frozen lung tumours for the presence of HPV with the Roche line blot assay and for the expression of mRNAs encoding E6 oncoprotein in HPV positive tumours. Only four samples were positive for HPV detection, one poorly differentiated squamous cell carcinoma and three large cell carcinomas. E6 mRNA was undetectable in these four samples. Our data confirm the low prevalence of HPV in lung carcinomas in Western European countries and do not plead in favour of a carcinogenic role for HPV in these carcinomas.**

*Modern Pathology* (2005) **18**, 1606–1609. doi:10.1038/modpathol.3800472; published online 29 July 2005

**Keywords:** human papillomavirus; lung carcinoma; HPV genotyping; mRNA expression

Human papillomaviruses (HPV) are small double-stranded and nonenveloped DNA viruses. They are epitheliotropic and associated with both benign and malignant lesions such as papillomas, condylomas and carcinomas. HPVs belong to a heterogeneous group of viruses including oncogenic or high risk, and nononcogenic or low risk, HPV (HR-HPV and LR-HPV, respectively). HR-HPV are considered to be responsible for cervical cancer<sup>1,2</sup> and for most carcinomas of the anogenital area. HR-HPV also play a role in malignant proliferation in other organs such as head and neck cancers and especially tonsil carcinomas.<sup>3,4</sup> In consequence, it has been suggested that HPV could also be found in other areas where the presence of a junctional epithelium could lead to an HPV infection. The fact that HPV can be found in the tonsil and that condyloma-like lesions exist in the bronchi, led us to look for the presence of HPV in bronchopulmonary carcinomas. Indeed, as in the squamo-columnar junction of the cervix or the anorectal junction, the respiratory epithelium of smokers shows microabrasions<sup>5</sup> with squamo-columnar junctions that are considered to be the prerequisite for the spread of HPV.<sup>6</sup> Previously, numerous studies had been undertaken principally

on squamous cell carcinoma of the lung, but according to the literature the link between HPV and carcinogenesis of lung cancers remains unclear.<sup>7</sup>

In a previous study in our laboratory, the Hybrid Capture II technique was used for the detection of HPV on 185 lung tumours.<sup>8</sup> Although it is highly sensitive, this technique can be defective<sup>9,10</sup> missing some HPV-HR infections. Moreover, this technique does not allow the genotyping of HPV. Thus, the aim of the present study was on the one hand to detect and to genotype HPV in a large series of 218 fresh frozen lung carcinomas using a novel PCR technique previously used on genital samples<sup>11–13</sup> and on the other hand to assess the expression of the mRNA encoding HPV E6 oncoprotein, when HPV DNA was detected.

## Materials and methods

### Patients and Samples

A total of 218 patients were examined in the Polyclinic Courlancy (Reims, France). Patients' mean age was 61.2 years (range 33–78 years), with 29 women and 189 men, and all were smokers.

Lung resected for primary tumours gave fresh samples that were immediately frozen in nitrogen. These include 126 squamous cell carcinomas (49 stage I, 41 stage II and 37 stage III according to the World Health Organisation (WHO) classification), 80 adenocarcinomas (AC), including 14 bronchio-alveolar carcinomas according to the WHO definition

Correspondence: Dr C Clavel, PhD, Laboratoire Pol BOUIN, Hôpital de la Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, CHU, 51100 Reims, France.

E-mail: [cclavel@chu-reims.fr](mailto:cclavel@chu-reims.fr)

Received 16 May 2005; accepted 15 June 2005; published online 29 July 2005

(42 stage I, 15 stage II, 22 stage III and 1 stage IV), 11 large cells carcinomas (three stage I, three stage II and five stage III) and one atypical carcinoid stage I. A frozen section was systematically performed to have a good representation of the histology of the tumours and to validate the viability of the sample before PCR.

### Detection and Typing of HPV DNA

Total DNA was extracted using the QIAGEN DNeasy Tissue Kit (catalogue no. 69506; QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The DNA samples were then put through a program of successive temperature changes to release potential impurities from the DNA. This program, originally used with the Gene Fizz reagent from Laboratoires EUROBIO (Les Ulis, France), consisted in a cycle of 30 s at 65°C, 30 s at 8°C, 1.5 min at 65°C, 3 min at 97°C, 1 min at 8°C, 3 min at 65°C, 1 min at 97°C, 1 min at 65°C and 10 min at 85°C. This cycle was repeated 20 times. The amount of DNA was measured with a UV spectrophotometer (Ultrospec III, Pharmacia) and the samples were then stored at -20°C for further experiments.

The detection and typing of the HPV DNA was performed using the ROCHE line blot assay. This assay is based on a PCR followed by a blotting of the PCR products and allows the typing of 21 HR-HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 70, 73 and 82) and 16 LR-HPV (6, 11, 40, 42, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 71, 72, 81, 83, 84 and CP6108). The PCR is based on the PGMY primer set combined with the B-PCO4 and B-GH20 primers as described earlier<sup>11</sup> and produces two fragments of, respectively, 450 and 268 bp. In all, 200–600 ng DNA, were engaged in each PCR. Distilled water as negative control and DNA extracted from baculoviruses having integrated different types of known HPV as positive controls were included in each PCR run. The amplicons produced were analysed with a line blot assay as described by Gravitt *et al*<sup>12</sup> with the difference that this one was able to detect more HPV genotypes.

### Determination of the HPV16 Viral Load by Real-Time PCR

The determination of the HPV16 viral load using hydrolysis probes was performed as described previously,<sup>14</sup> with that differences that the experiences were run on the iCycler iQ™ (BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, France), using the qPCR™ Mastermix-No ROX (EUROGENTEC, Seraing, Belgium) in a 50 µl final volume. The data collected with the iCycler iQ™ were analysed with the iCycler iQ™ Real-time PCR Detection System Software version-3.0A (BIO-RAD).

### Detection of HPV mRNA by RT-PCT

The RNA was extracted using the QIAGEN RNeasy Midi Kit (catalogue no. 75144; QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The amount and the quality of RNA were measured with a UV spectrophotometer (Ultropec III, Pharmacia) and the samples were then frozen at -80°C until further experiments.

The detection of the HPV E6 mRNA was accomplished using two primers targeting the differential spliced E6 transcripts: HPV16-3 primer (5'-CAA-GCA-ACA-GTT-ACT-GCG-ACG-TG-3') as the sense primer specific for nucleotides 202–224, and HPV16-4 primer (5'-TCC-GGT-TCT-GCT-TGT-CCA-GCT-GG-3') as the antisense primer specific for nucleotides 704–725 of the HPV16 to produce two fragments of, respectively, 321 and 204 bp. Since SiHa and CaSki cell lines are human cervical carcinoma cell lines known to carry transcriptionally active HPV16 genome,<sup>15</sup> RNA from SiHa cells and CaSki cells were extracted under the same conditions as the samples and used as positive controls and distilled water was the negative control. Using the Reverse Transcriptase RNA PCR Kit (Applied Biosystems) using the manufacturer's instructions, the cycling conditions were as follows: for the RT reaction 15 min at 70°C and 5 min at 4°C. The PCR program was 1 min at 95°C, a cycle repeated 45 times consisting of 1 min at 94°C, 30 s at 55.5°C and 30 s at 72°C. The last step was followed by a 3 min incubation at 72°C. The products were analysed on a SYBRgold stained gel electrophoresis.

## Results

The histological examination of the 218 tumours looking for morphological changes evocating HPV infection revealed the presence of koilocytosis and papillary exophytic lesions in only five squamous cell carcinomas (four men and one woman).

Out of the 218 DNA samples tested only four (2%) showed the presence of HPV DNA. In these four HPV-positive cases, three were large cell carcinomas. Two of them were staged III (one man 65 years old and one woman 37 years old) and one man (57 years old) staged I. The last HPV positive sample was a poorly differentiated squamous cell carcinoma staged I from a man who was 42 years old. Interestingly, the HPVs detected were in all cases HPV16 which is known to be the most involved in cervical and tonsillar carcinoma.

In these four HPV-DNA-positive cases, the presence of HPV16 was confirmed by real-time PCR which demonstrated a very low viral load (one copy per 10<sup>3</sup> cells). Moreover, the presence and the conservation of RNA was assessed by the detection of 28S RNA. Then the detection of HPV16 mRNA was undertaken to determine the expression of the viral oncogene E6 mRNA. No HPV16 E6 mRNA

was detected in these samples, whereas controls were all positive for E6 mRNA detection.

Clinically, all these patients were smokers. After a new histological examination of the frozen sections of the tumours used prior to PCR, no koilocytes and/or other signs of viral infection were detected in the HPV-positive samples, while the five tumours with koilicytosis and papillary structures were all negative for HPV detection.

## Discussion

The present study on a series of 218 lung carcinomas clearly confirms the low incidence of HPV infection in lung carcinomas. This series is one of the most important in the literature. In other studies, the prevalence of HPV in lung carcinomas ranges from 0 to 100%.<sup>7</sup> The high heterogeneity of these results can be largely explained by the mode of sampling: in fresh frozen tissue samples the DNA is less degraded than in paraffin-embedded tissues where it can be fragmented and/or modified and thus is very difficult to work with. Several techniques with different sensibilities and specificities have been used to detect HPV. Historically, *in situ* hybridization was first used but its sensitivity is weak detecting approximately 20 to 50 copies per cell. Most studies have then used PCR, which is much more sensitive, but with difficulties to obtain large amplifiers, notably when paraffin-embedded tissues are used and still again with high discrepancies.<sup>7</sup> That is why in our study fresh frozen tissues were chosen. Moreover, the PCR technique used in our present work has been validated in numerous studies in cervical pathology. It gives medium size amplifiers of 268 and 450 bp and displays a sensitivity of at least 10 HPV copies per PCR for HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 40, 45, 51, 52, 56 and 59<sup>11</sup> even though the primers and probes used in this technique do not exclude the presence of other cutaneous HPV types. Another way to understand the important differences between the results published in the literature is by the size of the cohorts studied. Indeed, the cohorts explored in previous studies show a range from 1<sup>16–19</sup> to 285<sup>20</sup> cases allowing large discrepancies. In addition to these factors, the geographic and environmental variations may account for the variable results reported.<sup>21,22</sup> For example, HPV infection has been largely detected in Asiatic countries (Japan and China). A recent study in French patients failed to detect any HPV DNA in 122 lung carcinomas.<sup>23</sup> In consequence, the prevalence of HPV infection in such carcinomas is a subject difficult to apprehend but in our experience is very low in our geographic area.

The presence of HPV in lung carcinomas has been mostly observed in squamous cell carcinoma. It is also sometimes associated with koilicytosis. In our series, HPV16 has been found in three large cell carcinomas and one poorly differentiated squamous

cell carcinoma. The presence of HPV in large cell carcinomas is unusual since it has been reported in only two studies<sup>24,25</sup> with the presence of HPV16 in one case and of HPV31–33 in two cases. Of particular interest is the absence of koilicytosis in all our positive cases. Such observations are similar in invasive cervical squamous cell carcinomas which rarely show koilicytosis. In another way, five papillary squamous cell carcinomas in our series showed indirect classical signs of viral infection such as exophytic proliferations with koilicytosis and were negative for HPV detection. Thus, all these morphological findings together with a low prevalence of HPV detection do not plead in favour of a direct involvement of HPV in lung carcinogenesis.

However, the carcinogenic role of HPV has been previously emphasized *in vitro* with the use of bronchial cell lines transfected with full-length HPV16 or 18 or HPV16 E6 and E7 genes.<sup>26–28</sup> Indeed after oncogenic HPV transfection, bronchial cell lines (BEP2D) were immortalized and showed terminal differentiation of keratinocytes, but they were not tumourigenic in nude mice. In another way, HPV16 transfection of lung adenocarcinoma (PC14) cells induced squamous metaplasia when injected into severely combined immunodeficient mice.<sup>29</sup> Consequently, in few cases, HPV could be involved in the multistep bronchial carcinogenesis. Nevertheless, in our present study we failed to detect any oncoprotein E6 mRNA expression in the four cases positive for HPV16. In the literature, there is only one paper reporting the expression of E6/E7 mRNA of HPV18 in one SCC and two adenocarcinomas in Japan.<sup>30</sup> Thus, the absence of oncoprotein E6 mRNA expression and of viral-induced morphological changes such as koilicytosis in the rare HPV16 positive cases pleads in favour of a simply opportunistic presence of HPV in lung carcinomas. Moreover, the mode of contamination in HPV-positive cases remains unclear. Considering our results, contrary to upper aerodigestive tract carcinomas, the effective role of HPV infection in the carcinogenesis of lung tumours is very limited in Western European countries.

## Acknowledgements

We are grateful to the Lion's Club from Soissons and the Lion's club from Villers-Cotterets who have supported a part of this work. We thank ROCHE Molecular Diagnostic who supplied chemicals and reagents for the HPV genotyping. Cyrille Coissard is supported by a grant from the University of Reims.

## References

- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12–19.

- 2 Duggan MA. A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Jpn J Cancer Chemother* 2002;29:176–193.
- 3 Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:449–455.
- 4 De Villiers EM, Gunst K, Stein H, et al. Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: prevalence of human papillomavirus DNA sequences. *Int J Cancer* 2004;109:253–258.
- 5 Auerbach O, Garfinkel L, Parks VL. Histologic type of lung cancer in relation to smoking habits, year of diagnosis and site of metastasis. *Chest* 1975;67:382–389.
- 6 Kashima H, Mounts P, Leventhal B, et al. Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:580–583.
- 7 Syrjanen KJ. Infections and lung cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:885–891.
- 8 Clavel CE, Nawrocki B, Bosseaux B, et al. Detection of human papillomavirus DNA in bronchopulmonary carcinomas by Hybrid Capture II. A study of 185 tumors. *Cancer* 2000;88:1347–1351.
- 9 Jonhson T, Bryder K, Corbet S, et al. Routine genotyping of human papillomavirus samples in Denmark. *APMIS* 2003;111:398–404.
- 10 Lonky NM, Felix JC, Naidu YM, et al. Triage of atypical squamous cells of undetermined significance with hybrid capture II: colposcopy and histologic human papillomavirus correlation. *Obstet Gynecol* 2003;101:481–489.
- 11 Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357–361.
- 12 Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, et al. Genotyping 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998;36:3020–3027.
- 13 Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, et al. The Canadian Women's HIV Study Group, Franco E. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002;40:902–907.
- 14 Prétet JL, Dalstein V, Monnier-Benoit S, et al. High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II® correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women. *J Clin Virol* 2004;31:140–147.
- 15 Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, et al. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987;61:962–971.
- 16 Bejui-Thivolet F, Chardonnet Y, Patricot LM. Human papillomavirus type 11 DNA in papillary squamous cell lung carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990;417:457–461.
- 17 DiLorenzo TP, Tamsen A, Abramson AL, et al. Human papillomavirus type 6a DNA in the lung carcinoma of a patient with recurrent laryngeal papillomatosis is characterized by a partial duplication. *J Gen Virol* 1992;73:423–428.
- 18 Katial RK, Ranlett R, Whitlock WL. Human papilloma virus associated with solitary squamous papilloma complicated by bronchiectasis and bronchial stenosis. *Chest* 1994;106:1887–1889.
- 19 Kawaguchi T, Matumura A, Iuchi K, et al. Solitary squamous papilloma of the bronchus associated with human papilloma virus type 11. *Intern Med* 1999;38:817–819.
- 20 Hiroshima K, Toyozaki T, Iyoda A, et al. Ultrastructural study of intranuclear inclusion bodies of pulmonary adenocarcinoma. *Ultrastruct Pathol* 1999;23:383–389.
- 21 Tsuhako K, Nakazato I, Hirayasu T, et al. Human papillomavirus DNA in carcinoma of the lung. *J Clin Pathol* 1998;51:741–749.
- 22 Colby TV, Koss MN, Travis WD. Tumours of the lower respiratory tracts In: Rosai J (ed). *Atlas of Tumor Pathology*. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC, 1995, pp 279–286.
- 23 Bouchet L, Valmary S, Dahan M, et al. Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br J Cancer* 2005;92:743–746.
- 24 Noutsou A, Koffa M, Ergazaki M, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) and K-ras mutations in human lung carcinomas. *Int J Oncol* 1996;8:1089–1093.
- 25 Miasko A, Niklinska W, Niklinski J, et al. Detection of human papillomavirus in non-small cell lung carcinoma by polymerase chain reaction. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39:127–128.
- 26 Willey JC, Brousseau A, Sleemi A, et al. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18. *Cancer Res* 1991;51:5370–5377.
- 27 De Silva R, Whitaker NJ, Rogan EM, et al. HPV-16 E6 and E7 genes, like SV40 early region genes, are insufficient for immortalization of human mesothelial and bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res* 1994;213:418–427.
- 28 Viallet J, Liu C, Emond J, et al. Characterization of human bronchial epithelial cells immortalized by the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16. *Exp Cell Res* 1994;212:36–41.
- 29 Kinjo T, Kamiyama K, Chinen K, et al. Squamous metaplasia induced by transfection of human papillomavirus DNA into cultured adenocarcinoma cells. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2003;56:97–108.
- 30 Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Shindoh M, et al. Human papillomavirus type 18 DNA and E6–E7 mRNA are detected in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1995;71:344–349.

## Publication N°2 :

*HPV and cell cycle-related markers in tonsillar squamous cell carcinoma : a study on 58 French patients.*

**C Coissard**, F Vitry, PJ Guillou, M Lorenzato, A Chays, M Pluot, MD Diebold, C Clavel, JC Mérol.

Journal of Clinical Virology, soumis.

## Introduction à la publication N°2

Les régions de l'Est de la France présentent un haut risque de cancers des VADS et plus particulièrement de cancers de la sphère O.R.L. dû à une forte imprégnation alcoololo-tabagique. Les HPV muqueux, responsables du cancer du col de l'utérus, semblent être étiologiquement liés à certains de ces cancers des VADS mais leur confèreraient un meilleur pronostic. De nombreuses études ont analysé ce lien entre HPV-HR et cancers des VADS dans les pays du nord de l'Europe et plus particulièrement en Suède. Ces pays nordiques ne sont pas connus pour être à haut risque de cancers oro-pharyngés contrairement à la France. A ce jour, aucune étude n'a analysé le rôle de ces HPV dans un tel contexte. Ce travail est donc le premier qui étudie l'impact éventuel des HPV dans une population à haut risque de cancer de la sphère O.R.L.

Au cours de cette étude, 58 tumeurs de l'amydale palatine incluses en paraffine ont été analysées. La présence et le génotypage de l'ADN de 37 HPV-HR et -BR ont été déterminés à l'aide du système Line Blot Assay<sup>®</sup> (ROCHE). Puis la charge virale de l'HPV-HR de type 16 a été analysée par PCR en temps réel. Les données HPV des tumeurs ont été stratifiées avec les données cliniques des patients ainsi qu'avec l'expression de marqueurs en relation avec le cycle cellulaire : p16, p53 et le marqueur de prolifération cellulaire Ki67.

Près de 21% des tumeurs amygdaliennes présentaient de l'ADN d'HPV-HR, majoritairement l'HPV-HR de type 16. Aucune association statistiquement significative n'a été trouvée entre le statut HPV et les données cliniques ou les

expressions de la p53 et du Ki67 déterminées par immunohistochimie. L'expression de la p16 était, quant à elle, significativement associée à la présence d'HPV-HR ( $p=0,0015$ ). De plus, les patients présentant une tumeur HPV-HR positive ont montré une tendance à une meilleure survie globale. Si l'implication des HPV-HR est moins claire que dans d'autres pays d'Europe où leur prévalence est plus importante et leur impact sur la survie globale plus significatif, il semble que les HPV-HR puissent avoir un impact dans le processus cancéreux dans une partie de notre population à haut risque.

# **HPV and cell cycle-related markers in tonsillar squamous cell carcinoma: a study on 58 French patients**

Cyrille Coissard<sup>1,2</sup>, Fabien Vitry<sup>3</sup>, Pierre-José Guillou<sup>4</sup>, Marianne Lorenzato<sup>1</sup>, André Chays<sup>5</sup>, Michel Pluot<sup>4</sup>, Marie-Danièle Diebold<sup>4</sup>, Christine Clavel<sup>1,2\*</sup>, Jean-Claude Mérol<sup>5</sup>

<sup>1</sup>CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Laboratoire Pol Bouin, REIMS, F-51092, France

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 514, REIMS, F-51092, France

<sup>3</sup>CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Unité d'Aide Méthodologique à la Recherche Clinique-DIM, REIMS, F-51092, France

<sup>4</sup>CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service Central d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, REIMS, F-51092, France

<sup>5</sup>CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Service d'O.R.L et de Chirurgie Cervico-Faciale, REIMS, F-51092, France

**\*Corresponding author:**

Pr C. Clavel, PhD  
INSERM UMR-S 514  
Laboratoire Pol Bouin  
45 rue Cognacq-Jay, CHU  
51100 Reims, France  
e-mail: [cclavel@chu-reims.fr](mailto:cclavel@chu-reims.fr)

Abstract: 242 words

Text: 3186 words

## **Abstract**

**Background.** High-risk human papillomaviruses (HPV) are the causative agents of cervical cancer and seem to be aetiologically linked with a subset of oropharyngeal carcinomas, particularly those arising from the tonsillar area. Despite the fact that some studies seem to point out a possible role for HPV in a better prognosis, their eventual implication in a population at high-risk of oropharyngeal carcinomas such as France has not been investigated.

**Objectives and study design.** In the present study, 58 formalin-fixed and paraffin-embedded tonsillar tumours were explored for the presence, genotyping and viral load of HPV using the ROCHE Line Blot Assay and real-time PCR. Moreover, the expression of p16, p53 and the proliferation marker Ki67 was assessed by immunohistochemical studies. **Results and conclusions.**

Twelve tumours (20.7%) were found to be HPV positive with the high-risk HPV type 16 being the most frequently found ( $n=8/12$ ). There was no significant association between the HPV status and any of the patients' or tumors' characteristics, nor the expression of p53 or the Ki67. The p16 status was significantly associated with the presence of HR-HPV ( $p=0.0015$ ) and a trend to better overall survival was observed for the patients having a HPV positive cancer. Taken together, our results indicate that the role of HPV in the tonsillar carcinogenesis in the French population is not as clear as in other European countries. Nevertheless, despite the fact that the infection may be opportunistic, it seems that the HPV may play a role in a small part of our population.

## **Keywords:**

HPV; tonsillar carcinoma; p16; p53; Ki67

## Introduction

Human papillomaviruses (HPV) are small epitheliotropic viruses that infect mucous or squamous epithelia. They can be divided into two sub-groups on the basis of their oncogenic potential. The so-called low-risk HPV (LR-HPV) are associated with benign lesions such as papillomas or condylomas, whereas the high-risk HPV (HR-HPV) are mainly detected during cervical pre-malignant and malignant lesions and are recognized as responsible for most carcinomas of the anogenital area (Walboomers et al., 1999; Duggan, 2002). The squamo-columnar junctions found in the cervix are thought to be the pre-requisite for the spread of HPV (Kashima et al. 1993). HR-HPV16 is the most frequently detected in malignant lesions of the cervix (Bosch et al., 1995) followed by HR-HPV18. The HR-HPV genome, encode two main oncoproteins known as E6 and E7. By interacting with p53 and pRB, E6 and E7, respectively are responsible for the overexpression of the *INK4A* gene p16 encoded protein (zur Hausen, 2002) and for the transformation and immortalization of human keratinocytes (for review, see Munger and Howley, 2002). Consequently, p16 could be regarded as a biomarker of transcriptionally active E7 and thus of HPV-transformed cells (Klaes et al., 2001; von Knebel Doeberitz, 2002; Milde-Langosch and Riethdorf, 2003). Since the actions of these oncoproteins inactivate both p53 and pRb, it is expected that genetic changes (i.e. mutations or DNA methylations) in these tumour-suppressor genes do not play a main role in HPV-associated carcinomas.

Oropharyngeal cancers originate mainly from the base of the tongue and the palatine tonsils and the majority of those tonsillar malignancies are squamous cell carcinomas followed by lymphomas (Beutter and Pinlong, 1995; Forastiere et al., 2001). The oropharyngeal carcinomas affect subjects with a chronic history of alcohol consumption and/or tobacco smoking or chewing, whereas tonsillar carcinomas also arise in younger patients without any of these known risk-factors, suggesting another aetiology. Like other head and neck cancers, tonsillar carcinomas arise by the accumulation of modifications in DNA stability, genetic deregulations in tumour suppressor genes and their counterpart oncogenes (Forastiere et al., 2001; Vogelstein and Kinzler, 2004). Recent studies showed that HPV may be strongly linked to the carcinogenesis of head and neck cancers (Herrero et al., 2003; Syrjanen, 2005) and more particularly to the one of tonsillar carcinomas (Syrjanen, 2004; Venuti et al., 2004). Moreover, these cancers share histological and molecular biological similarities with the HPV-associated anogenital carcinomas, such as common risk

factors or increased relative-risk of tonsillar cancer among patients previously presenting HPV-associated anogenital squamous cell carcinoma (Frisch and Biggar, 1999). One explanation could be that the disorganised epithelium in tonsillar crypts, due to lymphocytes infiltration, may improve the viral access to basal mucosal cells, as it is believed to play a main role in the general uptake and processing of antigens like any other part of the immune system. To support this idea, the work by Wilczynski et al (1998) showed clues suggesting that among the tonsillar squamous cell carcinomas, the HPV-associated ones originated from the crypts whereas the HPV-free others originated from the tonsillar surface. Furthermore, some studies tend to demonstrate that HPV-positive and HPV-negative tonsillar carcinomas seem to be different tumour entities (Klussmann et al., 2001; Klussmann et al., 2003a; El-Mofty and Lu, 2005). Indeed, when no HPV can be found, tonsillar carcinomas, as other head and neck cancers, usually show overexpression of p53 due to mutations in the tumour suppressor gene *TP53*. In contrary, in tonsillar carcinomas with HPV DNA, as in cervical carcinoma, almost no tumours exhibit p53 mutations.

Worldwide, France has one of the highest rates of oral and pharyngeal cancer (La Vecchia et al., 1997) and particularly in the northern of France (45.6/100 000 men) (Remontet et al., 2003). It has to be noted that this rate varies greatly regarding the studied population and countries. Indeed, the incidence of oral and pharynx cancer is very low in Northern Europe (range 3.1-7.1/100 000 men) but ranges from 2.1 to 26.3/100 000 men in Asia or from 5.9 to 49.4/100 000 men in Southern and Central Europe (Franceschi et al., 2000). Although most of oropharyngeal cancers are due to alcohol consumption and tobacco smoking, HPV seem also to be involved in their carcinogenesis, but the geographical area may influence their prevalence (Li et al., 2003). Moreover, some studies seem to point out a possible association for HPV with a better prognosis (Mellin et al., 2002; Ringstrom et al., 2002; Klussmann et al., 2003a). Thus, it is of prime importance to understand the exact role played by HPV in the carcinogenesis of these cancers.

Despite the high frequency of oropharyngeal cancer in France, no study had been undertaken on the eventual role of HPV in this carcinogenesis. The aim of this study was on the one hand to detect and to genotype HPV in a series of 58 tonsillar squamous cell carcinomas using a PCR technique previously used on genital samples (Gravitt et al., 1998; Gravitt et al., 2000; Coutlée et al., 2002) and to assess the eventual HR-HPV16 viral load by real-time PCR, and on the other hand to correlate these factors to the expression of p16, p53 and the proliferation marker Ki67 by immunohistochemical studies.

## **Methods**

### ***Case selection and histological features***

The aim of this study was to investigate the relationship between Human Papillomavirus and squamous cell carcinoma of the tonsil.

We reviewed retrospectively the medical files of patients diagnosed for oropharyngeal squamous cell carcinoma and managed between 1987 and 2004 in the Department of Head and Neck surgery of the Reims University Hospital. Ninety patients were identified. They were all previously untreated. For 19 patients, the clinical information was not reachable because their follow-up was not performed in our hospital.

In all cases, the initial tumour site was the tonsillar ring. Haematoxylin and eosin stained sections from paraffin embedded samples of all patients were reviewed by a pathologist to confirm the previous diagnosis of squamous cell carcinoma and to check the presence of tumour in the paraffin sample for the downstream experiments. Cases were classified by 2 pathologists independently. The histopathologic grade was assessed according to the WHO classification in poorly, moderately and well differentiated.

### ***Immunohistochemical studies***

The immunohistochemical studies were done on 4 µm cut tumoral sections on Dako Stainer automate using the Envision detection kit according to the manufacturer's instructions (DAKO, Trappes, France). The following antibodies were used: monoclonal p16 clone E6H4 (DAKO), monoclonal p53 clone DO7 (DAKO), and monoclonal Ki67 (DAKO), the antibody titres were respectively 1/40, 1/50 and 1/50.

### ***Image cytometry***

The quantification of the immunohistochemical staining for the three antibodies was performed using the AXIOSkop 2 microscope combined to the AXIOcam MRc 5 video camera (ZEISS, Göttingen, Germany). For each slide, a mean of 5 to 10 fields were read and counted at a X20 magnification. The results were analysed with the help of the KS300 software (ZEISS), a semiautomatic image analysis system, combined to home-made applications.

### ***Detection and typing of HPV DNA***

Total DNA extraction was performed on four paraffin sections of 4 µm using the EZ1 DNA tissue kit (catalog no. 953034; QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France) in combination with the BioRobot® EZ1 workstation and the EZ1 Paraffin Section Card (cat. no. 9015862; QIAGEN). The supplementary manufacturer's protocol for isolation of DNA from paraffin-embedded tissue (<http://www.qiagen.com/literature/protocols/pdf/MA11.pdf>) was scrupulously followed. DNA was eluted in a final volume of 200 µL and the DNA samples were processed through a program of successive temperature changes as described previously (Coissard et al., 2005). The amount of DNA was measured with the Pico Green® dsDNA Quantitation kit (cat. no. P7589; Molecular Probes-Interchim, Montluçon, France) using a microplate spectrofluorimeter SAFAS Xenius (SAFAS S.A., Monaco). The samples were then stored at -20°C until further experiments.

The HPV DNA detection and typing was performed using the PGMY primer set PCR-based combined with the B-PCO4 and B-GH20 primers ROCHE Line Blot Assay as described earlier (Gravitt et al., 2000). At least 10 ng DNA were necessary for each PCRs. DNA extracted from baculoviruses having integrated different types of known HPV as positive controls and distilled water as no-template control were included in each PCR run. The amplicons produced, sized 450 bp for the PGMY primer set and 268 bp for the B-PCO4 and B-GH20 primers, were analysed with a line blot assay as described by Gravitt et al (1998) with that difference that this one was able to detect 21 high-risk HPV and 16 low-risk HPV.

#### ***Viral load: Determination of the HPV16 DNA copies per human cell by real-time PCR***

The quantitative determination of the HPV16 DNA, targeting the E6 region, and albumin gene copy number using hydrolysis probes was performed as described previously (Pretet et al., 2004) with these differences that the experiences were performed in a 50 µL final volume using the qPCR™ Mastermix-No ROX (EUROGENTEC, Seraing, Belgium) and run on the iCycler iQ™ (BIO-RAD, Marnes-la-coquette, France). The data collected were analysed with the iCycler iQ™ Real-time PCR Detection System Software version 3.0A (BIO-RAD).

#### ***Statistical analysis***

Quantitative variables are expressed by mean +/- s.d. and tested by the Student t-test. Qualitative variables are expressed by number and percentage and are tested by Chi-square test or Fischer exact test. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier representation, and Log-Rank test was applied. The significance threshold is determined at p = 0.05 and

computation were conducted with the SAS v 8.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## Results

### *Patient's characteristics*

Among the 71 remaining case-selected patients, 58 were finally eligible for this study. Indeed, 12 patients were found to have DNA without sufficient quality for the downstream experiments and 1 sample was conserved in an inappropriate fixative.

Among them, 54 were men (93.1 %) and 4 were women (6.9 %). Patient's mean age at diagnosis was 55.67 years ranging from 37.58 to 90.68 years. Regarding smoking and alcohol habits, 94.8 % were smokers and 91.4 % drinkers with 89.6 % being both (Table 1).

### *Tumour characteristics*

Tumours were classified according to the International Union Against Cancer classification system. The pT and pN staging is summarised in table 1.

At the time of diagnosis, 6 patients suffered from a synchronous cancer localised in the oesophagus (n=3), the larynx (n=1), the bladder (n=1) and the lung (n=1).

### *Histological and Viral Characteristics*

Fifty-three tumours (91.4 %) were histologically graded as moderately to well differentiated whereas 5 (8.6 %) were poorly differentiated.

Twelve tumours (20.7 %) were found to be HPV DNA positive. High risk-HPV type 16 was the most frequently found (n=8), followed by HR-HPV 18 (n=2), HR-HPV 39 (n=1) and HR-HPV 52 (n=1). The HR-HPV 16 viral load assessed by real-time PCR ranged from 2 to 258 viral copies/human cell, except for one tumour where the viral load was inferior to 1 (patient number 408). For another patient, the viral load has not been determined because there was not enough DNA (Table 2).

There was no significant association between the HPV status and the pT staging ( $p=0.17$ ), nor the sex ( $p=0.62$ ), the age ( $p=0.95$ ), the alcohol or tobacco consumption ( $p=0.06$  and  $p=0.11$  respectively), the p53 status ( $p=0.74$ ) or the index of proliferation given by the Ki67 ( $p=0.19$ ) (Table 2).

The p16 status was significantly associated with the presence of HR-HPV ( $p=0.0015$ ) (Table 2), and more particularly with HR-HPV 16 ( $p<0.0001$ ). 41 tumours were HPV-/p16-, 5 were HPV-/p16+, 6 were HPV+/p16- and 6 tumours were both HPV+/p16+.

A trend to better overall survival was observed for the patients having a HPV positive cancer but with no significant association ( $p=0.086$ ) (Figure 1).

## Discussion

To our knowledge, this study is the first analysing the potential role of the HPV in tonsillar carcinomas in a French population. The HPV prevalence observed here (20.7%) is inferior to the one usually found in literature (Syrjanen, 2004; Dahlstrand and Dalianis, 2005). The populations presenting a HPV positive tonsillar carcinoma are frequently younger and have less history of alcohol or tobacco consumption when compared to the population suffering from HPV-negative tonsillar carcinoma. In our study, no difference was observed between the HPV status and the age nor the alcohol and tobacco habits of the patient. This population came from a geographic area with one of the highest rate of oropharyngeal cancer in the world (Franceschi et al., 2000; Remontet et al., 2003) and with a traditional high consumption of both alcohol beverages and cigarettes. The high burden of these two risk factors in our population could explain the lower HPV prevalence found in the studied tonsillar squamous carcinomas. Actually, the high incidence of tobacco-related tonsillar cancers in France compared to other European countries, where this incidence is much lower, may have lead to an underestimation of the real importance of HPV in the tonsillar carcinogenesis. Another explanation could be that we miss to detect HPV in certain samples because of the method of conservation of the tissues. Indeed, it is known that DNA extracted from formalin-fixed and paraffin embedded tissues can be of less quality compared to fresh tissues. This is mainly due to DNA fragmentation and to PCR inhibitors presence in the extracted DNA. In our study, the DNA quality was assessed by the amplification of a part of the beta-globin gene. Moreover, two different techniques have been used to detect HPV DNA, one targeting the L1 region of HPV for the genotyping, and the other targeting a part of the E6 region of HPV16 for the assessment of the viral load. We did not find any difference between the HPV16 results given by these two techniques meaning that the HPV prevalence found here is not due to technical artefacts but to our particular population where HPV do not seem to be a major cause of tonsillar cancer.

Among the studied histological biomarkers, p16 was the only statistically associated with the HPV status. This is in agreement with the literature reporting that the overexpression of p16 reflects an active HPV infection (Klaes et al., 2001; Munger and Howley, 2002; Benevolo et al., 2006). Together with the HPV16 viral load determined here, which is of similar magnitude as the one found in other series (Klussmann et al., 2001; Ringstrom et al., 2002; Syrjanen, 2004), this significant association between HPV and p16 expression suggests that some tonsillar cancers could be HPV induced. On the opposite, the cancers found to be both HPV and p16 negative, which are the majority of the studied cancers ( $n= 41/58$ ), could be a consequence of a long history of alcohol and tobacco consumption. In our study, discrepancies exist between the HPV status and the expression of p16. The HPV positive but p16 negative cancers ( $n= 6/58$ ) could be the consequence of two distinct, but not exclusive, mechanisms. A cell may be infected by a HR-HPV with no expression of the oncoproteins E6/E7, meaning, in that case, that HR-HPV have no role in the carcinogenesis. Moreover, in our study, one of the two HPV16-positive tumours without any p16 expression, showed a HPV copy number  $< 1$  copy per human cell (table 2, patient number 408). This suggests that in this case the HPV infection is opportunistic. Another explanation is the particular associated risk factors for head and neck cancers for patients with long history of alcohol drinking and/or tobacco smoking. Thus, the lack of p16 expression, due to a deletion in the *INK4a* gene or to methylation in its promoter, is common in head and neck cancers and may explain some negative results (Olshan et al., 1997; Weinberger et al., 2006). At the opposite, a tumour overexpressing p16 but without any HPV DNA ( $n= 5/58$ ) raises other questions. The techniques used in this work allow the detection of 37 mucosal HPV but we cannot exclude the presence of other undetected mucosal HPV or of cutaneous HPV. Moreover, nuclear p16 overexpression may also indicates a pRb defunctioning in tumour cells, which may result or not from HR-HPV, but this is not clear at present time (Wang and Lu, 2004). In addition, HPV are not the only viruses that might act on the p16 expression. The human cytomegalovirus (HCMV) can up-regulate this protein to create a favourable environment for its replication (Zannetti et al., 2006). Despite these discrepancies, the significant association between HPV DNA and p16 overexpression seems to indicate that HPV play a role in the tonsillar carcinogenesis at least in a small part of our population.

Unexpectedly, the HPV status was not associated with p53 or Ki67 expression either. There are conflicting data about the presence of HPV DNA and the detection of p53 in head and neck tumours (Wiest et al., 2002; Hafkamp et al., 2003; El-Mofty and Lu, 2005). Indeed, irrespective of the HPV status, p53 overexpression in tonsillar cancer is demonstrated in

approximately 50% of all cases (Snijders et al., 1994; Friesland et al., 2001). It is known that mutations in the p53 coding gene occur frequently in head and neck cancers due to the carcinogenic exposition to tobacco (Raybaud et al., 2003). An abnormal expression of p53 might be the consequence of a protein stabilisation due to tobacco-induced mutations in its coding gene, or to post-translational modifications during the carcinogenesis (Raybaud et al., 2003; Bode and Dong, 2004). By contrast, an active HPV infection with E6 expression should lead to the lack of p53 detection because of its degradation. However a recent study by Sdek et al (2006) suggests that the HPV-initiated carcinogenic mechanisms in oral cancer is not as clear as in cervical cancer and that the latter might differ from the events involved in the oral carcinogenesis. This explains in part why the association between HPV and p53 in head and neck cancers is not unequivocal. The proliferation marker Ki67 and HPV DNA are commonly associated in literature, notably when there is a progression in the grade of the lesion (Isacson et al., 1996; Lorenzato et al., 2005). But this association is not always statistically significant even in the uterine cervix (Skyldberg et al., 1999; Horikoshi et al., 2005). Moreover, our population is constituted by heavy smokers and as the tobacco is a carcinogenic factor, it is not surprising to find a Ki67 overexpression in tumour with no HPV DNA. Then, the absence of a statistical correlation between the HPV status and the other histological markers Ki67 and p53 pleads in favour of multiple mechanisms of carcinogenesis in these tonsillar cancers.

One of our findings is a slight association, although not statistically significant, between HPV and a better overall survival ( $p=0.08$ ). This is in agreement with the data of the literature (Ringstrom et al., 2002; Li et al., 2003; Syrjanen, 2004; Dahlstrand and Dalianis, 2005; Kozomara et al., 2005). The mechanisms underlying this association are still unknown. In head and neck cancers this could be the reflect of an absence of field cancerization or to an enhanced radiation sensitivity. In this study, all the HPV-positive patients, but 2, received radiations either as primary treatment or postoperatively. From the molecular biology viewpoint, the p16 overexpression HPV-induced may play a role in a better survival. Indeed, Stein *et al* suggested that p16 upregulation might be part of a differentiation program that is turned on in senescent fibroblasts (Stein et al., 1999). Moreover, another study demonstrated that this p16 overexpression is a key event in the terminal stages of growth arrest in senescence (Alcorta et al., 1996). Therefore, the difference in survival regarding the HPV status could be explained by the fact that high level of p16 could maintain the senescence induced by radiations. Moreover, a recent study by Hunter et al (2006) shows that oral carcinomas showing a high expression of p16 are of better prognosis than those without p16. The authors did not assess the HPV status. In our study, the p16 expression and the presence

of HPV are closely related. The lack of a true statistical association between HPV and the overall survival in our study may be due to an HPV-positive patient who died only 7 days after diagnosis of oropharyngeal cancer (see top left of figure 1). However, this trend to better overall survival in HPV positive patients pleads in favour of a role of HPV in the evolution of tonsillar cancer in our population.

Taken together, our results indicate that the role of HPV in the tonsillar carcinogenesis in the French population, which is at high-risk for oropharyngeal cancer, is not as clear as in other European countries. Nevertheless, despite the fact that the infection may be opportunistic, it seems that the HPV may play a role in a small part of our population.

## Acknowledgements

We are grateful to the “Local Clinical Research Program” of Reims University Hospital, La Ligue Contre Le Cancer, the Lion's Club from Soissons and the Lion's Club from Villers-Cotterets who have supported a part of this work. Cyrille Coissard is supported by a grant from the University of Reims.

## References

- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barret JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13742-13747
- Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. Immunohistochemical expression of p16INK4a is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006;19:384-391
- Beutter P, Pinlong E. Cancers de la region amygdalienne, In: Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-595-A-10, 1995, 12p
- Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:793-805
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer IBSCC study group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802
- Coissard CJ, Besson G, Polette MC, Monteau M, Birembaut PL, Clavel CE. Prevalence of human papillomaviruses in lung carcinomas: a study of 218 cases. *Mod Pathol* 2005;18:1606-1609
- Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, The Canadian Women's HIV Study Group, Franco E. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 2002;40:902-907
- Dahlstrand HM, Dalianis T. Presence and influence of human papillomaviruses (HPV) in tonsillar cancer. *Adv Cancer Res* 2005;93:59-89

Duggan MA. A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia. Gan To Kagaku Ryoho 2002;29:176-193

El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of High-risk human papillomavirus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. Am J Surg Pathol 2005;29:1367-1372

Forastiere A, Koch W, Trott A, Sidranski D. Head and neck cancer. N Engl J Med 2001;345:1890-1900

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. Oral Oncol 2000;36:106-115

Friesland S, Mellin H, Munck-Wickland E, Nilsson A, Lindholm J, Dalianis T, Lewensohn R. Human papillomavirus (HPV) and p53 immunostaining in advanced tonsillar carcinoma-relation to radiotherapy response and survival. Anticancer Res 2001;21:529-534

Frisch M, Biggar RJ. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. Lancet 1999;354:1142-1143

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. J Clin Microbiol 2000;38:357-361

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. J Clin Microbiol 1998;36:3020-3027

Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, Hopman AH, Manni JJ. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. Int J Cancer 2003;107:394-400

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJLM, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S, IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-1783

Horikoshi M, Kina K, Ishi K, Izumi H, Kunii Y, Nojima M. Correlation between human papillomavirus infection in cervical lesions and expression of p53, p21 proteins and Ki-67. *Rinsho Byori* 2005;53:494-498

Hunter KD, Thurlow JK, Fleming J, Drake PJH, Vass JK, Kalna G, Higham DJ, Herzyk P, MacDonald DG, Parkinson EK, Harrison PR. Divergent routes to oral cancer. *Cancer Res* 2006;66:7405-7413

Isaacson C, Kessis TD, Hedrick L, Cho KR. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res* 1996;56:669-674

Kashima H, Mounts P, Leventhal B, Hruban RH. Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:580-583

Klaes R, Friedrich T, Spitzkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, Von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-284

Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003a;162:747-753

Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumour entity? *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2003b;192:129-132

Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinoma. *Cancer* 2001;92:2875-2884

Kozomara R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-Magic M, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33:342-348

La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi S, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33:302-312

Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 2003;106:553-558

Li W, Thompson CH, Xin D, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, Gao K, Scolyer RA, Rose BR. Absence of papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Chinese patients. *Am J Pathol* 2003;163:2185-2189

Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, Birembaut P, Clavel C. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol* 2005;36:1101-1107

Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102:152-158

Milde-Langosch K, Riethdorf S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *J Cell Physiol* 2003;196:224-244

Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89:213-228

Olshan AF, Weissler MC, Pei H, Conway K, Anderson S, Fried DB, Yarbrough WG. Alterations of p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1 and HPV. *Oncogene* 1997;14:811-818

Pretet JL, Dalstein V, Monnier-Benoit S, Delpéut S, Mougin C. High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women. *J Clin Virol* 2004;31:140-147

Raybaud H, Odin G, Fafet A, Santini J, Monteil RA. Genic alterations in oral and head and neck squamous cell carcinomas: analysis of international literature. *Pathol Biol (Paris)* 2003;51:176-184

Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, Exbrayat C, Tretare B, Carli PM, Guizard AV, Troussard X, Bercelli P, Colonna M, Halna JM, Hedelin G, Mace-Lesc'h J, Peng J, Buemi A, Velten M, Jouglard E, Arveux P, Le Bodic L, Michel E, Sauvage M, Schvartz C, Faivre J. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003;51:3-30

Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8:3187-3192

Sdek P, Zhang ZY, Cao J, Pan HY, Chen WT, Zheng JW. Alteration of cell-cycle regulatory proteins in human oral epithelial cells immortalized by HPV16 E6 and E7. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006 Feb 27 (Epub ahead of print)

Skyldberg BM, Murray E, Lambkin H, Kelehan P, Auer GU. Adenocarcinoma of the uterine cervix in Ireland and Sweden: human papillomavirus infection and biologic alterations. *Mod Pathol* 1999;12:675-682

Snijders PJ, Van Den Brule AJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Papillomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:177-198

Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999;19:2109-2117

Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:449-455

Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32S:S59-S66

Venuti A, Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Rahimi S, Vigili M. Presence of HPV in head and neck tumours: High prevalence in tonsillar localisation. *J Exp Clin Cancer Res* 2004;23:561-566

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-799

von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002;38:2229-2242

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomaviruses is a necessary cause of invasive cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19

Wang HL, Lu DW. Detection of human papillomavirus DNA and expression of p16, Rb, and p53 proteins in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 2004;28:901-908

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favourable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24:736-747

Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002;21:1510-1517

Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998;152:145-156

Zannetti C, Mondini M, De Andrea M, Caposio P, Hara E, Peters G, Gribaudo G, Gariglio M, Landolfo S. The expression of p16(INK4a) tumor suppressor is upregulated by human cytomegalovirus infection and required for optimal viral replication. *Virology* 2006 Feb 25 (Epub ahead of print)

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-350

**TABLE 1:** Characteristics of the 58 case-selected patients regarding their HPV status.

	Total (n=58)	HPV + (n=12)	HPV – (n=46)	p value
<b>Age</b>	55,67 ±9,26	56,48 ±12,84	55,48 ±8,25	0,95
<b>Sex</b>				
Men	54	11	43	0,62
Women	4	1	3	
<b>Tobacco smoking<sup>1</sup></b>				
No	3	2	1	
Yes	55	10	45	0,11
Pack/year	34,43 ±14,15	30,83 ±16,21	35,37 ±13,60	
<b>Alcohol drinking<sup>2</sup></b>				
No	5	3	2	
Yes	53	9	44	0,06
Gram/day <sup>3</sup>	45,69 ±24,21	43,33 ±31,72	46,30 ±22,25	
<b>pT</b>				
Tis	1	1	0	
T1	10	3	7	
T2	15	4	11	0,17
T3	11	2	9	
T4	21	2	19	
<b>pN</b>				
N0	31	7	24	
N1	9	2	7	
N2a	6	1	5	0,98
N2b	3	0	3	
N3	9	2	7	
<b>Synchronous cancer</b>				
No	52	11	41	
Yes	6	1	5	0,64
Oesophagus	3	1	2	
Larynx	1	0	1	
Bladder	1	0	1	
Lung	1	0	1	
<b>Histological grade</b>				
PD	5	2	3	0,27
MD/WD	53	10	43	

<sup>1</sup>no smoking means no current smoking and/or no history of smoking, the observed values for the smokers ranged from 12 to 90 pack/year; <sup>2</sup>no drinking means no current drinking and/or no history of drinking, the observed values for the alcohol drinkers ranged from 20 to 80 gram/day; <sup>3</sup>a glass of wine or 25 cl of beer is considered to be 10 grams of pure ethanol; PD, poorly differentiated; MD/WD, moderately differentiated to well differentiated.

**TABLE 2:** Grading and immunohistochemical characteristics of the 12 HR-HPV positive tonsillar carcinomas.

Patient's number	HPV	Grade	Aspect	p16 <sup>1</sup>	p53 <sup>2</sup>	Ki67 <sup>2</sup>
501	16	PD	Ulcerative exophytic	Diffuse	Neg	++++
112	52	MD/WD	Ulcerative exophytic	Neg	++	+++
2005	16	MD/WD	Ulcerative exophytic	Diffuse	++	+++
1910	16	MD/WD	Ulcerative exophytic	Diffuse	Neg	++++
2004	16 <sup>3</sup>	MD/WD	Ulcerative exophytic	Neg	++	+
1408	39	MD/WD	Ulcerative exophytic	Neg	Neg	+
708	16	MD/WD	Ulcerative exophytic	Diffuse	Neg	+++
3004	16	MD/WD	Ulcerative exophytic	Diffuse	+	++++
408	16 <sup>4</sup>	MD/WD	Ulcerative exophytic	Neg	++	+
706	18	MD/WD	Ulcerative exophytic	Neg	+++	+++
408	16	PD	Ulcerative exophytic	Diffuse	+	++++
2511	18	MD/WD	Ulcerative exophytic	Neg	+++	++
HPV + }			p=0,27		p=0,0015	p=0,74
HPV - }						p=0,19

<sup>1</sup>Scored according to Klaes *et al* (2001); <sup>2</sup> Neg, negative; +, <25%; ++, 25-50%; +++, 50-75%; +++, >75%; PD, poorly differentiated; MD/WD, moderately to well differentiated; <sup>3</sup> viral load not determined; <sup>4</sup> viral load was < 1 HPV copy/human cell.

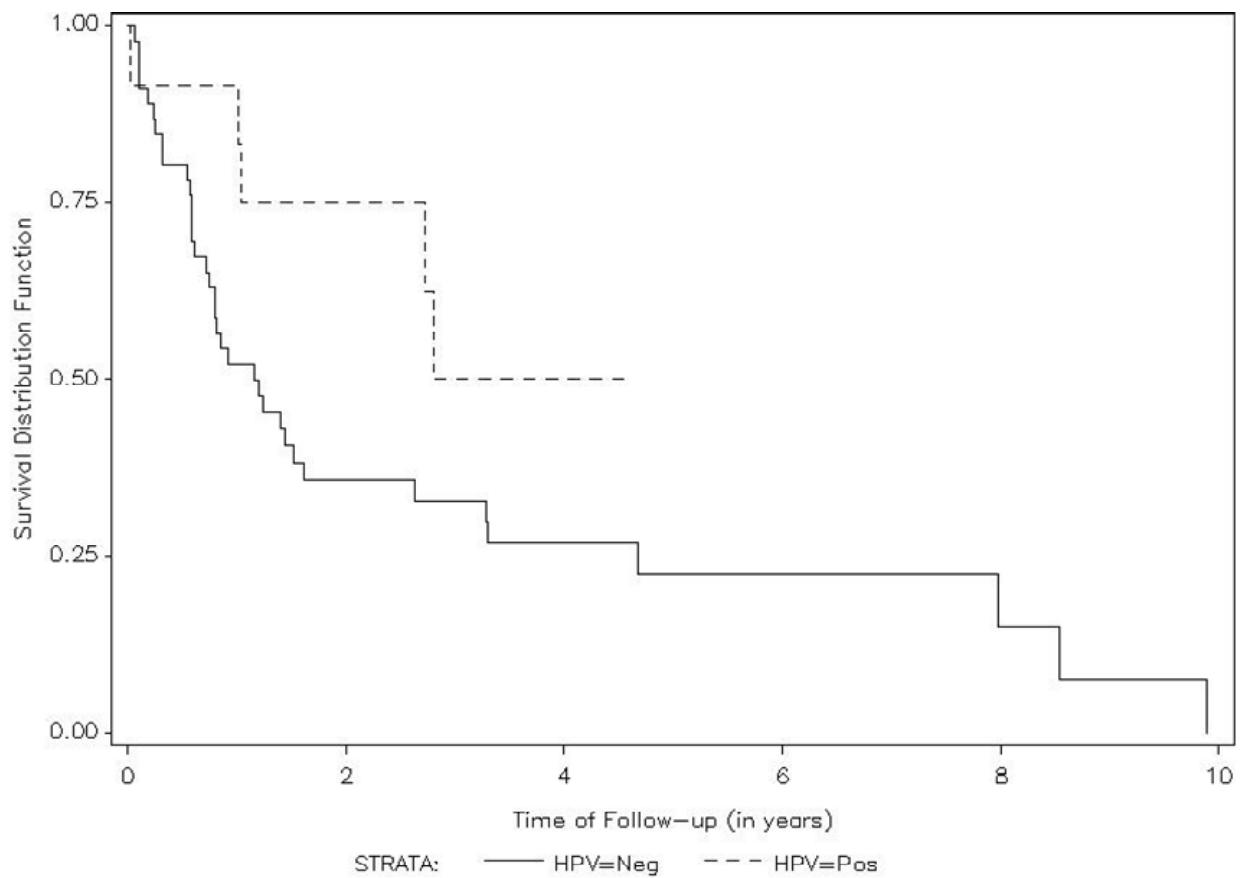


Figure 1: Survival analysis regarding the HPV status ( $p=0.086$ )

## RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Présentés sous forme de poster lors de la 23<sup>rd</sup> International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, 2006. Prague, République Tchèque.

*HPV E6/E7 expression and clinical aspects in oropharyngeal and base of tongue cancers : a study in a high-risk French population.*

**Coissard CJ**, Millon R, Birembaut P, Waslyk B, Abecassis J, Clavel C.

23rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. September 1-7, 2006, Prague, Czech Republic;P-095.

Après avoir constaté la présence d'HPV-HR dans des cancers de l'amygdale palatine, ainsi que leur rôle éventuel dans cette cancérogenèse, nous avons donc étudié l'implication des HPV-HR au niveau de l'oro-pharynx et de la base de la langue. En effet, ces deux localisations montrent la prévalence HPV-HR la plus élevée.

Cette étude a été réalisée sur des cancers de l'oro-pharynx et de la base de la langue de la région strasbourgeoise, région à haut-risque de cancer de la sphère O.R.L. Les 177 tumeurs analysées font de cette étude l'une des plus importante de la littérature et concernent exclusivement des prélèvements conservés dans l'azote liquide.

## **Matériels et méthodes**

### Sélection des patients

Les dossiers médicaux de patients atteints de cancers de l'oro-pharynx et de la base de la langue, proviennent du Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss et ont été revus rétrospectivement. Finalement, 177 tumeurs ont été sélectionnées, toutes issues de patients ayant été traités par chirurgie première.

Toutes ces tumeurs étaient stockées dans l'azote liquide dans la tumorothèque du Centre Anticancéreux Paul Strauss et tous les renseignements cliniques relatifs aux patients étaient disponibles. Selon la classification de l'OMS, ces cancers ont été classés histologiquement en cancers peu, moyennement ou bien différenciés.

### Détection et typage des HPV

L'extraction de l'ADN total des tumeurs a été effectuée sur des coupes de tumeurs congelées par la technique du phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol, ou à l'aide du kit Allprep de QIAGEN (QIAGEN, Courtaboeuf, France).

La présence éventuelle et le génotypage de l'ADN d'HPV-HR a été déterminée par l'utilisation système Linear Array® (ROCHE). Ce kit permet la détection simultanée de 37 types d'HPV muqueux différents. Il consiste en une PCR multiplex suivie de l'hybridation des amplicons obtenus sur une bandelette de nylon à la surface de laquelle sont fixées les sondes spécifiques des 37 HPV. L'amplification des amplicons HPV est obtenue par l'utilisation des amores dégénérées PGMY09/11 ciblant la région L1 des HPV (Gravitt *et al.*, 1998 ; Gravitt *et al.*, 2000) et produisant un amplicon de 450 pb. Le contrôle de la qualité de l'ADN est assuré par l'amplification d'un fragment de 268 pb du gène de la bêta-globine.

### Etude de l'expression des ARNm E6 et E7

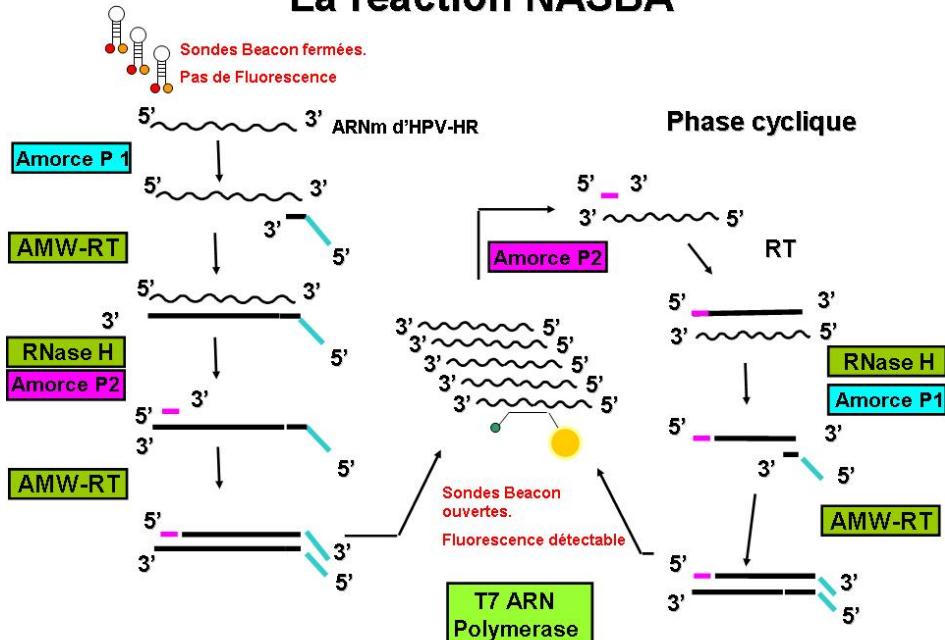
L'expression des ARNm E6/E7 des HPV-HR 16, 18, 31, 33 et 45 a été déterminée grâce au système PreTect HPV Proofer® (NorChip AS, Klokkarstua, Norvège). Cet essai est basé sur la technologie NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) qui permet l'amplification de molécules d'ARN. Cette amplification est combinée à une détection en temps réel des ARN-cibles grâce à des sondes fluorescentes de type beacon.

Trois enzymes sont utilisées lors de l'amplification : une transcriptase inverse AMW-RT (*Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase*), une RNase H et une T7 ARN Polymérase. La première réaction est une étape de transcription inverse « linéaire ». Deux types d'amores sont nécessaires à la réaction : une amorce P1

comportant à son extrémité 5' la séquence promotrice de la T7 ARN Polymérase ainsi qu'une courte séquence complémentaire de l'ARN-cible. La seconde amorce P2 contient une séquence identique à l'ARN-cible située en amont de la séquence où P1 s'hybride.

Puis la T7 ARN polymérase permet la synthèse d'ARN. Chaque molécule d'ARN nouvellement synthétisée sert alors de cible et est convertie comme la molécule d'ARN-cible originale en une molécule d'ADN contenant un promoteur T7 fonctionnel. Les amorces s'hybrident alors dans l'ordre inverse (P2 avant P1) car les nouveaux ARN sont orientés à l'opposé (3'-5') de la molécule originale. Puis une phase d'amplification cyclique débute et résulte en la synthèse exponentielle de molécules d'ARN. La présence d'ARN permet alors l'hybridation des sondes beacon qui s'ouvrent et émettent de la fluorescence. Lors de l'elongation, la transcriptase inverse va déplacer ces sondes qui vont se refermer et stopper l'émission de fluorescence. La réaction NASBA se poursuit dans des conditions isothermes à 41°C et permet une augmentation des molécules d'intérêt d'un facteur  $10^6$  à  $10^9$  en 90 minutes environ. Cette réaction est décrite plus puissante que la PCR et évite les contaminations en ADN.

## La réaction NASBA



La sensibilité de cette technique est de :

100 cellules SiHa (1 à 2 copies d'HPV 16) ou CaSki (600 copies d'HPV 16) dans un mélange contenant 10 000 cellules HPV négatives.

5 cellules HeLa (10 à 50 copies d'HPV 18) dans un mélange contenant 500 000 cellules HPV négatives.

10 cellules SiHa ou CaSki et 1 cellule HeLa dans une solution sans autre cellule.

Cette technique a déjà été utilisée lors d'études sur des frottis cervico-utérin mais sert ici pour la première fois dans le contexte des VADS (Molden *et al.*, 2005 ; Kraus *et al.*, 2006 ; Andersson *et al.*, 2006).

Trois mélanges (*mix*) NASBA sont préparés en dissolvant des sphères déshydratées de réactifs contenant les nucléotides, du dithiothréitol et du MgCl<sub>2</sub>. Le dissolvant utilisé est fourni dans le kit (Tris-HCl, 45% diméthyl-sulfoxyde). A chaque mélange sont ajoutés soit le mélange d'amorces ciblant les ARN soit d'U1A (contrôle interne de la qualité de l'ARN) et d'HPV 16, soit le mélange HPV 33 et 45 ou soit le mélange HPV 18 et 31. Après ajout de KCl, 10 µL de ces mélanges sont distribués dans les puits d'une micro-plaque. Puis 5 µL d'ARN à tester sont répartis dans chacun des puits contenant les différents couples d'amorces. Le tout est incubé pendant 4 minutes à 41°C afin d'éliminer les structures secondaires de l'ARN. Après incubation, 10 µL d'un mélange d'enzymes sont distribués dans chaque puits. L'amplification se déroule à 41°C pendant 2h30 et est mesurée en temps réel sur lecteur de microplaqué FLx 800 (BIOTEK). L'ensemble de logiciels PreTect Analysis Software (NorChip AS) a été utilisé pour l'analyse des données expérimentales.

### Détermination de la charge virale de l'HPV-HR 16

Les nombres de copies de l'HPV-HR 16 et du gène de l'albumine ont été déterminés par PCR en temps réel grâce à des sondes d'hydrolyse (chimie Taqman) ciblant la région E6 (Prétet et al., 2004 ; Coissard et al., 2005). La charge virale est exprimée en nombre de copies pour  $10^3$  cellules humaines.

### Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATA (Version 5.0, Stata, College Station, Tx). Le seuil de significativité a été fixé à  $p=0,05$ . Les caractéristiques des patients ont été analysés par le test de Student (variables quantitatives) et le test du Chi-2 de Pearson ou le test exact de Fisher (variables qualitatives) pour rechercher une éventuelle association avec le statut HPV.

L'analyse de survie a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier. Les modalités des différentes variables étudiées ont été comparées par un test du log-rank.

## Résultats

### Caractéristiques des patients et des tumeurs

Les principales caractéristiques des patients et des tumeurs sont résumées dans le tableau 1. L'ensemble de nos patients était constitué de 153 hommes (86,4%) et 24 femmes (13,6%). L'âge moyen au moment du diagnostic était de 57,5 ans (de 35 à 82 ans). 79% des patients étaient fumeurs, 75% consommateurs d'alcool et 73,4% étaient à la fois fumeurs et consommateurs d'alcool.

47 tumeurs (26,6%) étaient peu différenciées et 130 tumeurs (73,4%) étaient histologiquement moyennement à bien différenciées.

### Caractéristiques virales

Au total, 25 tumeurs (14%) ont été trouvées HPV-HR positives : 14,3% des cancers de la base de la langue et 21,5% des cancers de l'oro-paharynx contenaient l'ADN d'HPV-HR. Le type le plus fréquemment retrouvé est l'HPV-HR 16 (n=19) suivi de l'HPV-HR 33 (n=4). De plus, 2 tumeurs (8%) présentaient une infection multiple avec à la fois les HPV-HR 16 et 33. La charge virale de l'HPV-HR 16 se situait entre 4 000 et 250 000 copies virales pour  $10^3$  cellules humaines, mais certains échantillons n'ont pu être analysés à cause de prélèvements insuffisants.

### Expression des ARNm E6/E7

Parmi les 25 tumeurs HPV positives, 11 ont montré l'expression des ARNm E6/E7 de l'HPV-HR 16 (soit 52,4% des tumeurs contenant l'ADN de l'HPV-HR 16). L'expression des ARNm E6/E7 de l'HPV-HR 33 n'a été retrouvée que dans une seule tumeur et aucune des deux tumeurs multi-infectées ne présentaient d'expression d'ARNm des HPV-HR.

### Statut HPV et caractéristiques histologiques

Une association statistiquement significative a été trouvée entre la présence d'HPV-HR et la localisation de la base de la langue ou de l'oro-pharynx ( $p=0,001$ ), une faible différenciation histologique ( $p=0,002$ ), l'absence de consommation d'alcool ( $p=0,008$ ) et l'absence de consommation tabagique ( $p=0,022$ ). De plus, parmi les 3

tumeurs provenant de patients sans histoire tabagique ou alcoolique, deux présentaient de l'ADN d'HPV-HR.

Aucune association significative n'a été trouvée entre la présence d'HPV-HR et l'âge au moment du diagnostic ( $p=0,11$ ), le sexe ( $p=0,31$ ), le pT ( $p=0,098$ ) ou le pN ( $p=0,599$ ).

### Analyse de la survie

Une tendance à une meilleure survie a été observée chez les patients dont la tumeur était HPV positive ( $p=0,238$ ). Néanmoins, bien que toujours non significative, cette tendance était d'autant plus marquée si l'on prenait en considération l'expression des ARNm E6/E7 ( $p=0,136$ ). Le faible nombre de tumeurs exprimant de tels ARNm ( $n=11$ ) par rapport au nombre total de tumeur ( $n=177$ ) pourrait expliquer ce manque de significativité (Figure 1).

### **Conclusion**

A notre connaissance, cette étude préliminaire est l'une des plus importantes de la littérature en terme de taille de cohorte sur ces deux types de cancers. C'est aussi la première impliquant une population à haut risque de cancers de la sphère O.R.L. et analysant l'expression des ARNm dans un si grand nombre de tumeurs congelées, ceci *via* le système PreTect HPV Proofer® et la technologie NASBA. Ces résultats confirment les données de la littérature en ce qui concerne la prévalence des HPV-HR dans les cancers de l'oro-pharynx et de la base de la langue. Ils semblent indiquer que les HPV-HR peuvent jouer un rôle favorable dans une partie d'une population française à haut risque de cancers oro-pharyngés. Du point de vue

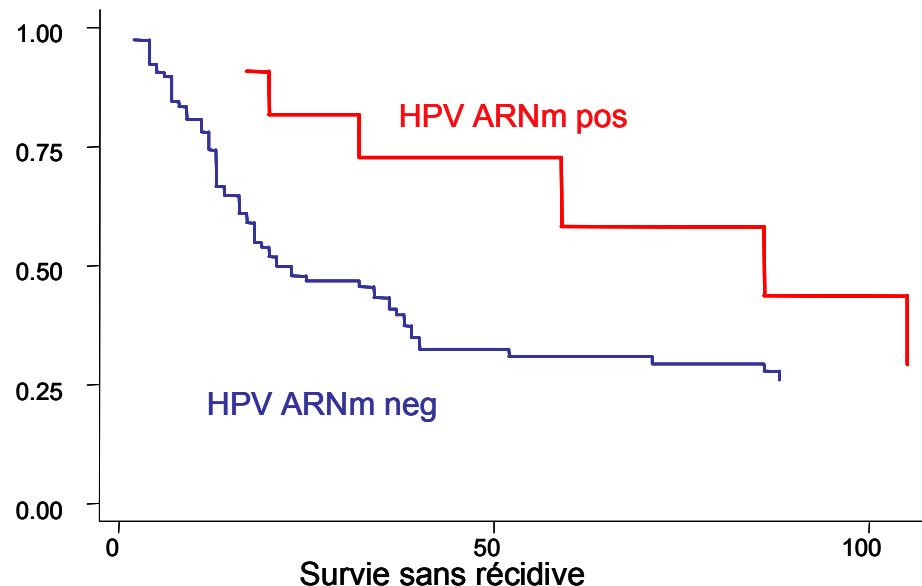
de la survie sans récidive, le facteur le plus important ne semble pas être la présence de l'ADN HPV-HR, mais plutôt l'expression d'ARNm E6/E7 qui reflète la présence d'une infection active au sein de ces cancers.

**TABLE 1:** Caractéristiques des 177 patients sélectionnés, en fonction de leur statut HPV.

	Total (n=177)	HPV + (n=25)	HPV – (n=152)	p
<b>Age</b>	57.5 ± 9.0	55.5 ± 9.5	57.9 ± 8.9	0.11
<b>Sexe</b>				
Homme	153	20	133	0.310
Femmes	24	5	19	
<b>Tabac<sup>1</sup></b>				
Non	5	3	2	
Oui	140	18	122	0.022
Inconnu	32	4	28	
<b>Alcool<sup>2</sup></b>				
Non	4	3	1	
Oui	134	16	118	0.008
Inconnu	39	6	33	
<b>pT</b>				
T1	11	2	9	
T2	88	12	76	
T3	57	10	47	0.098
T4	19	1	18	
Inconnu	2	0	2	
<b>pN</b>				
N0	33	3	30	
N1	28	5	23	
N2a	5	1	4	
N2b	44	7	37	0.599
N2c	35	5	30	
N3	19	2	17	
Inconnu	13	2	11	
<b>Grade histologique</b>				
PD	47	13	34	
MD/BD	130	12	118	0.002
<b>Localisation</b>				
Base de la langue	56	8	48	
Oro-pharynx	79	17	62	0.001
Autres <sup>3</sup>	42	0	42	

<sup>1</sup>Pas de tabac signifie pas de consommation de tabac actuelle ou passée; <sup>2</sup>Pas d'alcool signifie pas de consommation d'alcool actuelle ou passée ; PD, peu différencié; MD/BD, moyennement à bien différencié ; <sup>3</sup>Autres localisations : glande salivaire, gencive, plancher et cavité buccale, hypo-pharynx.

Courbes de survie (méthode de Kaplan-Meier) en fonction du statut en ARNm d'HPV.



**TROISIEME PARTIE :**  
**DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## Discussion

**Le déterminisme entre HPV et cancérogenèse des VADS est loin d'être aussi clair que celui du cancer du col utérin.** Nos résultats et les données épidémiologiques de la littérature plaident en faveur d'un rôle des HPV-HR dans certains cancers des VADS et surtout au niveau de l'amygdale palatine. Cependant, l'ADN de ces HPV-HR est régulièrement retrouvé dans d'autres cancers des VADS et plus particulièrement dans l'oropharynx au niveau de zones de néoplasie. Cet ADN viral est également détecté et persiste dans les lignées cellulaires dérivées de cancers de la cavité buccale (Ruutu *et al.*, 2002 ; Ruutu *et al.*, 2005). L'HPV de type 16 est le plus fréquemment retrouvé dans les cancers des VADS et il est capable, avec l'HPV 18, d'immortaliser des lignées cellulaires issues de différentes localisations aérodigestives (Steele *et al.*, 1992) *via* les oncoprotéines E6 et E7 (Ruutu *et al.*, 2005 ; Sdek *et al.*, 2006). En parallèle, des études sérologiques portant sur la présence d'anticorps anti-HPV 16 chez des patients présentant des tumeurs des VADS montrent des résultats variables voire discordants. Ainsi, la séropositivité HPV 16 est associée à une augmentation du risque de cancer de l'oro-pharynx d'un facteur 38 (Dahlstrom *et al.*, 2003) et du cancer de la cavité buccale, d'un facteur 6,8 (Schwartz *et al.*, 1998). Néanmoins, nous ne pouvons exclure que les anticorps anti-HPV sériques détectés ne reflètent en fait qu'une infection ano-génitale à HPV associée, ancienne ou persistante (en particulier chez les femmes) (Schwartz *et al.*, 1998). Il est donc actuellement difficile de déterminer si la simple présence d'ADN d'HPV-HR *per se* révèle une association causale dans la cancérogenèse des VADS. Rappelons que certains résultats conflictuels proviennent de l'hétérogénéité anatomique des groupes étudiés et de techniques moléculaires variées (avec des

sensibilités différentes). Des études épidémiologiques spécifiquement dédiées, incluant plus d'études de suivi des patients avec l'analyse concomitante de plusieurs paramètres viraux voire cellulaires, tels l'expression des ARNm E6/E7, l'étude de la charge virale, de l'intégration, de la p16... s'avèrent nécessaires pour comprendre l'impact réel des HPV dans ces cancers des VADS.

**L'effet oncogène des HPV-HR est largement attribué aux deux oncogènes E6 et E7.** Si les HPV-HR ont une action directe dans la cancérogenèse des VADS, les oncoprotéines produites devraient interagir sur les mêmes cibles cellulaires que celles au moins connues dans la cancérogenèse du col utérin. Dans les cancers du col utérin, il est classiquement décrit qu'E6 et E7 ont une action synergique. Ceci n'est pas toujours le cas dans les cancers des VADS. On retrouve ainsi dans la littérature une étude basée sur la transfection de cellules normales orales avec E6/E7 d'HPV 16, indiquant un rôle d'E7 supérieur à E6, où E6 serait non fonctionnelle avec un rôle sur l'immortalisation indépendant de p53 (Sdek *et al.*, 2006). Une autre équipe décrit une surexpression de p53, pRb et p16 non associée à l'expression d'HPV.

D'autre part, dans les cancers du col utérin, p53 est dégradée par E6 et le gène TP53 n'est pas muté. En revanche, **dans les tumeurs des VADS, le taux de mutations de TP53 est d'environ 50%**, l'incidence de ces mutations variant entre 33 à 76% (Dai *et al.*, 2004 ; Kozomara *et al.*, 2005). Ces résultats différents semblent en fait dépendants du type de prélèvement analysé (frais ou fixé) et de la méthode de détection utilisée (PCR-SSCP, séquençage direct....). Ces tumeurs des VADS avec TP53 muté, sont le plus souvent retrouvées chez des fumeurs (90% des cas), sans infection à HPV. Différemment, les cancers des VADS HPV positifs sont plutôt

retrouvés chez des sujets non fumeurs, sans mutation dans TP53, présentant des anticorps sériques anti-HPV E6 et sont de meilleur pronostic (Dai *et al.*, 2004 ; Weinberger *et al.*, 2006). Ainsi, il a été montré que la dégradation de la p53 sauvage par E6 n'est pas fonctionnellement équivalente à la perte de fonction de p53 induite par des mutations somatiques, dues à divers carcinogènes. Enfin, un autre mécanisme décrit, dans les infections virales à hépatite B, une inactivation fonctionnelle de la p53 sauvage par délocalisation nucléaire avec relocalisation cytoplasmique (Elmore *et al.*, 1997). Au total, les associations HPV/p53 dans les tumeurs des VADS ne sont pas toujours claires, avec les manques de corrélations déjà décrites entre l'infection à HPV et les paramètres cliniques (stade TNM...), ou encore le facteur alcoolo-tabagique. En effet, des patients HPV-HR positifs alcoolo-tabagiques sont également connus (Nemes *et al.*, 2006) et il existe aussi des tumeurs HPV positives avec des mutations du gène TP53. Ces tumeurs présentent un très mauvais pronostic et un taux de survie plus court que les patients HPV positifs sans mutation dans TP53 (Kozomara *et al.*, 2005). Ce même mauvais pronostic est également retrouvé dans les tumeurs HPV négatives. L'infection à HPV pourrait ici avoir lieu après la survenue de mutations dans TP53. Dans ce cas de figure, l'impact de TP53 muté serait plus important que l'infection à HPV seule, au niveau du pronostic de ces tumeurs et l'infection à HPV jouerait alors un rôle secondaire. Notre étude sur les 58 échantillons de cancers de l'amygdale palatine n'a pas non plus permis d'établir une corrélation entre la présence d'HPV et les caractéristiques tumorales et l'expression entre autres de la p53 en immunohistochimie. Précisons aussi, que les prélèvements des cancers des VADS sont souvent limités en nombre et en qualité et qu'un nombre conséquent d'études présentent au final une puissance statistique limitée. Certaines associations

statistiques modérées voire fortes ne présentent pas non plus souvent de différence significative.

Dans le cancer du col utérin, l'expression d'E7 conduit à la phosphorylation puis à la dégradation de pRb et indirectement à une sur-expression de p16. Dans le contexte des VADS l'expression de pRb est moins étudiée et **l'expression de p16 est souvent corrélée à la présence d'HPV-HR**. Ainsi, dans notre étude portant sur 58 cancers de l'amygdale palatine, la présence d'HPV-HR (16, 18, 39 et 52) était significativement associée à une sur-expression de p16 ( $p=0.0015$ ). De plus, ces patients présentaient une tendance à une meilleure survie comparativement aux tumeurs HPV-HR négatives. Ce meilleur pronostic et la moindre récurrence des tumeurs des VADS HPV-HR positives sont fréquemment décrits dans la littérature (Hafkamp *et al.*, 2004 ; De Petrini *et al.*, 2006). Cependant, nous avons aussi comme d'autres auteurs, identifié des tumeurs HPV-HR positives ne sur-exprimant pas la p16 et des tumeurs HPV négatives sans p16 (fréquent) ou avec p16 (rare). Très récemment, Weinberger *et al* ont ainsi proposé un modèle de cancérogenèse des VADS, s'appuyant sur le modèle de Braakhuis, qui pourrait expliquer les différents phénotypes des tumeurs en fonction de leur statut HPV, p53 et p16 (Braakhuis *et al.*, 2004 ; Weinberger *et al.*, 2006). Ces auteurs proposent une classification en trois catégories.

i) La première catégorie concerne les tumeurs des VADS ADN HPV-HR positives, avec une forte charge virale pour l'HPV 16, un fort taux de p16, des taux bas de p53 sauvage et de pRb (immunohistochimie fluorescente quantitative). Ces tumeurs sont peu différenciées, d'apparence basaloïde (Hafkamp *et al.*, 2004 ; El-Mofty *et al.*, 2005 ; Weinberger *et al.*, 2006), plutôt chez des personnes jeunes non

alcoolo-tabagiques et présentent un meilleur taux de survie. Ces tumeurs peu différencierées sont corrélées à un statut d'aneuploïdie mais pas à la présence ni à l'intégration d'HPV chez Rodrigo *et al.* (Rodrigo *et al.*, 1996). Une autre étude, mais dans des cancers cervicaux, décrit une surexpression de p16 variant en fonction du type d'HPV-HR, ainsi plus importante pour les HPV 16 et 52 que pour les HPV 35 et 51 (Ishikawa *et al.*, 2006). Il n'existe pas d'étude connue à ce jour sur l'implication de variants d'HPV 16 dans les tumeurs des VADS. D'autre part, chez Weinberger *et al.*, un seul cas est décrit HPV négatif / p16 surexprimé, traduisant sans doute la présence d'un HPV-HR non détecté. Enfin, différemment dans la maladie de Bowen, une sur-expression de p16 est décrite indépendante du statut HPV (Willman *et al.*, 2006).

ii) La seconde catégorie comporte les tumeurs ADN HPV-HR positives, avec une charge virale d'HPV 16 très faible, sans expression de p16 mais avec TP53 muté, présentant un profil similaire à celui des tumeurs HPV négatives (troisième catégorie). Cependant, ces patients présentaient un taux de récurrence supérieur à celui des patients HPV négatifs. Ceci a aussi été décrit avec la présence d'HPV 18. Il est possible que les HPV n'aient ici qu'un rôle de cofacteur synergique des traditionnels carcinogènes alcoolo-tabagiques.

iii) La dernière catégorie de cette étude de Weinberger *et al* concerne les tumeurs HPV négatives, sans p16 mais avec TP53 muté, correspondant à l'étiologie alcoolo-tabagique. Ces deux dernières catégories de tumeurs des VADS sans p16, avec TP53 muté (HPV positives ou négatives), correspondraient donc globalement au groupe de patients d'étiologie alcoolo-tabagique, impliquant un processus tumoral multifactoriel de cancérisation en champs, avec l'implication de mutations génétiques et/ou des inactivations épigénétiques de p53, pRb et p16. La méthylation du

promoteur de p16 conduisant à l'abrogation de cette protéine a ainsi été décrite dans les cancers du col utérin qui n'expriment pas des transcrits E7 (Nuovo *et al.*, 1999). L'infection à HPV interviendrait alors dans un second temps, en tant que cofacteur, tandis que les tumeurs HPV-HR positives et p16 positives seraient identifiables comme des entités cliniques distinctes des autres tumeurs des VADS. La notion d'HPV en tant que simple cofacteur pourrait aussi être appuyée par des études portant sur des cancers des VADS développés à partir de lésions papillomateuses pré-existantes. En effet, ces lésions sont bénignes mais l'action répétée du tabac et de l'alcool pourrait amener ces lésions vers une transformation maligne. La simple présence ou non des HPV serait alors très différente dans les cancers des VADS et dans ceux du col utérin (Linderberg *et al.*, 1989 ; Chen *et al.*, 1994 ; McCullough et McNichol, 1991 ; DiLorenzo *et al.*, 1992).

La prévalence des HPV dans les tumeurs amygdaliennes de notre étude est inférieure à celle habituellement décrite (14% comparée à 50% environ), alors que les prévalences déterminées pour les tumeurs de la base de la langue (14%) et de l'oro-pharynx (21%) sont en accord avec celles de la littérature. Ces différences de prévalence peuvent provenir en partie de la nature de nos échantillons. En effet, nos tumeurs amygdaliennes étaient fixées au formol et incluse en paraffine, alors que les tumeurs de la base de la langue et de l'oro-pharynx étaient fraîches et congelées dans l'azote liquide. D'autre part, la région Est de la France est connue pour être à haut-risque de cancers de l'oro-pharynx dus principalement à l'alcool et au tabac. L'écrasante majorité de nos patients était effectivement alcoolo-tabagique et permettrait d'expliquer l'absence d'identification de populations différentes entre les patients porteurs de tumeurs HPV positives et négatives. Au total, nos études portant sur cancers des amygdales palatines, de la base de la langue ou de l'oro-pharynx

n'ont pas permis de distinguer une population HPV-HR positive plus jeune et non fumeuse.

**Une infection active à HPV se caractérise par l'expression des ARNm spécifiques des gènes E6 et E7 et l'étude des voies p53, pRb et p16 fournit une évidence indirecte de la production E6/E7.** En revanche, selon les critères de Zur Hausen, l'absence prouvée de ces transcrits exclurait une cancérogenèse HPV-HR induite (zur Hausen, 2000). Le nombre des cancers des VADS HPV-HR positifs excède le nombre de tumeurs exprimant réellement les oncoprotéines E6 et E7 et l'étude de l'expression des transcrits E6/E7 devrait donc identifier les tumeurs où les HPV jouent réellement un rôle dans la cancérogenèse. Cependant, une nouvelle fois, des variations de l'expression des ARNm E6 et E7 semblent être dépendantes de la localisation anatomique des tumeurs. Ainsi, environ 50% des tumeurs des VADS présentent des transcrits E6/E7, ces ARNm étant surtout retrouvés dans les tumeurs de l'amygdale palatine et de l'oro-pharynx (80% et 50% respectivement) (Snijders *et al.*, 1997, Braakhuis *et al.*, 2004). Braakhuis *et al* précise aussi que les tumeurs exprimant les ARNm E6/E7 d'HPV 16 montrent une absence totale de mutation du gène TP53 tandis que les tumeurs HPV positives sans les transcrits E6/E7, présentent des mutations dans TP53. Ceci plaide en faveur d'une implication précoce des HPV dans les tumeurs HPV positives TP53 non muté. En revanche, pour les localisations buccale, pulmonaire ou oesophagienne, la prévalence de l'expression de E6 et E7 est très inférieure à la prévalence de l'ADN HPV 16 (dans respectivement 12%, 25% et 33% des tumeurs). Une étude impliquant des lignées cellulaires dérivant d'un cancer de la cavité buccale chez une patiente a aussi montré des variations d'expression d'E6/E7 entre sa tumeur et les 10 lignées cellulaires en

dérivant. Ainsi, une seule de ces 10 lignées cellulaires analysées montrait clairement la présence d'ARNm E6/E7 d'HPV 16, alors qu'aucune des 9 autres lignées ne présentait d'ADN ou d'ARNm de ce type d'HPV (Simon *et al.*, 1994). La technologie moléculaire utilisée dans ces études était surtout la RT-PCR ciblant E6 et/ou E7 de l'HPV 16. D'autres HPV-HR pourraient aussi jouer un rôle dans la cancérogenèse des VADS, comme l'HPV-HR 18 ou 33 par exemple. L'utilisation plus récente de la technologie NASBA dans la cancérogenèse cervicale, promet des résultats intéressants dans les tumeurs des VADS mais n'avait jamais été utilisée jusqu'à notre étude. Dans notre analyse préliminaire basée sur des tumeurs congelées de la base de la langue et de l'oro-pharynx, nous avons donc choisi d'utiliser cette technique NASBA, plus puissante que la PCR, permettant la détection potentielle de l'expression des ARNm E6/E7 des 5 HPV-HR les plus fréquemment retrouvés . 52,4% des tumeurs HPV 16 ADN positives et 1/4 des tumeurs HPV 33 ADN positives exprimaient les transcrits E6/E7 respectifs. Ceci concorde avec la littérature où des coinfactions à HPV-HR sont aussi décrites : 8% dans notre étude et 12% chez Nemes *et al* (Nemes *et al.*, 2006). Au total, la détection de tumeurs des VADS HPV-HR positives (multi-infections ou non), exprimant des transcrits E6/E7, sans mutation dans TP53 plaident en faveur d'un rôle précoce des HPV et d'un bon pronostic clinique.

L'expression des oncoprotéines virales E6 et E7 pose aussi la question de la **charge virale et de l'intégration des HPV-HR au sein du génome de l'hôte** dans les différentes tumeurs épithéliales.

i) Dans les tumeurs cervicales, la nécessité de l'intégration d'un HPV dans la transformation maligne n'est pas clairement établie. Une **forte charge virale** pourrait

être à risque de développer des lésions de haut grade et l'intégration serait parfois un événement précoce. Cependant, dans les lésions précancéreuses et cancéreuses cervicales où l'intégration est supposée être plus fréquente, cette charge virale est retrouvée plutôt faible. En fait, l'impact potentiel de la charge virale sur l'intégration virale est difficile à étudier actuellement, vu les limites techniques portant sur l'intégration, où une partie de la région E2 est en effet souvent déletée avec plus rarement E1 ou L1 (Kalantari *et al.*, 1998). Ces délétions interviennent *a priori* au hasard et les sites d'intégration au niveau de l'ADN de l'hôte ne sont pas connus ou compris actuellement. Les techniques actuelles de PCR en temps réel les plus utilisées en pathologie cervicale sont limitées à une partie de E2 et à E6 et mettent en évidence plus de formes mixtes (épisomales et intégrées) et épisomales que des formes intégrées seules (Peitsaro *et al.*, 2002).

ii) Au sein des cancers des VADS, les études portant sur la charge virale et l'intégration des HPV-HR sont moins nombreuses et portent majoritairement sur celle de l'HPV 16. Peu d'études relatent le statut physique des HPV, sous forme épisomale, intégrée ou encore mixte (Chen *et al.*, 2005). Nemes *et al* trouvent seulement 7% de séquences E2 non interrompues (sur 27 tumeurs de la cavité buccale HPV 16 positives). La charge virale est variable selon la localisation anatomique mais reste plus élevée dans les amygdales palatines où elle est équivalente à celle déterminée dans les cancers cervicaux (de 20 à 400 copies virales par cellules) (Syrjanen, 2004). Ces charges virales élevées dans les tumeurs amygdaliennes sont aussi associées à un bon pronostic clinique (Mellin *et al.*, 2002 ; Weinberger *et al.*, 2006). Kreimer *et al* corrèlent d'autre part une forte charge virale avec l'augmentation de la séropositivité E6 et E7 (Kreimer *et al.*, 2005b). Enfin, d'autres auteurs montrent que la transcription des ARNm E6/E7 dans les carcinomes

de l’amygdale n’est pas nécessairement dépendante de l’intégration des HPV, alors principalement présents sous forme épisomale. L’explication délicate de cette présence d’HPV-HR sous forme épisomale dans ces cancers, pourrait être liée à la protéine E2, qui servirait d’« ancre » pour accrocher les HPV épisomaux circulaires au fuseau mitotique, assurant ainsi le maintien de cet état épisomal (van Tine *et al.*, 2004). Enfin, Lindel souligne le bon pronostic clinique lié aux tumeurs HPV positives avec un gène E2 intact (non délété) (Lindel *et al.*, 2001).

**En conclusion générale**, le rôle des HPV-HR dans la cancérogenèse des VADS est donc bien plus complexe à déterminer que dans les cancers du col de l’utérus, bien que celui-ci puisse servir de modèle et ouvrir des pistes de réflexion. Dans la cancérogenèse des VADS, les HPV-HR jouent-ils un rôle dans les étapes précoces ou tardives ? Leurs actions sont-elles constantes ou transitoires voire mineures ? Quelle est la signification des faibles pertes d’hétérozygotie dans les cancers des VADS HPV-HR positifs comparé aux cancers HPV-HR négatifs ? Certaines pertes d’hétérozygotie associées sont-elles réellement nécessaires au développement d’une tumeur ? Ces HPV-HR sont-ils impliqués dans la stimulation de la prolifération cellulaire et dans l’initiation de l’instabilité génomique ? Ou bien encore, sont-ils aussi capables de moduler les mécanismes de la réponse immunitaire ?

Au total dans les VADS, une implication directe des HPV-HR est surtout retrouvée dans les cancers de l’oro-pharynx et particulièrement ceux de l’amygdale palatine. Une nouvelle classification « clinique et biologique » des tumeurs des VADS pourrait être proposée pour identifier les tumeurs réellement HPV-HR induites, selon les paramètres suivant :

- une localisation anatomique précise,
- la présence d'ADN d'HPV-HR,
- l'âge et le statut alcoololo-tabagique des patients,
- l'absence de mutation dans TP53,
- la sur-expression de p16,
- un statut histologique peu différencié,
- une charge virale élevée (particulièrement pour l'HPV 16),
- l'intégrité du gène E2,
- une expression des transcrits E6 et E7.

Au total, tous ces paramètres sont associés à un meilleur pronostic incluant une meilleure survie et une apparition moindre de récurrences locales, dans les 20% des tumeurs des VADS citées. Des études complémentaires sont nécessaires, sur de plus grandes cohortes de patients, sans doute mieux ciblés et identifiés, avec des prélèvements adéquats, afin de développer la prévention de ces cancers. De nouveaux outils de recherche semblent indispensables et les progrès en thérapies génique et cellulaire associés sont prometteurs.

### Perspectives.

Une étape indispensable au travail sur les tumeurs des VADS est **d'améliorer les outils et les moyens de recherche cliniques et fondamentaux**. Concernant les outils de travail, le stockage, la qualité et la gestion des prélèvements des tumeurs des VADS et des prélèvements tumoraux en général, restent primordiales. En France, le nombre de **tumorothèques** et de registres de tumeurs notamment

dédiées à l’O.R.L. est insuffisant et pose problème, tant pour la clinique que la recherche. La qualité des échantillons analysés est capitale pour la pertinence des résultats et la fixation au formol des pièces opératoires rend les analyses de biologie moléculaire extrêmement complexes (fragmentation des acides nucléiques, faible quantité d’ADN/ARN...). Les différences potentielles de stratégie thérapeutique entre les C.H.U. et les Centres de Lutte contre le Cancer, rendent également complexe l’analyse de ces tumeurs. La radio-chimiothérapie réalisée en première intention peut ainsi altérer les mécanismes moléculaires à étudier sur les pièces opératoires ou biopsies obtenues, comparée au choix de la chirurgie première (ultérieurement suivie d’une radio-chimiothérapie). Actuellement, aucun consensus thérapeutique international n’existe pour la plupart des tumeurs de la sphère O.R.L.

Les cancers des VADS et particulièrement les cancers de l’oro-pharynx et de la cavité buccale sont beaucoup plus rares que les cancers cervicaux. **L'accès aux prélèvements des VADS** est aussi plus complexe comparé au col utérin et il n'existe pas d'équivalent du frottis cervico-utérin. De plus, les pièces opératoires ou biopsiques de tumeurs des VADS « congelées » peuvent être difficiles à obtenir, vu la petite taille fréquente des tumeurs. Certains auteurs ont donc proposé l'emploi de **frottis buccaux** adaptés aux VADS et plus particulièrement à la cavité buccale et aux amygdales. Des frottis *via* des brossettes sur des sites précis ou encore des rinçages ou des gargarismes buccaux pourraient être utilisés (Smith *et al.*, 2004b ; Zhao *et al.*, 2005). Ceci reste cependant discuté car les études sont peu nombreuses et certains résultats discordants. En effet, dans certaines tumeurs HPV-HR positives, l’ADN de ces HPV-HR n’était pas toujours retrouvé dans les rinçages buccaux correspondants et des charges virales d’HPV 16 (PCR en temps réel) étaient inférieures dans les rinçages buccaux, comparé à celles des tumeurs (Zhao *et al.*,

2005). Enfin, des inhibiteurs de PCR dans la salive sont décrits et pourraient augmenter le taux de résultats faussement négatifs (Ochert *et al.*, 1994). Le diagnostic tardif fréquent des cancers de la sphère O.R.L. nécessiterait le développement de nouveaux modes de dépistage, restant encore à déterminer et comprenant peut-être un test HPV dans les années à venir.

**Concernant maintenant les perspectives au niveau des moyens de recherche,** un autre champ d'investigation extrêmement prometteur est le **développement de puces ADN** comportant de très nombreuses sondes ou cibles, qui permettront à une plus grande échelle, l'étude comparative de l'expression de gènes cellulaires dans les tumeurs des VADS HPV positives et négatives. Ces études d'expression génique des tumeurs HPV positives et négatives, corrélées aux données cliniques, pourraient permettre d'améliorer le pronostic et éventuellement d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces études devraient également apporter des réponses sur les mécanismes d'interactions entre les HPV-HR et d'autres carcinogènes.

Si l'entité tumorale « HPV positive/sur-expression p16 », de bon pronostic dans les VADS, paraît actuellement la mieux définie, des études avec des modèles cellulaires et animaux sont requises et se développent. Au niveau du **développement récent de modèles animaux** dédiés à l'O.R.L., le lien direct entre l'infection à HPV et les processus néoplasiques a été établi pour la première fois chez des PV animaux : CRPV (*Cottontail Rabbit PV*), BPV (*Bovine PV*) et COPV (*Canine Oral PV*). Le COPV responsable de papillomes dans l'oro-pharynx chez le chien est particulièrement intéressant. Ces papillomes peuvent en effet évoluer en cancers épidermoïdes et disséminer dans d'autres organes (Campo, 2002). Plus

récemment, l'émergence de modèles de souris transgéniques exprimant les oncogènes E6 ou E7 ou E6/E7 de l'HPV 16 permettent aujourd'hui de reproduire les caractéristiques moléculaires et histopathologiques (prolifération cellulaire, différenciation cellulaire) des cancers des VADS HPV positifs. En effet, après exposition à un carcinogène mimant les effets des dérivés du tabac, les souris exprimant l'une ou l'autre des oncoprotéines virales développent des tumeurs indifférenciées de la langue et de l'œsophage où la p16 est sur-exprimée. De tels modèles animaux pourront certainement aider à mieux comprendre le réel impact des HPV dans la cancérogenèse des VADS (Strati *et al.*, 2006).

**Au niveau des perspectives thérapeutiques, la thérapie génique ouvre une voie prometteuse dans le rétablissement des fonctions de p53, avec des essais cliniques déjà réalisés chez l'homme. Les vecteurs viraux de type Adénovirus recombinants pour le gène TP53 (AV-p53) sont les plus employés pour apporter le gène TP53 sauvage dans les cellules tumorales (Roth, 2006). Différentes études montrent une régression locale des tumeurs et une augmentation de l'efficacité de la chimio- et de la radio-thérapie (Shimada *et al.*, 2006 ; Roth, 2006 ; Ndoye *et al.*, 2006). La tolérance est bonne mais l'efficacité est encore actuellement limitée (Chon *et al.*, 2006).**

**Les thérapies anti-sens** présentent des résultats intéressants chez des souris atteintes de cancer des VADS, notamment pour rétablir la voie p53 dans des tumeurs exprimant les transcrits E6/E7 d'HPV-HR. Ainsi, dans des cellules SiHa, l'introduction d'ARN anti-sens E6/E7 *via* un vecteur adénoviral, permet l'augmentation de l'expression de la p53 et de la pRb et, après injection dans des souris *nude*, conduit à la réduction du volume de tumeurs sous-cutanées (Hamada *et*

al., 2006). Une autre étude introduisant cette fois des **siRNA E6** dans des cellules SiHa, permet également une accumulation de p53 dans le noyau et une réduction de la taille des tumeurs induites dans des souris NOD/SCID (Yoshinouchi et al., 2003). Le développement de ces thérapies géniques potentiellement efficaces devrait permettre de cibler spécifiquement les tumeurs HPV-HR induites du col utérin et des VADS.

Enfin, **les vaccins prophylactiques**, principalement anti-HPV 16 et 18, dans le cadre de la prévention du cancer du col utérin fourniront sans-doute une preuve indirecte de l'implication des HPV dans certains cancers des VADS cités. Il sera ainsi intéressant de constater si cette vaccination peut être corrélée à une baisse de l'incidence ou non des cancers de l'oro-pharynx.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- 1- Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaheri A. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope* 2002;112:700-707.
- 2- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barret JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13742-13747.
- 3- Anderson JA, Irish JC, McLachlin CM, Ngan BY. *H-ras* oncogene mutation and human papillomavirus infection in oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:755-760.
- 4- Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A, Karlsen F, Johansson B. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4A. *Int J Oncol* 2006;29:705-711.
- 5- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalistic nature of these viruses. *J Virol* 2000;74:11636-11641.
- 6- Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 2005;113:276-283.
- 7- Barbosa MS, Edmonds C, Fischer C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 1990;9:153-160.
- 8- Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989;63:1404-1407.
- 9- Barron BA, Richart RM. A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst* 1968;41:1343-1353.
- 10- Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5694-5699.
- 11- Bejui-Thivolet F, Liagre N, Chignol MC, Chardonnet Y, Patricot LM. Detection of human papillomavirus DNA in squamous bronchial metaplasia and squamous cell carcinomas of the lung by *in situ* hybridization using biotinylated probes in paraffin-embedded specimens. *Hum Pathol* 1990;21:111-116.
- 12- Bellanger S, Demeret C, Goyat S, Thierry F. Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J Virol* 2001;75:7244-7251.

- 13- Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* 1997;8:1277-1286.
- 14- Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006;118:1071-1076.
- 15- Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005;32S:S1-S6.
- 16- Beutter P, Pinlong E. Cancers de la région amygdalienne. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-595-A-10, 1995, 12p.
- 17- Birley HD, Hart CA, Stacey SN. Human papillomaviruses and the genital tract: old virus, new developments. *J Med Microbiol* 1995;43:81-84.
- 18- Blachon S, Bellanger S, Demeret C, Thierry F. Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:36088-36098.
- 19- Blot WJ. Alcohol and cancer. *Cancer Res* 1992;52:2119s-2123s.
- 20- Bohlmeyer T, Le TN, Shroyer AL, Markham N, Shroyer KR. Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:265-269.
- 21- Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, Clavel C. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* 2002;102:519-525.
- 22- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-265.
- 23- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
- 24- Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S, et al. What is relevant in cervical carcinogenesis other than HPV ? In : Monsonego J, editor. Challenges of modern medicine: papillomavirus in human pathology. Rome: Ares-Serono Symposia, 1995;9:173-181.
- 25- Bousarghin L, Touze A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31 and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* 2003;77:3846-3850.

- 26- Braakhuis BJM, Leemans RC, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin in Cancer Biol* 2005;15:113-120.
- 27- Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune WJH, Meijer CJLM, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:998-1006.
- 28- Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer A, Leemans CR, Brakenhoff CH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization : Evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003;63:1727-1730.
- 29- Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002;38:99-166.
- 30- Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SN, Sidranski D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:429-435.
- 31-Bristow RG, Benchimol S, Hill RP. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 1996;40:197-223.
- 32- Brown DR, Pratt L, Bryan JT, Fife KH, Jansen K. Virus-like particles and E1-E4 protein expressed from the human papillomavirus type 11 bicistronic E1-E4-L1 transcript. *Virology* 1996;222:43-50.
- 33- Brugere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. *Cancer* 1986;57:391-5.
- 34- Bundgaard T, Wildt J, Frydenberg M, Elbrond O, Nielsen JE. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control* 1995;6:57-67.
- 35- Burgos JS. Involvement of the Epstein-Barr virus in the nasopharyngeal carcinoma pathogenesis. *Med Oncol* 2005;22:113-121.
- 36- Butler S, Molinari JA, Plezia RA, Chandrasekar P, Venkat H. Condyloma acuminatum in the oral cavity: four cases and a review. *Rev Infect Dis* 1988;10:544-550.
- 37- Cabanne F, Bonenfant JL. Anatomie Pathologique - Principes de pathologie générale et spéciale. Les Presses de l'Université Laval 1980; Maloine S.A. Editeur, Paris.
- 38- Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 2002;89:249-261.
- 39- Campo MS, Ashrafi GH, Marchetti B, Haghshenas M, Araibi E. Papillomavirus E5 proteins and MHC Class I: a common way to evade the immune response. 23rd

International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. September 1-7, 2006, Prague, Czech Republic:PS12-3.

40- Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002;89:191-199.

41- Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:303-315.

42- Castellsague X, Munoz N. Chapter 3 : Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:20-28.

43- Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004;108:741-749.

44- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995;69:3074-3083.

45- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991;65:1053-1061.

46- Chen B, Yin H, Dhurandhar N. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal squamous cell carcinoma by the polymerase chain reaction using consensus primers. *Hum Pathol* 1994;25:920-923.

47- Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982;299:529-534.

48- Chen G, Stenlund A. Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J Virol* 1998;72:2567-2576.

49- Chen G, Stenlund A. Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J Virol* 2000;74:1506-1512.

50- Chen R, Aaltonen LM, Vaheri A. Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Rev Med Virol* 2005;15:351-363.

51- Chen RW, Aalto Y, Teesalu T, Durst M, Knuutila S, Aaltonen LM, Vaheri A. Establishment and characterisation of human papillomavirus type 16 DNA immortalised human tonsillar epithelial cell lines. *Eur J Cancer* 2003;39:698-707.

- 52- Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependant up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 1995;9:2335-2349.
- 53- Chin-Hong PV, Palefsky JM. Human papillomavirus anogenital disease in HIV-infected individuals. *Dermatol Ther* 2005;18:67-76.
- 54- Chon HS, Hu W, Kavanagh JJ. Targeted therapies in gynecologic cancers. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6:333-363.
- 55- Ciechanover A, Shkedy D, Oren M, Bercovich B. Degradation of the tumor suppressor protein p53 by the ubiquitin-mediated proteolytic system requires a novel species of ubiquitin-carrier protein, E2. *J Biol Chem* 1994;269:9582-9589.
- 56- Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 2001;84:1616-1623.
- 57- Clavel CE, Nawrocki B, Bosseaux B, Poitevin G, Putaud IC, Mangeonjean CC, Monteau M, Birembaut PL. Detection of human papillomavirus DNA in bronchopulmonary carcinomas by hybrid capture II: a study of 185 tumors. *Cancer* 2000;88:1347-1352.
- 58- Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Lina Villa L. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic disease. *Vaccine* 2006;24S3:S3/26-S3/34.
- 59- Coissard CJ, Besson G, Polette MC, Monteau M, Birembaut PL, Clavel CE. Prevalence of human papillomaviruses in lung carcinomas: a study of 218 cases. *Mod Pathol* 2005;18:1606-1609.
- 60- Combita AL, Touze A, Bousarghin L, Sizaret PY, Munoz N, Coursaget P. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* 2001;204:183-188.
- 61- Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 1999;274:2696-2705.
- 62- Cossart YE, Thompson C, Rose B. Genital warts human papillomavirus infection. In: Mindel A, editor. *Virology*. 1st ed. London : Edward A 1995, pp. 1-34.
- 63- Crum CP, Berber S, Symbula M, Snyder K, Saleh AM, Roche JK. Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* 1990;178:238-246.

- 64- Cruz MR, Cerqueira DM, Cruz WB, Camara GN, Brigido MM, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:281-282.
- 65- Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* 2006;80:8940-8950.
- 66- Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Hogmo A, Bjornestal L, Lindholm J, Lundberg B, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:1015-1019.
- 67- Dahlstrand HM, Dalianis T. Presence and influence of human papillomaviruses (HPV) in tonsillar cancer. *Adv Cancer Res* 2005;93:59-89.
- 68- Dahlstrand HM, Lindquist D, Bjornesstal L, Ohlsson A, Dalianis T, Munck-Wikland E, Elmberger G. P16 INK4a correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:4375-4384.
- 69- Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, Spitz MR, Schiller JT, Wei Q, Sturgis EM. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers : a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003;9:2620-2626.
- 70- Dai M, Clifford GM, le Calvez F, Castellsague X, Snijders PJF, Pawlita M, Herrero R, Hainaut P, Fanceschi S. Human papillomavirus type 16 and *TP53* mutation in oral cancer : matched analysis of the IARC multicenter study. *Cancer Res* 2004;64:468-471.
- 71- Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, Carbillot JP, Kantelip B, Schaal JP, Mougin C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003;106:396-403.
- 72- Davy CE, Jackson DJ, Raj K, Peh WL, Southern SA, Das P, Sorathia R, Laskey P, Middleton K, Nakahara T, Wang Q, Masterson PJ, Lambert PF, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J. Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol* 2005;79:3998-4011.
- 73- Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Miller JB, Doorbar J. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2002;76:9806-9818.
- 74- Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependant pathway. *Virology* 2003;307:1-11.

- 75- Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcriptionreplication protein, E2, to PML oncogenic domain. *J Virol* 1998;72:142-150.
- 76- De Petrini M, Ritta M, Schena M, Chiusa L, Campisi P, Giordano C, Landolfo V, Pecorari G, Landolfo S. Head and neck squamous cell carcinoma : role of the human papillomavirus in tumour progression. *New Microbiol* 2006;29:25-33.
- 77- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- 78- Dehesdin D, Choussy O. Anatomie du pharynx. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-491-A10, 1998,10p.
- 79- Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* 1997;71:9343-9349.
- 80- DiLorenzo TP, Tamsen A, Abramson AL, Steinberg BM. Human papillomavirus type 6a DNA in the lung carcinoma of a patient with recurrent laryngeal papillomatosis is characterized by a partial duplication. *J Gen Virol* 1992;73:423-428.
- 81- Dong G, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* 1994;68:1115-1127.
- 82- Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus 1 E4 gene product. *EMBO J* 1986;5:355-362.
- 83- Doorbar J, Coneron I, Gallimore PH. Sequence divergence yet conserved physical characteristics among the E4 proteins of cutaneous human papillomaviruses. *Virology* 1989;172:51-62.
- 84- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824-827.
- 85- Doorbar J, Evans HS, Coneron I, Crawford LV, Gallimore PH. Analysis of HPV-1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. *EMBO J* 1988;7:825-833.
- 86- Doorbar J. The E4 proteins and their role in the viral cycle. In: Lacey C, editor. *Papillomavirus reviews: current research on papillomaviruses*. Leeds: Leeds University Press; 1996 p. 31-38.
- 87- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32S:S7-S15.
- 88- Doorbar J, Elston RC, Napthine S, Raj K, Medcalf E, Jackson D, Coleman N, Griffin HM, Masterson P, Stacey S, Mengistu Y, Dunlop J. The E1E4 protein of

human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C-terminus. *J Virol* 2000;74:10081-10095.

89- Dostatni N, Thierry F, Yaniv M. A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *EMBO J* 1988;7:3807-3816.

90- Duensing S, Duensing A, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* 2001;61:2356-2360.

91- Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissman L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1987;1:251-256.

92- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-937.

93- El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of high-risk human papillomavirus DNA in nonkeratinizing (cylindrical cell) carcinoma of the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1367-1372.

94- El-Mofty SK, Patil S. Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma : characterization of a distinct phenotype. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol endod* 2006;101:339-345.

95- Elmore LW, Hancock AR, Chanh SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14707-14714.

96- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997;71:2449-2456.

97- Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 2006;24:2606-2611.

98- Fehrman F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 2003;77:2819-2831.

99- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0., Lyon: IARC Press 2004.

100- Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 1976;458:283-321.

- 101- Firzlaff JM, Galloway DA, Eisenman RN, Luscher B. The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II. *New Biol* 1989;1:44-53.
- 102- Flores ER, Lambert PF. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* 1997;71:7167-7179.
- 103- Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* 2002;76:10009-10014.
- 104- Forastiere A, Koch W, Trott A, Sidranski D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345:1890-1900.
- 105- Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide : etiological clues. *Oral Oncol* 2000;36:106-115.
- 106- Frisch M, Biggar RJ. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet* 1999;354:1442-1443.
- 107- Fuchs PG, Pfister H. Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* 1994;37:159-167.
- 108- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependant DNA replication by p21 is blocked by interaction with HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 1997;11:2090-2100.
- 109- Gao GF, Roth MJ, Wei WQ, Abnet CC, Chen F, Lu N, Zhao FH, Li XQ, Wang GQ, Taylor PR, Pan QJ, Chen W, Dawsey SM, Qiao YL. No association between HPV infection and the neoplastic progression of esophageal squamous cell carcinoma : result from a cross-sectional study in a high-risk region of China. *Int J Cancer* 2006 Apr 13 (Epub ahead of print).
- 110- Garcia SB, Novelli M, Wright NA. The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *Int J Exp Pathol* 2000;81:89-116.
- 111- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomaviruse and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-720.
- 112- Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* 2004;31:744-754.
- 113- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001;75:1565-1570.
- 114- Goldenberg D, Golz A, Netzer A, Rosenblatt E, Rachmiel A, Goldenberg RF, Joachims HZ. Epstein-Barr virus and cancers of the head and neck. *Am J Otolaryngol* 2001;22:197-205.

- 115- Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Munger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteosomal degradation of E7. *J Virol* 2001;75:7583-7591.
- 116- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357-361.
- 117- Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998;36:3020-3027.
- 118- Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P, Tommasino M, Zehbe I. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:820-822.
- 119- Grundmann E. Cancer morbidity and mortality in USA Mormons and Seventh-day Adventists. *Arch Anat Cytol Pathol* 1992;40:73-78.
- 120- Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* 2004;124:520-526.
- 121- Hafkamp HC, Speel EJM, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WNM, Ramaekers FCS, Hopman AHN, Manni JJ. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16 INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003;107:394-400.
- 122- Hagensee ME, Cameron JE, Leigh JE, Clark RA. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *Am J Med Sci* 2004;328:57-63.
- 123- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400:464-468.
- 124- Hamada K, Shirakawa T, Gotoh A, Roth JA, Follen M. Adenovirus-mediated transfer of human papillomavirus 16 E6/E7 antisense RNA and induction of apoptosis in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2006;Aug 12 ; (Epub ahead of print).
- 125- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 126- Hawes SE, Critchlow CW, Sow PS, Toure P, N'Doye I, Diop A, Kuypers JM, Kasse AA, Kiviat NB. Incident high-grade squamous intraepithelial lesions in Senegalese women with and without human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:100-109.
- 127- Hecht HS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:733-744.

- 128- Helt AM, Galloway DA. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol* 2001;75:6737-6747.
- 129- Hemminki K, Dong C, Frish M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:433-437.
- 130- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosck FX, Reidel U, Snijders PJF, Meijer CJLM, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus and oral cancer : the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-1783.
- 131- Herrero R. Chapter 7 : human papillomavirus and cancerof the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2003;31:47-51.
- 132- Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. I Classification, virology, pathology and epidemiology. *J Clin Pathol* 1994;47:1066-1072.
- 133- Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer : a review. *Virus Res* 2002;89:229-240.
- 134- Hinds PW. The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:79-83.
- 135- Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1365-1371.
- 136- Hochstrasser M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:215-223.
- 137- Howley PM. Papillomavirinae: the viruses and their replication. *in Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, pp. 2045-2076.
- 138- Howley PM. The human papillomaviruses. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:429-432.
- 139- Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. Warner-Lambert Parke-Davis Award Lecture. *Am J Pathol* 1983;113:414-421.
- 140- Hu X, Guo Z, Tianyun P, Ponten F, Wilander E, Andersson S, Ponten J. HPV typing and HPV16 E6sequence variations in synchronous lesions of cervical squamous-cell carcinoma from Swedish patients. *Int J Cancer* 1999;83:34-37.
- 141- Huang PS, Patrick DR, Edwards G, Goodhart PJ, Huber HE, Miles L, Garsky VM, Oliff A, Heimbrook DC. Protein domains governing interactions between E2F,

the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. Mol Cell Biol 1993;13:953-960.

142- Huertas A, Rodriguez JA, Martin L, Molano M, Combita AL, Bravo MM. E6 molecular variants in HPV 16 isolates from colombian women with CIN 3 and cervical carcinoma. 23rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. September 1-7, 2006, Prague, Czech Republic : P-141.

143- Hunter KD, Parkinson EK Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. Nat Rev Cancer 2005;5:127-135.

144- Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. Virology 1995;211:227-233.

145- International Agency for Research on Cancer. Alcohol Drinking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 44 (IARC, Lyon, 1988).

146- International Agency for Research on Cancer. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 71 (IARC, Lyon, 1999).

147- International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoke and Involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 83 (IARC, Lyon, 2002).

148- International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 38 (IARC, Lyon, 1986).

149- Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, Tzukazaki K, Mukai M, Nozawa S. Overexpression of p16 INK4A as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. Int J Gynecol Cancer 2006;16:347-353.

150- Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCance DJ. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. J Virol 1992;66:1329-1335.

151- Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. J Dent Educ 2001;65:328-39.

152- Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. Genes Dev 1997;11:2101-2111.

153- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qvarforth-Tubbin P, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllensten UB. Viral load of human papilloma

virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. Lancet 2000;355:2189-2193.

154- Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. J Biol Chem 1999;274:5810-5822.

155- Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. Diagn Mol Pathol 2001;10:46-54.

156- Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of the HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. Int J Gynecol Pathol 1998;17:146-153.

157- Kashima HK, Mounts P, Shah K. Recurrent respiratory papillomatosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1996;23:699-706.

158- Kingsley K, Johnson D, O'malley S. Transfection of oral squamous cell carcinoma with human papillomavirus -16 induces proliferative and morphological changes in vitro. Cancer Cell Int 2006;6:14 (Epub ahead of print).

159- Kinzler W, Vogelstein B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. Cell 1996;87:159-170.

160- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. Nature 1998;396:84-88.

161- Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, Walboomers JM, Meijer CJ. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997;6:799-805.

162- Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. BMJ 2002;325:572.

163- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. Cancer Res 1999;59:6132-6136.

164- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature 1996;380:79-82.

- 165- Klingelhutz AJ, Qian Q, Phillips SL, Gourrone FA, Darbro BW, Patil SR. Amplification of the chromosome 20q region is associated with expression of HPV-16 E7 in human airway and anogenital epithelial cells. *Virology* 2005;340:237-244.
- 166- Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162:747-753.
- 167- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92:2875-2884.
- 168- Knight GL, Grainger JR, Gallimore PH, Roberts S. Cooperation between different forms of the human paillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis. *J Virol* 2004;78:13920-13923.
- 169- Koromilas AE, Li S, Matlashewski G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:157-170.
- 170- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327:1272-1278.
- 171- Kozomara R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-MagicM, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33:342-348.
- 172- Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB, Skomedal H. Presence of E6 and E7 mRNA from papillomavirus types 16, 18, 31, 33 and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 2006;44:1310-1317.
- 173- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinoma worldwide : a systemic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-475a.
- 174- Kreimer AR, Clifford GM, Snijders PJF, Castellsague X, Meijer CJLM, Pawlita M, Viscidi R, Herrero R, Franceschi S. HPV16 semiquantitative viral load and serological biomarkers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005;115:329-332b.
- 175- Kühnel W. *Atlas de poche d'histologie*. Médecine-Sciences, Editions Flammarion, 1997, Paris, France.
- 176- La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33:302-312.

- 177- Lambot MA, Haot J, Peny MO, Fayt I, Noel JC. Evaluation of the role of human papillomavirus in oesophageal squamous cell carcinoma in Belgium. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:154-156.
- 178- Lefebvre JL, Chevalier D, Demaille A. *Epidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures*. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-949-A-10, 1996, 8p.
- 179- Leroux-Robert J, de Brux J. *Histopathologie O.R.L. et cervico-faciale*. 1976, Masson Ed, Paris.
- 180- Levine AJ. The p53 tumor suppressor gene and gene product. *Princess Takamatsu Symp* 1989;20:221-230.
- 181- Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Björklund A, Rutqvist LE. Smoking tobacco, oral snuff, alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998;82:1367-75.
- 182- Li W, Thompson CH, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Rose BR. The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck* 2004;26:1-9.
- 183- Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 2003;106:553-558.
- 184- Li X, Coffino P. Identification of a region of p53 that confers lability. *J Biol Chem* 1996;271:4447-4451.
- 185- Liebowitz D. Nasopharyngeal carcinoma : the Epstein-Barr virus association. *Semin Oncol* 1994;21:376-381.
- 186- Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx-a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92:805-813.
- 187- Linderberg H, Syrjanen S, Karja J, Syrjanen K. Human papillomavirus type 11 DNA in squamous cell carcinomas and pre-existing multiple laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol* 1989;107:141-149.
- 188- Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:362-372.
- 189- Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, Rush BB, Gravitt PE, Schussler JE, Schiffman M. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002;360:228-229.

- 190- Lyon JL, Gardner K, Gress RE. Cancer incidence among Mormons and non-Mormons in Utah (United States) 1971-85. *Cancer Causes Control* 1994;5:149-56.
- 191- Major T, Szarka K, Sziklai I, Gergely L, Czegledy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *J Clin Pathol* 2006;58:51-55.
- 192- Malanchi I, Accardi R, Diehl F, Smet A, Androphy E, Hoheisel J, Tommasino M. Human papillomavirus type 16 E6 promotes retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle progression. *J Virol* 2004;78:13769-13778.
- 193- Marandas P, Marandas N. Chapitre 1: Situation actuelle des cancers des voies aéro-digestives supérieures en France et données épidémiologiques. In: *Cancers des voies aéro-digestives supérieures. Données actuelles*. Ed Masson, Issy-les-Moulineaux, 2004, p3-21.
- 194- Marchetti B, Yuan ZQ, Gault EA, Ellis SA, Nasir L, Campo SM. Association between equine sarcoids and bovine papillomavirus. 23rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. September 1-7, 2006, Prague, Czech Republic:P-299.
- 195- Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 1998;72:7407-7419.
- 196- McBride AA, Byrne JC, Howley PM. E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:510-514.
- 197- McBride AA, Schlegel R, Howley PM. The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J* 1988;7:533-539.
- 198- McCullough DW, McNichol PJ. Laryngeal carcinoma associated with human papillomavirus type 16. *J Otolaryngol* 1991;20:97-99.
- 199- McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol* 1993;67:3142-3150.
- 200- McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* 1999;261:271-279.
- 201- Mellin H, Dahlgren C, Munck-Wiklund E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102:152-158.

- 202- Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic Patterns. *Acta Cytol* 1976;20:505-509.
- 203- Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003;77:10186-10201.
- 204- Miller CS, Johnstone BM. 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* 2001;91:622-635.
- 205- Missero C, Calautti E, Eckner R, Chin J, Tsai LH, Livingston DM, Dotto GP. Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5451-5455.
- 206- Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 2004;112:854-859.
- 207- Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* 2005;92:891-894.
- 208- Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:367-372.
- 209- Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mougin C, Prétet JL. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol* 2006;35:270-277.
- 210- Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez-Hernandez MJ, Domiguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000;36:170-174.
- 211- Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125-1131.
- 212- Moscicki AB, Shibuski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, Darragh TM, Brescia R, Kanowitz S, Miller SB, Stone J, Hanson E, Palefsky J. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* 1998;132:277-284.

- 213- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakama H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh KW. Mechanisms of human papillomavirus –induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-11460.
- 214- Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20:7888-7898.
- 215- Munger K. The molecular biology of cervical cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1995;23:55-60.
- 216- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-527.
- 217- Munoz N, Castellsague X, Berrington de Gonzales A, Gissman L. Chapetr 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24S3:S3/1-S3/10.
- 218- Munoz N, Kato I, Bosch FX, Eluf-Neto J, De Sanjose S, Ascunce N, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Gonzalez LC, Tafur L, Walboomers JM, Shah KV. Risk factors for HPV DNA detection in middle-aged women. *Sex Transm Dis* 1996;23:504-510.
- 219- Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19:1-5.
- 220- Nadais RD, Campaner AB, Piatto S, Longo Galvao MA, Dos Santos RE, Aoki T. Langerhans' cells and smoking in intraepithelial neoplasia of the cervix. *Gynecol Oncol* 2006;102:356-360.
- 221- Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms : relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005;11:350-359.
- 222- Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* 2002;76:10914-10920.
- 223- Nasseri M, Hirochika R, Broker TR, Chow LT. A human papillomavirus type 11 transcript encoding an E1—E4 protein. *Virology* 1987;159:433-439.
- 224- Ndoye A, Dolivet G, Hogset A, Leroux A, Fifre A, Erbacher P, Berg K, Behr JP, Guillemin F, Merlin JL. Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma xenografts using nonviral p53 gene therapy and photochemical internalization. *Mol Ther* 2006;13:1156-1162.
- 225- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-κB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001;75:4283-4296.

- 226- Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV 16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 2002;277:23958-23964.
- 227- Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Marton IJ. Expression of p16INK4A, p53, and pRb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:344-352.
- 228- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risso EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354:20-25.
- 229- Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12754-12759.
- 230- Ochert AS, Boulter AW, Birnbaum W, Johnson WW, Teo CG. Inhibitory effects of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR Methods Appl* 1994;3:365-368.
- 231- Oetke C, Auvinen E, Pawlita M, Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch Virol* 2000;145:2183-2191.
- 232- Oren M. The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* 1992;11:141-148.
- 233- Orth G, Favre M, Majewski S, Jablonska S. Epidermodysplasia verruciformis defines a subset of cutaneous human papillomaviruses. *J Virol* 2001;75:4952-4953.
- 234- Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6 : Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:41-46.
- 235- Park P, Copeland W, Yang L, Wang T, Botchan MR, Mohr IJ. The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8700-8704.
- 236- Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck : striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 2005;55:242-258.
- 237- Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79:595-604.
- 238- Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002;40:886-891.

- 239- Penrose KJ, McBride AA. Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* 2000;74:6031-6038.
- 240- Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today* 1998;19:414-421.
- 241- Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 1988;53:539-547.
- 242- Piccini A, Storey A, Romanos M, Banks L. Regulation of human papillomavirus type 16 DNA replication by E2, glucocorticoid hormone and epidermal growth factor. *J Gen Virol* 1997;78:1963-1970.
- 243- Polyak K. Negative regulation of cell growth by TGF beta. *Biochim Biophys Acta* 1996;1241:185-199.
- 244- Popescu NC, DiPaolo JA. Integration of human papillomavirus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalized human keratinocyte lines. *Cancer Res* 1990;50:1316-1323.
- 245- Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauwers JM, Van Assche FA. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest* 1995;39:34-38.
- 246- Prades J-M, Schmitt T, Timoshenko A. Cancer de la langue. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-627-A-10, 2004, 13p.
- 247- Prétet JL, Dalstein V, Monnier-Benoit S, Delpeut S, Mougin C. High-risk HPV load estimated by Hybrid Capture II correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women. *J Clin Virol* 2004;31:140-147.
- 248- Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* 2005;73:1253-1263.
- 249- Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977;21:26-31.
- 250- Pyeon D, Newton MA, Sengupta S, Den Boon JA, Marsit CJ, Haugen TH, Smith EM, Kelsey KT, Turek LP, Lambert PF, Ahlquist P. Fundamental differences in cell-cycle deregulation in human papillomavirus-positive and -negative head/neck and cervical cancers. 23rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. September 1-7, 2006, Prague, Czech Republic;PS 21-2.
- 251- Rapp L, Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F1-19.

- 252- Remontet L, Buemi A, Jougl E, Estève J. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Réseau français des registres du cancer, Francim Hôpitaux de Lyon, Institut national de la santé et de la recherche médicale, Inserm, Institut de veille sanitaire, InVS, 2003.
- 253- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111.
- 254- Richart RM. Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1987;60:1951-1959.
- 255- Riley RR, Duensing S, Brake T, Munger K, Lambert PF, Arbeit JM. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 2003;63:4862-4871.
- 256- Rodrigo JP, Suarez C, Gonzalez MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, Garcia LA, Martinez JA. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope* 2001;111:1297-1301a.
- 257- Rodrigo Tapia JP, Alvarez Alvarez I, Martinez Sanchez JA, Lazo PS, Ramos S, Sampedro Nuno A, Suarez Nieto C. The relation between human papillomavirus and cellular DNA content in epidermoid carcinoma of the head and neck. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1996;47:343-347.
- 258- Rodrigo Tapia JP, Suarez NC, Sanchez Lazo P, Ramos S, Coto E, Alvarez V, Alvarez Alvarez I, Garcia Gonzalez LA, Martinez Sanchez JA. Molecular changes in epidermoid carcinoma of the oropharynx. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:24-31b.
- 259- Rommel O, Dillner J, Fligge C, Bergsdorf C, Wang X, Selinka HC, Sapp M. Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: basis for a virus-like particle ELISA. *J Med Virol* 2005;75:114-121.
- 260- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998;12:2061-2072.
- 261- Rosty C, Sheffer M, Tsafrir D, Stransky N, Tasfrir I, Peter M, de Crémoux P, de la Rochedordière A, Salmon R, Dorval T, Thiery JP, Couturier J, Radvanyi F, Domany E, Sastre-Garau X. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* 2005;24:7094-7104.
- 262- Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:55-61.
- 263- Rouvière H, Delmas A. Anatomie humaine descriptive, topographique et fonctionnelle. Tome 1. Tête et cou. 14<sup>ème</sup> édition. Ed. Masson, 1997, Paris (a).
- 264- Rouvière H, Delmas A. Anatomie humaine descriptive, topographique et fonctionnelle. Tome 2. Tronc. 14<sup>ème</sup> édition. Ed. Masson, 1997, Paris (b).

- 265- Ruutu M, Johansson B, Grenman R, Syrjanen S. Two different global gene expression profiles in cancer cell lines established from etiologically different oral carcinomas. *Oncol Rep* 2005;14:1511-1517.
- 266- Ruutu M, Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33-positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. *Int J Cancer* 2002;100:318-326.
- 267- Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:679-694.
- 268- Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL. Telomeres, telomerase and cancer: an endless search to target the ends. *Cell Cycle* 2004;39:1138-1150.
- 269- Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Greenberg MD, Lorincz AT. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000;283:87-93.
- 270- Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995;76:18886-1901.
- 271- Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001;286:3106-3114.
- 272- Schlecht NF. Prognostic value of human papillomavirus in the survival of head and neck cancer patients: an overview of the evidence. *Oncol Rep* 2005;14:1239-1247.
- 273- Schlegel R, Wade-Glass M, Rabson MS, Yang YC. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science* 1986;233:464-467.
- 274- Schwartz E, Freeze UK, Gissman L, Mayer W, Roggenbuck B, Strelau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-114.
- 275- Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1626-1636.
- 276- Sdek P, Zhang ZY, Cao J, Pan HY, Chen WT, Zheng JW. Alteration of cell-cycle regulatory proteins in human oral epithelial cells immortalized by HPV16 E6 and E7. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:653-657.
- 277- Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and

trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 1991;65:4860-4866.

278- Sedman T, Sedman J, Stenlund A. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* 1997;71:2887-2896.

279- Selinka HC, Giroglou T, Sapp M. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* 2002;299:279-287.

280- Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:702-706.

281- Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. *in Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, pp. 2077-2109.

282- Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 2002;94:102-107.

283- Shibuya K, Mathers CD, Bosch-Pinto C, Lopez AD, Murray CJL. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site : II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*. 2002 Dec 26;2:37. Epub 2002 Dec 26.

284- Shimada H, Matsubara H, Shiratori T, Shimizu T, Miyazaki S, Okazumi S, Nabeya Y, Shuto K, Hayashi H, Tanizawa T, Nakatani Y, Nakasa H, Kitada M, Ochiai T. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2006;97:554-561.

285- Sigstad E, Lie AK, Luostarinen T, Dillner J, Jellum E, Lehtinen M, Thoresen S, Abeler V. A prospective study of the relationship between prediagnostic human papillomavirus seropositivity and HPV DNA in subsequent cervical carcinomas. *Br J Cancer* 2002;87:175-180.

286- Simon M, Khan T, Schneider A, Pirsig W. Laryngeal carcinoma in a 12-year-old child. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:277-282.

287- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium : clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-968.

288-Slebos RJC, Yi Y, Carter J, Evjen E, Zhang X, Shyr Y, Murphy BM, Cmelak AJ, Burkey BB, Netterville JL, Levy S, Yorbrough WG, Chung CH. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:701-709.

289- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussman JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-772 (a).

- 290- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:449-455 (b).
- 291- Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Walboomers JM. Role of human papillomaviruses in cancer of the respiratory and upper digestive tract. *Clin Dermatol* 1997;15:415-425.
- 292- Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. HPV-mediated cervical carcinogenesis : concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006;208:152-164.
- 293- Souto Damin AP, Guedes Frazzon AP, de Carvalho Damin D, Beck Biehl H, Abruzzi de Oliveira L, Auler R, Marroni C, Alexandre CO. Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the esophagus by auto-nested PCR. *Dis Esophagus* 2006;19:64-68.
- 294- Sparkowski J, Mense M, Anders J, Schlegel R. E5 oncoprotein transmembrane mutants dissociate fibroblast transforming activity from 16-kilodalton protein binding and platelet-derived growth factor receptor binding and phosphorylation. *J Virol* 1996;70:2420-2430.
- 295- Steele C, Sacks PG, Adler-Storthz K, Shillitoe EJ. Effect on cancer cells of plasmids that express antisense RNA of human papillomavirus type 18. *Cancer Res* 1992;52:4706-4711.
- 296- Stern PL. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol* 2005;32S:S72-S81.
- 297- Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14152-14157.
- 298- Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL. Squamous cell carcinoma of the tonsils : a molecular analysis of HPV association. *Clin Cancer Res* 2002;8:1093-1100.
- 299- Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. Differential role for cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999;19:2109-2117.
- 300- Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 1999;9:379-386.
- 301- Sun Q, Tang SC, Pater MM, Pater A. Different HPV16 E6/E7 oncogene expression patterns in epithelia reconstructed from HPV16-immortalized human endocervical cells and genital keratinocytes. *Oncogene* 1997;15:2399-2408.

- 302- Sun YN, Lu JZ, McCance DJ. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 1996;216:219-222.
- 303- Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983;12:418-24.
- 304- Syrjanen K, Syrjanen S. Chapter 5: Epidemiology of genital HPV infections, CIN and cervical cancer. *Papillomavirus infections in human pathology*. London: Wiley; 2000 p. 132.
- 305- Syrjänen K, Syrjänen S. Natural history of cervical HPV infections and CIN. *In Papillomavirus Infections in Human Pathology*, Chichester, 2000, pp. 148-151.
- 306- Syrjanen KJ, Pyrhonen S, Syrjanen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg* 1983;21:147-153.
- 307- Syrjanen KJ. HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:885-891.
- 308- Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:721-728.
- 309- Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:449-455.
- 310- Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32S:S59-S66.
- 311- Syrjanen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol* 2003;192:123-128.
- 312- Tan SH, Gloss B, Bernard HU. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* 1992;20:251-256.
- 313- Thorner L, Bucay N, Choe J, Botchan M. The product of the bovine papillomavirus type 1 modulator gene (M) is a phosphoprotein. *J Virol* 1988;62:2474-2482.
- 314- Thorner LK, Lim DA, Botchan MR. DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol* 1993;67:6000-6014.
- 315- Tidy JA, Wrede D. Tumor suppressor genes : new pathways in gynecological cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1992;2:1-8.
- 316- Touze A, Mahe D, El Mehdaoui S, Dupuy C, Combita-Rojas AL, Bousarghin AL, Sizaret PY, Coursaget P. The nine C-terminal amino acids of the major capsid

protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. FEMS Microbiol Lett 2000;189:121-127.

317- Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. EMBO J 1991;10:449-457.

318- van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. Int J Cancer 2002;98:590-595.

319- Van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. J Gen Virol 1992;73:2653-2660.

320- Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, Sanbucher TM, Lin BY, Zou N, Chiang CM, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:4030-4035.

321- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. J Virol 2001;75:4467-4472.

322- Venuti A, Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Rahimi S, Vigili M. Presence of HPV in head and neck tumours : high prevalence in tonsillar localization. J Exp Clin Cancer Res 2004;23:561-566.

323- Varnell R, Helin K, Muller H. Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. J Biol Chem 2003; 278(46):46124-46137.

324- Villa LL, Vieira KB, Pei XF, Schlegel R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. Mol Carcinog 1992;6:5-9.

325- Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. FASEB J 1993;7:872-879.

326- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999;1:12-19.

327- Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J. Type specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. N Engl J Med 1999;341:1633-1638.

328- Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans S, Dillner J. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. New Engl J Med 1999;341:1633-1638.

329- Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 2001;20:4740-4749.

330- Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, Davy C, Masterson PJ, Walker PA, Laskey P, Omary MB, Doorbar J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* 2004;78:821-833.

331- Wang SS, Hildesheim WA. Chapter 5 : Viral and host factor in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:35-40.

332- Watheler MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* 1998;1:507-518.

333- Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyri A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24:736-747.

334- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-79.

335- Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. Histologie fonctionnelle. Medsi/Mc Graw Hill, 1988, Paris.

336- Wiatrak BJ, Wiatrak DW, Broker TR, Lewis L. Recurrent respiratory papillomatosis : a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *Laryngoscope* 2004;114:1-23.

337- Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kirnbauer R, Greer CE, Lowy D, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG et al. Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in an incident case-control study of cervical neoplasia. *J Infect Dis* 1995;172:1425-1430.

338- Wiest T, Schwartz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002;21:1510-1517.

339- Wilczynski SP, Lin B, Xie Y, Paz B. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998;152:145-156.

340- Willey JC, Broussoud A, Sleemi A, Bennett WP, Cerutti P, Harris CC. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomavirus 16 or 18. *Cancer Res* 1991;51:5370-5377.

- 341- Willman JH, Heinz D, Golitz LE, Shroyer KR. Correlation of p16 and pRb expression with HPV detection in Bowen's disease. *J Cutan Pathol* 2006;33:629-633.
- 342- Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* 2005;191:731-738.
- 343- Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptative immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 2005a;206:306-335.
- 344- Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol* 2005b;53:65-76.
- 345- Wittekindt C, Gultekin E, Weissenborn J, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol* 2005;62:72-80.
- 346- Wittekindt C, Gultekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol* 2005;62:72-80.
- 347- Wolf H, Seibl R. Benign and malignant disease caused by EBV. *J Invest Dermatol* 1984;83(1 Suppl):88s-95s.
- 348- Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001;357:1831-1836.
- 349- Wu EW, Clemens KE, Heck DV, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J Virol* 1993;67:2402-2407.
- 350- Xavier SD, Bussoloti Filho I, Lancellotti CL. Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies : preliminary study. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2005;71:510-514.
- 351- Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Lee SK, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2002;11:343-351.
- 352- Xu CL, Qian XL, Zhou XS, Zhao QZ, Li YC. Expression of HPV16-E6 and E7 oncoproteins in squamous cell carcinoma tissues of esophageal cancer and non-cancer tissues. *Ai Zheng* 2004;23:165-168.

353- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997;71:2463-2472.

354- Yankatas JR, Haizlip JE, Conrad M, Koval D, Lazarowski E, Paradiso AM, Rinehart CA Jr, Sarkadi B, Schlegel R, Boucher RC. Papilloma virus immortalized tracheal epithelial cells retain a well-differentiated phenotype. *Am J Physiol* 1993;264:1219-1230.

355- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, Adami HO, Gyllensten UB, Melbye M. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2194-2198.

356- Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. Alpha(6) integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:668-673.

357- Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, Nishihara T, Yamato K. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Ther* 2003;8:762-768.

358- You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley P. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004;117:349-360.

359- Yousem SA, Ohori NP, Sonmez-Alpan E. Occurrence of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasms. *Cancer* 1992;69:693-697.

360- Zerfass-Thome K, Zworschke W, Mannhardt B, Tindle R, Borz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996;13:2323-2330.

361- Zhao M, Rosenbaum E, Lopes Carvalho A, Koch W, Jiang WW, Sidransky D, Califano J. Feasibility of quantitative PCR-based saliva-rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005;117:605-610.

362- Zhou J, Sun XY, Louis K, Frazer IH. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* 1994;68:619-625.

363- Zhou XB, Guo M, Quan LP, Zhang W, Lu ZM, Wang QH, Ke Y, Xu NZ. Detection of human papillomavirus in Chinese squamous cell carcinoma and adjacent normal epithelium. *World J Gastroenterol* 2003;9:1170-1173.

364- zur Hausen H. Papillomavirus in anogenital cancer: the dilemma of epidemiologic approaches. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1680-1682.

365- zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996a;1288:F55-78.

366- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-350.

367- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690-698.

368- zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996b;122:3-13.

369- zur Hausen H. Viruses in human tumors--reminiscences and perspectives. *Adv Cancer Res* 1996c;68:1-22.

## **ANNEXES**

## **Publication N°3 :**

*The tumor suppressor PTEN inhibits EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 expression in FTC-133 thyroid carcinoma cells.*

M Soula-Rothhut, **C Coissard**, H Sartelet, C Boudot, G Bellon, L Martiny, B Rothhut.

Experimental Cell Research 2005; 304: 187-201

## **Introduction à la publication N°3**

Cette publication fait suite à notre travail effectué au cours de notre DEA au sein du Laboratoire de Biochimie, Unité Matrice Extra-Cellulaire et Régulations Cellulaires, CNRS UMR 6198 de l'Université de Reims.

Cette étude analyse l'effet de la protéine suppresseur de tumeur PTEN sur l'expression, induite par l'EGF, de la protéine matricielle thrombospondine-1 (TSP-1) et de l'inhibiteur tissulaire de métallo-proteinases matricielles TIMP-1.

# The tumor suppressor PTEN inhibits EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 expression in FTC-133 thyroid carcinoma cells

Mahdhia Soula-Rothhut<sup>a</sup>, Cyrille Coissard<sup>a</sup>, Hervé Sartelet<sup>a</sup>, Cédric Boudot<sup>a</sup>, Georges Bellon<sup>b</sup>, Laurent Martiny<sup>a</sup>, Bernard Rothhut<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Unité Matrice Extracellulaire et Régulations Cellulaires, CNRS UMR 6198, Laboratory of Biochemistry, University of Reims Champagne-Ardenne, Moulin de la Housse, 51687 Reims Cedex 2, France  
<sup>b</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, CNRS UMR 6198, Faculty of Medicine, F-51095, Reims Cedex 2, France

Received 15 May 2004, revised version received 29 October 2004  
Available online 23 November 2004

## Abstract

Thrombospondin-1 (TSP-1) is a multidomain extracellular macromolecule that was first identified as natural modulator of angiogenesis and tumor growth. In the present study, we found that epidermal growth factor (EGF) up-regulated TSP-1 expression in FTC-133 (primary tumor) but not in FTC-238 (lung metastasis) thyroid cancer cells. Both EGF and TSP-1 induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in a mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)-dependent manner. In FTC-133 cells, EGF induced proliferation in a TSP-1- and TIMP-1-dependent manner. In addition, we determined that re-expression of the tumor suppressor protein PTEN induced cell death, an effect that correlated with a block of Akt kinase phosphorylation. EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 promoter activity and protein expression were inhibited in FTC-133 cells stably expressing wtPTEN but not in cells expressing mutant PTEN. Furthermore, we found that wtPTEN inhibited EGF—but not TSP-1—stimulated FTC-133 cell migration and also inhibited invasion induced by EGF and by TSP-1. Finally, an antibody against TSP-1 reversed EGF-stimulated FTC-133 cell invasion as well as the constitutive invasive potential of FTC-238 cells. Overall, our results suggest that PTEN can function as an important modulator of extracellular matrix proteins in thyroid cancer. Therefore, analyzing differential regulation of TSP-1 by growth factors such as EGF can be helpful in understanding thyroid cancer development.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Thrombospondin-1; Epidermal growth factor; PTEN; PI3-kinase; Tissue inhibitor of metalloproteinase; Follicular thyroid carcinoma cell lines

## Introduction

Thrombospondin-1 is a multifunctional extracellular matrix protein that affects tumor growth through modulation of angiogenesis and other stromal biological functions [1,2]. Thrombospondin is expressed in various cell types under physiological and pathophysiological states including wound healing, angiogenesis, and neoplasia [3–5]. TSP-1 has many effects on cell function including adhesion [6,7], cytoskeletal organization [8], cell

motility [7,9], neurite outgrowth [10], cell–cell aggregation [11], proliferation [12], apoptosis [13,14], differentiation [15], and transcriptional regulation [16]. The involvement of TSP-1 in tumor progression remains complex and controversial since both stimulatory [17,18] and inhibitory [19,20] effects in angiogenesis have been described and assigned to up-regulation of matrix-degrading enzymes and their inhibitors. Expression of TSP-1 is up-regulated in response to various cytokines and growth factors including platelet-derived growth factor (PDGF), EGF, transforming growth factor (TGF-β), basic fibroblast growth factor (bFGF), and down-regulated by interleukin-1β, tumor necrosis factor α, interleukin-6, bFGF, hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), and interferon γ. EGF is a

\* Corresponding author. Fax: +33 3 26 91 83 66.

E-mail address: bernard.rothhut@univ-reims.fr (B. Rothhut).

potent mitogen and EGF receptor is commonly overexpressed in a variety of human cancers with the level of EGF receptor expression correlated to the increased metastatic potential of the tumors [21].

Oncogenes and oncosuppressor genes have also been shown to modulate expression of TSP-1 in cancer cells. Among them, the tumor suppressor PTEN, also known as MMAC1 and TEP1, has been shown to play an important role in the pathogenesis of a variety of human cancers including breast and thyroid [22]. The expression of PTEN in cells deficient in the wild-type gene product has revealed that the protein is involved in the modulation of cell growth, apoptosis [23], and interaction with the extracellular matrix, and inhibits cell migration, spreading, and focal adhesion [24]. The function of PTEN as a dual-specificity phosphatase and a major lipid phosphatase, appears to be down-regulation of the PI3-kinase product phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, which regulates Akt and complex downstream pathways affecting cell growth, migration, and survival.

In the present study, we found that EGF up-regulated TSP-1 expression in human follicular thyroid carcinoma cells derived from a primary tumor (FTC-133) but did not alter TSP-1 expression in FTC-238 cells derived from a lung metastases of the same patient. Moreover, we document for the first time that both EGF and TSP-1 induced TIMP-1 expression by multiple signal pathways including PI3-kinase/Akt and MAPK/ERK-dependent pathways. In FTC-133 cells, EGF stimulated cell proliferation in a TSP-1- and TIMP-1-dependent manner.

We also demonstrated that re-expression of the tumor suppressor protein PTEN induced cell death and down-regulated EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 gene transcription and protein expression. Both EGF- and TSP-1-stimulated FTC-133 cell migration and wtPTEN inhibited cell migration induced by EGF but not by TSP-1. Finally, EGF- and TSP-1-dependent (in FTC-133) as well as independent (in FTC-238) cell invasion, was inhibited by wtPTEN but not by the phosphatase inactive PTEN-C mutant and an antibody against TSP-1 reversed EGF-stimulated FTC-133 cell invasion as well as the invasive potential of FTC-238 cells in the absence of EGF.

## Materials and methods

### Cell culture and materials

The human follicular thyroid carcinoma cell lines FTC-133 and FTC-238 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM/Ham's F12 medium containing 2 mM glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in a humidified CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Human recombinant EGF and TIMP-1 were, respectively, from Upstate Biotechnology Inc. and Calbiochem (San Diego, CA, USA). TSP-1 was purified

from human platelets [25] and the absence of associated MMP-2 was verified by gelatin zymography. We also verified that the effects of purified TSP-1 mentioned in this study were not mediated by TSP-1-bound TGF-β1, by using an ELISA as described [25]. The MEK inhibitor U0126, the PI3 kinase inhibitor LY294002 and the p38 inhibitor SB203580 were purchased from Calbiochem. Rabbit polyclonal anti-TSP-1 was raised in our laboratory. Mouse monoclonal anti-human TSP-1 IgGs (MAB054 clone P10 and clone 3F355) and anti-TIMP-1 (clone 7–6C1) were, respectively, from Chemicon International (Temecula, CA, USA), US Biological (Swampscott, MA, USA), and Calbiochem. Anti-Akt and anti-phospho-Akt antibodies were obtained from New England Biolabs, Inc. Mouse monoclonal anti-β-actin antibody was purchased from Sigma. Rabbit anti-mouse IgG-peroxidase conjugate and goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate were from Amersham Pharmacia Biotech (Orsay, France).

### cDNA plasmids

PTEN-GFP plasmids (wild type and C124S mutant) were kindly donated by Dr. K. Yamada (N.I.H. Bethesda, USA). The TSP-1 promoter-driven luciferase (LUC) construct (−1290/+750) was from Dr. P. Bornstein (University of Washington, Seattle, USA) and Dr. M. Okamoto (Kyushu University, Fukuoka, Japan) and the TIMP-1 promoter-driven LUC construct (−1718/+95) was from Dr. I. Clark (University of East Anglia, Norwich, UK). HA-tagged Akt constructs (wild type and myristylated-Akt) were a kind gift from Dr. T. Franke (Columbia University, New York, USA). Green fluorescent protein (GFP) expression vector was from Clontech. The neomycin resistance pBK-CMV mammalian expression plasmid was purchased from Stratagene (La Jolla, CA).

### Immunoblotting and immunoprecipitation

Cultured cells were made quiescent by serum starvation for at least 24 h before preincubation with or without inhibitors for 30 min and then stimulated for the indicated times with human recombinant EGF or purified human TSP-1 at the concentrations indicated. The reactions were terminated by aspirating the medium and washing the cells with ice-cold PBS. Each dish was then treated with 300 µl lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride, and 1 µg/ml each aprotinin, leupeptin, pepstatin, antipain), placed on ice for 20 min and then centrifuged at 14,000 × g for 15 min at 4°C. Protein concentrations were measured using the protein assay from BIO-RAD. Two micrograms of monoclonal anti-hemagglutinin (HA) antibody was added to equal amounts of protein per sample and immunoprecipitation was then carried out as described [26]. Equal amounts of

protein (whole cell extracts and concentrated supernatants) was electrophoresed by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blot was stained with Ponceau S to confirm equal loading of proteins and then probed with the indicated antibodies. Immunoblots were developed using appropriate secondary horseradish peroxidase-coupled antibodies and an enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham). To ensure equal loading of proteins from whole cell extracts, the membranes were stripped and re-probed with an anti- $\beta$ -actin antibody under the same conditions as described above.

#### *Transfections and luciferase assay*

Cells ( $1.5 \times 10^6$ ) were co-transfected with 0.2  $\mu$ g of luciferase plasmid DNA, 50 ng of pRL-TK vector (Promega) together with the relevant expression vectors (i.e., wtPTEN, PTEN-C124S mutant or myr-Akt), using Lipofectamine 2000 reagent following the protocol provided by the supplier (Life Technologies, Rockville, MD, USA). At 24 h after transfection, the luciferase activity of the transient transfectant was assayed in a luminometer (Lumat Berthold Instrument) using the Dual-Luciferase kit from Promega (Madison, WI).

FTC-133 and FTC-238 cells ( $5 \times 10^6$ ) were transfected as described above with 5  $\mu$ g GFP or wild-type or mutant constructs of PTEN together with 5  $\mu$ g of pBK-CMV (required for stable selection). After 24 h of incubation, the cells were maintained in DMEM/Ham's F12 medium plus 10% FCS containing 800  $\mu$ g/ml G418 (Sigma) for selection of stably transfected cells. Following 2-week culture, drug-resistant colonies were expanded to generate clonal cell lines and were analyzed for expression of various constructs by Western blotting for GFP and PTEN.

#### *Cell growth assays*

DNA synthesis was measured by thymidine incorporation. Both cell lines were plated at  $1.5 \times 10^4$  cells per well in 10% FCS in a 96-well flat-bottomed microplate. Cells were allowed to attach, then incubated in serum-free medium overnight in the presence or absence of EGF, TSP-1 or TIMP-1. After 24 h of culture, cells were pulsed with [ $^3$ H]-thymidine for 6 h in order to determine the amount of radioactivity incorporated in the cells. To test the effects of anti-TSP-1, anti-TIMP-1 or appropriate IgG control antibodies on both EGF and TSP-1-mediated proliferation, they were incubated for 1 h prior to addition to cultured cells and repeating of the growth assays.

To confirm the effects of EGF, TSP-1, and TIMP-1 on cell proliferation, cell counts were performed. FTC-133 cells were plated in triplicate wells of 24-well plates and incubated for 24 h at 37°C. Cells were then serum starved for 24 h before stimulation. After 48 h, cells were trypsinized and counted on a hemacytometer.

#### *Detection of GFP-derived fluorescence by flow cytometry*

Cells transfected with GFP, wtPTEN, or PTEN-C alone or in combination with myrAkt constructs were washed in PBS, detached with EDTA and analyzed in a FACS Calibur System (Becton Dickinson) for GFP-derived fluorescence. The quantitative evaluation of cell populations was performed using a computer-based program (Cell Quest, Becton Dickinson).

#### *Detection of apoptosis by fluorescence microscopy*

Apoptosis was assessed morphologically by staining of transfected cells with the DNA intercalating dye bisbenzimide Hoechst 33342, which allows visualization of the nuclear chromatin pattern. The number of Hoechst-stained cells with pyknotic nuclei that were also GFP-positive were quantitated using a fluorescence microscope and photographed with a CDD camera.

#### *Sub-G1 and cell cycle analysis by flow cytometry*

Assays were performed in 100-mm dishes. To analyze the sub-G1 populations, cells were transiently transfected with GFP, wtPTEN or PTEN-C and then either left untreated or treated with EGF or TSP-1. After 24 h, both floating and adherent cells were pooled, centrifuged ( $1000 \times g$  for 5 min), resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), fixed by adding them drop-wise into ice-cold 70% ethanol while vortexing and kept at -20°C for at least 4 h. Fixed cells ( $0.5 \times 10^6$ ) were collected by centrifugation ( $1000 \times g$  for 10 min) and resuspended in PBS containing DNase-free RNase (1 mg/ml) and propidium iodide (50  $\mu$ g/ml).

To analyze the percentage of cells in G1, S, and G2/M phases of the cell cycle (among nonapoptotic populations), FTC-133 cells expressing the various constructs were selected with puromycin, seeded in 100-mm dishes and then either left untreated or treated with EGF or TSP-1. After 48 h, cells were trypsinized, and processed as described above.

Measurement of DNA content of nonapoptotic cells as well as ethanol-extracted low molecular weight DNA from apoptotic cells (sub-G1 population) was done using a fluorescence-activated cell sorter (Elite Beckman Coulter).

#### *Cell migration assay*

For detection of cell migration, in vitro 'scratch' wounds were created by scraping cell monolayers with a sterile pipette tip. After puromycin selection of cells expressing the various constructs, FTC-133 cells were grown to confluence on 3-cm wells, which were previously labeled with a traced line. After injury, the cells were gently washed with medium and stimulated with recombinant EGF or purified TSP-1. Cell migration was quantified by measuring the width of the cell-free zone (distance between the edges of the injured

monolayer) at four distinct positions 8 h after treatment using a computer-assisted microscope (Nikon Eclipse).

#### Cell invasion assay

Invasion of FTC-133 and FTC-238 cells in vitro was investigated using modified Boyden chambers (tissue culture treated, 6.5-mm diameter, 8- $\mu$ m pore size; Transwell Costar, Brumath, France). After puromycin selection of cells expressing the various constructs, FTC-133 and FTC-238 cells were trypsinized, suspended ( $0.25 \times 10^6$  cells/ml) in serum-free DMEM/Ham's F12 medium containing 0.2% BSA alone or supplemented with EGF (50 ng/ml) or TSP-1 (50  $\mu$ g/ml) and seeded onto membranes coated with 30  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Matrigel (ECM gel, Sigma). Neutralizing anti-TSP-1 (30  $\mu$ g/ml, clone 3F355) or control IgG antibodies were also added to the upper chamber of the transwell units. Medium containing 1% FCS was placed in the lower compartment of the chamber. After 48 h at 37°C, cells in the upper surface of the filters were removed by careful wiping with a cotton swab and the filters were fixed with methanol and stained with 0.5% crystal violet solution for 15 min. Invasive cells adhering to the undersurface of the filter were then counted using an inverted microscope.

## Results

#### EGF-induced TSP-1 protein expression is blocked by both inhibitors of MEK and PI3-kinase in FTC-133 cells

We first determined the expression of TSP-1 in FTC-133 and FTC-238 cells in response to EGF treatment and then

analyzed pathways that might be involved for this regulation. Quiescent cells were treated with 50 ng/ml EGF and harvested at different times. The level of the TSP-1 protein was analyzed by immunoblotting cellular extracts with a polyclonal anti-TSP-1 antibody. In unstimulated quiescent FTC-133 cells, TSP-1 protein expression was low (Fig. 1A). EGF stimulation led to an increase of TSP-1 levels detectable 2 h post-stimulation and continued to increase until 24 h. In quiescent FTC-238 cells, TSP-1 was already detected in unstimulated cells and EGF did not alter the constitutive expression of the protein.

In order to investigate the pathways connecting EGF to the induction of TSP-1, we tested the effect of U0126, an inhibitor of MEK (the dual-specificity kinase that activates p42/p44 MAPK/ERK by phosphorylation), SB203580 an inhibitor of p38 MAP kinase and LY294002 an inhibitor of PI3-kinase. Both U0126 and LY294002 inhibited EGF-induced TSP-1 expression in FTC-133 cells whereas SB203580 had no effect (Fig. 1B). Treatment of FTC-238 cells with these drugs also inhibited the constitutive expression of TSP-1 (data not shown).

#### EGF stimulates TSP-1 promoter activity in a time- and dose-dependent manner and depends upon MEK and PI3-kinase activities

To determine whether EGF was able to induce TSP-1 promoter activity, we used the -1290 base pair (bp) human TSP-1 promoter fragment linked to the *firefly* luciferase reporter gene (pGL3-basic) [27]. Quiescent cells transiently transfected with this construct were treated with EGF for different times (time course; Fig. 2A) and at different concentrations (dose response; Fig. 2B). The time course of

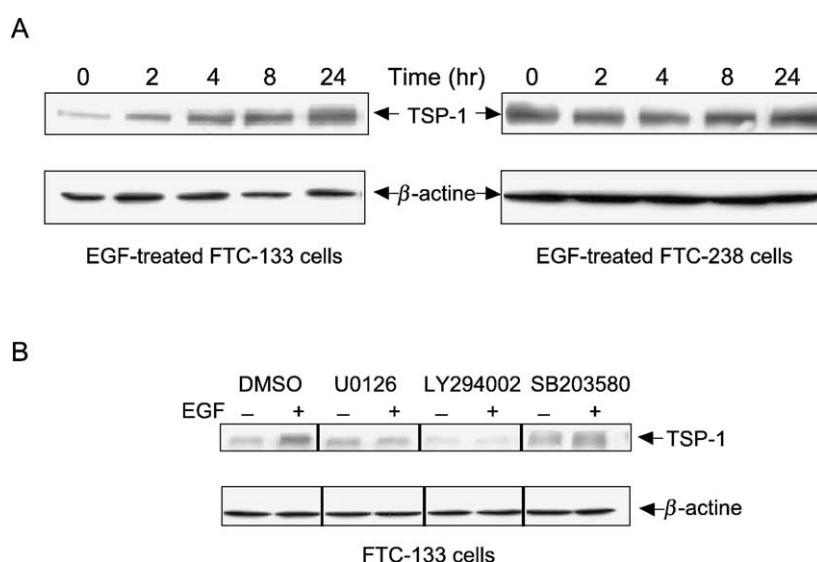


Fig. 1. EGF stimulates TSP-1 protein expression in a MAPK/ERK- and PI3-kinase-dependent manner. FTC-133 cells were cultured without serum for 24 h then incubated with EGF (50 ng/ml) for the indicated periods (0, 2, 4, 8, 24 h), or treated (B) for 24 h with EGF in presence or absence of U0126 (25  $\mu$ M), LY294002 (25  $\mu$ M), or SB203580 (25  $\mu$ M). Same amount of protein was separated by SDS-PAGE with 7.5% polyacrylamide gels. The level of TSP-1 protein was determined by Western blot with specific antibody. For loading controls, the blots were stripped and reprobed with an anti-β-actin antibody.

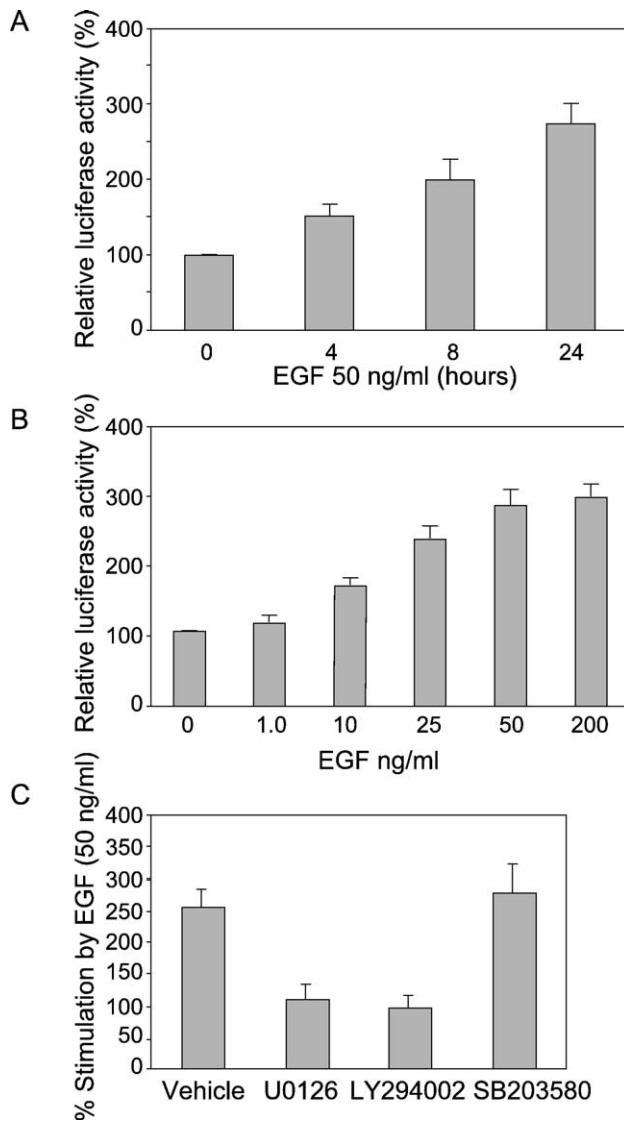


Fig. 2. EGF stimulates TSP-1 promoter activity in a time- and dose-dependent manner and is dependent upon MEK and PI3K activities. Quiescent cells transiently transfected with the -1290/+750 bp TSP-1 promoter construct (pGL3) were treated with 50 ng/ml EGF for the time points as indicated (A) and with the different concentrations of EGF for 24 h as indicated (B). Cells were harvested and luciferase activity normalized by *renilla* luciferase activity was expressed in relative units to EGF stimulation. Basal luciferase activity (unstimulated sample) was established as 100%. (C) Quiescent cells transiently transfected with the -1290/+750 bp TSP-1 promoter construct were pretreated or not (vehicle) with U0126, LY294002, or SB203580 at the concentrations as indicated in Fig. 1. Luciferase reporter gene activity was analyzed 24 h after the addition of EGF. The data are shown as the means  $\pm$  SE (error bars) of three independent experiments each run in triplicate.

EGF-stimulated TSP-1 promoter/reporter activity showed an increase that was significantly different from control at 4 h (1.5-fold) and reached 3-fold at 24 h. The kinetic in TSP-1 promoter gene activity induced by EGF was exactly correlated with the increase in TSP-1 protein expression as shown in Fig. 1A. EGF also stimulated TSP-1 promoter in a concentration-dependent manner reaching 3-fold above basal level at 200 ng/ml for a 24-h stimulation.

Treatment with U0126 and LY294002 inhibited EGF-induced promoter activation whereas SB203580 had no effect (Fig. 2C). Again, EGF did not induce TSP-1 promoter activity in FTC-238 cells (data not shown). These results indicate that the induction of TSP-1 by EGF in FTC-133 cells is dependent on MAPK/ERK activation and suggest an involvement of PI3 kinase.

#### Both EGF and TSP-1 induce TIMP-1 protein expression in FTC-133 cells

Quiescent FTC-133 cells were stimulated with EGF (50 ng/ml) or TSP-1 (25  $\mu$ g/ml) for 24 h. Both agonists led to an induction of TIMP-1 protein levels detectable at 4 h for EGF (Fig. 3A) and 6 h for TSP-1 (Fig. 3B) and continued to increase until 24 h. In FTC-238 cells, TIMP-1 protein was already observed in control cells and neither EGF nor TSP-1 altered TIMP-1 protein expression (not shown). Fig. 3C shows that a neutralizing monoclonal antibody against TSP-1 (clone P10) inhibited EGF-induced TIMP-1 protein expression whereas a normal IgG had no effect.

#### EGF and TSP-1 induce TIMP-1 promoter and protein expression in a MAPK/ERK and PI3-kinase-dependent manner

Quiescent FTC-133 cells pre-incubated or not with U0126 (Fig. 4A) or LY294002 (Fig. 4B) were treated with EGF or TSP-1. Both inhibitors are potent at inhibiting EGF and TSP-1-induced TIMP-1 protein expression. To further determine whether the regulation is at the transcriptional level, quiescent cells transiently transfected with the TIMP-1 promoter were stimulated with EGF or TSP-1 in presence or absence of the inhibitors. As shown in Fig. 4C, stimulation with both agonists increased TIMP-1

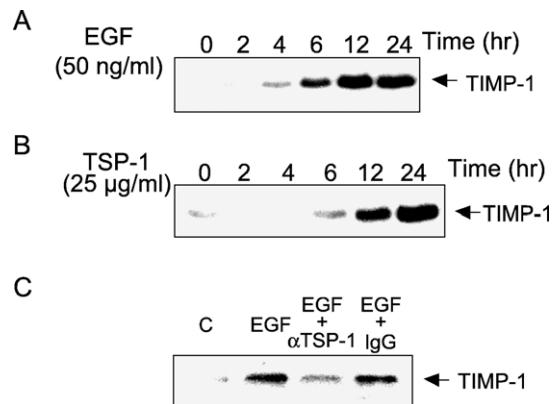
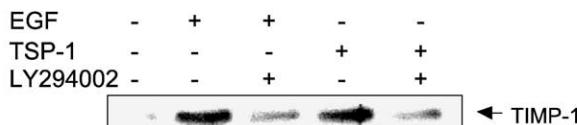
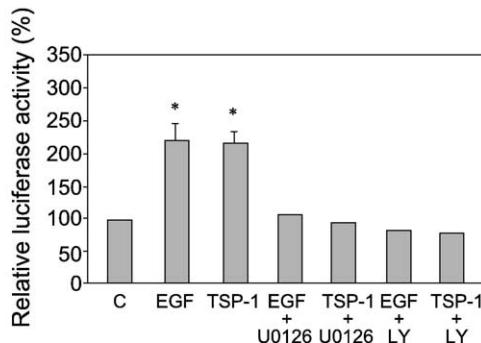


Fig. 3. EGF and TSP-1 induce TIMP-1 protein expression. FTC-133 cells were incubated with EGF (50 ng/ml) (A) or TSP-1 (25  $\mu$ g/ml) (B) for different times (0, 2, 4, 6, 12, and 24 h). Same amount of supernatant was separated by SDS-PAGE (10% gels) and the level of TIMP-1 protein was determined by Western blot with specific antibody. (C) TIMP-1 protein expression was induced by EGF (50 ng/ml) for 6 h in the absence (C) or presence of a monoclonal antibody against TSP-1 ( $\alpha$ TSP-1) or control IgG.

**A****B****C**

**Fig. 4.** EGF and TSP-1 induce TIMP-1 protein and promoter activity in a MAPK/ERK- and PI3-kinase-dependent manner. Serum-starved FTC-133 cells pretreated with U0126 (25  $\mu$ M) (A) or LY294002 (25  $\mu$ M) (B) were stimulated with EGF (50 ng/ml) or TSP-1 (25  $\mu$ g/ml) for 24 h. Supernatants were collected and TIMP-1 protein levels were examined by Western blot analysis. (C) Cells were transfected with  $-1718/+95$  bp TIMP-1 promoter/luciferase reporter construct. Twenty-four hour after transfection, cells were preincubated with U0126 or LY294002 for 30 min and treated with EGF or TSP-1 for 24 h. The luciferase activity normalized by *renilla* luciferase activity was expressed in relative units to EGF or TSP-1 stimulation (mean  $\pm$  SE of three independent experiments performed in triplicate). Basal luciferase activity (unstimulated sample) of the reporter construct was established as 100%. \*, significantly different compared with control or with inhibitors ( $P < 0.05$ ; Student's *t* test).

promoter activity, an effect that was inhibited by U0126 and LY294002. TIMP-1 promoter activity is also regulated by EGF and TSP-1 in a time- and dose-dependent manner (not shown).

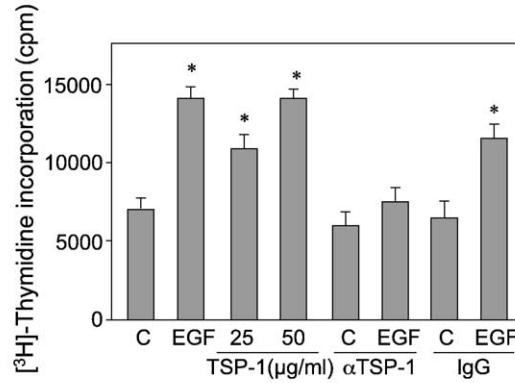
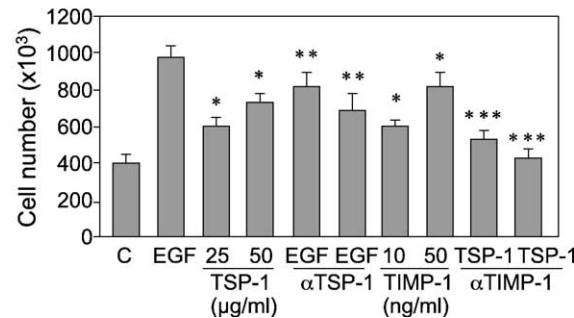
#### EGF induces proliferation of FTC-133 cells in a TSP-1 and TIMP-1-dependent manner

We then evaluated the effect of EGF and TSP-1 on FTC-133 cell proliferation by measuring [ $^3$ H]-thymidine incorporation. Fig. 5A shows that both EGF and TSP-1 induced an increase in DNA synthesis. The effect of EGF was inhibited when preincubated with a monoclonal anti-TSP-1 antibody showing that the effect of EGF on cell proliferation was mediated in part by the induction of TSP-1. To confirm the results of thymidine incorporation, we also performed cell counts. Again, we found that EGF and TSP-1 induced an increase in cell number compared with untreated cells (Fig. 5B). In addition, we found that TIMP-1 increased cell

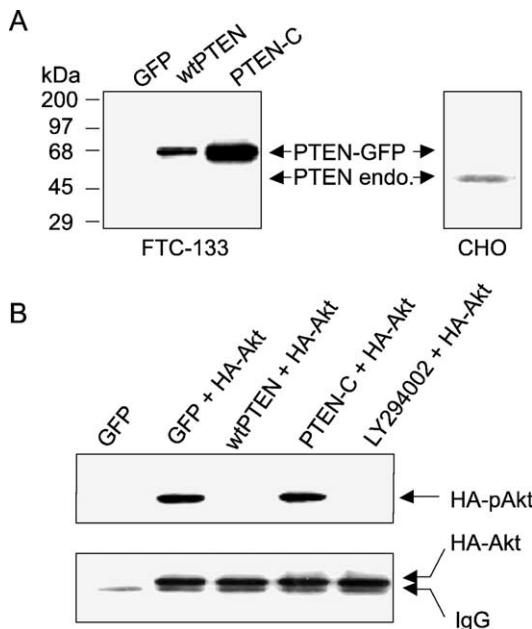
counts in a dose-dependent manner and that a monoclonal antibody against TIMP-1 could reverse the induction by TSP-1.

#### Overexpression of wtPTEN inhibits phosphorylation of Akt kinase

Weng et al. [28] showed that FTC-133 cells do not express PTEN protein due to hemizygous deletion and mutation in the other allele. We performed Western blotting and confirmed that these cells lack endogenous PTEN protein compared to Chinese hamster ovary (CHO) cells as a control (Fig. 6A). We then transiently transfected FTC-133 cells with plasmids encoding wtPTEN and PTEN-C124S mutant constructs and show that both transgenes are expressed in FTC-133 cells. However, wtPTEN was always expressed at much lower levels

**A****B**

**Fig. 5.** EGF, TSP-1, and TIMP-1 induce FTC-133 cell proliferation. (A) Cells were plated in 24-well plates, quiesced in serum-free medium and left untreated or incubated with 50 ng/ml EGF, 25 or 50  $\mu$ g/ml TSP-1, an antibody against TSP-1 ( $\alpha$ TSP-1, 50  $\mu$ g/ml), or control IgG alone or in the presence of EGF (50 ng/ml). DNA synthesis was determined by incorporation of [ $^3$ H]-thymidine as described under Materials and methods. Data are expressed as the means  $\pm$  SE of triplicate wells. \*,  $P < 0.05$  versus control (B) Cells were plated in 24-well plates and treated for 24 h with EGF (50 ng/ml) alone or in the presence of  $\alpha$ TSP-1 (25 and 50  $\mu$ g/ml); with TSP-1 (25 and 50  $\mu$ g/ml) alone or in the presence of  $\alpha$ TIMP-1 (2.5 and 5  $\mu$ g/ml) or with TIMP-1 (10 and 50 ng/ml). After 48 h, cells were trypsinized and counted. Cell numbers are expressed as the means  $\pm$  SE of triplicate wells. \*,  $P < 0.05$  versus control; \*\*,  $P < 0.05$  versus EGF alone; \*\*\*,  $P < 0.05$  versus 50  $\mu$ g/ml TSP-1.



**Fig. 6.** Re-expression of wtPTEN completely inhibits Akt phosphorylation. (A) FTC-133 cells were transfected with GFP, wtPTEN, or PTEN-C124S expression plasmids. PTEN protein levels in FTC-133 cells (endogenous and PTEN-GFP) and CHO cells (endogenous) were examined by Western blot analysis. (B) Quiescent cells were transiently transfected with GFP alone, with HA-tagged Akt together with GFP, wtPTEN or PTEN-C124S mutant or with HA-Akt alone and treated with LY294002. Cells were lysed and Akt was immunoprecipitated with a monoclonal anti-HA antibody. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with an anti-phospho-Akt antibody (upper panel) or re-probed with an anti-Akt antibody (lower panel) to ensure that equal amount of protein had been immunoprecipitated. The data shown are representative Western blots from two (A) or three (B) experiments with similar results.

compared to mutant PTEN. In PTEN deficient cells, Akt is constitutively phosphorylated and activated [29]. To test whether PTEN inhibits Akt phosphorylation in FTC-133 cells, we overexpressed either wtPTEN or phosphatase dead mutant C124S together with an HA-tagged Akt construct. Fig. 6B shows that re-expression of wtPTEN completely inhibited Akt phosphorylation, as did the PI3-kinase inhibitor LY294002 whereas PTEN mutant had no effect.

**Table 1**  
wtPTEN affects cell survival and apoptosis

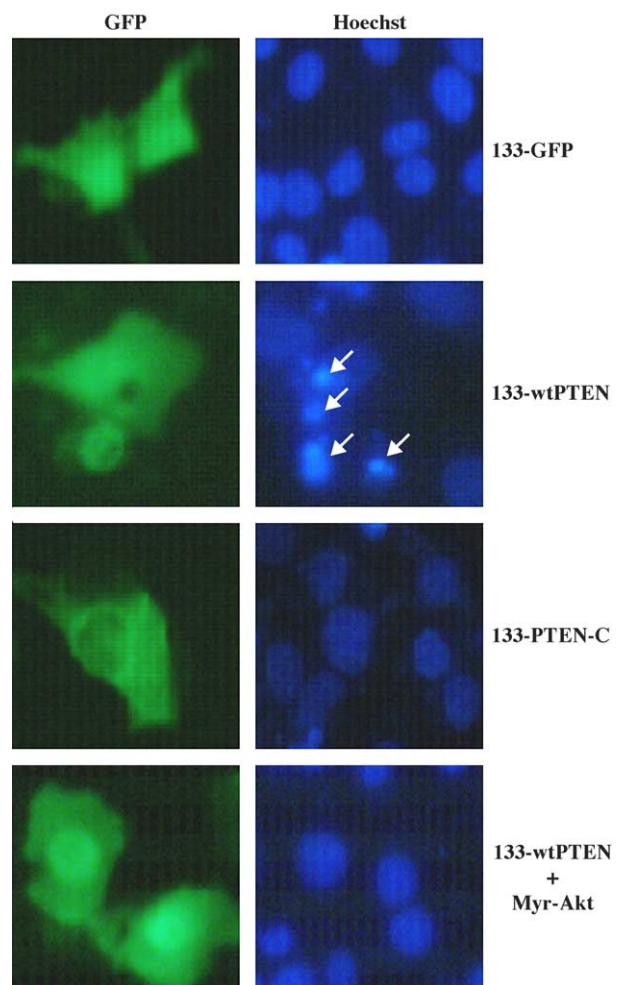
Constructs	% GFP <sup>+</sup> cells <sup>a</sup>	% of apoptotic cells <sup>a</sup>
Empty vector	0.05 ± 0	
GFP	12.29 ± 3.2	5 ± 1
GFP + myrAkt	12.67 ± 2.1	ND <sup>b</sup>
wtPTEN	6.89 ± 1.1	49 ± 5
wtPTEN + myrAkt	13.66 ± 2.0	12 ± 2
PTEN-C	12.31 ± 1.9	15 ± 3
PTEN-C + myrAkt	12.83 ± 2.4	ND

<sup>a</sup> Values represent the mean ± SD from triplicate determinations.

<sup>b</sup> ND, not determined.

### Active PTEN induces apoptosis of FTC-133 cells

It is now known that ectopic expression of PTEN induces cell-type-dependent cell death in a variety of cancer cell lines. In order to test this hypothesis, we first transfected FTC-133 cells with GFP, the various PTEN-GFP plasmids alone or in combination with a constitutively active Akt construct (myr-Akt). The percentage of GFP<sup>+</sup> cells was then analyzed by FACS and the results are summarized in Table 1. When wtPTEN was transfected, there was clearly less GFP-derived fluorescence measured compared to GFP or PTEN-C construct. The expression of myr-Akt by itself did not affect the percentage of GFP<sup>+</sup> cells but prevented the reduction induced by wtPTEN.



**Fig. 7.** wtPTEN induces apoptosis of FTC-133 cells. Apoptosis was assessed following transfection with the GFP expressing vector, with PTEN-C or vector encoding wtPTEN alone or with myr-Akt. Cells were stained with Hoechst 33342 and fluorescence was observed in microscopic fields (GFP). Hoechst stain of the same field of cells showing the nuclei of both GFP<sup>+</sup> and GFP<sup>-</sup> cells (Hoechst). Cells transfected with wtPTEN become rounded and display pycnotic nuclei (arrows). A statistical analysis of these assays obtained by counting the % of cells with apoptotic nuclei from the GFP<sup>+</sup> population is shown in Table 1.

To confirm that the reduced number of GFP<sup>+</sup> cells following wtPTEN was due to increased apoptosis, we performed the same transfection experiments but determined the percentage of GFP positive cells with pyknotic nuclei (a feature of apoptosis). As shown in Fig. 7, FTC-133 cells re-expressing wtPTEN underwent apoptosis at a significant higher rate than cells containing GFP. The phosphatase inactive form of PTEN (C124S mutant) also induced some apoptosis (15%). Co-expression of a constitutively active Akt mutant (myr-Akt) overcame the ability of wtPTEN to induce apoptosis. See also Table 1 for a quantitative determination.

Analysis of the sub-G1 population is indicative of cell death and is considered to be a marker of apoptosis [30]. We therefore also determined the sub-G1 hypodiploid nuclei of cells by flow cytometry after transient transfection with the different constructs in the presence or absence of EGF or TSP-1. As shown in Fig. 8, approximately 50% of the cells entered into the sub-G1 fraction with wtPTEN and neither EGF nor TSP-1 could modulate this induction. We also found a good correlation between the two methods used to measure the percentage of apoptosis, i.e., Hoechst staining and sub-G1. It is worth noting that overexpression of the phosphatase inactive mutant also caused significantly cell death, although much less than that induced by wild type, suggesting that PTEN-mediated apoptosis can be phosphatase dependent and independent.

#### *Transfection of wtPTEN correlates with inhibition of EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 promoter and protein expression*

To investigate whether wtPTEN inhibits TSP-1 at the transcriptional level, we examined its effects on the activity

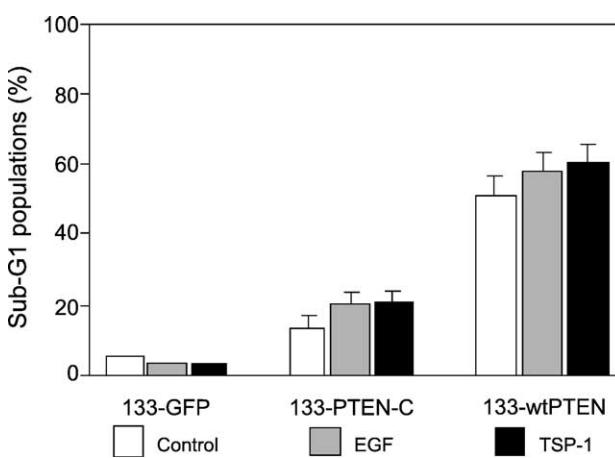


Fig. 8. Transfection with wtPTEN increases sub-G1 populations in FTC-133 cells. Cells were transiently transfected with GFP, wtPTEN, or PTEN-C constructs and then treated with or without EGF or TSP-1 for 24 h. Both floating and adherent cells were harvested and processed for flow cytometry. The percentage of apoptotic cells (sub-G1 populations) was estimated based on DNA staining with propidium iodide. Results are shown as the means  $\pm$  SE (error bars) of triplicate of dishes.

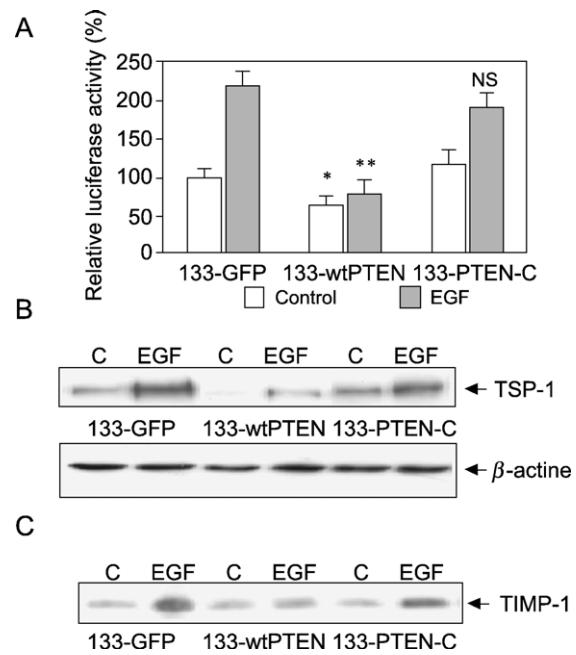


Fig. 9. wtPTEN inhibits EGF induced TSP-1 promoter activity and protein expression. (A) GFP, wtPTEN, or PTEN-C were co-transfected with pBK-CMV in FTC-133 cells and selected by neomycin. Cells were made quiescent and were transiently transfected with  $-1290/+750$  bp TSP-1 promoter/luciferase reporter construct. Twenty-four hours after transfection, cells were either left untreated (□) or stimulated with 50 ng/ml EGF (■) for 24 h and luciferase reporter gene activity was analyzed as described in Fig. 3C. Data are expressed as the means  $\pm$  SE from three independent experiments, each performed in triplicate. \*, P < 0.05 versus 133-GFP cells for the control group; \*\*, P < 0.05 versus 133-GFP cells for the +EGF group; NS, not significantly different from 133-GFP cells for the +EGF group. (B) and (C) Cells were plated in 24-well plates, quiesced in serum free medium, then treated with or without EGF for 12 h. Supernatants were collected, cells were lysed, and equal amount of protein was separated by SDS-PAGE transferred onto nitrocellulose membranes and hybridized with an anti-TSP-1 and anti- $\beta$ -actin (B) or anti-TIMP-1 (C) antibody. The Western blots are representative of two independent experiments.

of the  $-1290$ -bp TSP-1 and  $-1718$ -bp TIMP-1 promoter luciferase constructs. Fig. 9A shows that wtPTEN is able to completely inhibit EGF-induced TSP-1 promoter activity whereas the phosphatase-inactive mutant had no effect. The effect of PTEN constructs on TSP-1 and TIMP-1 proteins expression was assessed on transfected cells that had been selected as described in Materials and methods. Figs. 9B and 9C show a complete inhibition of EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 proteins by wtPTEN but was not significantly affected by C124S mutant.

#### *Transfection of wtPTEN and cell cycle progression*

We analyzed the cell cycle distribution of cultured FTC-133 cells that were transfected with the different constructs and selected with puromycin in the absence or presence of EGF or TSP-1. Fig. 10 shows that EGF and TSP-1 were potent in inducing cell cycle progression in both FTC-133-GFP and FTC-133-PTEN-C cells. FTC-133-wtPTEN cells showed an increase in G1 phase of the cell cycle in control as

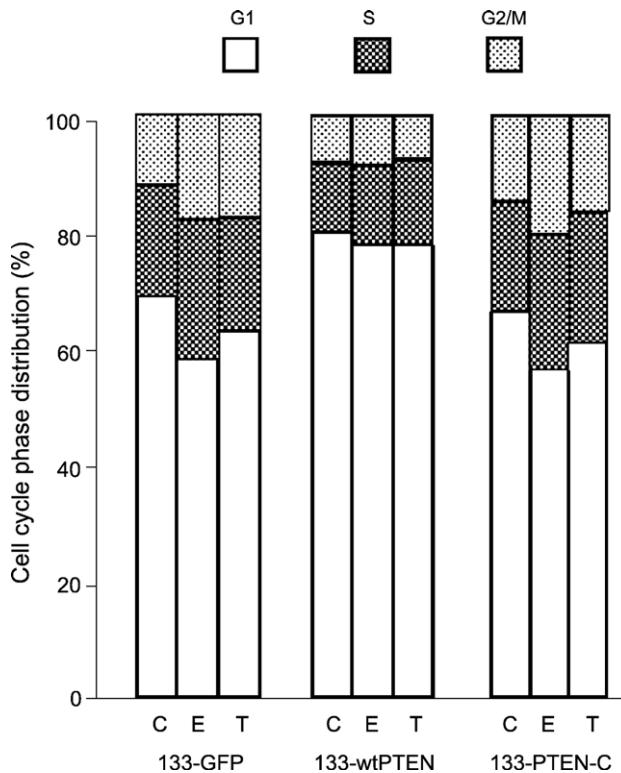


Fig. 10. The effect of *PTEN* overexpression on the FTC-133 cell cycle. GFP, wtPTEN, or PTEN-C were co-transfected with pBK-CMV in FTC-133 cells, selected by neomycin, and then either left untreated (C) or treated with EGF (E) or TSP-1 (T) for 48 h. Cells were then harvested and processed for flow cytometry analysis of DNA content as described in Materials and methods. The percentage of cells within each phase of the cell cycle (among the nonapoptotic cell population) is shown. Values are representative of one experiment out of two with identical results.

well as in EGF and TSP-1 treated cells. These results suggest that overexpression of wtPTEN induced both cell death and G1 arrest independently of EGF and TSP-1.

#### *wtPTEN alters EGF-mediated FTC-133 cell migration*

To address whether wtPTEN overexpression modulates the effects of EGF and TSP-1 on FTC-133 cell migration, we performed a scratch wound assay on cultured FTC-133 cells that were transfected with the different constructs. EGF and TSP-1 enhanced the migration of FTC-133 cells into the cell-free zone 8 h after wounding (Fig. 11). Overexpression of wtPTEN reduced FTC-133 cell migration both at baseline and after EGF but not after TSP-1 treatment. Moreover, in the presence of TSP-1, wtPTEN could not inhibit EGF-induced cell migration (not shown). As expected, PTEN-C did not affect basal migration nor had appreciable effects on EGF and TSP-1-induced migration.

#### *Role of wtPTEN in FTC-133 and FTC-238 cell invasion*

To address whether wtPTEN overexpression affects EGF and TSP-1-induced FTC-133 cell invasion, we performed

assays on cultured FTC-133 cells that were transfected with the different constructs. Both EGF and TSP-1 stimulated the invasion of 133-GFP and 133-PTEN-C cells (Fig. 12A). Overexpression of wtPTEN inhibited basal as well as EGF- and TSP-1-induced cell invasion.

To determine if EGF-stimulated TSP-1 production mediates FTC-133 cell invasion, we performed assays in the presence or absence of antibodies against TSP-1. We found that anti-TSP-1 antibody inhibited EGF-mediated invasion of 133-GFP and 133-PTEN-C cells compared to IgG control (Fig. 12A). Anti-TSP-1 antibody was also able to slightly but significantly inhibit basal invasion of 133-GFP and 133-PTEN-C cells (not shown).

We then also wanted to test the effects of wtPTEN and anti-TSP-1 antibody on the invasion of FTC-238 cells, which are basically more invasive than FTC-133 cells [31]. As shown in Fig. 12B, neither EGF nor TSP-1 were able to further stimulate the invasion of 238-GFP and 238-PTEN-C cells, but invasion of 238-wtPTEN cells was highly inhibited. Interestingly, in the absence of EGF, addition of anti-TSP-1 antibody inhibited the invasion of 238-GFP and 238-PTEN-C cells reaching the inhibition found in 238-wtPTEN-expressing cells.

Altogether, these results suggest that the inhibition of invasion induced by wtPTEN is mediated at least in part by the regulation of TSP-1 expression.

## Discussion

TSP-1, a multifunctional component of the extracellular matrix has been shown to modulate cell adhesion, migration, proliferation, and to influence angiogenesis and tumor progression. However, the regulation of TSP-1 expression in thyroid cancer cells has not yet been addressed. In the

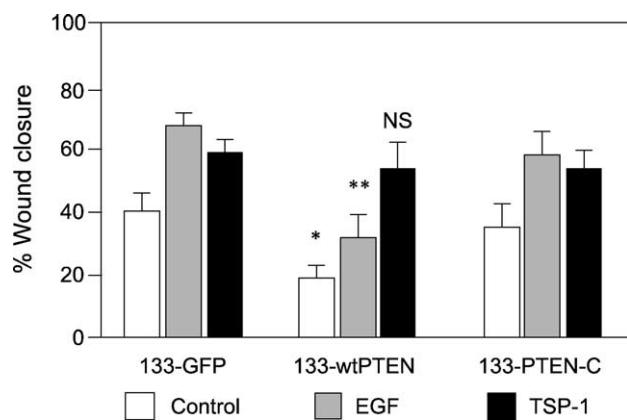


Fig. 11. wtPTEN inhibits EGF-induced cell migration. GFP, wtPTEN, or PTEN-C were co-transfected with pBK-CMV in FTC-133 cells and selected by neomycin. Cells were plated in 12-well plates and migration was quantified in the absence (□) or presence of EGF (▨) or TSP-1 (■) by the scratch method as described under Materials and methods. Data are expressed as the means  $\pm$  SE. \*, P < 0.05 versus 133-GFP cells for the control group; \*\*, P < 0.05 versus 133-GFP cells for the +EGF group; NS, not significantly different from 133-GFP cells for the +TSP-1 group.

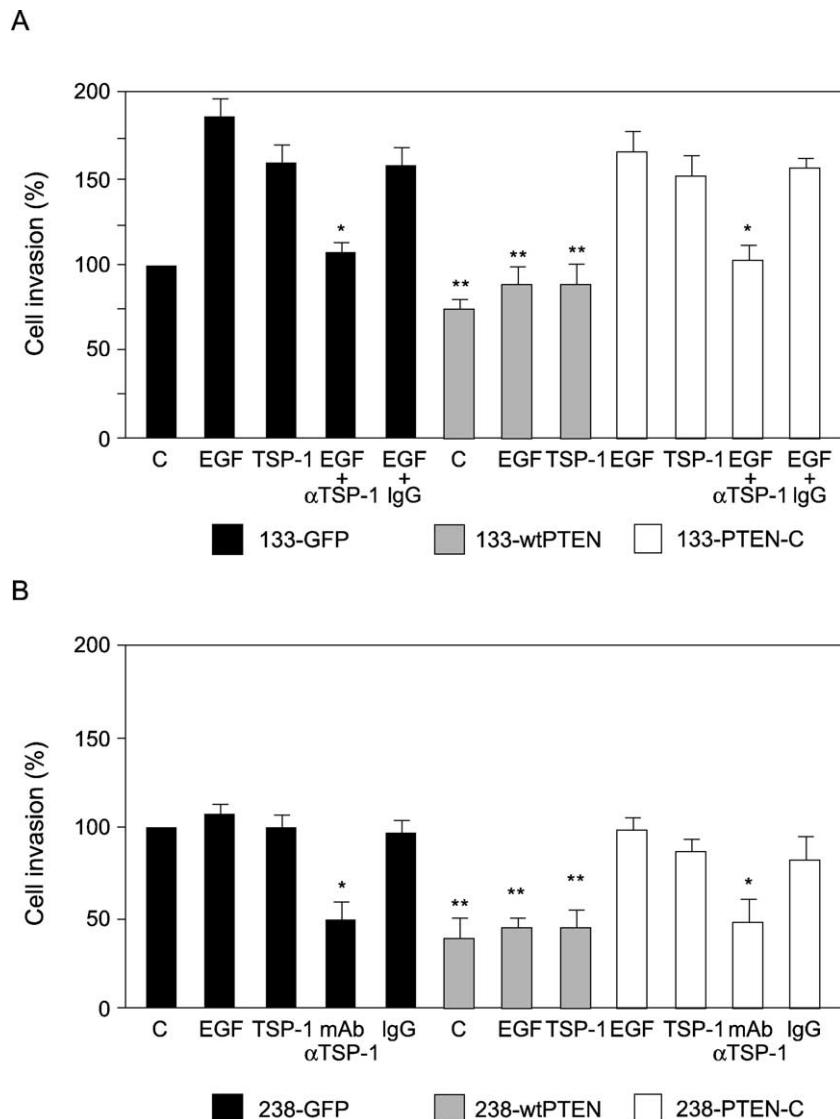


Fig. 12. wtPTEN inhibits EGF and TSP-1-induced FTC-133 cell invasion. GFP, wtPTEN, or PTEN-C were co-transfected with pBK-CMV in FTC-133 (A) and FTC-238 (B) cells and selected by neomycin. Cell invasion was measured on Transwell coated with Matrigel as described under Materials and methods. Cells were incubated with EGF (50 ng/ml) or TSP-1 (50 µg/ml), alone or in the presence of a neutralizing antibody against TSP-1 (30 µg/ml clone 3F355) or control IgG. After a 48-h incubation period, invading cells were stained with crystal violet and counted under an inverted microscope. Results are expressed as percent of control (133-GFP and 238-GFP, respectively) cell invasion and represent the means ± SE of triplicate wells. \*, P < 0.05 versus EGF for 133-GFP and versus control for 238-GFP cells (■); versus EGF for 133-PTEN-C and 238-PTEN-C cells (□). \*\*, P < 0.05 versus 133-GFP and 238-GFP cells (■) for respectively their control, EGF and TSP-1 groups.

present study, we documented for the first time that TSP-1 expression is regulated by EGF in FTC-133 cells through two major signaling pathways including PI3-kinase/Akt and MAPK/ERK. The regulation of TSP-1 and TIMP-1 promoters are complex and have been well documented [32–35]. For example Okamoto et al. [27] found that regulation of TSP-1 promoter activity by EGF relies on binding of Sp1 transcription factor to a GC-rich element and EGF-dependent activation of the MAPK/ERK pathway has been shown to modify the Sp1 factor to up-regulate the apolipoprotein A-1 promoter [36] and urokinase plasminogen activator receptor expression [37] in human cancer cell lines.

We also found that both EGF and TSP-1 induced TIMP-1 expression through the same signaling pathways and recently Sp1 transcription factor has also been shown to be involved in TIMP-1 regulation [38]. Studies are under way to map EGF stimulatory elements in the human TSP-1 and TIMP-1 promoters in these cells.

TSP-1 has been shown to be highly expressed in human malignant tissues and present in high levels in the plasma of cancer patients. Although its precise biological role in thyroid carcinoma cells has not yet been unambiguously determined, it has been well documented that the function of TSP-1 in tumor progression is complex and still controversial since both stimulatory and inhibitory effects have been described.

In the thyroid, several reports suggested a tumor inhibitory function of TSP-1. For example, expression analysis of TSP-1 by RT-PCR and immunohistochemistry showed its down-regulation in most aggressive tumors and seemed to correlate with thyroid tumor invasiveness [39]. Also, the degree of extra-thyroidal infiltration of the primary tumor was inversely correlated with the expression of TSP-1 [40]. In a p53-null anaplastic thyroid carcinoma cell line FRO, and contrary to previous data [41], it was shown that wt-p53 introduction leading to cell growth inhibition and radiosensitization, suppressed TSP-1 expression in FRO cells [42]. More recently, the same group reported that overexpression of TSP-1, which did not affect the *in vitro* cell growth, significantly inhibited the *in vivo* tumor growth and neovascularization but not tumorigenesis [43].

The effect of TSP-1 is also dependent upon binding to some receptors, i.e., CD36, CD47,  $\alpha\beta\gamma$  integrin, and the patterns of expression may vary in each organ [44]. However, CD36 on cells is not always correlated with an increase in TSP-1 binding as specific conformation of phosphorylation states of CD36 is required for the binding [45].

Overall differences in the effects of TSP-1 in thyroid carcinomas can depend upon the amount present in the stroma surrounding the tumor and the proteolytic state of the protein; can result from variations in the expression of receptors, of pro- and anti-angiogenic factors, of tumor suppressors and oncogenes; or can be due to up-regulation of matrix-degrading enzymes and their inhibitors. The overall effect of TSP-1 on tumor cells could therefore reflect the balance between anti-angiogenic forces versus invasive forces.

The effects of TSP-1 on cell proliferation are known to be cell-type dependent. For example, TSP-1 synergizes with growth factors such as EGF or PDGF to promote smooth muscle cell proliferation [46] and migration, the latter being dependent upon MAPK/ERK [47] and PI3-kinase signaling pathways [48].

EGF has been shown to enhance proliferation, migration, and invasion of follicular thyroid cancer *in vitro* and *in vivo* [31]. On the other hand, TSP-1 enhances migration of oligodendrocyte glial cells [49] and glioblastoma cell lines [50] and promotes the invasive properties of breast tumor cells [51]. In the present study, we found that TSP-1 was able to reproduce the effects of EGF on FTC-133 cell proliferation, migration, and invasion, and that anti-TSP-1 antibodies reversed the effect of EGF on proliferation and invasion. In addition, in the absence of EGF, the invasive potential of FTC-238 cells (derived from a lung metastasis) was also inhibited by antibodies against TSP-1. These findings support the hypothesis that TSP-1 plays an important role in thyroid cancer metastasis.

We also found that TSP-1 (Fig. 1A) and TIMP-1 (not shown) proteins are constitutively expressed in FTC-238 cells, independently of EGF treatment. TIMPs as components of ECM have been shown to be important in the

control of metastasis by inactivating matrix metalloproteinases (MMPs) [52,53]. However, TIMP-1 has also been shown to exhibit other functions independent of their MMP inhibitory activity. TIMP-1 has erythroid potentiating activity [54], promote cell growth in a wide range of cells [55], and has anti-apoptotic activity mediated by the PI3-kinase signaling pathway and the downstream phosphorylation of Akt/PKB [56].

In thyroid cancers, the biological role of TIMP-1 also remains controversial. For example, EGF had no effect on TIMP-1 expression in malignant human thyroid cell lines in contrast to the induction of MMP-1 in these cells [57], whereas Aust et al. [58] found that dedifferentiated thyroid carcinoma cell lines are potential producers of both MMP-1 and TIMP-1 but not normal thyrocytes. In other studies, TIMP-1 high scores significantly correlated with several unfavorable prognostic features such as large tumor size, presence of lymph node metastases, and high intra-thyroidal and vascular invasion. Immunolocalization of TIMP-1 was found largely in thyroid papillary carcinoma and much less frequently in the fibroblasts and endothelial cells in the tumor stroma [59]. Another immunohistochemical study showed strong TIMP-1 staining in the stroma cells of advanced stages of thyroid carcinomas and elevated mRNA of TIMP-1 correlated directly with tumor aggressiveness. However, overexpression of TIMP-1 by gene transfer resulted in a significant suppression of the malignant phenotype of NPA cells [60]. By cDNA arrays, 10 genes, including TIMP-1 and MMP-11, were found to be up-regulated in papillary thyroid carcinomas [61]. In conclusion, alterations in the level of TIMP-1 may lead to tumor invasiveness and metastases formation and shift the balance from apoptosis to cell survival and proliferation.

Therefore, it is tempting to suggest that TSP-1 could play a critical role in regulation of thyroid cell proliferation, migration and invasion and, by inducing TIMP-1, could potentiate proliferative and/or anti-apoptotic signals. However, we cannot rule out the possibility that TSP-1 may also play a critical role in the regulation of tumor cell invasion through up-regulation of MMPs and through the urokinase plasminogen activator receptor as it has been described [62–64]. In addition, it was found that FTC-238 cells exhibited a more complex array of proteases than FTC-133 cells, although 72- and 92-kDa gelatinases were present in the conditioned media from both cell lines [65]. We are currently analyzing the possible role and regulation of MMPs and of the plasminogen/plasmin system following EGF or TSP-1 treatment of FTC-133 and FTC-238 cells.

It has been demonstrated that both oncogene activation including ras [19], v-src [66], c-myc [67], c-jun [68] and loss of tumor-suppressor gene activation p53 [41], Smad [69], PTEN [70], and APC (adenomatous polyposis coli) [71] are associated with regulation of TSP-1 expression. The PTEN tumor suppressor is one of the most frequently mutated gene in human cancers. Loss of PTEN expression

has been shown to increase the metastatic potential of tumor cells by increasing the survival of cells involved in invasion. Wen et al. [70] showed that PTEN may negatively regulate the angiogenic response by the induction of TSP-1 expression in U87MG glioma cells but the increased angiogenesis associated with PTEN inactivation was not attributable to down-regulation of TSP-1 expression in prostate cancers [72]. In addition, PTEN suppression of cell invasion has recently been linked to modulation of MMP-2 [73] and MMP-9 [74]. On the other hand, it was found that the level of TSP-1 expression seemed to correlate with the degree of malignancy in glioma cells [75] and the involvement of TSP-1 expression by malignant gliomas in tumor invasion was suggested [50]. In this study, we found that lack of endogenous PTEN protein expression correlated with a high level of Akt/PKB phosphorylation. Ectopic expression of PTEN wild type completely inhibited Akt phosphorylation and induced apoptosis as revealed by Hoechst staining and by analyzing sub-G1 populations. In addition, we found that introduction of functional *PTEN* gene in FTC-133 tumor cells suppressed EGF-dependent TSP-1 expression possibly through inhibition of the PI3-kinase pathway implicated in the transduction of both proliferation and survival signals. Although the exact role of PI3 kinase in thyroid tumorigenesis is yet to be defined, it appears that molecules that lead to activation (receptor tyrosine kinases, ras, loss of PTEN expression and/or function) of this pathway, are involved in the development of thyroid tumors, indicating that activation of the PI3-kinase pathway(s) may represent a crucial event during thyroid carcinogenesis. Though, in a recent publication, Watnick et al. [76] found that Myc phosphorylation repressed TSP-1 expression through Ras induced activation of the PI3-K/Rho pathway independently of both Akt signaling and Raf/MAPK pathway. These results are in contradiction with what we have described here since these authors showed that treatment of high Ras-expressing cells with LY294002 restored TSP-1 protein levels. Therefore, we also performed pilot experiments using a dominant negative Ras construct, i.e., N17Ras and found an inhibition of both basal and EGF-stimulated TSP-1 promoter activity (not shown). Additional studies are necessary to clearly identify pathways downstream of PI3-K that are involved in TSP-1 regulation in thyroid cancer cells. Whether or not a cell-type-specific regulation of TSP-1 protein accounts for this disparity needs to be further investigated.

Overall our results suggested that TSP-1 is a positive effector in tumorigenesis of thyroid carcinomas as assessed by the stimulation of cell proliferation, migration, and invasion *in vitro*. We showed for the first time that expression of the tumor suppressor PTEN reduced EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 protein expression. By inhibiting TSP-1 synthesis, PTEN might reduce the invasive phenotype induced by EGF contributing to its tumor suppressive activity in these cells. A model of how PTEN, EGF, TSP-1, TIMP-1, and other factors mutually interact to

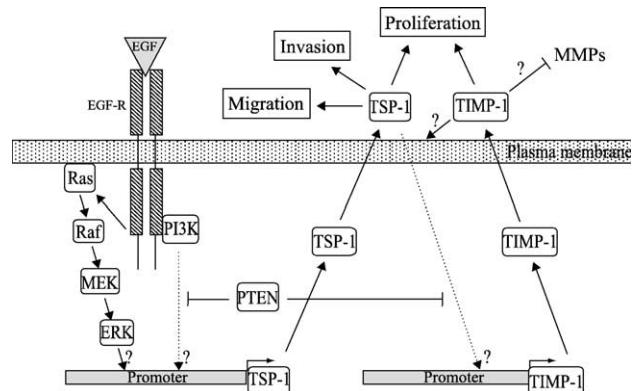


Fig. 13. Model of signaling pathways from EGF to TSP-1.

modulate growth and ECM for thyroid cancer cells is presented in Fig. 13.

In conclusion, the identification of potential novel targets regulated by PTEN, i.e., TSP-1 and possibly TIMP-1, involved in tumor progression, angiogenesis, and apoptosis, will help to better understand the functions of these proteins on tumorigenesis in thyroid carcinomas.

## Acknowledgments

This work was supported by CNRS, by Association pour la Recherche sur le Cancer Contract 7734, by Ligue Nationale contre le Cancer, Comité de la Marne and by Région Champagne-Ardenne. We thank Dr. François-Xavier Maquart (CNRS UMR 6198, Reims) for his constant support and Dr. Marie Claude Gendron (Institut Jacques Monod, Paris) for performing flow cytometry analysis.

## References

- [1] S.C. Hsu, O.V. Volpert, P.A. Steck, T. Mikkelsen, P.J. Polverini, S. Rao, P. Chou, N.P. Bouck, Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1, *Cancer Res.* 56 (1996) 5684–5691.
- [2] J. Lawler, M. Sunday, V. Thibert, M. Duquette, E.L. George, H. Rayburn, R.O. Hynes, Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 982–992.
- [3] P. Bornstein, Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin-1, *J. Cell Biol.* 130 (1995) 503–506.
- [4] D.D. Roberts, Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1, *FASEB J.* 10 (1996) 1183–1191.
- [5] J.C. Adams, Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions, *Annu. Rev. Dev. Biol.* 17 (2001) 25–51.
- [6] M.D. Kosfeld, W.A. Frazier, Identification of active peptide sequences in the carboxyl-terminal cell binding domain of human thrombospondin-1, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16230–16236.
- [7] J.C. Adams, J.J. Lawler, Diverse mechanisms for cell attachment to platelet thrombospondin, *Cell Sci.* 104 (1993) 1061–1071.
- [8] J.A. Greenwood, M.A. Pallero, A.B. Theibert, J.E. Murphy-Ullrich, Thrombospondin signaling of focal adhesion disassembly requires

- activation of phosphoinositide 3-kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1755–1763.
- [9] L. Chandrasekaran, C.Z. He, H. Al-Barazi, H.C. Krutzsch, M.L. Iruela-Arispe, D.D. Roberts, Cell contact-dependent activation of alpha $\beta$ 1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 2885–2900.
- [10] N. Guo, N.S. Templeton, H. Al-Barazi, J.A. Cashel, J.M. Sipes, H.C. Krutzsch, D.D. Roberts, Thrombospondin-1 promotes  $\alpha\beta$ 1 integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells, *Cancer Res.* 60 (2000) 457–466.
- [11] Y. Yamauchi, M. Kuroki, T. Imakiire, K. Uno, H. Abe, R. Beppu, Y. Yamashita, T. Shirakusa, Opposite effects of thrombospondin-1 via CD36 and CD47 on homotypic aggregation of monocytic cells, *Matrix Biol.* 21 (2002) 441–448.
- [12] R.A. Majack, S.C. Cook, P. Bornstein, Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 9050–9054.
- [13] G. Taraboletti, D.D. Roberts, L.A. Liotta, R.J. Giavazzi, Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor, *Cell Biol.* 111 (1990) 765–772.
- [14] B. Jimenez, O.V. Volpert, S.E. Crawford, M. Febbraio, R.L. Silverstein, N. Bouck, Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1, *Nat. Med.* 6 (2000) 41–48.
- [15] A. Vacca, L. Di Marcotullio, G. Giannini, M. Farina, S. Scarpa, A. Stoppacciaro, A. Calce, M. Maroder, L. Frati, I. Scrpanti, A. Gulino, Thrombospondin-1 is a mediator of the neurotypic differentiation induced by EGF in thymic epithelial cells, *Exp. Cell Res.* 248 (1999) 79–86.
- [16] Z. Li, L. He, K. Wilson, D.D. Roberts, Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation, *J. Immunol.* 166 (2001) 2427–2436.
- [17] G.P. Tuszyński, T.B. Gasic, V.L. Rothman, K.A. Knudsen, G.L. Gasic, Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis, *Cancer Res.* 47 (1987) 4130–4133.
- [18] V. Castle, J. Varani, S. Fligiel, E.V. Prochownik, V.M. Dixit, Antisense-mediated reduction in thrombospondin reverses the malignant phenotype of a human squamous carcinoma, *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 1883–1888.
- [19] V. Zabrenetsky, C.C. Harris, P.S. Steeg, D.D. Roberts, Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines, *Int. J. Cancer* 59 (1994) 191–205.
- [20] V. Castle, V.M. Dixit, P.J. Polverini, Thrombospondin-1 suppresses tumorigenesis and angiogenesis in serum- and anchorage-independent NIH 3T3 cells, *Lab. Invest.* 77 (1997) 51–61.
- [21] R. Radinsky, S. Risin, D. Fan, Z. Dong, D. Bielenberg, C. Bucana, I. Fidler, Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells, *Clin. Cancer Res.* 1 (1995) 19–31.
- [22] D. Liaw, D.J. Marsh, J. Li, P.L. Dahia, S.I. Wang, Z. Zheng, S. Bose, K.M. Call, H.C. Tsou, M. Peacocke, C. Eng, R. Parsons, Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome, *Nat. Genet.* 16 (1997) 64–67.
- [23] Y. Lu, Y.Z. Lin, R. LaPushin, B. Cuevas, X. Fang, S.X. Yu, M.A. Davies, H. Khan, T. Furui, M. Mao, R. Zinner, M.C. Hung, P. Steck, K. Siminovitch, G.B. Mills, The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells, *Oncogene* 18 (1999) 7034–7045.
- [24] M. Tamura, J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, K.M. Yamada, Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN, *Science* 280 (1998) 1614–1617.
- [25] D. Claisse, L. Martiny, B. Chaour, Y. Wegrowski, E. Petitfré, C. Schneider, B. Haye, G. Bellon, Influence of transforming growth factor b1 (TGF- $\beta$ 1) on the behaviour of porcine thyroid epithelial cells in primary culture through thrombospondin-1 synthesis, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 1405–1416.
- [26] L. Guillemot, A. Levy, Z.J. Zhao, G. Béréziat, B. Rothhut, The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 is required during angiotensin II-mediated activation of cyclin D1 promoter in CHO-AT1A cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 26349–26538.
- [27] M. Okamoto, M. Ono, T. Uchiumi, H. Ueno, K. Kohno, K. Sugimachi, M. Kuwano, Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human cancer cells—transcriptional activation and messenger RNA stabilization, *Biochim. Biophys. Acta* 1574 (2002) 24–34.
- [28] L.P. Weng, O. Gimm, J.B. Kum, W.M. Smith, X.P. Zhou, D. Wynford-Thomas, G. Leone, C. Eng, Transient ectopic expression of PTEN in thyroid cancer cell lines induces cell cycle arrest and cell type-dependent cell death, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 251–258.
- [29] D. Haas-Kogan, N. Shalev, M. Wong, G. Mills, G. Yount, D. Stokoe, Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC, *Curr. Biol.* 8 (1998) 1195–1198.
- [30] Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos, Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry* 13 (1992) 795–808.
- [31] T. Hoelting, A.E. Siperstein, O.H. Clark, Q.Y. Duh, Epidermal growth factor enhances proliferation, migration, and invasion of follicular and papillary thyroid cancer in vitro and in vivo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 401–408.
- [32] P. Framson, P. Bornstein, A serum response element and a binding site for NF-Y mediate the serum response of the human thrombospondin 1 gene, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4989–4996.
- [33] T. Shingu, P. Bornstein, Overlapping Egr-1 and Sp1 sites function in the regulation of transcription of the mouse thrombospondin 1 gene, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32551–32557.
- [34] D.R. Gewert, B. Coulombe, M. Castelino, D. Skup, B.R. Williams, Characterization and expression of a murine gene homologous to human EPA/TIMP: a virus-induced gene in the mouse, *EMBO J.* 6 (1987) 651–657.
- [35] B. Coulombe, A. Ponton, L. Daigneault, B.R. Williams, D. Skup, Presence of transcription regulatory elements within an intron of the virus-inducible murine TIMP gene, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 3227–3234.
- [36] X.L. Zheng, S. Matsubara, C. Diao, M.D. Hollenberg, N.C. Wong, Nerve growth factor uses Ras/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase cascades to upregulate the N-methyl-D-aspartate receptor 1 promoter, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 45372–45379.
- [37] D. Trisciuglio, A. Iervolino, A. Candiloro, G. Fibbi, M. Fanciulli, U. Zangemeister-Wittke, G. Zupi, D. Del Bufalo, bcl-2 induction of urokinase plasminogen activator receptor expression in human cancer cells through Sp1 activation: involvement of ERK1/ERK2 activity, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6737–6745.
- [38] M. Lee, S.U. Song, J.K. Ryu, J.K. Suh, Sp1-dependent regulation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter, *J. Cell. Biochem.* 91 (2004) 1260–1268.
- [39] G. Bunone, P. Vigneri, L. Mariani, S. Buto, P. Collini, S. Pilotti, M.A. Pierotti, I. Bongarzone, Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 1967–1976.
- [40] K. Tanaka, H. Sonoo, J. Kurebayashi, T. Nomura, S. Ohkubo, Y. Yamamoto, S. Yamamoto, Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 1125–1131.
- [41] K.M. Dameron, O.V. Volpert, M.A. Tainsky, N. Bouck, Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1, *Science* 265 (1994) 1282–1284.

- [42] M. Narimatsu, Y. Nagayama, K. Akino, M. Yasuda, T. Yamamoto, T.T. Yang, A. Ohtsuru, H. Namba, S. Yamashita, H. Ayabe, M. Niwa, Therapeutic usefulness of wild-type p53 gene introduction in a p53-null anaplastic thyroid carcinoma cell line, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 3668–3672.
- [43] Y. Nagayama, K. Shigematsu, H. Namba, K. Zeki, S. Yamashita, M. Niwa, Inhibition of angiogenesis and tumorigenesis, and induction of dormancy by p53 in a p53-null thyroid carcinoma cell line in vivo, *Anticancer Res.* 20 (2000) 2723–2728.
- [44] M. Patey, B. Delemer, G. Bellon, L. Martiny, M. Plout, B. Haye, Immunohistochemical study of thrombospondin and its receptors  $\alpha v\beta 3$  and CD36 in normal thyroid and in thyroid tumours, *J. Clin. Pathol.* 52 (1999) 895–900.
- [45] A.S. Asch, I. Liu, F.M. Briccetti, J.W. Barnwell, F. Kwakye-Berko, A. Dokun, J. Goldberger, M. Pernambuco, Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain, *Science* 262 (1993) 1436–1440.
- [46] R.A. Majack, L.V. Goodman, V.M. Dixit, Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation, *J. Cell Biol.* 106 (1988) 415–422.
- [47] V. Gahtan, X.J. Wang, A.I. Willis, G.P. Tuszyński, B.E. Sumpio, Thrombospondin-1 regulation of smooth muscle cell chemotaxis is extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 dependent, *Surgery* 126 (1999) 203–207.
- [48] A.I. Willis, S. Fuse, X.J. Wang, E. Chen, G.P. Tuszyński, Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C attenuates extracellular matrix protein-induced vascular smooth muscle cell chemotaxis, *J. Vasc. Surg.* 31 (2000) 1160–1167.
- [49] S. Scott-Drew, C. Ffrench-Constant, Expression and function of thrombospondin-1 in myelinating glial cells of the central nervous system, *J. Neurosci. Res.* 50 (1997) 202–214.
- [50] K. Amagasaki, A. Sasaki, G. Kato, S. Maeda, H. Nukui, H. Naganuma, Antisense-mediated reduction in thrombospondin-1 expression reduces cell motility in malignant glioma cells, *Int. J. Cancer* 94 (2001) 508–512.
- [51] T.N. Wang, X. Qian, M.S. Granick, M.P. Solomon, V.L. Rothman, D.H. Berger, G.P. Tuszyński, Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer, *J. Surg. Res.* 63 (1996) 39–43.
- [52] R. Khokha, M.J. Zimmer, C.H. Graham, P.K. Lala, P. Waterhouse, Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 84 (1992) 1017–1022.
- [53] A.M. Montgomery, B.M. Mueller, R.A. Reisfeld, S.M. Taylor, Y.A. DeClerck, Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line, *Cancer Res.* 54 (1994) 5467–5473.
- [54] T. Hayakawa, K. Yamashita, J. Kishi, K. Harigaya, Tissue inhibitor of metalloproteinases from human bone marrow stromal cell line KM 102 has erythroid-potentiating activity, suggesting its possibly bifunctional role in the hematopoietic microenvironment, *FEBS Lett.* 268 (1990) 125–128.
- [55] K. Brew, D. Dinakarpandian, H. Nagase, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1477 (2000) 267–283.
- [56] E. Lambert, C. Boudot, Z. Kadri, M. Soula-Roth hut, M. Sowa, P. Mayeux, W. Hornebeck, B. Haye, E. Petitfrère, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival, *Biochem. J.* 372 (2003) 767–774.
- [57] S. Korem, M.B. Resnick, Z. Kraiem, Similar and divergent patterns in the regulation of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of MMP-1 gene expression in benign and malignant human thyroid cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 3322–3327.
- [58] G. Aust, A. Hofmann, S. Laue, A. Rost, T. Kohler, W.A. Scherbaum, Human thyroid carcinoma cell lines and normal thyrocytes: expression and regulation of matrix metalloproteinase-1 and tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1 messenger-RNA and protein, *Thyroid* 7 (1997) 713–724.
- [59] H. Maeta, S. Ohgi, T. Terada, Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas, *Virchows Arch.* 438 (2001) 121–128.
- [60] Y. Shi, R.S. Parhar, M. Zou, M.M. Hammami, M. Akhtar, Z.P. Lum, N.R. Farid, S.T. Al-Sedairy, M.C. Paterson, Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) mRNA is elevated in advanced stages of thyroid carcinoma, *Br. J. Cancer* 79 (1999) 1234–1239.
- [61] V.-M. Wasenius, S. Hemmer, E. Kettunen, S. Knuutila, K. Franssila, H. Joensuu, Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 68–75.
- [62] X. Qian, T.N. Wang, V.L. Rothman, R.F. Nicosia, G.P. Tuszyński, Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells, *Exp. Cell Res.* 235 (1997) 403–412.
- [63] X. Qian, V.L. Rothman, R.F. Nicosia, G.P. Tuszyński, Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix metalloproteinase-9 production, *Pathol. Oncol. Res.* 7 (2001) 251–259.
- [64] D. Albo, V.L. Rothman, D.D. Roberts, G.P. Tuszyński, Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 298–306.
- [65] M.J. Demeure, C.H. Damsky, F. Elfman, P.E. Goretzki, M.G. Wong, O.H. Clark, Invasion by cultured human follicular thyroid cancer correlates with increased beta 1 integrins and production of proteases, *World J. Surg.* 16 (1992) 770–776.
- [66] J.L. Slack, P. Bornstein, Transformation by v-src causes transient induction followed by repression of mouse thrombospondin-1, *Cell Growth Differ.* 5 (1994) 1373–1380.
- [67] A.T. Tikhonenko, D.J. Black, M.L. Linial, Viral Myc oncoproteins in infected fibroblasts down-modulate thrombospondin-1, a possible tumor suppressor gene, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30741–30747.
- [68] O.V. Volpert, R. Pili, H.A. Sikder, T. Nelius, T. Zaichuk, C. Morris, C.B. Shiflett, M.K. Devlin, K. Conant, R.M. Alami, Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1, *Cancer Cells* 2 (2002) 473–483.
- [69] I. Schwarte-Waldhoff, O.V. Volpert, N.P. Bouck, B. Sipos, S.A. Hahn, S. Klein-Scory, J. Luttges, G. Kloppel, U. Graeven, C. Eilert-Micus, A. Hintemann, W. Schmiegel, Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9624–9629.
- [70] S. Wen, J. Stolarov, M.P. Myers, J.D. Su, M.H. Wigler, N.K. Tonks, D.L. Durden, PTEN controls tumor-induced angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 4622–4627.
- [71] L.S. Gutierrez, M. Suckow, J. Lawler, V.A. Ploplis, F.J. Castellino, Thrombospondin 1-a regulator of adenoma growth and carcinoma progression in the APC(Min<sup>+/−</sup>) mouse model, *Carcinogenesis* 24 (2003) 199–207.
- [72] D. Giri, M. Ittmann, Inactivation of the PTEN tumor suppressor gene is associated with increased angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma, *Hum. Pathol.* 30 (1999) 419–424.
- [73] D. Koul, R. Parthasarathy, R. Shen, M.A. Davies, S.A. Jasser, S.K. Chintala, J.S. Rao, Y. Sun, E.N. Benveniste, T.J. Liu, W.K. Yung, Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN, *Oncogene* 20 (2001) 6669–6678.
- [74] M.J. Park, M.S. Kim, I.C. Park, H.S. Kang, H. Yoo, S.H. Park, C.H. Rhee, S.I. Hong, S.H. Lee, PTEN suppresses hyaluronic acid-induced

- matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation, *Cancer Res.* 62 (2002) 6318–6322.
- [75] T. Kawataki, H. Naganuma, A. Sasaki, H. Yoshikawa, K. Tasaka, H. Nukui, Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression with malignancy of glioma, *Neuropathology* 20 (2000) 161–169.
- [76] R.S. Watnick, Y.N. Cheng, A. Rangarajan, T.A. Ince, R.A. Weinberg, Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis, *Cancer Cell* 3 (2003) 219–231.