Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2020

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE

DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

DE BIOLOGIE MEDICALE

(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 21 septembre 2020 à POITIERS
par Anaïs GRIMAL, née le 26 juillet 1993 à Rodez (12)

Détection des HPV à haut risque oncogène dans une série de biopsies de néoplasies épidermoïdes oculaires au CHU de Poitiers

Composition du jury

Président : Monsieur le Professeur Nicolas LEVEQUE

Membres : Monsieur le Professeur Eric FROUIN

Madame le Professeur Christine IMBERT

Monsieur le Docteur Martial MERCIE

Directeur de thèse : Madame le Docteur Agnès BEBY-DEFAUX

UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année universitaire 2019-2020

PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- CHAUZY Alexia, Pharmacologie, pharmacocinétique
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, Pharmaco chimie
- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

- BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- ELIOT Guillaume, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier
- GAY Julie

Poste de Doctorant

- FREYSSIN Aline

UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le Doyen,

Année universitaire 2019 - 2020

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- BOULETI Claire, cardiologie **(absente jusque début mars 2020)**
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- ISAMBERT Nicolas, cancérologie
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation **(en détachement)**
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHEIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail **(en détachement)**
- BILAN Frédéric, génétique
- BOISSON Matthieu, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CAYSSIALS Emilie, hématologie
- COUDROY Rémy, réanimation
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie
- JAVAUGUE Vincent, néphrologie
- KERFORNE Thomas, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- MARTIN Mickaël, médecine interne
- PALAZZO Paola, neurologie
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités

- PELLERIN Luc, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe

Bât. D1 - 6 rue de la Milétrie – TSA 51115 - 86073 POITIERS CEDEX 9 - France
☎05.49.45.43.43 - 🖷 05.49.45.43.05

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié

Professeurs émérites

- ALLAL Joseph, thérapeutique (08/2020)
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie (08/2020)
- CARRETIER Michel, chirurgie générale (08/2021)
- DORE Bertrand, urologie (08/2020)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GOMES DA CUNHA José, médecine générale (08/2021)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2021)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (24/11/2020)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (08/2021)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2020)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2021)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOTCatherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- EUGENE Michel, physiologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- VANDERMARCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Nicolas Lévêque,
Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ma thèse. Je vous remercie de m'avoir accueillie avec tant de bienveillance et de gentillesse dans votre service et de m'avoir fait partager toute la richesse de vos connaissances.
Je vous prie de trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Agnès Beby-Defaux,
Je tiens à te remercier de m'avoir confié ce travail de thèse et de m'avoir permis de le réaliser. Merci pour ton temps, ta gentillesse et ton sens de l'écoute.
J'espère que tu trouveras ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Eric Frouin,
Je vous remercie de m'avoir permis d'accéder à vos échantillons, élément indispensable à la réalisation de ce travail. Merci également d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Pour cela, je vous adresse mes plus sincères remerciements.

A Madame le Professeur Christine Imbert,
Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail aujourd'hui.
Je mesure tout l'honneur que vous me faites.

A Monsieur le Docteur Martial Mercié,
Je vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous portez à mon sujet de thèse et vous remercie d'avoir accepté de le juger.

Au personnel du laboratoire de Virologie du CHU de Poitiers. Vous avez grandement contribué à ce travail de thèse et je vous en remercie.

A l'ensemble du personnel du laboratoire du CHU de Poitiers pour ces semestres passés (et à venir), en votre compagnie.

Au personnel du laboratoire du CH de La Rochelle, merci de m'avoir accueillie avec tant de gentillesse et de bonne humeur.

A mes proches,

Je remercie tout particulièrement mes parents, mes frères Simon et Lucas, Marjorie, et Maxime. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi jusqu'à présent, et surtout pour votre soutien indéfectible et votre amour.

Enfin, merci à mes amis.

TABLE DES MATIERES

I. LISTE DES ABREVIATIONS 4
II. LISTE DES FIGURES 5
III. LISTE DES TABLEAUX 6
IV. INTRODUCTION 7
1. Diversité de la famille des *Papillomaviridae* 8
1.1. Historique et classification phylogénétique 8
1.2. Tropisme épithélial et pouvoir oncogène 10
2. Caractéristiques virologiques générales 11
2.1. Organisation génomique 11
2.2. Expression et fonction des protéines virales 12
2.2.1. La région E (Early) et ses protéines 13
2.2.2. La région L (*Late*) et ses protéines 14
2.2.3. La région LCR 14
3. Histoire naturelle de l'infection à HPV 15
3.1. Cycle viral 15
3.1.1. Attachement et entrée du virus dans la cellule 15
3.1.2. Réplication du génome viral 16
3.1.3. Assemblage et libération des virions néo-formés 17
3.2. Évolution de l'infection 18
3.2.1. Clairance, latence et persistance virales 18
3.2.2. Réponse immunitaire 18
3.2.3. Stratégies d'échappement immunitaire 20
3.3. Mécanismes de la carcinogenèse induite par HPV 21
3.3.1. Expression de E6 et E7 21
3.3.2. Dérégulation du cycle cellulaire et immortalisation 21
3.3.3. Transformation cellulaire 22
3.3.4. Facteurs associés 24
4. Infections par HPV : épidémiologie et lésions associées 24
4.1. Épidémiologie et modes de contamination 24
4.2. Manifestations cliniques associées aux HPV 26
4.2.1. Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme cutané 27

4.2.1.1 Verrues cutanées 27
4.2.1.2 Epidermodysplasie verruciforme 28
4.2.1.3 Syndrome WHIM 29
4.2.1.4 Carcinomes épidermoïdes cutanés 29
4.2.2. Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme muqueux 29
4.2.2.1 Lésions génitales 29
4.2.2.2 Les lésions intraépithéliales de bas-grade, haut-grade et cancers 30
4.2.2.3 Lésions et cancers de la muqueuse oropharyngée et des voies aérodigestives supérieures 32
4.2.3. Immunodépression acquise et HPV 33
5. Les pathologies oculaires associées aux papillomavirus 34
5.1. Brefs rappels anatomiques et histologiques de la surface oculaire 34
5.2. Modes de contamination 36
5.3. Tumeurs de la surface oculaire et HPV 36
5.3.1. Papillome conjonctival et HPV 36
5.3.2. Ptérygions et HPV 38
5.3.3. Néoplasies épidermoïdes et HPV 39
5.4. Attribution d'une tumeur aux HPV à haut risque 42
V. OBJECTIF DE L'ETUDE 43
VI. MATERIELS ET METHODES 44
1. Patients et échantillons 44
2. Purification d'ADN à partir de tissus conservés dans la paraffine 45
2.1. Déparaffinage des échantillons 45
2.2. Extraction de l'ADN 45
3. Estimation de la quantité d'ADN présente dans les échantillons et de la qualité de l'extraction 46
4. Détection du génome d'HPV par PCR en temps réel 46
4.1. Principe de la PCR en temps réel 46
4.2. Particularités de la trousse Anyplex™ II HPV28 Detection (SEEGENE®) 49
4.3. Détection du génome d'HPV dans les échantillons 52
5. Évaluation de la présence ou non d'inhibiteurs d'amplification 53
VII. RESULTATS 54
1. Population étudiée et caractéristiques 54
2. Estimation de la quantité d'ADN présente dans les échantillons 56

3. Prévalence d'HPV dans les échantillons analysés 56
4. Vérification de la présence d'inhibiteurs d'amplification 60
5. Patiente ayant une tumeur positive pour HPV16 61
VIII. DISCUSSION 64
IX. CONCLUSION 67
X. BIBLIOGRAPHIE 68
XI. SERMENT DE GALIEN 79
XII. RESUME 80

I. LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messager
BCC : *Basal Cell Carcinoma* ou carcinome basaloïde
CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia ou néoplasies intraépithéliales cervicales
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMTA : *Catcher Melting Temperature Analysis*
COVID-19 : *Coronavirus Disease* 2019
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRPV : Cottontail Rabbit Papillomavirus
Ct : *Cycle treshold* (cycle seuil)
dNTPs : Désoxyribonucléotide Triphosphate
FCU : Frottis Cervico-Utérin
EGFR : *Epidermal Growth Factor*
HES : Hématoxyline-Eosine-Safran
HPV : *Human Papillomavirus*
HSH : Hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes
HSV : Herpes Simplex Virus
IARC : *International Agency for Research on Cancer*
IC : Contrôle Interne
ICC : *Invasive Cervical Cancer* ou cancer cervical invasif
INF : Interféron
IST : Infection Sexuellement Transmissible
ORL : Otorhinolaryngologie
NGS : *Next Generation Sequencing*
NK : *Natural Killer*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*
SCC : *Squamous Cell Carcinoma* ou carcinome épidermoïde
SFO : Société Française d'Ophtalmologie
TOCE : *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*
UV : Ultra-Violet (rayons)
VADS : Voies Aéro-Digestives Supérieures
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

II. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des papillomavirus humains 9
Figure 2 : Représentation schématique du génome d'un papillomavirus humain 11
Figure 3 : Organisation du cycle réplicatif des HPV 15
Figure 4 : Koïlocytes 17
Figure 5 : Réponse immune naturelle au cours de l'infection par HPV 19
Figure 6 : Représentation schématique des principales étapes de la carcinogenèse induite par les HPV HR 23
Figure 7 : Répartition globale mondiale des cancers attribuables à HPV en 2012 25
Figure 8 : Aspect clinique de verrues cutanées 28
Figure 9 : Aspect clinique de condylomes acuminés anogénitaux 30
Figure 10 : Représentation schématique anatomique et histologique de la surface oculaire et du limbe 35
Figure 11 : Aspect clinique d'un papillome conjonctival du cul-de-sac inférieur 37
Figure 12 : Aspect clinique d'un ptérygion 38
Figure 13 : Aspect clinique de carcinome in situ (a) et de carcinome épidermoïde invasif (b) 40
Figure 14 : Aspects histologiques des néoplasies épidermoïdes de la surface oculaire .. 40
Figure 15 : Biopsie en bloc de paraffine, microtome et copeaux de 10µm 44
Figure 16 : Protocole d'extraction des acides nucléiques grâce au kit QIAGEN™ 46
Figure 17 : Principe d'un cycle de PCR 47
Figure 18 : Les différentes phases d'une PCR en temps réel 48
Figure 19 : Émission de la fluorescence lors d'une PCR en temps réel 48
Figure 20 : Ajustement du catcher 49
Figure 21 : Principe de la technologie CMTA cyclique utilisée dans le kit Anyplex™ II HPV28 50
Figure 22 : Principe de la technologie TOCE™ 51
Figure 23 : Diagramme de flux de l'étude 54

III. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification IARC du niveau de risque des différents papillomavirus humains 10
Tableau 2 : Principales fonctions et caractéristiques des protéines virales précoces et tardives 12
Tableau 3 : Nombre global estimé de nouveaux cas de cancers attribuables à HPV en 2012 25
Tableau 4 : Types d'HPV et lésions particulières associées 27
Tableau 5 : Classification des anomalies histologiques cervicales selon Richart 31
Tableau 6 : Classification des anomalies cytologiques cervicales selon Bethesda 32
Tableau 7 : Détection d'HPV dans les papillomes conjonctivaux 37
Tableau 8 : Détection d'HPV dans les ptérygions 39
Tableau 9 : Détection d'HPV dans les néoplasies épidermoïdes de l'œil 41
Tableau 10 : Interprétation des résultats selon l'amplification du contrôle interne (IC) .. 53
Tableau 11 : Caractéristiques cliniques de la population étudiée 55
Tableau 12 : Quantité estimée d'ADN dans les extraits obtenus 56
Tableau 13 : Résultats bruts de la détection des HPV à haut risque et bas risque des 37 échantillons inclus 58
Tableau 14 : Tableau résumé de la détection d'HPV, en fonction de la nature de la lésion 59
Tableau 15 : Détection du contrôle interne exogène DICO 60

IV. INTRODUCTION

Les papillomavirus humains (HPV) constituent une large famille de virus, ubiquitaires, ciblant les épithéliums malpighiens où ils développent des infections fréquentes, généralement asymptomatiques et le plus souvent éliminées par la réponse immunitaire. Cependant, certains d'entre eux sont considérés comme des virus oncogènes. Ils sont en effet responsables d'environ 5% de tous les cancers confondus chez l'Homme regroupant le cancer du col de l'utérus, d'autres cancers ano-génitaux et le carcinome de l'oropharynx. Alors que l'implication des HPV dans ces cancers est largement démontrée, pour d'autres localisations, la relation causale n'est pas clairement définie. C'est le cas des néoplasies épidermoïdes de la surface oculaire qui comprennent un large spectre de tumeurs affectant la conjonctive et la cornée. Les rares études qui ont été conduites afin de déterminer la prévalence et l'implication des HPV dans ces lésions ont donné des résultats disparates ne permettant pas de conclure. La relation entre HPV et la survenue de ces pathologies néoplasiques de l'œil reste donc encore à explorer.

1. Diversité de la famille des *Papillomaviridae*

1.1. Historique et classification phylogénétique

Les Papillomavirus étaient considérés à l'origine avec les Polyomavirus, comme faisant partie d'une unique famille, les *Papovaviridae*. Leurs grandes différences, autant dans leurs caractéristiques biologiques que dans leur organisation génétique, ont conduit à les classer en deux familles distinctes, les *Papillomaviridae* et les *Polyomaviridae* (1). Les Papillomavirus appartiennent donc à la famille des *Papillomaviridae*, large famille qui englobe des virus responsables de lésions cutanéo-muqueuses le plus souvent bénignes, mais parfois malignes, infectant l'Homme (Papillomavirus Humains, HPV), mais aussi de nombreuses autres espèces animales vertébrées, avec une grande spécificité d'espèce (2). Le mot lui-même « Papillomavirus », vient du mot latin « papilloma » signifiant « bouton » et du suffixe « oma » désignant le caractère tumoral. L'évolution des HPV a fait l'objet de nombreuses études, tant sur un plan phylogénétique que fonctionnel, qui concluent à leur origine très ancienne. Au 4ème siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate a été le premier à décrire les verrues cutanées et génitales (3). A la fin du 19ème siècle, Payne rapporte l'augmentation contagieuse des verrues communautaires (4). Ciuffo démontre alors en 1907 en Italie, l'origine infectieuse des verrues humaines par hétéro-inoculation d'un ultrafiltrat provenant d'une verrue broyée (5). La nature virale des condylomes génitaux et des papillomes laryngés est démontrée quelques années plus tard, et en 1933, Richard E. Shope observe une évolution en cancer de certaines lésions en étudiant la papillomatose du lapin de garenne (6). En 1949, Strauss décrit pour la première fois HPV en microscopie électronique (7). Ce n'est que dans les années 70 que Harald Zur Hausen démontre le rôle de certains HPV dans les cancers du col de l'utérus (8), ce qui lui vaudra l'obtention du prix Nobel de médecine en 2008. Depuis 2006, une prévention du cancer du col de l'utérus par vaccination, considérée comme une vaccination anti-cancer, a été mise en place.

Les papillomavirus sont classés par génotypes (ou types) et identifiés par un chiffre. Jusque-là, plus de 300 types de papillomavirus ont été identifiés et entièrement séquencés, selon le centre international de référence (9), dont plus de 200 HPV (10). La classification des HPV repose sur les homologies de séquences nucléotidiques du gène codant la protéine de capside L1 (11,12). En effet, le gène *L1* est le plus conservé du génome des papillomavirus. Les HPV sont ainsi classés en genres, espèces, types, sous-

types, variants. Les genres possèdent au moins 60% d'homologie de séquence et les espèces de 60 à 70% (1). Un nouveau (géno)type d'HPV est reconnu dès lors que sa séquence d'ADN diffère de plus de 10% par rapport au plus proche type d'HPV déjà connu, alors que 2 à 10% de différence définissent un sous-type, et moins de 2%, un variant (1). Les comparaisons de génome ont permis la constitution d'arbres phylogénétiques, composé donc des 5 genres comportant des HPV, désignés par une lettre grecque : alpha, bêta, gamma, mu et nu. Les autres genres comportent des papillomavirus uniquement animaux. Les espèces, elles, sont numérotées par un chiffre arabe (Figure 1).

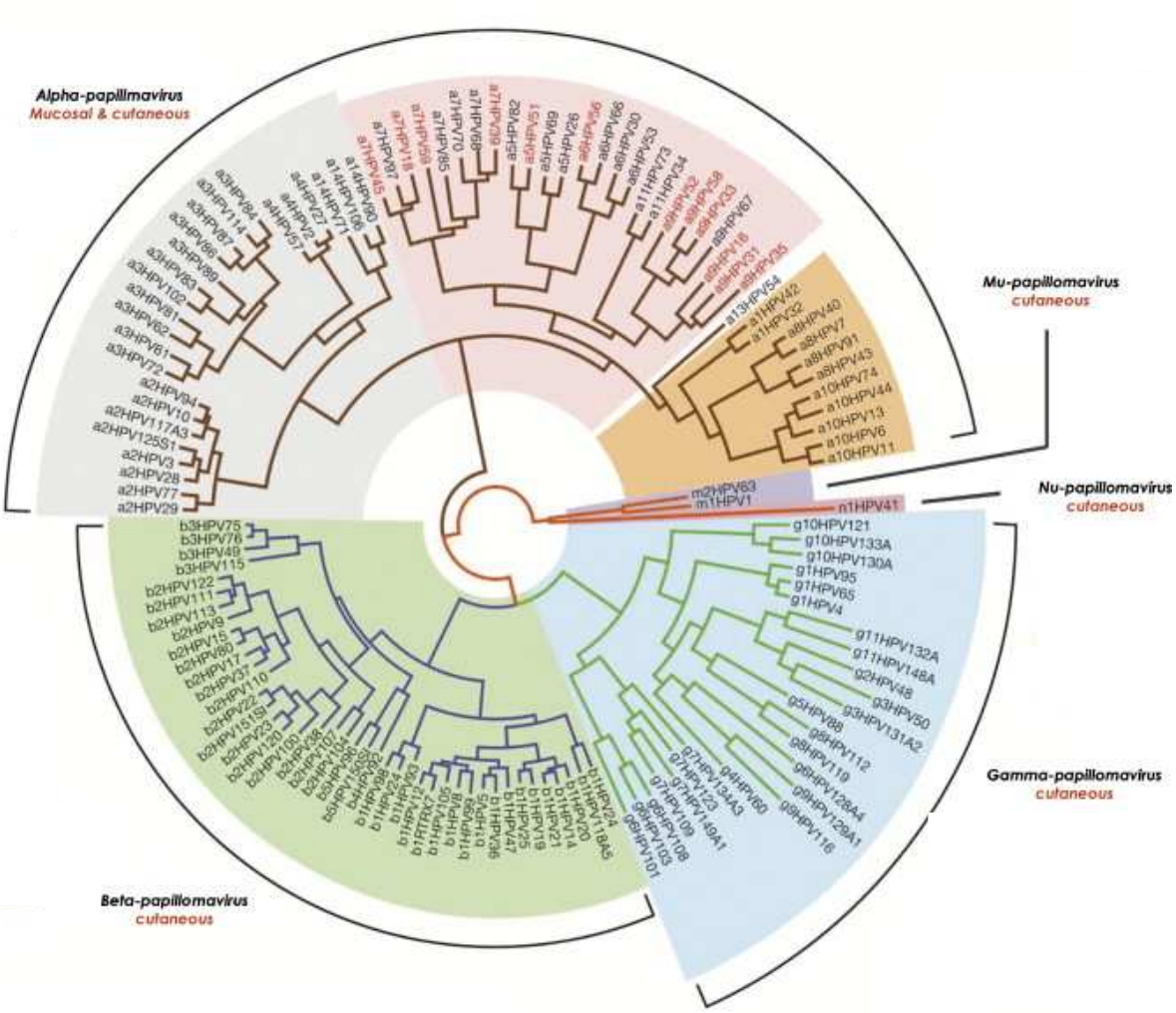


Figure 1 : Arbre phylogénétique des papillomavirus humains

(d'après Doorbar et al, (35))

Les HPV sont classés en 5 genres ; alpha, bêta et gamma représentent les genres les plus importants. Les HPV appartenant au genre alpha sont souvent classés selon la nature des épithéliums qu'ils infectent et le risque oncogène qu'ils représentent : en gris les αHPV cutanés à bas risque oncogène, en orange les αHPV muqueux à bas risque oncogène et en rose les αHPV muqueux à haut risque oncogène avec en rouge ceux du groupe 1 (oncogènes) selon la classification de l'Agence Internationale contre le Cancer (IARC).

1.2. Tropisme épithélial et pouvoir oncogène

Les papillomavirus humains ont comme particularité de présenter un tropisme préférentiel pour les kératinocytes de la peau ou des muqueuses en fonction de leur génotype, causant alors des lésions cliniquement distinctes (11,12). Deux grands groupes d'HPV ont été identifiés : les HPV dits muqueux et les HPV dits cutanés (13). Cette distinction n'est pas toujours absolue, certains types d'HPV n'ayant pas de tropisme strict pour la peau ou les muqueuses. Le genre alpha-HPV comprend des génotypes infectant les muqueuses génitales et oropharyngées (14), mais aussi des génotypes à tropisme cutané, responsables du développement de verrues. Les genres bêta, gamma, mu et nu regroupent des HPV à tropisme cutané. Les HPV sont également classés en fonction de leur pouvoir oncogène. Cette classification concerne principalement les HPV à tropisme muqueux car elle repose sur le risque de cancer du col de l'utérus associé à HPV. Une première classification distinguait les HPV à haut risque oncogène (HR), les HPV à risque intermédiaire (ou probablement à haut risque) et les HPV à bas risque oncogène (BR). Depuis, ils ont été classés par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) comme les autres carcinogènes : 12 sont classés comme oncogènes, 1 probablement oncogène, ces 2 groupes correspondent aux HPV HR. Les autres sont classés possiblement oncogènes ou inclassables quant à leur potentiel oncogène, ces derniers correspondant aux HPV BR (Tableau 1) (15). En dehors des HPV impliqués dans les cancers, la majeure partie des HPV n'est pas classée par l'IARC.

Niveau de risque	Génotypes HPV muqueux	Génotypes HPV cutanés
1 (oncogènes)	**16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59**	
2A (probablement oncogènes)	**68**	
2B (possiblement oncogènes)	26, 53, 66, 67*, 70, 73, 82, 30*, 34*, 69*, 85*, 97*	5 et 8 (chez les patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme)
3 (non classables quant à leur potentiel oncogène chez l'homme)	6 et 11	HPV du genre β (sauf 5 et 8) et γ

Tableau 1 : Classification IARC du niveau de risque des différents papillomavirus humains

(dernière mise à jour le 7 avril 2015)

*Génotypes classés 2B du fait de leur analogie phylogénétique avec les HPV du groupe 1

2. Caractéristiques virologiques générales

2.1. Organisation génomique

Les papillomavirus sont des petits virus non enveloppés, mesurant 45 à 55 nm de diamètre et comportant une capside icosaédrique. Cette dernière est composée de 72 capsomères pentamériques contenant 2 protéines structurales ; L1 et L2, codées par le virus. Le génome viral est quant à lui composé d'une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire, d'environ 8000 paires de bases. Les papillomavirus possèdent une organisation génomique typique ; un seul des deux brins d'ADN est codant, avec 8 ou 9 ORF (*Open Reading Frame*) ou cadres ouverts de lecture, qui se chevauchent (10).

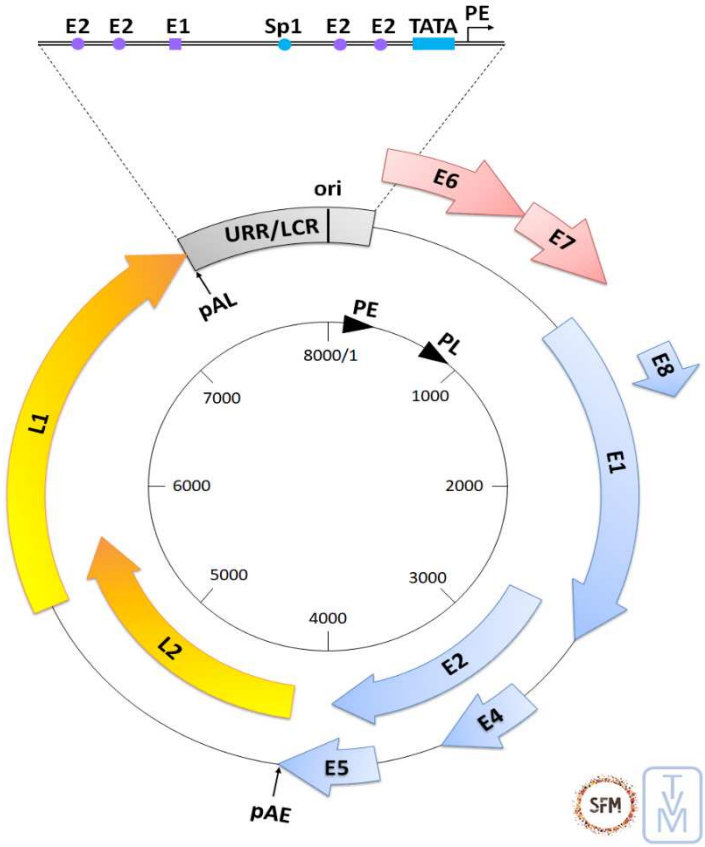


Figure 2 : Représentation schématique du génome d'un papillomavirus humain

(image extraite du Traité de Virologie Médicale 2019, (16))

L'ADN double brin du génome est représenté par le cercle noir au centre. La position du promoteur précoce (PE) et du promoteur tardif (PL) sont indiqués par des flèches noires. La position de chaque gène E (early) et de chaque gène L (late) est représentée par une flèche de couleur, et la position de la région LCR par un cadre gris (ori : origine de la réplication, pAE : polyadénylation précoce et pAL : polyadénylation tardive).

Ce génome peut être divisé en trois régions : une région codante E (*Early*) contenant les gènes E1, E2, E3, E4, E5, E6 et E7, une région L (*Late*) contenant les gènes codant pour les protéines L1 et L2, et une région régulatrice non codante LCR (*Long Control Region*), également appelée URR (*Upstream Regulatory Region*), contenant la majeure partie des éléments impliqués dans la réplication de l'ADN et de sa transcription (Figure 2) (10).

2.2. Expression et fonction des protéines virales

Les HPV ne possèdent pas d'ADN polymérase virale ; ils ont donc recours à la machinerie réplicative des cellules de l'hôte pour la réplication de leur génome. Le Tableau 2 résume les fonctions des principaux gènes produits lors de la réplication virale des HPV.

Protéine virale	Fonctions et caractéristiques
E1	Contrôle la réplication de l'ADN viral en formant un hétérodimère avec E2.
E2	Initie la réplication virale avec E1 et régule négativement le promoteur de gènes précoces (inhibe l'expression de E6 et E7).
E4	Impliquée dans la maturation et le relargage des particules virales par destruction du cytosquelette cellulaire.
E5	Stimule la prolifération cellulaire et favorise l'échappement immunitaire.
E6	Oncoprotéine virale majeure ; affecte la fonction de nombreuses protéines cellulaires.
E7	Oncoprotéine virale majeure ; affecte la fonction de nombreuses protéines cellulaires.
L1	Protéine majeure de capside ; utilisée pour la fabrication des vaccins prophylactiques contre HPV.
L2	Protéine mineure de capside.

Tableau 2 : Principales fonctions et caractéristiques des protéines virales précoces et tardives

(d'après Tommasino, 2014 (10))

2.2.1. La région E (Early) et ses protéines

La région E code pour les protéines précoces et représente 50% du génome (17).

E1 est une protéine de 600 à 650 acides aminés et constitue la seule enzyme codée par le génome des HPV. C'est également une des protéines la plus conservée chez les HPV (18). Elle possède une fonction hélicase et une activité ATPase essentielles à la réplication de l'ADN viral. E1 contrôle la réplication virale (19) en s'associant avec la protéine E2 pour former un hétérodimère et ainsi initier la réplication de l'ADN viral au niveau de l'origine de réplication, en association avec les composés cellulaires de réplication de l'ADN (20).

E2 participe donc à l'initiation de la réplication du génome viral en synergie avec E1 via le recrutement de cette dernière au niveau de l'origine de réplication. Mais E2 est également un facteur important de régulation de la transcription virale ; E2 réprime notamment la transcription de *E6* et *E7.* L'inactivation de E2 est considérée comme un évènement important de l'oncogenèse virale (21), qui sera détaillée dans le chapitre 3.3.

E4 est une protéine cytoplasmique traduite majoritairement à partir d'un ARNm E1^E4 et détectée lors des dernières étapes du cycle viral juste avant l'expression des protéines tardives de capside L1 et L2 (22). E4 est impliquée notamment dans le relargage des particules virales, en liant les structures de cytokératine de la cellule, et favorisant ainsi la destruction du cytosquelette cellulaire (17). Ce phénomène se produit particulièrement dans les couches superficielles de l'épithélium infecté par HPV et permet d'utiliser la protéine E4 comme cible de marquage immunohistochimique afin de mettre en évidence une infection productive à HPV (23).

Les protéines **E5, E6** et **E7** constituent les trois oncoprotéines virales des HPV HR. Ces protéines ont la capacité d'altérer de multiples mécanismes clés de régulation cellulaire dont le but initial est de favoriser le déroulement du cycle viral mais qui sont capables, en cas d'expression non contrôlée, de créer un environnement favorable à la survenue d'un cancer (24). Parmi leurs propriétés, on note la stimulation et la survie des cellules basales de l'épithélium (21). On constate cependant une hétérogénéité d'expression et de fonction de ces trois protéines selon les génotypes d'HPV étudiés. En effet, les βHPV, à l'exception d'HPV14, sont dépourvus du gène précoce E5. De plus, seules les protéines E6 et E7 des HPV HR sont capables d'induire la dégradation de certaines protéines cellulaires impliquées dans la régulation négative du cycle cellulaire ou le maintien de l'intégrité du

génome cellulaire telles que pRb (protéine du rétinoblastome) qui inhibe le passage de la cellule en phase S, et p53, facteur de transcription contrôlant notamment la réparation de l'ADN et l'apoptose des cellules maintenues en cycle cellulaire (24). Le rôle précis de ces trois oncoprotéines sera développé dans le chapitre 3.3 : mécanismes de la carcinogenèse induite par HPV.

2.2.2. La région L (*Late*) et ses protéines

La région L code pour les protéines tardives de capside L1 et L2 et représente 40% du génome (17). L'expression de ces protéines n'est possible que dans les cellules les plus différenciées des couches supérieures des épithéliums et survient tardivement dans le cycle viral d'où le terme de protéines « tardives » (*late*).

L1 est la protéine structurale majeure de capside. Sa structure est hautement conservée entre les papillomavirus et elle porte les épitopes spécifiques de genre et certains épitopes spécifiques de type d'HPV (25). Les protéines L1 recombinantes produites isolément sont capables de s'auto-assembler pour former des pseudo-particules virales vides, les VLP (*Virus Like Particles*) (26). Cette propriété de L1 constitue la base de la fabrication des vaccins contre HPV.

L2 est la protéine structurale mineure de capside ; elle porte des épitopes communs à plusieurs types d'HPV mais est toutefois moins conservée par l'évolution que la protéine L1. L'association de L1 et L2 est indispensable pour les étapes d'entrée dans la cellule, et également pour l'assemblage des particules virales et la stabilisation de la capside (27).

2.2.3. La région LCR

La région LCR (*Long Control Region*) est une région très variable comptant 400 à 1000 nucléotides, non codante, localisée entre les ORFs L1 et E6. Elle représente environ 10% du génome (17). Elle contient l'origine de la réplication et également la plupart des éléments régulateurs impliqués dans la réplication de l'ADN viral et de sa transcription (10).

3. Histoire naturelle de l'infection à HPV

3.1. Cycle viral

Le cycle viral des HPV est étroitement lié à l'état de différenciation des cellules épithéliales. Les protéines virales sont synthétisées de façon séquentielle dans l'épithélium infecté selon la différenciation cellulaire (Figure 3). Les différentes étapes du cycle viral sont détaillées dans les paragraphes 3.1.1, 3.1.2 et 3.1.3.

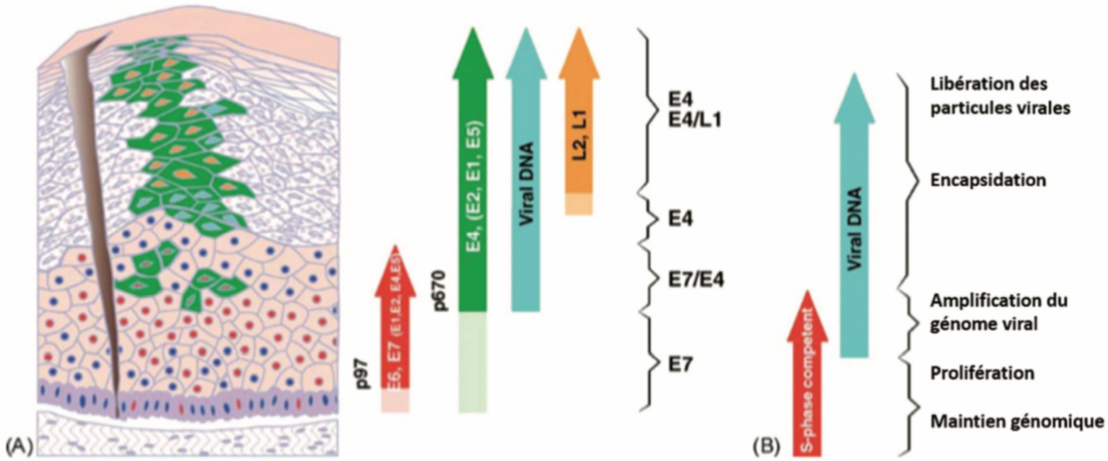


Figure 3 : Organisation du cycle réplicatif des HPV

(d'après Doorbar *et al*, 2005 (28))

(A) Représentation schématique de l'épithélium et du profil d'expression des gènes viraux. Après infection des kératinocytes de la couche basale (représentés en violet), le génome viral est maintenu sous la forme d'une faible quantité d'épisomes. Lors de la différenciation épithéliale, le promoteur précoce (p97 pour HPV16) promeut l'expression des gènes *E6* et *E7* nécessaire à l'entrée des cellules en phase S (rouge). Le promoteur tardif (p670) est stimulé au niveau des couches les plus externes de l'épithélium et les protéines E1, E2, E4 et E5 augmentent en quantité (vert), facilitant l'amplification du génome viral (bleu). Des modifications de l'épissage de l'ARNm permettent l'expression de la protéine E4 au niveau des couches externes où l'on retrouve les protéines de la capside virale (orange).

(B) Les cellules des couches basales de l'épithélium sont en phase S. L'amplification du génome viral débute dans ces cellules et s'arrête dans les cellules les plus différenciées.

3.1.1. Attachement et entrée du virus dans la cellule

Les papillomavirus humains ont un tropisme particulier pour les épithéliums malpighiens ; ces derniers sont retrouvés au niveau cutané, au niveau des voies aéro-digestives supérieures (VADS) (cavité buccale, pharynx, œsophage, moitié supérieure du

larynx), et également au niveau du canal anal et de l'appareil génital notamment au niveau de l'exocol de l'utérus et du vagin (29). L'infection productive par HPV nécessite que le virus ait accès aux cellules des couches basales de ces épithéliums, le plus souvent à la faveur d'un microtraumatisme (30). Certaines zones sont particulièrement vulnérables à l'infection virale ; c'est le cas notamment de la zone de transition, dite zone de jonction, entre l'épithélium malpighien de l'exocol et l'épithélium glandulaire de l'endocol, zone qui facilite l'accès d'HPV aux cellules basales et aux cellules cuboïdes (29). Il existe aussi une zone de jonction au niveau de l'épithélium ano-rectal, constituant alors un autre site privilégié d'infection par HPV (31). Au niveau de la peau, les follicules pileux, riches en cellules souches épithéliales, semblent constituer un point d'entrée pour les HPV à tropisme cutané (29).

Il a été montré que les protéines de capside L1 et L2 des particules virales s'attachent initialement à la cellule via les chaînes d'héparane sulfate qui composent le glycosaminoglycane de surface. Suite à cela, le virus subit des changements conformationnels nécessaires à son entrée dans la cellule (29). Le récepteur cellulaire des HPV n'est pas identifié de façon certaine, mais l'entrée du virus impliquerait des interactions avec plusieurs protéines membranaires, comme l'intégrine $\alpha 6$, dont les fonctions restent encore mal déterminées (32). Le virus entre alors dans la cellule par un mécanisme d'endocytose, qui varie en fonction du génotype. Une fois décapsidé, l'ADN viral est libéré dans le milieu intracellulaire puis transféré dans le noyau au cours de la mitose (33).

3.1.2. Réplication du génome viral

Après ce transfert, il va y avoir une première phase de maintien du génome viral dans les cellules basales. Ce dernier est amplifié de façon limitée, durant la phase S du cycle cellulaire, en même temps que le génome de l'hôte et grâce aux enzymes cellulaires. Les protéines E1 et E2 contrôlent la réplication, et maintiennent le nombre de copies épisomales de l'ordre de 50 à 200 copies par cellule fille dans le noyau (34).

La phase de maintien est suivie d'une phase d'amplification du génome dans les couches suprabasales ; en temps normal, ces cellules entament un processus de différenciation qui induit l'arrêt du cycle cellulaire. Il a été montré que les HPV à haut risque arrivent à préserver la capacité d'entrée des cellules en phase S via l'expression de la protéine virale

E7 qui interagit avec la protéine pRB, provoquant sa dégradation, et avec d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (35). La protéine E6 est complémentaire par le biais de la dégradation de p53 qui empêche l'apoptose des cellules maintenues en phase S (36). Pendant cette phase d'amplification du génome viral, les protéines E1 et E2 directement impliquées dans la réplication, sont produites en abondance grâce à la stimulation du promoteur tardif (37).

3.1.3. Assemblage et libération des virions néo-formés

La dernière étape du cycle viral consiste en l'assemblage des nouveaux virions ainsi que leur libération dans le milieu extracellulaire. Elle n'a lieu que dans les cellules superficielles bien différenciées, dans lesquelles les deux protéines structurales L1 et L2 codées par HPV peuvent être synthétisées ; les protéines L2 s'accumulent dans des structures subnucléaires, recrutent les protéines L1 et l'ADN viral. La particule virale s'assemble alors en une capside contenant le génome viral, constituée d'environ 360 protéines L1 et 12 protéines L2 (28). Toutefois, des VLP (*Virus Like Particles*), peuvent s'assembler même si la protéine L2 est absente (38). La protéine E4, synthétisée tardivement, contribue à la libération des virions en perturbant l'intégrité du réseau de kératine (39). L'infection n'est pas lytique pour la cellule infectée. La libération des virions néo-formés ne peut se faire que lorsque celle-ci atteint la surface de l'épithélium par desquamation naturelle. L'effet cytopathogène caractéristique est la koïlocytose (Figure 4).

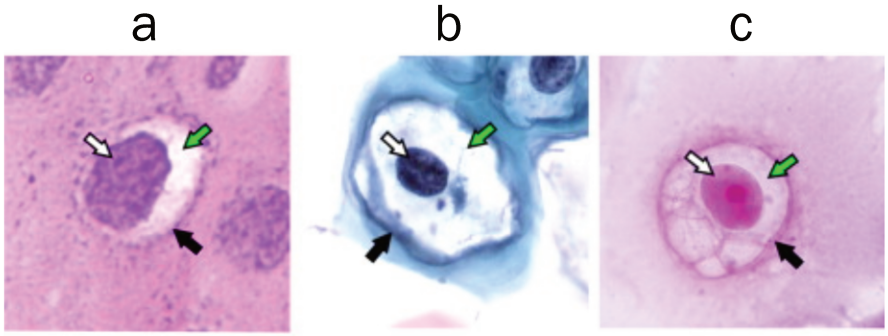


Figure 4 : Koïlocytes

(d'après Krawczyk *et al*, (41))

Koïlocytes dans a : une biopsie de col utérin (coloration HES), b : un frottis cervical (coloration de Papanicolaou) et c : une culture cellulaire (coloration HES).

Les flèches indiquent les aspects typiques des Koïlocytes : un noyau excentré, agrandi et à la chromatine irrégulière (flèche blanche), accompagné d'une large vacuole péri-nucléaire (flèche verte), entouré d'une bordure cytoplasmique épaissie (flèche noire).

3.2. Évolution de l'infection

3.2.1. Clairance, latence et persistance virales

Les infections à HPV sont très fréquentes et, dans la majorité des cas, transitoires (70% à 1 an et 90% à 2-3 ans), sans apparition de signes cliniques (34). Il s'agit du phénomène de clairance virale. Toutefois, la clairance virale est définie par l'absence de génome détectable, ce qui n'exclut pas la possibilité d'une persistance de génomes résiduels non détectables dans les cellules basales, ou latence virale, pouvant expliquer la détection intermittente d'un HPV donné chez un individu, en l'absence de nouvelle exposition (16). Ce taux de clairance virale diminue lors d'une infection par des HPV HR, notamment HPV16, qui présente une durée moyenne de persistance plus longue que les autres HPV HR, ce qui contribuerait à son plus grand pouvoir oncogène (40). De fait, les individus présentant des infections persistantes à HPV HR, sont plus à risque de développer des lésions cancéreuses (41).

3.2.2. Réponse immunitaire

La clairance virale fait suite à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace de la part de l'hôte. Elle présente deux composantes : une immunité innée, qui agit en première ligne de l'infection et est non spécifique, associée à une immunité adaptative, qui intervient dans un second temps, et qui prévient les réinfections (Figure 5). L'immunité innée fait notamment intervenir les cellules NK (*Natural Killer*), recrutées via la production d'interféron (INF-α et β) par les cellules infectées. Les cellules NK vont éliminer les cellules infectées ainsi que les éventuelles cellules tumorales ayant perdu l'expression du CMH de classe I à leur surface (42). Les macrophages jouent également un rôle important dans l'immunité innée contre HPV, en détruisant les cellules infectées via la sécrétion de TNF-α et de radicaux libres oxygénés (43). L'immunité adaptative, elle, intervient après activation des cellules de Langerhans, principales CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes) localisées dans l'épiderme. Elles vont présenter les antigènes viraux aux cellules de l'immunité adaptative dans les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes CD4+ naïfs vont se différencier en Lymphocytes T *helper*, Th1 ou Th2. Deux types de réponses vont alors se mettre en place : la réponse humorale à l'origine des anticorps spécifiques neutralisants, et la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques

(CTL). Ces CTL vont alors pouvoir éliminer les cellules infectées, ainsi que les cellules cancéreuses exprimant des antigènes d'HPV, et sont un des acteurs clés dans la réponse immunitaires contre HPV (42). En effet, la régression spontanée des lésions induites par HPV est associée sur le plan histologique à la présence d'un important infiltrat intralésionnel de lymphocytes CD4+, CD8+, ainsi que de macrophages (44). Malgré cet important système de défense, plusieurs mécanismes d'échappement immunitaire développés par les HPV contribuent à la persistance du virus et jouent un rôle dans la carcinogenèse.

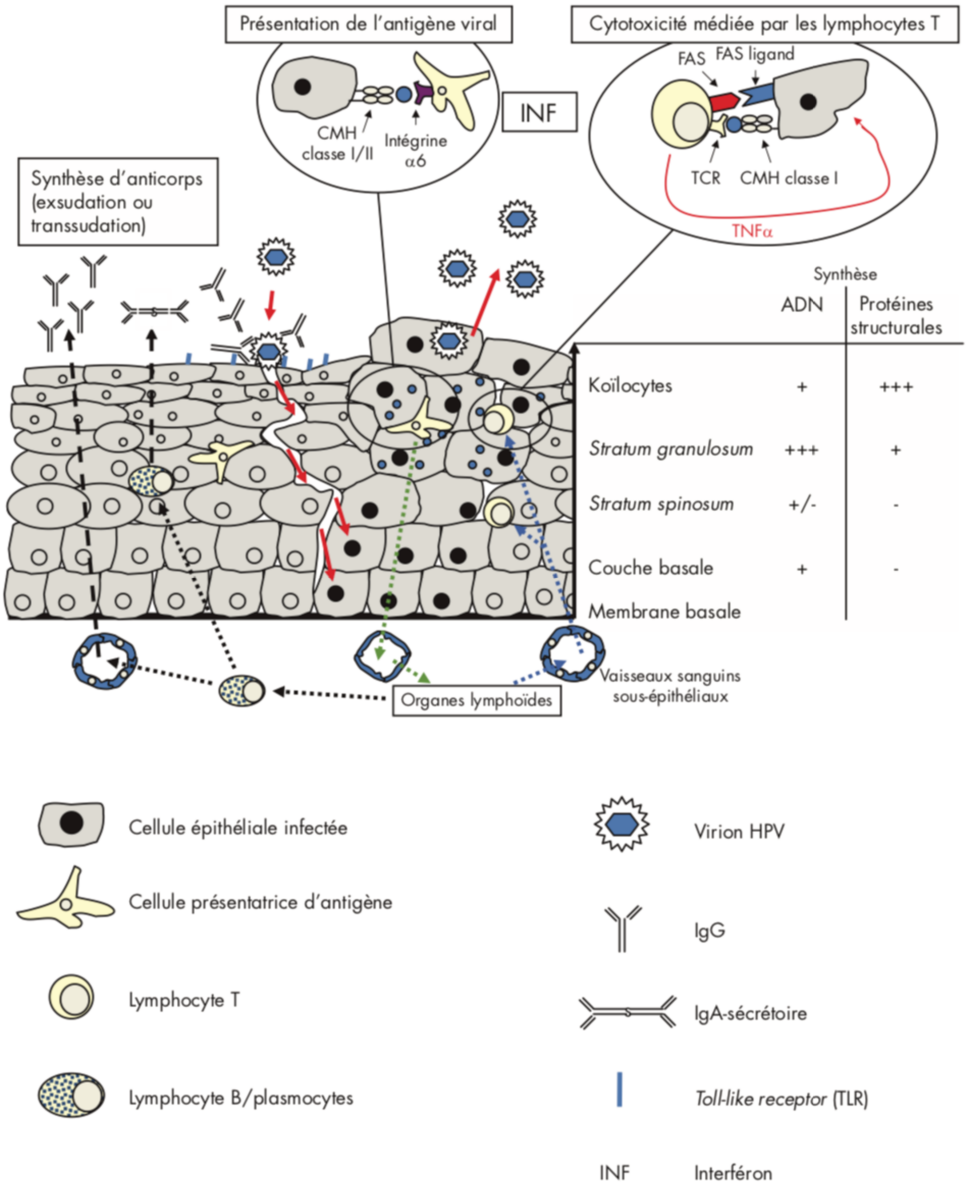


Figure 5 : Réponse immune naturelle au cours de l'infection par HPV

(d'après Alain *et al* (45))

3.2.3. Stratégies d'échappement immunitaire

Les HPV induisent le plus souvent des infections asymptomatiques, car elles vont être contrôlées par le système immunitaire, mais dans certains cas, leur détection peut échapper au système immunitaire. En effet, d'une part, le cycle réplicatif des HPV est exclusivement intra-épithélial et sans virémie associée, les protéines virales précoces sont très faiblement exprimées au niveau des couches basales, et les protéines de capsides, bien que très immunogènes, sont exprimées uniquement dans les couches supérieures de l'épithélium, et de ce fait, moins accessibles aux cellules immunitaires. D'autre part, les HPV sont des virus non lytiques, qui sont assemblés dans les couches externes de l'épithélium constituées de kératinocytes différenciées et sont éliminés au cours du processus naturel de desquamation de ces couches superficielles (46). Enfin, le virus a également développé plusieurs mécanismes d'échappement immunitaire, plus efficaces pour les HPV HR, et notamment pour HPV16 (47). Parmi eux, et concernant l'immunité innée, il a été démontré que les protéines E6 et E7 des HPV16 et 18 diminuent la production d'INF-α par les cellules infectées et le recrutement des cellules NK et des macrophages au niveau de la lésion (48). En ce qui concerne l'immunité adaptative, la plupart des HPV réduiraient l'expression des cadhérines-E à la surface des cellules épithéliales, diminuant alors la présence des cellules de Langerhans (49). De plus, un autre mécanisme d'échappement mis en place par HPV est l'inhibition de la réponse cytotoxique Th1 par un glissement vers une réponse Th2 humorale. En effet, les lésions induites par HPV sont caractérisées par une faible quantité de cellules Th1 et un infiltrat important de cytokines Th2 (notamment IL-6, IL-8 et IL-10) (50). La protéine E5 contribue également à l'échappement immunitaire en inhibant le transport du CMH de classe I à la surface des cellules infectées et donc la présentation des antigènes viraux (51).

Lorsque la réponse immunitaire échoue à éliminer l'infection à HPV, une infection persistante s'installe et peut conduire à des manifestations cliniques variables, développées dans le chapitre 4.2.

3.3. Mécanismes de la carcinogenèse induite par HPV

L'implication d'HPV dans le cancer du col de l'utérus a été démontré il y a maintenant 40 ans, et les types 16 et 18 ont rapidement été mis en cause (52,53). C'est donc selon le modèle du cancer du col de l'utérus que l'implication des HPV dans la cancérogenèse a été établie. Dans les cellules infectées, E5, E6 et E7 constituent les trois oncoprotéines codées par les HPV HR. De par leurs interactions avec de multiples protéines cellulaires, elles créent un environnement favorable à la transformation cellulaire (Figure 6).

3.3.1. Expression de E6 et E7

L'expression prolongée et dérégulée de E6 et E7 des HPV HR constitue l'évènement clé de l'oncogenèse. Parmi les mécanismes menant à cette expression non contrôlée, la perte de la régulation négative exercée par E2 constitue un évènement majeur. La perte de E2 est le plus souvent secondaire à une intégration du génome viral dans le génome cellulaire (coupure ou délétion) (54). Plusieurs études ont montré que la fréquence de l'intégration du génome viral d'HPV était corrélé à la sévérité des lésions (55). La perte de l'expression de E2 peut également survenir par hyperméthylation de l'ADN viral (56).

3.3.2. Dérégulation du cycle cellulaire et immortalisation

La protéine E7 interagit avec pRb, protéine du rétinoblastome, et ses protéines associées p107 et p130 ; ces protéines sont directement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, pRb régule négativement les facteurs de transcription de la famille E2F (E2F1-3), cette association maintenant les cellules dans un état de quiescence en phase G0/G1 du cycle cellulaire. L'interaction de E7 des HPV HR avec pRb conduit à la dégradation de pRb par le protéasome, permettant la libération de E2F et ainsi le passage des cellules en phase S du cycle cellulaire. E7 peut également dégrader p107 et p130 qui sont elles aussi des régulateurs de E2F (10). De plus, E7 inactive directement les protéines p21 et p27, inhibitrices des kinases dépendantes des cyclines (CDK) favorisant une prolifération cellulaire incontrôlée (57). Enfin, même en présence de lésions de l'ADN, E7 peut faciliter la prolifération cellulaire *via* la voie ATR-CHK1 (24).

La protéine E6 joue un rôle complémentaire par rapport à E7, en prévenant l'apoptose des cellules maintenues en phase S par l'action de E7. En effet, une des propriétés les plus importantes de E6 des HPV HR est sa capacité à induire la dégradation de la protéine suppresseur de tumeur p53 (58). En cas de stress cellulaire, p53 est un facteur de transcription activé permettant de stopper le cycle cellulaire afin de réparer d'éventuelles lésions de l'ADN, ou bien d'induire l'apoptose de la cellule, afin de garantir l'intégrité du génome cellulaire et de prévenir l'émergence d'éventuelles cellules anormales. E6 forme un complexe avec la protéine E6AP (E6-associated protein), une ubiquitine ligase cellulaire, ce complexe se lie à p53 et induit sa dégradation par le protéasome. E6 est capable également d'induire l'activation du gène *hTERT* (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) et donc une augmentation de l'activité télomérase contribuant à l'immortalisation de la cellule (59). E6 peut également dégrader d'autres protéines pro-apoptotiques comme Bak et Bax (10).

Le rôle de la protéine E5 dans le processus carcinogène est de plus en plus étudié ; elle semble jouer un rôle en addition des protéines E6 et E7. Notamment, elle est capable elle aussi d'induire la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bax (60) et elle est également impliquée dans le processus de prolifération cellulaire en modulant l'expression du récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor-Receptor*) (61). Cependant, son expression est absente dans la majorité des cancers attribuables aux HPV alors que celle de E6 et E7 est conservée.

3.3.3. Transformation cellulaire

La transformation cellulaire liée aux HPV est rare. *In* vitro, les cellules immortalisées par E6 et E7 peuvent se transformer après un grand nombre de passages ou en co-exprimant une autre protéine oncogène. E6 et E7 induisent une instabilité génétique favorable à la survenue d'anomalies génétiques conduisant au cancer. Les protéines E6 et E7 contribuent toutes deux à la transformation cellulaire. La protéine E6 des HPV HR possède un motif PDZ-ligand, capable de se lier au domaine PDZ de nombreuses protéines et d'induire leur dégradation conduisant notamment à une altération de la polarité cellulaire et de la formation des jonctions serrées et adhérentes de l'épithélium (62). La protéine E7, elle, via des interactions avec les cyclines/CDK2 entraîne des anomalies de

la duplication des centrosomes induisant la formation de faisceaux mitotiques aberrants à l'origine d'aneuploïdies (63). Les deux protéines favorisent donc la perte de la polarité cellulaire et la rupture des jonctions des cellules épithéliales.

Les protéines E5, E6 et E7 sont donc responsables d'une dérégulation du cycle cellulaire avec accumulation de mutations du génome et une progression vers la transformation cellulaire.

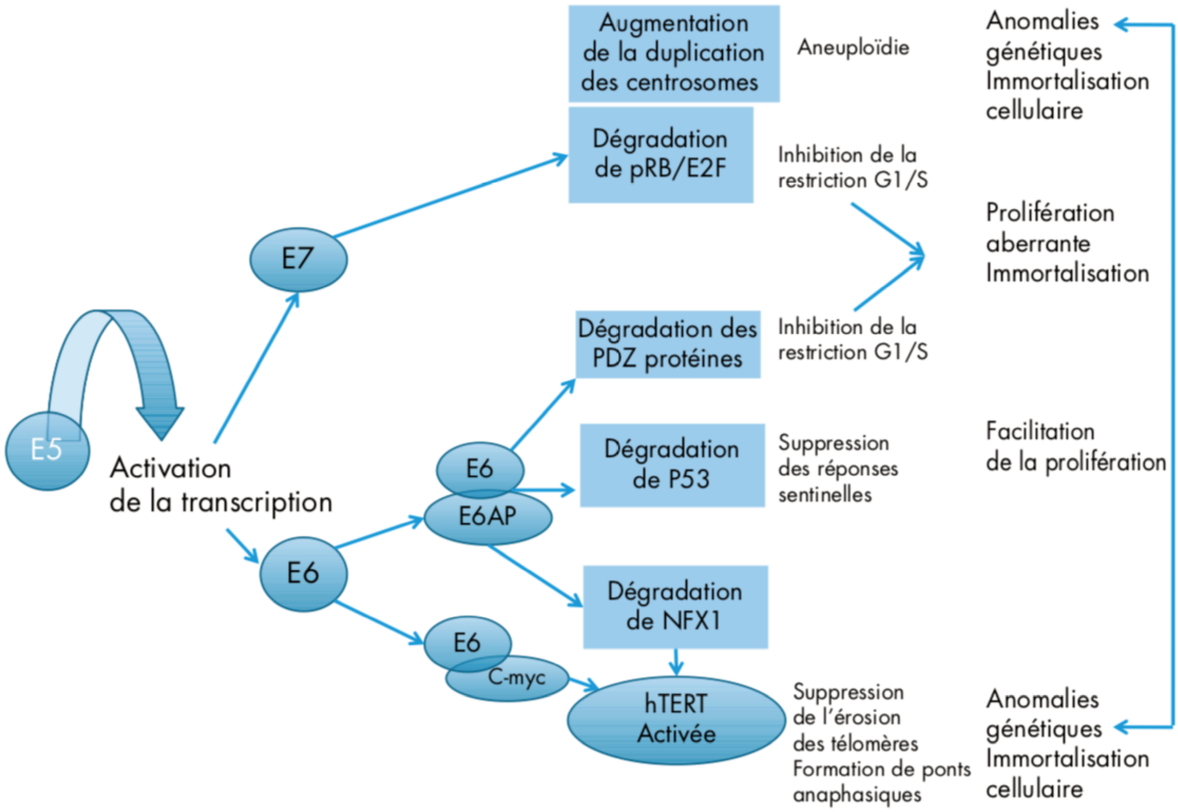


Figure 6 : Représentation schématique des principales étapes de la carcinogenèse induite par les HPV HR

(d'après Alain *et al*, (45))

Les protéines E5, E6 et E7 coopèrent pour transformer des cellules basales et suprabasales. L'activation de la prolifération cellulaire par inactivation de l'entrée en phase S, la dérégulation de la ségrégation des chromosomes et l'augmentation de l'activité télomérase contribuent à augmenter la fréquence des mutations dans les cellules en phase de croissance. L'inhibition des facteurs cellulaires suppresseurs de tumeurs p53 et pRB, empêche la destruction des cellules transformées.

3.3.4. Facteurs associés

L'influence de cofacteurs exogènes peut également favoriser l'infection à HPV, sa persistance ou encore son évolution vers un processus carcinogène. La consommation de tabac, par son rôle carcinogène et également immunosuppresseur, favorise le développement de lésions malignes, quelle que soit la localisation de l'infection (64). Les données épidémiologiques montrent également que les patient VIH+ ont plus de risque de développer des cancers HPV induits, là aussi quelle que soit la localisation de l'infection (cancers oropharyngés, du col de l'utérus, de l'anus ou du pénis) (65–67). Au niveau du col de l'utérus, la multiparité, l'obésité et l'imprégnation oestrogénique du col, acquise ou intervenant lors de la grossesse, favorisent la métaplasie malpighienne et pourrait ainsi faciliter l'évolution vers un cancer (64,68). L'existence d'une coinfection avec d'autres agents d'IST (notamment *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*) pourrait contribuer au développement d'anomalies cervicales (69,70). Au contraire, l'infection concomitante par plusieurs types d'HPV, fréquente chez la population jeune, n'influe pas sur la durée et la persistance de l'infection (71).

4. Infections par HPV : épidémiologie et lésions associées

4.1. Épidémiologie et modes de contamination

Chaque année, plus de 600 000 nouveaux cas de cancers sont attribuables aux HPV (72). La prévalence des infections génitales à HPV dans le monde est estimée à 12% (73) et 75% de la population sexuellement active sera infectée par un HPV au moins une fois dans sa vie (74). Bien que la majorité des cas étudiés le soit chez la femme, le taux naturel d'infection par HPV est globalement similaire chez les deux sexes. De plus, HPV est associé à 100% des cancers cervicaux, presque 90% des cancers anaux, environ 50% des cancers du pénis et 40% des cancers du vagin et de la vulve, environ 30% des cancers de l'oropharynx (variation selon les pays), et plus de 2% des cancers de la cavité buccale (Tableau 3 et Figure 7) (75).

Localisation du cancer	Nouveaux cas (n)	Attribuables à HPV (n)	Fraction attribuable (%)	Attribuables par genre (n)	
				Hommes	Femmes
Col de l'utérus	528 000	528 000	100	_	528 000
Anus	40 000	35 000	88	17 000	18 000
Vagin et vulve	49 000	20 000	41	_	20 000
Pénis	26 000	13 000	51	13 000	_
Oropharynx	96 000	29 000	31	24 000	6 000
Bouche	358 000	9 000	2,4	7 000	2 000
Total	1 097 000	634 000	58	61 000	574 000

Tableau 3 : Nombre global estimé de nouveaux cas de cancers attribuables à HPV en 2012

(d'après Schiffman *et al*, 2016 ((75))

Etude GLOBOCAN 2012

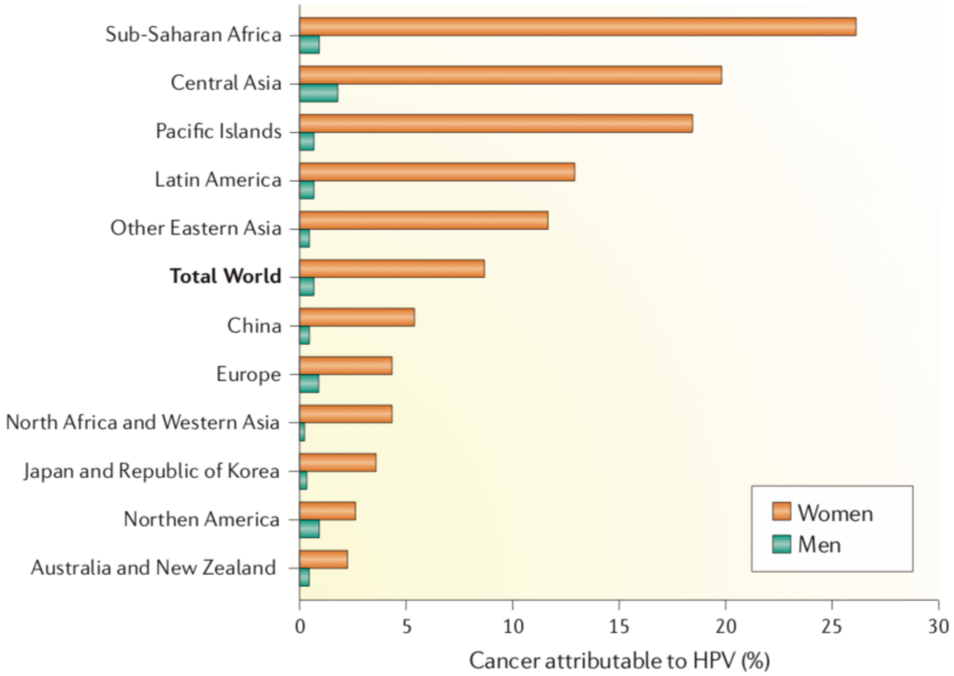


Figure 7 : Répartition globale mondiale des cancers attribuables à HPV en 2012

(d'après Schiffman *et al*, 2016 ((75))

La fraction de cancers attribuables à HPV par genre et région géographique est très variable. La nette prédominance de cancers féminins reflète la part importante des cancers du col de l'utérus, quasiment tous attribuables à HPV. La fraction attribuable est la fraction de cancers qui ne seraient pas survenus s'il n'y avait pas eu d'exposition à HPV.

La transmission du Papillomavirus Humain peut se faire par contact direct entre individus infectés par HPV, ou par auto-inoculation. Elle peut également se faire par contact indirect avec des objets ou surfaces souillés par le virus, grâce à sa résistance dans l'environnement (76). Concernant l'appareil génital, la transmission du papillomavirus humain est principalement sexuelle ; l'infection à HPV est en effet la première IST dans le monde (77). Les rapports à risque de transmission comprennent les rapports sexuels vaginaux et anaux, mais également les activités sexuelles sans pénétration, ainsi que le sexe oral (78). Enfin, une transmission verticale *in utero* de la mère à l'enfant, et également en per et post-partum est possible, mais à un degré moindre (79).

Hommes et femmes sont donc les deux principaux maillons de la chaine de transmission de ce virus. Ils peuvent être à la fois porteurs asymptomatiques, transmetteurs ou victimes d'infection productive à HPV, dont les manifestations sont développées dans le chapitre suivant.

4.2. Manifestations cliniques associées aux HPV

Les HPV sont des virus ubiquitaires bien adaptés à l'être humain, dont presque toutes les parties du corps peuvent être affectées. Les infections peuvent être totalement inapparentes ou donner des manifestations cliniques allant de lésions bénignes telles que des verrues (lésions cutanées) ou des condylomes (lésions des muqueuses), à des lésions précancéreuses ou cancéreuses. Bien que certains types d'HPV soient associés à des atteintes cliniques caractéristiques (Tableau 4), ces associations ne sont pas absolues. Les infections à HPV peuvent être productives, infracliniques ou latentes, aussi bien dans les atteintes cutanées que muqueuses (80).

Lésions	Principaux types d'HPV associés
Verrues communes	HPV 2, 4, 7
Verrues planes	HPV 3, 10, occasionnellement 26, 29 et 41
Verrues plantaires	HPV 1, 2, 4
Epidermodysplasie verruciforme Verrues planes Plaques pityriasis-like Carcinome de la peau exposée au soleil	 HPV 3, 10 HPV 5, 8 HPV 5, 8
Verrues anogénitales Condylomes acuminés Tumeur de Buschke Lowenstein (condylome acuminé géant) Papulose bowénoïde	 HPV 6, 11, 40, 42-44, 54, 61, 72, 1, 89 HPV 6, 11 HPV 16, 55
Pré-cancers et cancers anogénitaux	Groupe 1 (oncogènes) Groupe 2A (probablement oncogènes) Groupe 2B (possiblement oncogènes)
Lésions orales et oropharyngées Papillomes oraux Papillomes laryngés et papillomatose respiratoire juvénile Hyperplasie focale (maladie deHeck) Cancer oropharyngé	 HPV 2, 6, 7, 11, 16, 18, 32, 57 HPV 6, 11 HPV 13, 32 HPV 16

Tableau 4 : Types d'HPV et lésions particulières associées

(d'après Cubie, 2013 (80))

4.2.1. Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme cutané

4.2.1.1 Verrues cutanées

Les verrues communes ou « vulgaires » de la peau sont des lésions bénignes isolées ou multiples et de taille variable (Figure 8). Elles se transmettent par contact direct de personne à personne, ou indirectement via des objets ou surfaces contaminées, la transmission étant facilitée par des lésions de la peau, même minimes (80). Elles sont associées préférentiellement avec un génotype donné selon leur localisation (Tableau 4). Les verrues vulgaires siègent préférentiellement au niveau du dos de la main, mais peuvent être retrouvées au niveau des genoux chez les enfants. Leur prévalence s'échelonne de 3,5% chez l'adulte à plus de 30% chez l'enfant (81). Les verrues plantaires peuvent prendre l'aspect de lésions douloureuses piquetées de noir appelées myrmécies, ou alors un ensemble de lésions plus superficielles et moins douloureuses appelées

verrues mosaïques. Les verrues planes, elles, sont des petites lésions légèrement surélevées pouvant être pigmentées et siégeant fréquemment au niveau du dos de la main ou du visage. Elles s'arrachent facilement et se propagent assez vite sur le visage, le cou et les lèvres.

Figure 8 : Aspect clinique de verrues cutanées

a et b. Verrues communes sur le dos de la main et périunguéales (d'après Cubie, 2013 (80))

c. Verrues planes sur le visage (Mayo Foundation for Medical Education and Research)

d. Verrues plantaires (d'après Cubie, 2013 (80))

4.2.1.2 Epidermodysplasie verruciforme

L'épidermodysplasie verruciforme est une maladie génétique récessive rare, caractérisée par une infection cutanée chronique disséminée à HPV. Elle est associée à une mutation d'un des deux gènes *EVER1* ou *EVER2*. Les gènes *EVER* codent pour des protéines transmembranaires qui interviennent dans l'homéostasie du zinc : leur mutation entraîne une susceptibilité aux infections par plus de 40 types de β-papillomavirus. Les patients peuvent présenter des lésions prenant l'apparence de verrues planes, de macules hyper ou hypo-pigmentées, pouvant se réunir sous forme de plaques, ou également sous forme de lésions verruqueuses. Ces lésions possèdent un risque important de

transformation avec l'exposition au soleil. Les HPV 5 et 8, classés comme oncogènes possibles selon l'IARC (2B), sont les génotypes les plus souvent impliqués dans les phénomènes de transformation (80).

4.2.1.3 Syndrome WHIM

Le syndrome WHIM est un syndrome congénital rare, secondaire à un déficit immunitaire. L'acronyme WHIM signifie *Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis*, et résume les principales caractéristiques cliniques de la maladie. Les patients présentent entre autres, des verrues cutanées et des condylomes anogénitaux dus à des infections persistantes par HPV. La transmission se fait selon un mode autosomique dominant, et la maladie est due dans 98% des cas à une mutation entrainant une activation de la voie de signalisation associée au récepteur de chimiokine CXCR4. Les lésions du tractus génital et oropharyngé peuvent évoluer en cancer (82).

4.2.1.4 Carcinomes épidermoïdes cutanés

Le lien entre HPV et les cancers cutanés, carcinomes épidermoïdes (SCC) et carcinomes basaloïdes (BCC) n'est pas clair, excepté chez les patients immunodéprimés. Des HPV muqueux, en particulier HPV16, sont parfois détectés dans les SCC et BCC, et plus rarement, les génotypes 2, 31, 34, 35, 58, 61 et 73 (83).

La maladie de Bowen est un carcinome épidermoïde *in situ* de la peau. Dans 3 à 5% des cas, il évolue vers un carcinome invasif pouvant être associé à des métastases (84).

4.2.2. Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme muqueux

4.2.2.1 Lésions génitales

L'ADN d'HPV à tropisme muqueux est détecté dans les prélèvements cervicaux en absence de toute manifestation clinique chez 11 à 12% des femmes, partout dans le monde avec de grandes variations selon les régions et les populations. Les infections peuvent donc être totalement inapparentes, tant sur le plan clinique

qu'anatomopathologique. HPV16 est le génotype le plus souvent détecté même lorsque la cytologie est normale (73).

Les condylomes acuminés sont des manifestations fréquentes de l'infection à HPV au niveau des muqueuses anales et génitales (organes génitaux externes et col chez la femme, testicules et pénis c hez l'homme). Ces lésions se présentent sous la forme d'excroissances dites en « crête de coq » (Figure 9), pouvant récidiver après traitement, surtout si une immunodépression survient. Les HPV les plus fréquemment mis en cause sont les génotypes 6, 11 (85).

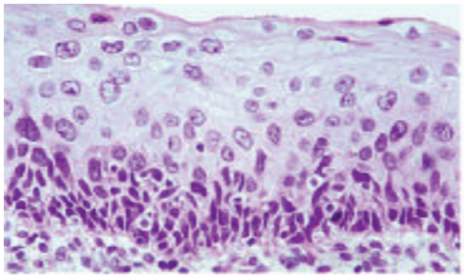
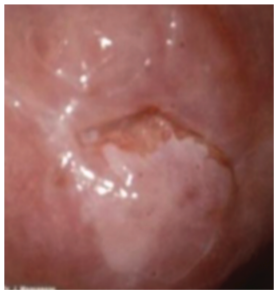
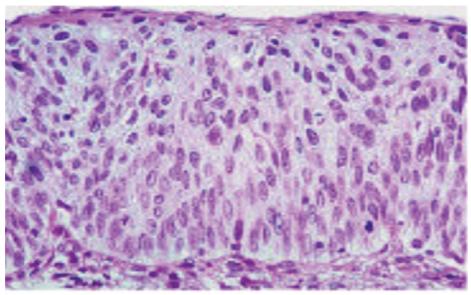
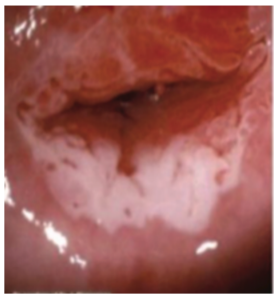
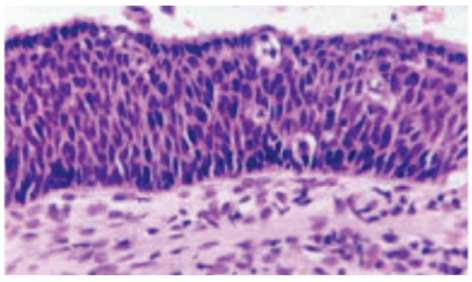
Figure 9 : Aspect clinique de condylomes acuminés anogénitaux

(d'après Cubie, 2013 (80))

4.2.2.2 Les lésions intraépithéliales de bas-grade, haut-grade et cancers

Les lésions précancéreuses du col de l'utérus sont classées en trois groupes histologiques selon la classification de Richart, en fonction de la proportion et de la hauteur de l'épithélium anormal. Comparé à un épithélium malpighien normal, une CIN (néoplasie intraépithéliale cervicale) est caractérisée par des perturbations architecturales, avec des troubles de la différenciation cellulaire, associées à des anomalies cytologiques : les CIN1 correspondant à des lésions de bas grade (LSIL), et les CIN2 et CIN3 correspondant à des lésions de haut-grade (HSIL) (Tableau 5). Les lésions de haut-grade regroupent des dysplasies s'étendant de 2/3 à la totalité de l'épithélium et également les carcinomes *in situ*. Les deux formes histologiques majeures du cancer cervical invasif (ICC) sont les carcinomes épidermoïdes (environ 85%) et les adénocarcinomes (environ 15%). Cette

classification est superposable pour les autres localisations (vagin, vulve, anus et pénis). Sur le plan cytologique, la classification de référence est celle de Bethesda (Tableau 6) ; la corrélation cyto-histologique n'étant pas parfaite, certaines lésions classées de bas grade en cytologie peuvent s'avérer de haut grade en histologie. Les lésions de bas grade présentent des signes d'infection productive avec la présence de koïlocytes visibles en cytologie et histologie. HPV16 est détecté dans 20 à 28% des FCU présentant une cytologie normale ou une lésion de bas-grade LSIL/CIN1, dans 40/47% des CIN2/HSIL et dans 58/63% des CIN3/ICC (86).

Lésion	CIN	Histologie	Images colposcopiques
Dysplasie légère (avec koïlocytose)	CIN1		
Dysplasie modérée	CIN2		
Dysplasie sévère Carcinome in situ	CIN3		

LSIL — Lésion intra-épithéliale de bas grade

HSIL — Lésion intra-épithéliale de haut grade

Tableau 5 : Classification des anomalies histologiques cervicales selon Richart

La classification histologique la plus récente et qui est actuellement utilisée est la terminologie LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*), qui distingue les lésions de haut grade (HSIL) et de bas grade (LSIL).

Anomalies malpighiennes	
ASC-US	Atypies de nature indéterminée
ASC-H	Atypies ne pouvant exclure une lésion de haut grade
LSIL	Lésion intraépithéliale de bas grade
HSIL	Lésion intraépithéliale de haut grade
Carcinome	
Anomalies glandulaires	
AGC	Atypies glandulaires
AIS	Adénocarcinome *in situ*
Adénocarcinome	

Tableau 6 : Classification des anomalies cytologiques cervicales selon Bethesda

ASC-US : *Atypical Squamous Cells of Undertermined Significance Lesions*
ASC-H : *Atypical Squamous Cells Evocating High-grade Lesions*
LSIL : *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions*
HSIL : *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions*
AGC : *Atypical Glandular Cells*
AIS : *Adenocarcinoma in situ*

Outre le cancer du col de l'utérus, des dysplasies et des cancers peuvent également être observés au niveau de la vulve, du vagin, du pénis et de l'anus. La proportion de cas attribuables à HPV est résumée dans le Tableau 3.

4.2.2.3 Lésions et cancers de la muqueuse oropharyngée et des voies aérodigestives supérieures

En dehors de la sphère génitale, les HPV peuvent être responsables d'infection des VADS, pouvant se présenter sous la forme de papillomes, condylomes, verrues ou encore de cancers.

L'hyperplasie épithéliale focale ou maladie de Heck est une affection rare de la muqueuse orale associée à HPV, plus souvent rencontrée chez les femmes et les enfants de certaines populations (esquimaux, amérindiens, maghrébins, turcs). Les lésions sont localisées au niveau de la sphère orale (lèvre, langue, palais) et se caractérisent par des papules. Les HPV 13 et 32 sont les plus fréquemment retrouvés (87).

La papillomatose laryngée juvénile est la tumeur la plus fréquente du larynx de l'enfant. Elle se manifeste avant 5 ans, et son mode de transmission le plus probable est vertical, lors du passage du nouveau-né dans la filière génitale maternelle infectée. La forme adulte, elle, débute typiquement entre 20 et 40 ans, et la transmission serait plutôt orogénitale. Les papillomes sont des lésions proches des condylomes et siègent principalement au niveau du larynx, mais peuvent s'étendre à tout l'arbre respiratoire, ainsi qu'au pharynx et à l'œsophage. Les HPV impliqués sont les mêmes que ceux des condylomes, à savoir HPV6 et 11, HPV11 semblant être associé à des formes plus sévères, avec un risque accru d'obstruction des voies aériennes (88). Le risque de transformation de ces lésions bénignes reste faible (<1%) (89).

Une méta-analyse récente a montré une augmentation de la fréquence des cancers oropharyngés (50 000 cas par an dans le monde) (90). Ce phénomène est associé à l'augmentation de l'incidence des cancers oropharyngés attribuables aux HPV, estimé à 41% en 2000 contre 72% en 2004, probablement dû aux modifications des pratiques sexuelles. Les cancers oropharyngés associés à HPV sont de meilleur pronostic que les cancers non viro-induits. La recherche d'une infection à HPV dans les cellules tumorales fait désormais partie du bilan initial (marqueur pronostique). Le génotype retrouvé en majorité est également HPV16 (au moins 85% des cas) ; HPV18, 31, 33 et 35 pouvant également être détectés (91).

4.2.3. Immunodépression acquise et HPV

De par les traitements immunosuppresseurs qui leur sont administrés, les patients transplantés d'organes solides présentent un terrain favorable aux infections. Un large spectre d'HPV est trouvé dans les lésions présentées par ce type de patients, et, contrairement aux personnes immunocompétentes, la régression spontanée n'est que très

rarement constatée. Des lésions à HPV sont détectables chez 24 à 53% des patients dès les premiers mois suivant la transplantation. De plus, la prévalence des manifestations cliniques augmente avec la durée du traitement immunosuppresseur (92). En effet, cinq ans après la greffe, 85% des patients ayant subi une transplantation rénale développent des lésions dues à HPV, se présentant le plus souvent sous forme de papillomatoses extensives. Enfin, le risque de transformation de ces lésions cutanées chez le patient transplanté rénal est de 14% dans les dix premières années suivant la greffe, et 40% dans les vingt ans post-greffe, et une association entre HPV et les carcinomes épidermoïdes présentés par ces patients a été retrouvé dans la majorité des cas (93).

Les patients vivant avec le VIH eux, sont plus susceptibles de développer des lésions à HPV, malignes ou non. Les atteintes anogénitales et oropharyngées sont les manifestations les plus courantes de l'infection à HPV dans cette population (94). De plus, il existe une corrélation entre la diminution progressive du nombre de CD4+ et la détection accrue d'HPV au niveau anal et cervical, indiquant qu'une immunodépression plus importante serait associée à une réplication plus intense d'HPV (95). Le taux de transformation est également plus important que dans la population générale, avec une augmentation de la prévalence des cancers oropharyngés à HPV ainsi que des néoplasies intraépithéliales ano-génitales. Enfin, des papillomatoses disséminées peuvent également être observées qui pourraient être en lien avec le syndrome de restauration immunitaire pouvant apparaître chez certains patients recevant une thérapie antirétrovirale (96).

5. Les pathologies oculaires associées aux papillomavirus

5.1. Brefs rappels anatomiques et histologiques de la surface oculaire

La surface oculaire est constituée de l'ensemble des composants qui assurent l'interface entre l'œil et le milieu extérieur. Cette entité inclut les paupières, la conjonctive, le tissu lymphoïde conjonctival, la cornée, les nerfs sensitifs de la cornée, les glandes lacrymales et le film lacrymal, et également le limbe. Le limbe est la zone de jonction entre la cornée et la sclérotique et sa fonction première est le renouvellement de l'épithélium de la cornée, car il héberge les cellules souches épithéliales de la cornée. Dans chaque tissu, les carcinomes ont une localisation préférentielle. Comme vu précédemment pour le

cancer du col de l'utérus, les épithéliums de transition ou de jonction sont particulièrement exposés au développement de carcinomes, et c'est également le cas de la zone de jonction cornéolimbique (Figure 10) (97). En effet, à leur niveau deux micro-environnements différents se côtoient, pouvant favoriser l'apparition de dysplasies et de carcinomes *in situ* puis invasifs (98). Les différences de vitesse de renouvellement cellulaire pourraient avoir un impact sur le risque de transformation. Certains épithéliums comme celui de la cornée et de l'intestin grêle ont un renouvellement très rapide (moins de 3 jours) et seraient relativement protégés des carcinomes, alors que ceux à renouvellement lent seraient plus exposés comme dans le côlon. Les épithéliums de jonction sont à cycle lent. Ainsi, les carcinomes sont plus fréquents au niveau de la marge palpébrale et du limbe (99). De plus, ces deux localisations sont plus exposées aux irritations chroniques environnementales et aux rayons ultraviolets qui constituent un facteur de risque supplémentaire de cancer.

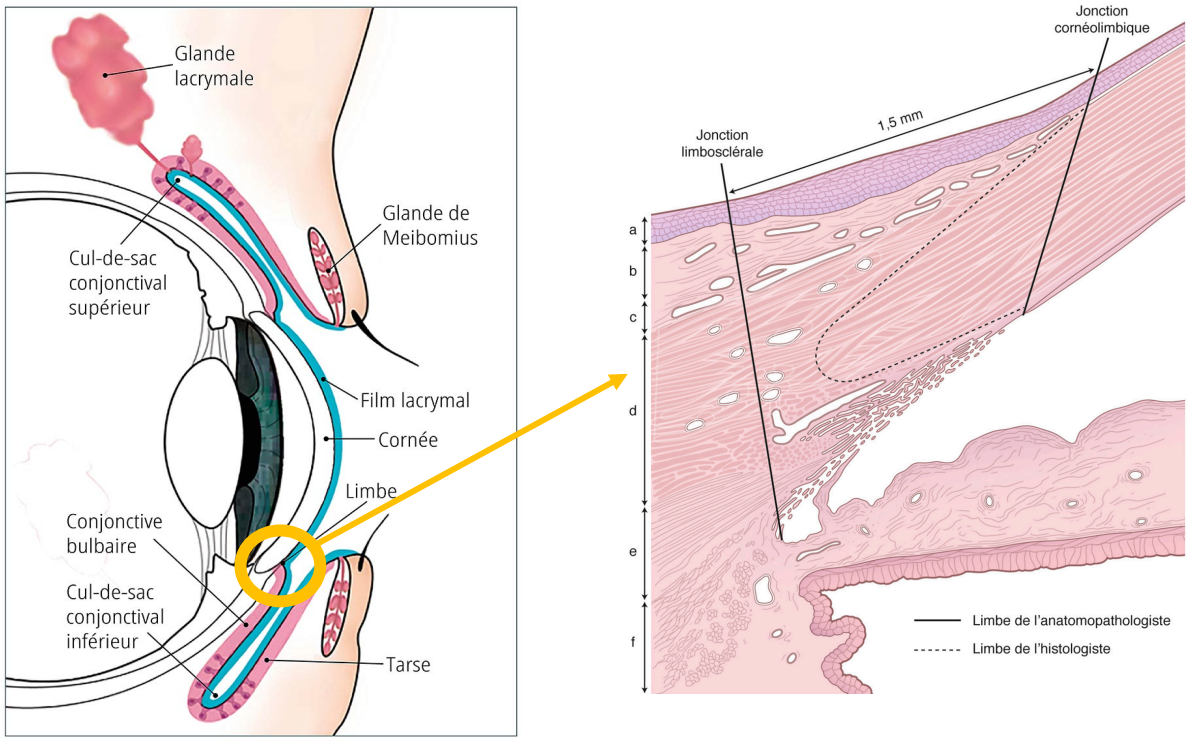


Figure 10 : Représentation schématique anatomique et histologique de la surface oculaire et du limbe

(adapté d'après (100) et (101))

a. épithélium conjonctival ; b. stroma conjonctival ; c. capsule de Tenon et épisclère ; d. stroma limbique et cornéoscléral ; e. muscle ciliaire ; f. partie circulaire et radiaire du muscle ciliaire.

5.2. Modes de contamination

L'auto-inoculation via des doigts contaminés par une surface ou des lésions semble être la source majeure de contamination de l'œil. En effet, une étude a montré la présence d'HPV sur les doigts de patients présentant des verrues génitales (37,5% des femmes, n=3 et 69% des hommes, n=9) (102). De plus, il semble exister une transmission verticale de la mère à l'enfant durant le travail et lors du passage de la filière génitale, comme le montre la détection d'HPV dans le papillome conjonctival d'un enfant né d'une mère présentant une infection vulvaire à HPV durant la grossesse (103).

5.3. Tumeurs de la surface oculaire et HPV

Il existe une grande variété de tumeurs de la surface oculaire ; en effet, l'ensemble des éléments constituant l'épithélium et le stroma conjonctival peut être à l'origine d'un processus tumoral. Les tumeurs bénignes sont ainsi beaucoup plus fréquentes que les tumeurs malignes, plus rares, essentiellement représentées par les néoplasies épidermoïdes, le lymphome et le mélanome. Comme pour les autres localisations, les HPV peuvent être présents au sein d'une conjonctive ne présentant aucune anomalie clinique ou histologique. Le rôle d'HPV dans les lésions bénignes et malignes de l'œil n'est pas complètement élucidé (104). Seront développées ici les papillomes, les ptérygions et les néoplasies épidermoïdes.

5.3.1. Papillome conjonctival et HPV

Le papillome conjonctival est une tumeur bénigne relativement fréquente, se présentant sous la forme d'une excroissance, qui peut être sessile ou pédiculée, et souvent d'aspect rosé dû à la présence d'une forte vascularisation de la lésion (Figure 11). Le siège de prédilection des papillomes est le cul-de-sac ou la conjonctive bulbaire. Ils peuvent apparaître à la fois chez l'adulte et l'enfant, bien que l'incidence la plus élevée se situe entre 20 et 39 ans, ce qui correspond également au pic d'incidence de l'infection génitale à HPV chez les jeunes adultes sexuellement actifs, avec une prédominance masculine (environ 60% des papillomes) (105).

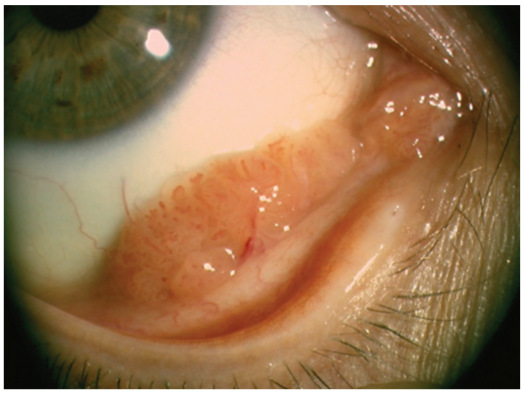


Figure 11 : Aspect clinique d'un papillome conjonctival du cul-de-sac inférieur

(image de la SFO (101))

L'étiologie des papillomes conjonctivaux n'est pas parfaitement connue, mais la relation causale avec la présence d'HPV a été documentée. Les études qui ont un nombre conséquent d'échantillons cliniques montrent la présence d'un HPV dans la majorité des lésions (Tableau 7). Les HPV6 et 11 sont les HPV plus fréquemment détectés (106).

Auteurs	Date de publication	Prévalence d'HPV	Types d'HPV	Méthode de détection	Nombre d'échantillons
McDonnell *et al* (107)	1987	65%	6, 11	ISH	23
Mincione *et al* (108)	1992	50%	6, 11	ISH	4
Saegusa *et al* (109)	1995	100%	16	PCR	5
Nakamura *et al* (110)	1997	50%	6	PCR	8
Sjö *et al* (111)	2001	92%	6, 11, 16	PCR	52
Minchiotti *et al* (112)	2006	100%	11	PCR	4
Sjö *et al* (113)	2007	81%	6, 11, 45	PCR	106
Takamura *et al* (114)	2008	100%	_	PCR	8

Tableau 7 : Détection d'HPV dans les papillomes conjonctivaux

(d'après Chalkia *et al*, (106))

PCR : *Polymerase Chain Reaction* ; ISH : Hybridation *in situ*

Comme les autres papillomes, les papillomes conjonctivaux sont des lésions avec un très faible potentiel de transformation (111), bien qu'une évolution vers une tumeur maligne ait déjà été décrite (115).

5.3.2. Ptérygions et HPV

Le ptérygion est une lésion fréquente et bénigne de la conjonctive située la plupart du temps du côté interne de l'œil (vers le nez) (Figure 12). Elle possède une forme d'aile caractéristique, pouvant envahir la cornée et menacer alors la vision. Outre une prédisposition génétique, les facteurs extrinsèques, notamment l'exposition aux UV et aux poussières, jouent un rôle primordial dans sa genèse, ce qui expliquerait la grande fréquence du ptérygion dans la zone intertropicale et dans certaines professions particulièrement exposées à ces facteurs (116). En effet, la prévalence du ptérygion est variable selon les régions, inférieure à 2% dans les pays tempérés, elle peut aller jusqu'à 30% dans la zone intertropicale (117).

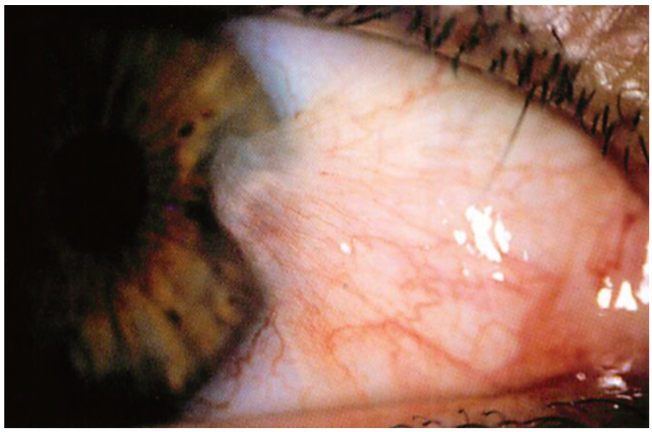


Figure 12 : Aspect clinique d'un ptérygion

(d'après Twelker *et al*, (118))

Cependant, de récentes études ont suggéré qu'HPV pourrait également être impliqué dans la physiopathologie du ptérygion. En effet, sa formation serait plutôt un processus en plusieurs étapes, dans lequel les facteurs génétiques et environnementaux, ainsi que les infections par certains virus seraient susceptibles d'être impliqués (119). La relation entre HPV et les ptérygions a été depuis largement étudiée (Tableau 8). Des variations importantes de détection existent entre les différentes études, allant de 0 à 100%. Ce manque de consensus entre les études peut notamment être expliqué par des différences de méthodologie et de technique de détection. L'étude de Piras *et al* (134), a montré une incidence de 100% d'HPV dans des cas de ptérygions provenant d'Italie, contre 21% pour des ptérygions d'Équateur, et ce, en utilisant la même technique de détection, la PCR. Les différences géographiques de prévalence du virus pourraient expliquer ces variations, soutenant l'hypothèse d'une physiopathologie multifactorielle du ptérygion (120).

Auteurs	Date de publication	Pays	Prévalence d'HPV	Types d'HPV	Méthode de détection	Nombre d'échantillons
McDonnell *et al* (121)	1992	USA	0%	_	PCR	6
Varinli *et al* (122)	1994	Turquie	64%	_	IHC	25
Dushku *et al* (123)	1999	USA	0%	_	PCR	13
Detorakis *et al* (124)	2001	Grèce	24%	18	PCR	50
Gallagher *et al* (125)	2001	UK	50%	6, 11, 16	PCR	10
Piras *et al* (126)	2003	Italie	100%	_	PCR	41
		Équateur	21%		PCR	
Chen *et al* (127)	2003	Taiwan	0%	_	PCR	65
Ateenyi-Agaba *et al* (128)	2004	Ouganda	50%	11, 37	PCR	10
Schellini *et al* (129)	2006	Brésil	0%	_	PCR	36
Kuo *et al* (130)	2006	Taiwan	0%	_	PCR	4
Sjö *et al* (113)	2007	Danemark	4,4%	6	PCR	90
Takamura *et al* (114)	2008	Japon	4,8%	_	PCR	42
Rodrigues *et al* (131)	2008	Brésil	58,3%	1, 2, 16	PCR	36
Otlu *et al* (132)	2009	Turquie	0%	_	PCR	40
Tsai *et al* (133)	2009	Taiwan	24%	16, 18	PCR	129
Piecyk-Sidor *et al* (134)	2009	Pologne	27,6%	5, 6, 11, 16, 18, 31, 52, 59	PCR	58
Hsiao *et al* (135)	2010	Taiwan	3%	18	PCR	65
Chong *et al* (136)	2014	Malaisie	64,4%	16, 18, 58, 59	PCR	45
Hamed-Azzam *et al* (137)	2016	Israël	0%	_	IHC	100
Chalkia *et al* (138)	2018	Grèce	42,86%	33, 39, 45, 56, 59, 66	PCR	21

Tableau 8 : Détection d'HPV dans les ptérygions

(d'après Chalkia *et al*, (106))

PCR : *Polymerase Chain Reaction* ; IHC : Immunohistochimie

5.3.3. Néoplasies épidermoïdes et HPV

Les néoplasies épidermoïdes de la surface oculaire comprennent un spectre large de tumeurs affectant la conjonctive et la cornée, allant de néoplasies intraépithéliales telles que des dysplasies et carcinomes *in situ*, jusqu'à différents grades de carcinomes

épidermoïdes invasifs. Elles se présentent souvent sous la forme d'une lésion sessile, gélatineuse, bien définie et légèrement surélevée, située près du limbe, et pouvant s'étendre sur la cornée (Figure 13).

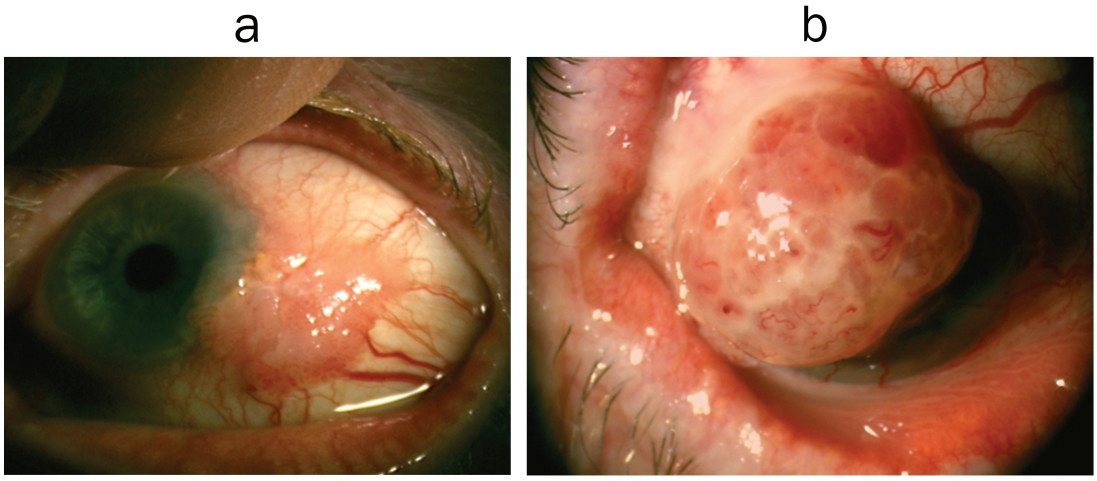


Figure 13 : Aspect clinique de carcinome in situ (a) et de carcinome épidermoïde invasif (b)

(images de la SFO (101))

L'absence d'envahissement cornéen et une importante vascularisation seraient plutôt en faveur d'un carcinome invasif mais il n'y a pas de critères cliniques clairs pour différencier les lésions purement intraépithéliales (dysplasies et carcinomes in situ), des lésions ayant envahi le chorion (carcinomes invasifs) (101). Le diagnostic de certitude est histologique (Figure 14).

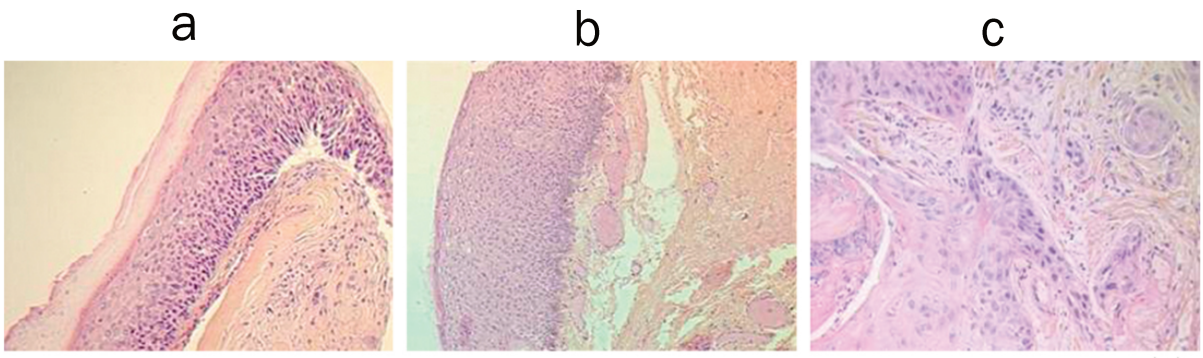


Figure 14 : Aspects histologiques des néoplasies épidermoïdes de la surface oculaire

(images de la SFO (101))

a. Dysplasie conjonctivale avec atypies modérées ; présence d'atypies cellulaires plus ou moins marquées n'intéressant que les couches profondes de l'épithélium, les couches les plus superficielles étant normales.

b. Carcinome épidermoïde *in situ* ; les atypies sont plus sévères et intéressent toute l'épaisseur de l'épithélium, mais elles respectent la membrane basale.

c. Carcinome épidermoïde invasif ; les anomalies sont similaires au carcinome épidermoïde *in situ* mais avec franchissement de la membrane basale et envahissement du chorion sous-jacent.

L'incidence de ces cancers semble également être fortement corrélée à l'immunodépression ; en effet une incidence plus élevée de ces pathologies est montrée dans les pays où l'infection par le VIH est épidémique (139). Cependant, d'autres facteurs de risque sont associés avec ces pathologies : l'âge avancé, le sexe masculin et l'exposition aux UV notamment (139).

Auteurs	Date de publication	Pays	Prévalence d'HPV	Types d'HPV	Méthode de détection	Nombre d'échantillons
Lauer *et al* (140)	1990	USA	80%	16, 18	PCR	5
Tuppurainen *et al* (141)	1992	Finlande	0%	_	PCR/ISH	4
McDonnell *et al* (121)	1992	USA	88%	16	PCR	42
Tabrizi *et al* (142)	1997	Australie	39%	6, 11, 16, 18	PCR	88
Karcioglu *et al* (143)	1997	UK	55,6%	16, 18	PCR nichée	45
Dushku *et al* (123)	1999	USA	0%	_	PCR nichée	8
Toth *et al* (144)	2000	USA	22%	16, 18	PCR	23
Scott *et al* (145)	2002	USA	100%	16, 18	PCR/ISH	10
Eng *et al* (146)	2002	USA	0%	_	PCR nichée	20
Tulvatana *et al* (147)	2003	UK	0%	_	PCR	30
Ateenyi-Agaba *et al* (128)	2004	Ouganda	86%	_	PCR	21
Moubayed *et al* (148)	2004	Tanzanie	93%	6, 11, 18	PCR	14
Tornesello *et al* (149)	2006	UK	19,8%	6, 18	PCR	86
Kuo *et al* (130)	2006	Taiwan	100%	6, 11, 16, 18, 33, 37, 58, 72	PCR nichée	9
Sen *et al (150)*	2007	Inde	0%	_	IHC	30
Manderwad *et al* (151)	2009	Inde	0%	_	PCR	57
Guthoff *et al* (152)	2009	Allemagne	0%	_	PCR/IHC	31
Asadi-Amoli *et al* (153)	2011	Iran	88%	_	PCR nichée	50
Chauhan *et al* (154)	2012	UK	11%	16	PCR	64
Woods *et al* (155)	2013	Australie	6,5%	16	PCR nichée	50
Afrogheh *et al* (156)	2016	USA	30%	16	ISH/PCR	43

Tableau 9 : Détection d'HPV dans les néoplasies épidermoïdes de l'œil

(d'après Chalkia *et al*, (106))

PCR : *Polymerase Chain Reaction* ; IHC : Immunohistochimie ; ISH : Hybridation *in situ*

Différentes études ont été conduites afin de déterminer la prévalence d'HPV dans ces lésions oculaires. Néanmoins, il en résulte une grande variation, avec une détection du virus variant de 0% à 100%. Ainsi, d'après les études rapportées dans le Tableau 9, la prévalence moyenne est de 39% (0-100%). Malheureusement, le statut immunitaire notamment VIH des patients inclus dans ces études n'a pas été mentionné.

5.4. Attribution d'une tumeur aux HPV à haut risque

Il existe plusieurs méthodes en pratique pour attribuer un cancer aux HPV à haut risque. Elles sont utilisées pour les cancers dont une partie n'est pas associée aux HPV, comme les tumeurs de l'oropharynx. Dans les cancers attribuables aux HPV, E6 et E7 sont constamment exprimées. C'est pour cette raison que la détection des ARNm E6/E7 par RT-PCR en temps réel est le « *gold-standard* » ou test de référence (157), témoignant d'une infection transcriptionnellement active. La présence du génome viral, surtout quand elle est mise en évidence par PCR n'est pas suffisante, pouvant être le simple reflet d'une infection concomitante non transformante. Dans une étude menée sur une série de 143 tumeurs oropharyngées, l'ADN d'HPV a été retrouvé dans 24 d'entre elles, mais l'expression de E6/E7 a été mise en évidence sur seulement 12 des 24 tumeurs HPV positives (soit 50%) (158). Une alternative à la détection des ARNm E6/E7 est de détecter la protéine p16, qui est un marqueur indirect de l'expression de E7 des HPV à haut risque. Les tumeurs liées à HPV sont celles où l'ADN viral et la surexpression de p16 sont simultanément détectés (157). Enfin, l'hybridation *in situ* chromogénique est une technique qui, bien que moins sensible que les techniques de PCR, permet de visualiser la présence d'ADN viral dans les cellules tumorales.

V. OBJECTIF DE L'ETUDE

L'objectif principal de notre travail était d'étudier la prévalence des HPV dans une série de biopsies de néoplasies épidermoïdes oculaires, prélevées entre 2010 et 2020 et conservées dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (Dr Eric Frouin) au CHU de Poitiers.

VI. MATERIELS ET METHODES

1. Patients et échantillons

Les patients ont été sélectionnés grâce à une requête informatique réalisée dans le système informatique du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Poitiers avec l'aide du Dr Eric Frouin. La requête, contenant les codes ADICAP : HOE6418 (correspondant aux métaplasies conjonctivales), HOEE5 (correspondant aux néoplasies intraépithéliales), HOEE6 (correspondant aux carcinomes *in situ*), HOEE7 (correspondant aux carcinomes infiltrants) et HOEE4 (correspondant aux kératoses actiniques conjonctivales), a été utilisée dans le logiciel DaVinci® afin d'intégrer l'ensemble des pathologies carcinomateuses de l'œil, de janvier 2010 à mars 2020.

Pour chaque patient, l'âge au moment du diagnostic, le sexe, la nature de la lésion, et le statut immunitaire ont été recueillies.

Une biopsie a été effectuée chez ces patients afin d'identifier la tumeur et été conservée après inclusion en paraffine (Figure 15). Les tissus prélevés ont été fixés dans du formaldéhyde 10%, déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante et inclus en paraffine afin d'obtenir un durcissement des tissus. Les pièces ont été découpées au microtome (Figure 15), permettant d'obtenir des coupes très fines de 10µm. Après apposition sur lame et coloration à l'HES (Hématéine-Eosine-Safran), ces coupes ont fait l'objet d'une double lecture au microscope optique permettant de diagnostiquer et définir le stade histopathologique de la tumeur. Pour notre travail, environ 10 copeaux de paraffine de 10µm d'épaisseur (Figure 15) ont été découpés à partir du bloc incluant chaque tumeur afin d'en extraire et d'étudier l'ADN.

Figure 15 : Biopsie en bloc de paraffine, microtome et copeaux de 10µm

Les tissus prélevés ont été fixés dans du formaldéhyde 10%, déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante et inclus en paraffine afin d'obtenir un durcissement des tissus.

2. Purification d'ADN à partir de tissus conservés dans la paraffine

2.1. Déparaffinage des échantillons

Une étape de déparaffinage des copeaux contenant les tumeurs a précédé l'extraction de l'ADN, selon le protocole en vigueur au laboratoire. Ainsi, pour chaque échantillon, les copeaux de paraffine ont été transférés dans un microtube à vis de 2 mL. Un volume de 1,2 mL de xylène a été ajouté, et l'ensemble a été agité vigoureusement grâce à un vortex pendant une minute. Puis les microtubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 20 000 g, à température ambiante (15-25°C). Le surnageant a alors été éliminé, sans perturber le culot. Un volume de 1,2 mL d'éthanol absolu (96-100%) a été ajouté au culot, afin d'éliminer le xylène résiduel. L'ensemble des microtubes a été agité par vortexage, puis centrifugé selon les mêmes modalités que précédemment. Le surnageant a de nouveau été éliminé, puis un second lavage à l'éthanol a été réalisé, dans les mêmes conditions. Les microtubes ont alors été incubés dans un bain sec à 37°C, pendant environ 15 minutes, jusqu'à obtenir une évaporation complète de l'éthanol résiduel.

2.2. Extraction de l'ADN

Pour procéder à l'étape de purification de l'ADN, le kit d'extraction manuelle QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN™) a été utilisé, selon la procédure fabricant (Figure 16). Le principe de cette extraction repose sur l'adsorption de l'ADN sur une membrane de gel de silice. Le culot des échantillons précédemment obtenus a d'abord été repris dans 180 µL de tampon ATL. Une lyse a été effectuée en ajoutant 20 µL de Protéinase K, et après un bref vortexage des échantillons, ces derniers ont été incubés dans un bain sec à 56°C pendant 2 heures (jusqu'à lyse complète des tissus). Puis un volume de 200 µL de tampon de lyse AL a été ajouté et les échantillons ont été vortexés jusqu'à obtention d'une solution homogène. A ce moment-là, 20 µL de contrôle interne exogène (trousse DICO Extra R-GENE™) ont été additionnés. Les échantillons ont tous ensuite été incubés dans un bain sec à 70°C pendant 10 minutes. La précipitation de l'ADN a été induite par l'addition de 200 µL d'éthanol. La solution de 600 µL ainsi obtenue pour chaque échantillon a été transférée en totalité sur une colonne de silice (QIAamp®), pour lier les acides nucléiques, après une centrifugation de 1 minute à 6000 g. Un premier lavage pour éliminer les impuretés a été réalisé, en utilisant 500 µL de tampon de lavage AW1, suivi d'une

centrifugation à 6000 g pendant 1 minute. Une fois l'effluent éliminé, un deuxième lavage avec 500 µL de tampon de lavage AW2, suivi d'une centrifugation à 20 000 g pendant 3 minutes a été réalisé. Une fois l'effluent à nouveau éliminé, l'ADN a été élué par centrifugation (1 minute à 6000 g) dans 50 µL ou 30 µL (pour certains échantillons avec peu de matériel) de tampon d'élution AE, après une incubation de 5 minutes à température ambiante. Afin de concentrer au maximum l'extrait ainsi obtenu, une deuxième élution avec l'éluat précédemment obtenu a été réalisée dans les mêmes conditions. Les extraits ainsi obtenus ont été conservés à -20 °C, ou utilisés aussitôt.

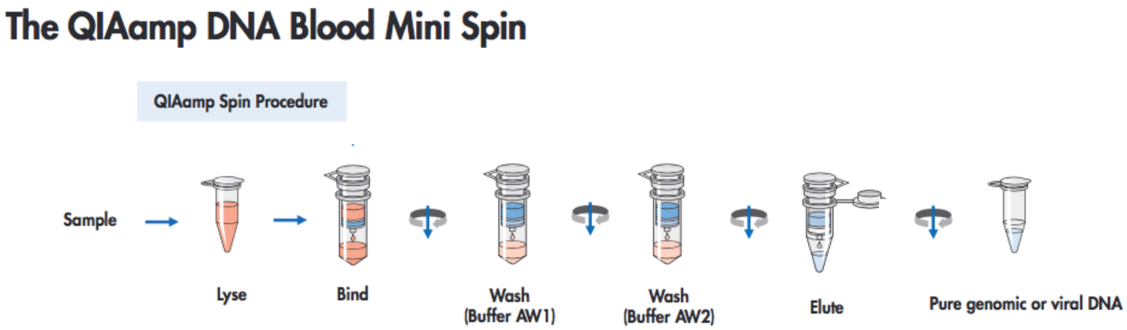


Figure 16 : Protocole d'extraction des acides nucléiques grâce au kit QIAGEN™ (QIAamp® DNA Mini Kit)

3. Estimation de la quantité d'ADN présente dans les échantillons et de la qualité de l'extraction

Une estimation de la quantité d'ADN obtenue dans chaque extrait a été réalisée grâce au recueil de densités optiques (DO) par spectrophotométrie dans le rayonnement ultra-violet à 260nm, spectre d'absorption maximal des acides nucléiques. La pureté de la solution d'ADN a été évaluée par le rapport A260 nm/A280 nm. La pureté est considérée comme acceptable quand ce ratio est compris entre 1,8 et 2.

4. Détection du génome d'HPV par PCR en temps réel

4.1. Principe de la PCR en temps réel

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est aujourd'hui la technique la plus fréquemment utilisée pour la détection des HPV. Elle permet l'amplification d'une séquence nucléotidique spécifique directement à partir de l'ADN extrait d'un échantillon. Dans le cas

des HPV, on utilise un couple d'amorces ciblant et encadrant spécifiquement la séquence subgénomique du génotype que l'on souhaite analyser. Des systèmes multiplex ont été développés, pour lesquels plusieurs couples d'amorces, chacun spécifique d'un génotype que l'on veut identifier, sont réunis dans un même mélange réactionnel. Ils permettent donc de détecter la présence de plusieurs génotypes d'HPV au sein d'une seule réaction de PCR. La réaction comporte en général une quarantaine de cycles. Chaque cycle comporte une étape de dénaturation de l'ADN, une étape d'hybridation des amorces et une étape d'élongation permettant à la *Taq* polymerase de synthétiser le brin d'ADN complémentaire, à partir des nucléotides (dNTPs) présents dans le milieu réactionnel (Figure 17). Ainsi, n cycles de PCR permettent en théorie de produire 2^n copies de la séquence ciblée.

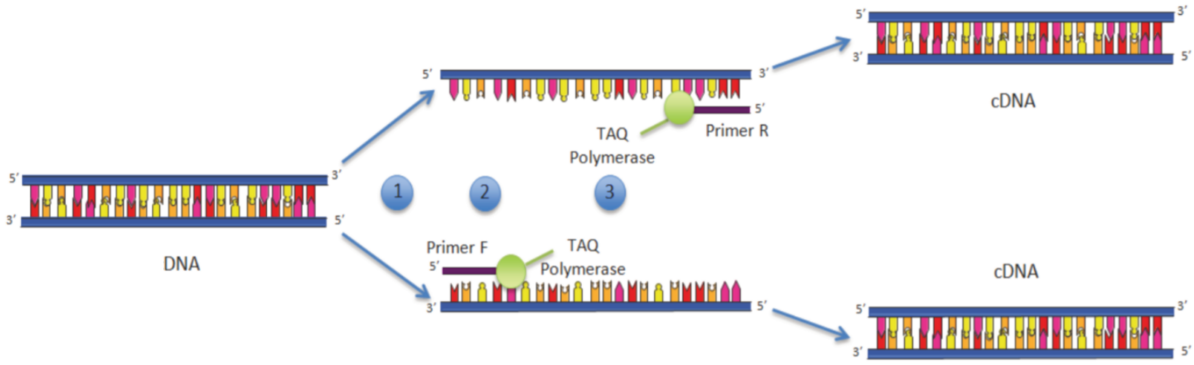


Figure 17 : Principe d'un cycle de PCR

1. Phase de dénaturation de l'ADN à 95°C
2. Phase d'hybridation des amorces sur la séquence cible à 60°C
3. Phase d'élongation avec synthèse du brin d'ADN complémentaire à 72°C

Primer F : Amorce sens, Primer R : Amorce anti-sens

cDNA : brin d'ADN complémentaire

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de détecter l'amplification de l'ADN cible dans une réaction au cours du temps. Cela est possible grâce à une détection de la fluorescence, émise par une ou plusieurs sondes spécifiques de l'ADN cible présentes d'emblée dans le mélange réactionnel, au cours de la répétition de plusieurs cycles de transition de température. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR. Plus l'échantillon est concentré en ADN cible à l'origine, moins il faudra de cycles de PCR pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est alors significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est alors défini comme le cycle seuil ou Ct (pour *Cycle treshold*) et apparaît en début de phase exponentielle. Si l'on suit la

fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe 3 phases distinctes (Figure 18) :

- la phase d'initiation : la quantité de produit amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- la phase exponentielle : la quantité de produit amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite. C'est uniquement pendant cette phase que la quantification est possible.
- la phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction deviennent limitants et le système ne permet donc plus une amplification exponentielle.

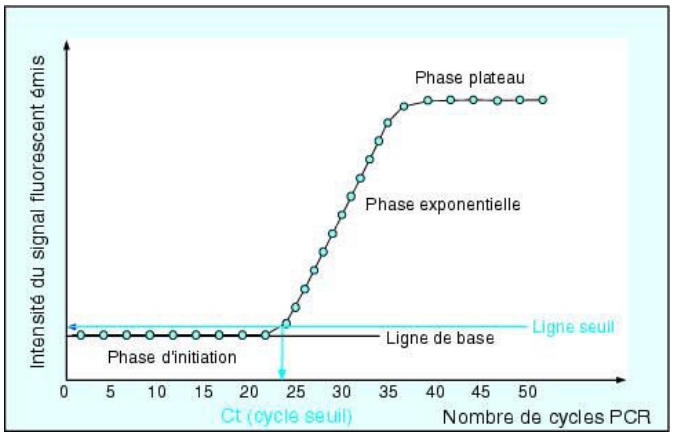


Figure 18 : Les différentes phases d'une PCR en temps réel

La fluorescence est émise soit par un agent intercalant (exemple : SYBR green), qui s'incorpore dans les doubles brins d'ADN, soit, le plus souvent, par une sonde spécifique de la séquence cible (Figure 19). Les sondes les plus fréquemment utilisées sont les sondes d'hybridation, couramment appelées sondes TaqMan®.

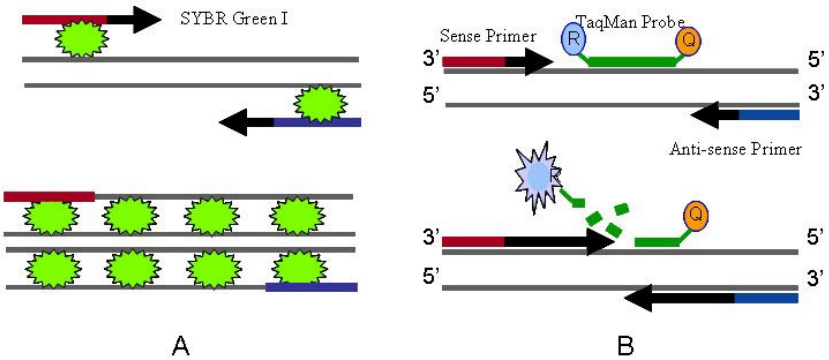


Figure 19 : Émission de la fluorescence lors d'une PCR en temps réel

A : agent intercalant et B : sonde d'hybridation

4.2. Particularités de la trousse Anyplex™ II HPV28 Detection (SEEGENE®)

La trousse Anyplex™ II HPV28 Detection qui a été utilisée permet la détection semi-quantitative par PCR en temps réel de 28 génotypes d'HPV en 2 panels A et B :
- Panel A : détecte les 12 HPV de classe 1 (oncogènes) : HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 et 59 ainsi que le seul HPV de classe 2A (probablement oncogène) : HPV68 et un HPV du groupe 2B, HPV66, antérieurement classé dans les hauts risques.
- Panel B : 6 HPV de classe 2B (possiblement oncogènes) : HPV26, 53, 69, 70, 73 et 82 ainsi que 8 autres HPV à bas risque oncogène (classe 3 ou non classés par l'IARC) : HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54 et 61.

Le contrôle interne (IC), endogène, correspond à l'amplification simultanée du gène de la bêta-globine humaine, qui permet de vérifier la bonne cellularité du prélèvement et l'absence d'inhibiteurs de la PCR.

La détection des HPV par le kit Anyplex™ II HPV28 fait appel à une PCR multiplexe en temps réel particulière, dont le principe repose sur une détection semi-quantitative grâce à la technique CMTA cyclique (*Catcher Melting Temperature Analysis*) (Figure 21), associée à la technologie TOCE (*Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*) (Figure 22). Cette technologie repose notamment sur deux composés essentiels : le *pitcher* et la *catcher* (Figure 20).

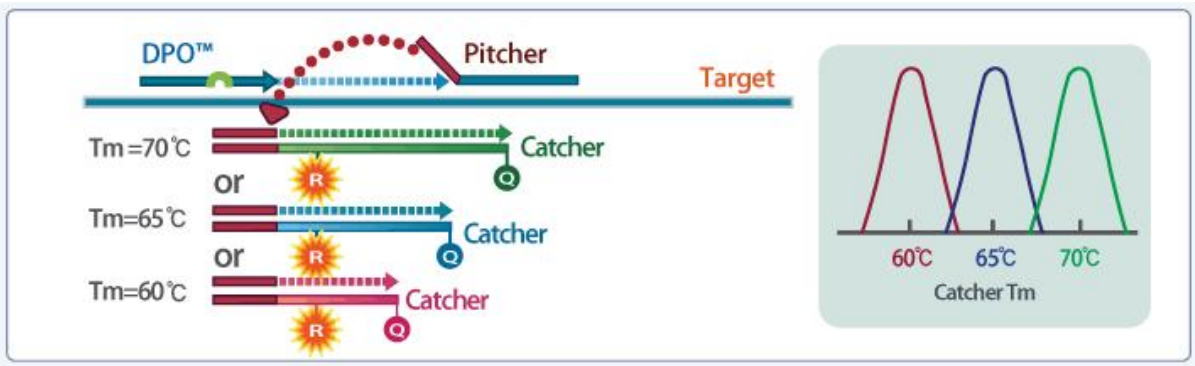


Figure 20 : Ajustement du catcher

Le *pitcher* est un oligonucléotide simple brin qui se lie à la séquence cible. Le *catcher* est une matrice simple brin artificielle marquée par deux fluorochromes, le *quencher* et le *reporter*. En présence de leur séquence cible, les amorces et le *pitcher* se lient à cette séquence. Lors de la phase d'élongation, le *pitcher* est clivé. Sa portion non liée à la séquence cible (ou *tagging portion*) est ainsi libérée et vient s'hybrider à sa séquence complémentaire présente sur le *catcher*. L'élongation de la *tagging portion* sur le *catcher* entraîne la séparation du *quencher* et du *reporter*, permettant alors à ce dernier d'émettre une fluorescence détectée par le CFX™96.

Les matrices spécifiques des 28 HPV et du contrôle interne sont marquées par des fluorochromes différents permettant leur détection simultanée au cours d'une seule et même réaction, via 5 canaux différents (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 et Quasar 705). Par ajustement de la séquence et de la longueur du *catcher*, elles présentent également des températures de fusion différentes permettant leur détection simultanée au sein d'un seul et même canal. Cela permet de discriminer les différents pathogènes détectés dans un même canal fluorescent grâce à l'analyse à 3 reprises de la courbe de fusion (*melting curve*) lors des 30ème, 40ème et 50ème cycle de PCR, et ainsi, de quantifier le ou les HPV présents, de façon semi-quantitative (+++, ++, + ou indétectable) (Figure 21).

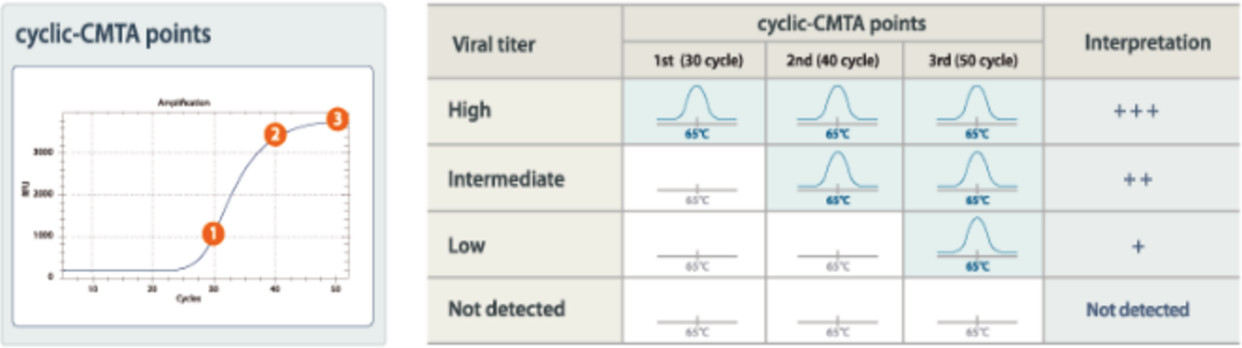


Figure 21 : Principe de la technologie CMTA cyclique utilisée dans le kit Anyplex™ II HPV28

(d'après SEEGENE®)

Une analyse de la courbe de fusion est effectuée à 3 reprises (à 30, 40 et 50 cycles de PCR), permettant une détection semi-quantitative des HPV détectés.

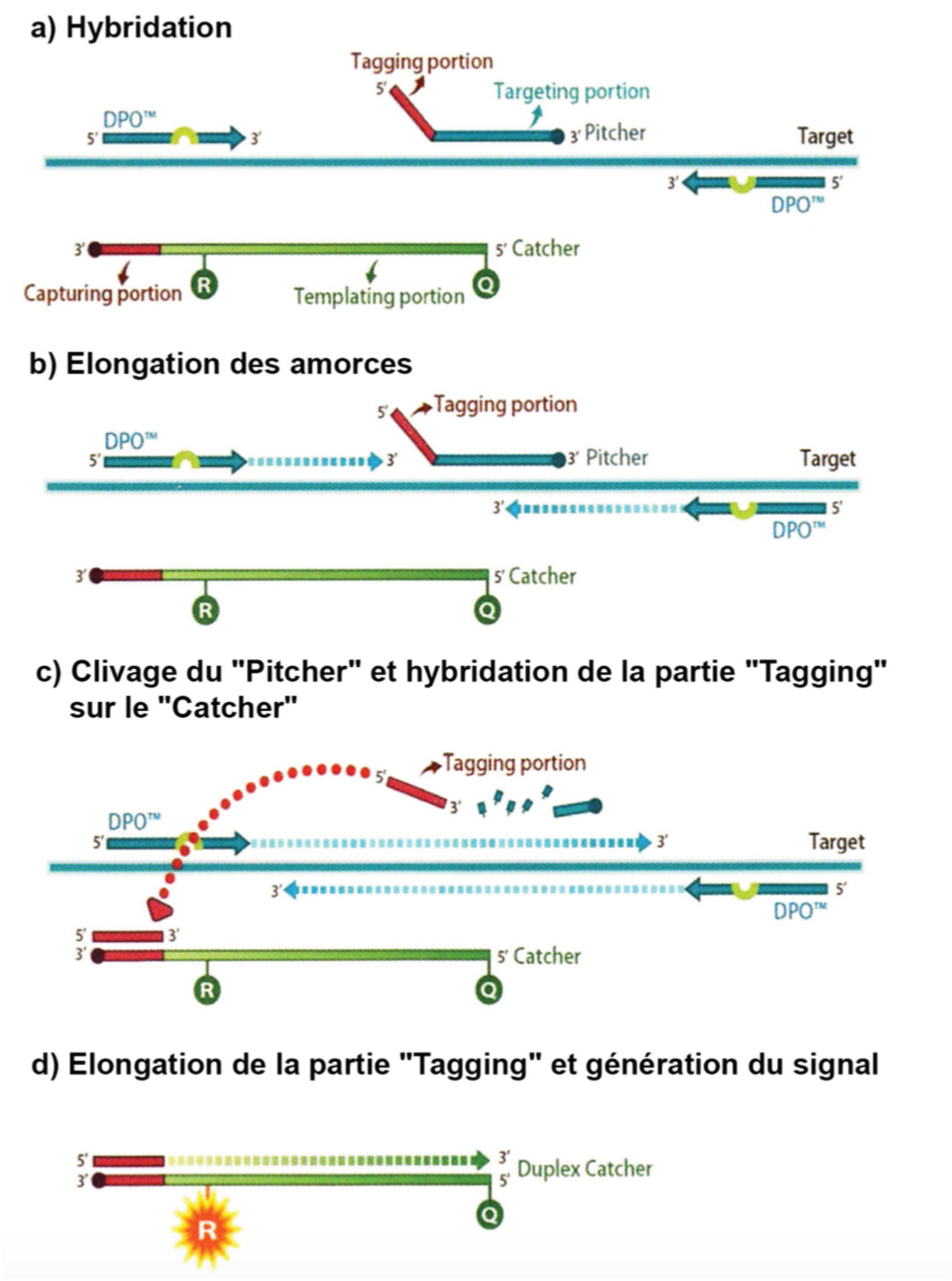


Figure 22 : Principe de la technologie TOCE™

4.3. Détection du génome d'HPV dans les échantillons

Pour la détection des 28 génotypes d'HPV avec la trousse Anyplex™ II, deux mélanges réactionnels différents par échantillon ont été nécessaires, correspondant aux deux panels A et B.

Dans chaque puits de PCR, ont été introduits : 5 µL de mélange réactionnel incluant les dNTPs et la *Taq* polymerase (PCR Master Mix), 5 µL d'eau dépourvue de RNAses, 5 µL de réactif HPV28 A ou B, et enfin 5 µL d'échantillon (extraits d'ADN ou contrôle). Trois contrôles positifs différents (HPV28 PC1, PC2 et PC3) et un contrôle négatif (eau RNAse-free) ont été utilisés pour valider l'amplification.

L'amplification a été effectuée grâce à un thermocycleur en temps réel (CFX96, BIORAD®). La PCR en temps réel a été réalisée selon le protocole pré-programmé spécifique de la trousse du fournisseur. Une détection de la fluorescence lors de l'analyse de la courbe de fusion aux cycles 30, 40 et 50, a permis une détection semi-quantitative.

Programme d'amplification :

- incubation initiale à 50°C pendant 4 minutes : activation de l'Uracile-N-Glycosylase permettant d'éliminer les amplicons résultant de PCR antérieures
- dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes permettant la séparation des deux brins d'ADN et d'activer la *Taq* polymerase.
- 50 cycles de PCR avec :
    - dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
    - hybridation à 60°C pendant 1 minute
    - élongation à 72°C pendant 30 secondes
- analyse de la courbe de fusion avec détection de la fluorescence aux cycles 30, 40 et 50.

Suite à la PCR, les données brutes des 3 lectures de fluorescence ont été exportées vers le logiciel d'interprétation Seegene® Viewer. La validation technique de l'analyse a été réalisée en fonction du résultat d'amplification du contrôle interne (IC). Pour chaque signal, à chacun des trois points de fusion, la détection ou l'absence de détection de la température de fusion spécifique a été évaluée. Si la température de fusion du signal est détectée à l'un des trois points CMTA au minimum, le signal est considéré comme détecté. Si la température de fusion du signal n'est détectée à aucun des trois points CMTA, le signal est considéré comme non détecté (Tableau 10).

Résultat cibles	Résultat IC	Interprétation
+++ ou ++ ou +	+++ ou ++ ou + ou -	**Cible détectée**
-	+++ ou ++	**Cible non détectée**
-	+ ou -	**Ininterprétable** (mauvaise qualité du prélèvement ou présence d'inhibiteurs)

Tableau 10 : Interprétation des résultats selon l'amplification du contrôle interne (IC)

Les échantillons pour lesquels au moins l'un des 28 signaux HPV, ainsi que le signal du contrôle interne, ont été détectés sont considérés comme positifs (ADN HPV détecté avec identification de la (ou des) cible(s) HPV). Les échantillons pour lesquels au moins l'un des 28 signaux HPV a été détecté, alors que le signal du contrôle interne est faible ou n'a pas été détecté, sont considérés comme positifs (ADN HPV détecté avec identification de la (ou des) cible(s) HPV, mais d'autres génotypes HPV qui n'ont pas été détectés peuvent être présents). Les échantillons pour lesquels aucun des 28 signaux HPV n'a été détecté, alors que le signal du contrôle interne est faible ou n'a pas été détecté, sont considérés comme invalides (prélèvement ou préparation inadéquat de l'échantillon, présence d'inhibiteurs, phénomène de compétition).

5. Évaluation de la présence ou non d'inhibiteurs d'amplification

Pour les échantillons n'ayant pas obtenu une amplification acceptable du gène de la bêta-globine lors de la détection d'HPV par la trousse Anyplex™ II HPV28, une détection de l'ADN d'un contrôle interne exogène (trousse DICO Extra R-GENE™) a été effectuée afin de vérifier l'absence d'inhibiteur d'amplification dans les extraits d'ADN obtenus. Ce contrôle interne a été ajouté avant l'étape d'extraction de l'ADN, il permet donc également de vérifier la qualité de l'extraction.

VII. RESULTATS

1. Population étudiée et caractéristiques

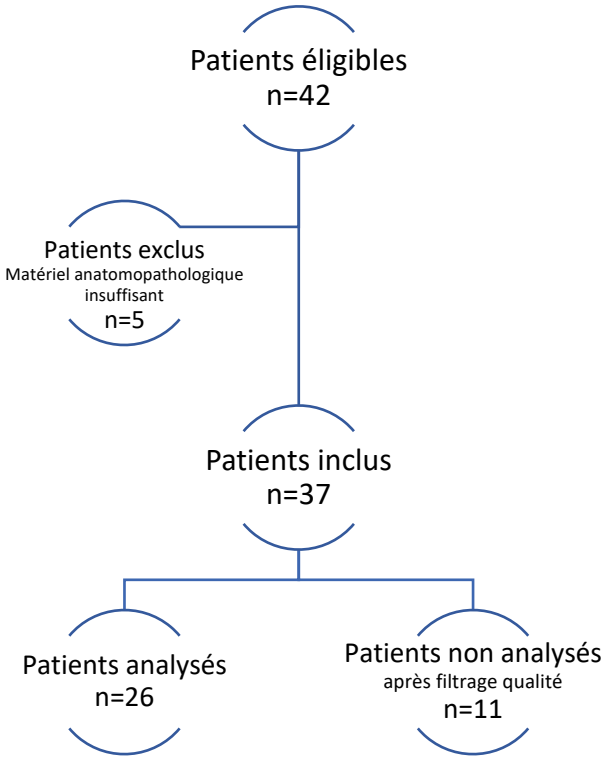


Figure 23 : Diagramme de flux de l'étude

Le nombre de patients éligibles pour cette étude suite à la requête informatique était de 42 ; 5 patients ont été exclus d'emblée suite à une quantité insuffisante de matériel disponible sur les blocs d'anatomopathologie. Les 37 biopsies incluses dans l'étude ont donc fait l'objet d'une mesure de la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon par spectrophotométrie (résultats présentés dans le chapitre 2. Estimation de la quantité d'ADN dans les échantillons), et d'une recherche de l'ADN d'HPV par PCR (résultats présentés dans le chapitre 3. Prévalence d'HPV dans les échantillons analysés). Suite à la PCR HPV, l'absence de détection du contrôle cellulaire pour 11 échantillons a mené à leur exclusion pour l'analyse des données. Une recherche d'inhibiteurs de PCR a été réalisée pour ces échantillons (résultats présentés dans le chapitre 4. Vérification de la présence d'inhibiteurs de l'amplification).

N°	N° de bloc de paraffine	Nature de la lésion	Âge au diagnostic (années)	Sexe	Immunodépression connue	Infection VIH
1	596438	Néoplasie intraépithéliale	84	M	Non	NC
2	616774	Néoplasie intraépithéliale	69	M	Oui	NC
3	620848	Néoplasie intraépithéliale	64	M	Non	NC
4	622744	Néoplasie intraépithéliale	61	M	Non	NC
5	626467 A	Néoplasie intraépithéliale	73	M	Non	NC
6	644875	Néoplasie intraépithéliale	91	M	Non	NC
7	645643	Néoplasie intraépithéliale	80	M	Non	NC
8	658518 A	Néoplasie intraépithéliale	79	M	Non	NC
9	662496	Néoplasie intraépithéliale	86	M	Non	NC
10	679291	Néoplasie intraépithéliale	77	M	Non	NC
11	681514 B	Néoplasie intraépithéliale	83	M	Non	NC
12	693946 3	Néoplasie intraépithéliale	81	M	Non	NC
13	694034 3	Néoplasie intraépithéliale	95	M	Non	NC
14	717006 A3	Néoplasie intraépithéliale	57	M	Non	NC
15	722794 A1	Néoplasie intraépithéliale	84	M	Non	NC
16	731011 B1	Néoplasie intraépithéliale	49	M	Oui	Oui
17	18H12019	Néoplasie intraépithéliale	47	M	Non	NC
18	19H4501	Néoplasie intraépithéliale	76	M	Non	NC
19	633894 A	Carcinome infiltrant	62	M	Non	NC
20	643617 B	Carcinome infiltrant	82	F	Non	NC
21	665074	Carcinome infiltrant	66	M	Non	NC
22	702031	Carcinome infiltrant	80	M	Non	NC
23	711583 A10	Carcinome infiltrant	91	M	Non	NC
24	717606 A1	Carcinome infiltrant	63	F	Non	NC
25	607852	Métaplasie conjonctivale	51	F	Non	NC
26	667939	Métaplasie conjonctivale	89	F	Non	NC
27	703444 3	Métaplasie conjonctivale	48	M	Oui	Oui
28	723970	Métaplasie conjonctivale	69	F	Non	NC
29	734531 C	Métaplasie conjonctivale	65	F	Non	NC
30	577108	Métaplasie conjonctivale	75	M	Non	NC
31	19H1626	Métaplasie conjonctivale	46	F	Non	Non
32	19H1675	Métaplasie conjonctivale	67	M	Non	Non
33	20H1207	Néoplasie intraépithéliale	52	M	Non	NC
34	663628 C	KA conjonctivale	59	M	Non	NC
35	677358	KA conjonctivale	28	F	Non	Non
36	19H9191	Carcinome in situ	52	M	Oui	Non
37	19H10163	Carcinome in situ	27	M	Non	NC

Tableau 11 : Caractéristiques cliniques de la population étudiée

KA : Kératose actinique ; NC : non connu

La médiane d'âge de la population étudiée est de 69 ans avec un minimum 27 ans et un maximum de 95 ans. Le sex ratio est de 3,6 soit 29 hommes pour 8 femmes. Les patients ont été considérés comme ayant une immunodépression connue si il été retrouvé : une prise de traitements immunosuppresseurs ou de corticoïdes, une chimiothérapie, un stade SIDA ou une cirrhose. Le statut VIH a été recherché pour tous les patients ; la plupart du temps celui-ci est non connu, les patients n'ayant pas bénéficié d'un dépistage sérologique au CHU de Poitiers.

2. Estimation de la quantité d'ADN présente dans les échantillons

Les résultats de l'estimation de la quantité d'acides nucléiques mesurée par spectrophotométrie dans chaque extrait analysé sont présentés dans le Tableau 12. La quantité d'ADN était le plus souvent faible. Les ratios A260/280 étaient tous acceptables.

N°	Quantité d'ADN estimée (ng/µL)
1	5.20
2	0,90
3	2,20
4	2,35
5	0,40
6	171,3
7	2,20
8	4,40
9	4,65
10	5,00
11	2,85
12	2,35
13	199,65

N°	Quantité d'ADN estimée (ng/µL)
14	3,30
15	2,55
16	4,60
17	2,40
18	2,25
19	28,05
20	7,75
21	8,50
22	12,55
23	9,95
24	3,35
25	2,75
26	2,95

N°	Quantité d'ADN estimée (ng/µL)
27	3,35
28	3,35
29	3,25
30	4,25
31	3,35
32	3,65
33	11,15
34	3,70
35	3,10
36	9,40
37	49,05

Tableau 12 : Quantité estimée d'ADN dans les extraits obtenus

3. Prévalence d'HPV dans les échantillons analysés

Pour chacun des 37 extraits obtenus, la recherche d'HPV a été effectuée par PCR : un puits réactionnel détectant les génotypes « haut risque », à savoir 66, 45, 58, 51, 59, 16, 33, 39, 52, 35, 18, 56, 68, et 31, et un autre puits détectant les génotypes « bas risque », 26, 69, 73, 42, 82, 53, 43, 54, 70, 61, 6, 44, 40 et 11. Les résultats bruts analysés par le logiciel Seegene® Viewer sont présentés dans le Tableau 13.

N°	Génotype d'HPV																											Contrôle interne		Interprétation automatique
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31	26	69	73	42	82	53	43	54	70	61	6	44	40	11	HR	BR	
PC1	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	PC1 valide
PC2	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	-	PC2 valide
PC3	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	PC3 valide
NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NC valide
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Non détecté
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	HR non détecté
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	Non détecté
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Non détecté
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	HR non détecté
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Non détecté
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Non détecté
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Non détecté
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	HR non détecté
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	Non détecté
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Non détecté
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	HR non détecté
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	BR non détecté
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Non détecté
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Non détecté
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Non détecté
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Non détecté
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Non détecté

N°	Génotype d'HPV																											Contrôle interne		Interprétation automatique
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31	26	69	73	42	82	53	43	54	70	61	6	44	40	11	HR	BR	
24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	HPV16 détecté
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	BR non détecté
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	HR non détecté
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Non détecté
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	Non détecté
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	HR non détecté
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Non détecté
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Non détecté
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ininterprétable
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	Non détecté
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	Non détecté

Tableau 13 : Résultats bruts de la détection des HPV à haut risque et bas risque des 37 échantillons inclus

HR : Haut Risque

BR : Bas Risque

PC1 : Positive Control 1

PC2 : Positive Control 2

PC3 : Positive Control 3

NC : Negative Control

- : cible non détectée

+, ++, +++ : cible détectée

La bordure rouge symbolise la séparation entre les génotypes HR et les génotypes BR, détectés dans 2 puits de réaction différents.

Le contrôle interne est un contrôle interne endogène ; il correspond à la détection du gène de la bêta-globine humaine et permet de vérifier la cellularité de l'échantillon.

Les cases sur fond gris représentent les résultats ne pouvant pas être interprétés du fait de l'absence d'amplification du contrôle cellulaire endogène.

N°	Nature de la lésion	Détection d'ADN d'HPV
24	Carcinome infiltrant	Présence d'ADN d'HPV16
1	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
3	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
4	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
6	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
8	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
9	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
12	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
13	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
19	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV
20	Carcinome infiltrant	Absence d'ADN d'HPV
21	Carcinome infiltrant	Absence d'ADN d'HPV
22	Carcinome infiltrant	Absence d'ADN d'HPV
23	Carcinome infiltrant	Absence d'ADN d'HPV
29	Métaplasie conjonctivale	Absence d'ADN d'HPV
30	Métaplasie conjonctivale	Absence d'ADN d'HPV
32	Métaplasie conjonctivale	Absence d'ADN d'HPV
33	Métaplasie conjonctivale	Absence d'ADN d'HPV
36	Carcinome in situ	Absence d'ADN d'HPV
37	Carcinome in situ	Absence d'ADN d'HPV
2	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV HR
5	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV HR
11	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV HR
14	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV HR
28	Métaplasie conjonctivale	Absence d'ADN d'HPV HR
31	Métaplasie conjonctivale	Absence d'ADN d'HPV HR
16	Néoplasie intraépithéliale	Absence d'ADN d'HPV BR
27	Métaplasie conjonctivale	Absence d'ADN d'HPV BR
7	Néoplasie intraépithéliale	Ininterprétable
10	Néoplasie intraépithéliale	Ininterprétable
15	Néoplasie intraépithéliale	Ininterprétable
17	Néoplasie intraépithéliale	Ininterprétable
18	Néoplasie intraépithéliale	Ininterprétable
25	Carcinome infiltrant	Ininterprétable
26	Métaplasie conjonctivale	Ininterprétable
34	KA conjonctivale	Ininterprétable
35	KA conjonctivale	Ininterprétable

Tableau 14 : Tableau résumé de la détection d'HPV, en fonction de la nature de la lésion

Sur les 37 échantillons présentés dans le Tableau 14, un seul contient de l'ADN d'HPV HR, en l'occurrence HPV16, 19 d'entre eux montrent une absence de détection d'HPV et sont donc considérés négatifs. Pour 6 autres, on note une absence de détection d'HPV HR, la détection des HPV à bas risque étant ininterprétable du fait de l'absence d'amplification du contrôle cellulaire endogène. De même, pour 2 échantillons, une absence d'HPV à bas risque est montrée, sans pouvoir conclure sur les génotypes haut risque du fait de l'absence d'amplification de ce même contrôle. Enfin, 9 résultats sont totalement ininterprétables, également du fait de l'absence d'amplification du contrôle interne. Ainsi, après avoir écarté les 11 échantillons pour lesquels l'amplification du contrôle cellulaire endogène n'était pas acceptable pour la détection des HPV à haut risque (rendus ininterprétables pour la détection des HPV à haut risque), les 26 échantillons restants ont pu être inclus dans l'analyse des données.

4. Vérification de la présence d'inhibiteurs d'amplification

Pour les 11 échantillons n'ayant pas obtenu une amplification acceptable du gène de la bêta-globine (résultats ininterprétables) et qui ont donc été exclus de l'analyse des données, une détection de l'ADN d'un contrôle interne (trousse DICO Extra R-GENE™) a été effectuée afin de vérifier l'absence d'inhibiteur d'amplification dans les extraits d'ADN obtenus, dont les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

N°	Détection	Ct	Interprétation
PC	+	27,93	PC valide
NC	-	Indéterminé	NC valide
7	+	27,91	Cible détectée
10	+	27,64	Cible détectée
15	+	27,78	Cible détectée
16	+	27,68	Cible détectée
17	+	27,57	Cible détectée
18	+	27,70	Cible détectée
25	+	26,91	Cible détectée
26	+	27,68	Cible détectée
27	+	27,60	Cible détectée
34	+	27,52	Cible détectée
35	+	27,42	Cible détectée

Tableau 15 : Détection du contrôle interne exogène DICO

PC : Positive Control

NC : Negative Control

Les résultats montrent une amplification acceptable du contrôle interne pour tous les extraits (Ct inférieur au Ct du contrôle positif+3Ct), permettant de conclure à une absence d'inhibiteur de réaction de PCR dans les extraits analysés. Ainsi, pour ces échantillons, l'absence de détection du contrôle interne endogène (bêta globine cellulaire) suggère une quantité insuffisante de matériel cellulaire dans l'échantillon de biopsie, et/ou, la présence d'une mauvaise qualité de l'ADN extrait (séquences endommagées).

5. Patiente ayant une tumeur positive pour HPV16

La patiente est une femme née en 1954, qui a comme principaux antécédents un kyste branchial gauche traité chirurgicalement en 2004 et 2 hernies discales. Elle n'a pas de traitement ; il y a une intoxication tabagique, estimée à 30 paquets-années. C'est une ancienne ouvrière d'usine de produits chimiques, qui ne travaille plus. Il n'y pas d'antécédents néoplasiques dans la famille.

L'histoire de la maladie remonte à octobre 2010 avec l'apparition d'adénopathies cervicales bilatérales sous maxillaires. Une imagerie tomodensitométrique cervico-thoracique est effectuée en 2012 et retrouve des adénopathies nécrotiques jugulo-carotidiennes bilatérales, ainsi qu'une tuméfaction kystique cervicale antérieure gauche. Une exérèse est réalisée et, après examen anatomopathologique, un carcinome malpighien différencié non kératinisant est diagnostiqué, conduisant tout d'abord à l'hypothèse de la transformation carcinomateuse d'un kyste branchial résiduel, avec métastases ganglionnaires. Un nouveau scanner est réalisé un mois plus tard et retrouve un hypermétabolisme intense en regard des 2 sillons amygdalo-glosses, une atteinte jugulo-carotidienne bilatérale ainsi qu'une atteinte basi-cervicale gauche. Il est alors décidé un évidement cervical bilatéral avec amygdalectomie bilatérale. L'examen anatomopathologique diagnostique un carcinome épidermoïde moyennement différencié, peu mature, infiltrant l'amygdale droite. De plus, 3 ganglions métastatiques sans franchissement capsulaire sur 5 ganglions gauches sont retrouvés, ainsi que 2 autres sur 13 au niveau cervical droit. Il s'agissait donc d'un carcinome épidermoïde de la tonsille métastatique. L'étude immunohistochimique met en évidence une surexpression de p16 au niveau de la tumeur évoquant un cancer attribuable aux HPV. A la suite d'une réunion de concertation multidisciplinaire, une indication de radio-chimiothérapie concomitante adjuvante est posée. La patiente est traitée jusqu'en avril 2013, puis une surveillance est mise en place.

En août 2016, la patiente se plaint d'un œil gauche larmoyant. Une consultation en ophtalmologie en janvier 2017 retrouve un œdème palpébral et la découverte d'une lésion indurée du canthus interne sous caronculaire gauche, ferme à la palpation. L'examen anatomopathologique confirme la présence d'un carcinome infiltrant, moyennement différencié, non kératinisant. De plus, dans cette lésion également, l'étude immunohistochimique montre une surexpression de p16. Les examens complémentaires du bilan d'extension retrouvent un hypermétabolisme intense de la lésion tumorale du canthus interne et de la paroi interne de l'orbite gauche, s'étendant au canal lacrymal, à la paupière inférieure et à l'espace pré-maxillaire. Il est alors décidé une exérèse du carcinome épidermoïde orbitaire avec exantération gauche. La patiente a bénéficié d'une radio-chimiothérapie concomitante.

Début 2018, la patiente présente une volumineuse ulcération en regard de la loge tonsillaire droite, s'étendant à la paroi latérale de l'oropharynx droit et à l'uvule. Des biopsies sont réalisées et l'examen anatomopathologique confirme la récidive. Lors d'une consultation de contrôle en janvier 2020, la patiente présente une évolution de la lésion au niveau de l'uvule, qui est biopsiée, et un carcinome épidermoïde infiltrant moyennement différencié non kératinisant est retrouvé. De plus, p16 est également détectée par immunohistochimie.

Lors d'une pan-endoscopie ORL, la patiente présente une désaturation importante et une trachéotomie de sauvetage est réalisée. Sur le plan carcinologique, l'imagerie objective un aspect global de progression des lésions laryngo-pharyngées. La réunion de concertation pluridisciplinaire en février 2020 propose alors une prise en charge par soins palliatifs exclusifs. La patiente est décédée le 26 juillet 2020.

La détection de l'ADN d'HPV a été réalisée rétrospectivement au niveau de la biopsie de la tumeur lacrymale et au niveau de la tumeur oropharyngée droite, et retrouve l'ADN d'HPV16 dans les 2 lésions. Leur analyse immunohistochimique avait montré une surexpression de p16 ; on peut en déduire que la nature tumorale des lésions de la patiente est donc attribuable à HPV. La question se pose d'une métastase oculaire du carcinome de la tonsille ou d'un second cancer. Pour apporter une réponse, nous avons décidé de séquencer les 2 HPV16 par une technique à haut débit (NGS) afin de comparer les séquences virales et les sites d'insertion de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire. L'ADN a

été envoyé au Pr Charlotte Charpentier qui travaille sur les cancers de l'anus attribuables aux HPV et utilise cette technique pour ses travaux, et qui avait proposé son aide. Malheureusement, le séquençage n'a pas encore pu être effectué du fait de l'épidémie mondiale actuelle (utilisation des séquenceurs uniquement pour le COVID-19).

VIII. DISCUSSION

Les néoplasies épidermoïdes de la surface oculaire comprennent un spectre large de tumeurs affectant la conjonctive et la cornée, allant de néoplasies intraépithéliales telles que des dysplasies et carcinomes in situ, jusqu'à différents grades de carcinomes épidermoïdes invasifs. Les HPV sont connus pour induire des lésions intraépithéliales menant à des dysplasies et jusqu'à diverses pathologies néoplasiques, largement étudiées dans le cas des carcinomes du col de l'utérus et dans une moindre mesure, dans les cancers anaux et de l'oropharynx. Toutefois, l'association entre HPV et les néoplasies épidermoïdes de la surface oculaire n'est pas complètement élucidé, et la littérature retrouve des résultats hétéroclites. L'objectif du travail présenté ici était de rechercher la présence d'HPV par PCR dans une série de biopsies oculaires, à partir d'une étude rétrospective réalisée en collaboration avec le laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Poitiers.

Cette étude a donc retrouvé la présence d'HPV sur une seule des 26 biopsies de néoplasies épidermoïdes oculaires analysées, soit une prévalence de 3,8%. Cette faible prévalence suggère que l'infection à HPV ne serait la cause de la maladie que dans de rares cas, et serait alors plutôt un cofacteur à son développement. En effet, dans la littérature, la prévalence d'HPV au sein de ces lésions demeure extrêmement variable, allant de 0 à 100%. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces variations. Tout d'abord, elles peuvent être dues aux moyens méthodologiques employés dans les différentes études. D'une part, par la nature des échantillons analysés ; en effet, les tissus paraffinés sont souvent plus difficiles à traiter que des tissus congelés ou frais. L'inclusion des tissus dans la paraffine entraine des effets délétères sur les séquences d'ADN. De même, le choix du protocole d'extraction de l'ADN peut influer sur les résultats. En fonction du protocole utilisé, la quantité et la qualité de l'ADN extrait peut fortement varier, comme le montre l'étude de Alvarez-Aldana *et al* (159). Le protocole d'extraction qui a été utilisé ici est celui en vigueur au laboratoire de virologie du CHU de Poitiers, utilisé en routine lors d'extraction d'ADN à partir de tissus en paraffine. De plus, le même kit d'extraction est utilisé par le laboratoire d'oncologie biologique du CHU de Poitiers. Dans la littérature, ce protocole de déparaffinage est retrouvé plusieurs fois (149,151,153,155,160), ainsi que le kit d'extraction utilisé (151,153,160). D'autre part, la technique de PCR est fortement

conditionnée par le choix des amorces et de la sonde, qui dépendent de la qualité et de la taille des séquences d'ADN extraites. Néanmoins, Estrade *et al* (161) ont montré une très bonne sensibilité et spécificité de la PCR Anyplex™ II HPV28 de Seegene® qui a été utilisée ici. Il faut enfin tenir compte de la présence éventuelle d'inhibiteurs d'amplification dans les prélèvements, ainsi que de la cellularité du matériel étudié. En effet, la paraffine est un inhibiteur potentiel d'amplification, ce qui peut expliquer en partie la présence d'inhibiteur dans les échantillons. Cependant dans cette étude, les échantillons qui ont été rendus ininterprétables semblent l'être du fait d'une mauvaise cellularité du prélèvement, démontré par l'absence d'amplification du contrôle cellulaire endogène, plutôt que de la présence d'inhibiteurs de PCR, vérifié par l'amplification d'un contrôle cellulaire exogène. Cela s'explique du fait de la très petite taille des biopsies étudiées, parfois presque invisibles à l'œil nu. Enfin, un dernier élément à prendre en compte pour comparer les différentes études semble être le biais d'origine géographique. En effet, une équipe italienne (126) a comparé la détection d'HPV dans des ptérygions d'individus italiens (prévalence retrouvée = 100%) et d'individus équatoriens (prévalence retrouvée = 21%), suggérant l'hypothèse de l'existence de différences géographiques dans l'implication d'HPV au sein de ces lésions, pouvant être expliquées par les différents modes de vie, les conditions environnementales et la composition génétique. Tous ces facteurs influent sur la mise en évidence des HPV et peut expliquer en partie les différences d'incidence trouvées par les différentes équipes de recherche.

Une des limites à l'étude présentée ici est la taille de la population étudiée ; seulement 26 échantillons ont pu rentrer dans l'analyse statistique. Les autres études ne montrent cependant pas de grands effectifs non plus, ces tumeurs étant relativement rares. Deux d'entre elles atteignent plus 100 échantillons (133,137), les autres en ayant en moyenne aux alentours de 40. Une étude multicentrique permettrait de s'affranchir de ce facteur et ainsi d'avoir une population étudiée qui soit plus représentative.

L'équipe iranienne d'Asadi-amoli *et al* (153) a conclu à l'implication d'HPV dans le développement des néoplasies oculaires avec une forte association, après étude de 50 biopsies pour lesquelles l'ADN d'HPV a été retrouvé dans 46 d'entre elles, versus 50 biopsies témoins saines, toutes négatives. A l'instar de cette dernière, la majorité des études ne se contente que de la détection d'HPV par PCR ; comme évoqué dans le paragraphe IV. 5.4 de ce travail, cela est insuffisant pour attribuer le caractère tumoral

d'une lésion à un HPV. La recherche par RT-PCR des ARNm E6/E7, considérée comme le « *gold standard* », n'est que peu réalisée car elle nécessite des biopsies fraiches ou congelées uniquement, alors que la majorité des études utilisent des tissus paraffinés. Les études associant la détection d'HPV par PCR, aux techniques d'immunohistochimie semblent alors être les plus pertinentes. C'est le cas du travail de l'équipe allemande de Guthoff *et al* (152), qui n'a pas retrouvé de preuve de l'implication d'HPV dans le développement de la majorité des néoplasies de la surface oculaire. Comme elle, la majorité des publications n'arrivent pas à démontrer l'implication d'HPV en tant qu'instigateur de ces pathologies néoplasiques de l'œil, démontrant l'hétérogénéité de la littérature et la nécessité de nouvelles recherches pour prouver ou non cette implication ainsi que son degré. En effet en 2011, l'IARC a conclu la preuve de l'implication d'HPV dans les pathologies de la surface oculaire comme étant faible, et de ce fait, ne le citant pas dans la liste des agents oncogènes de la surface oculaire (162).

En ce qui concerne la patiente de notre étude, les biopsies analysées surexprimaient p16 ; on peut en déduire que la nature tumorale de ses lésions est donc attribuable à HPV. Le résultat du séquençage permettra de conclure sur la nature métastatique de sa tumeur oculaire ou au contraire plutôt primitive. Si l'hypothèse du cancer primitif est retenue, alors le lien entre HPV et néoplasie oculaire sera certain.

Enfin, les génotypes détectés le plus souvent dans les lésions oculaires sont les génotypes 6, 11, 16 et 18, les infections par ces derniers pouvant être prévenues par la vaccination. Il existe actuellement deux vaccins prophylactiques, le Gardasil 9®, nonavalent, ciblant les HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 et 58 et le Cervarix®, bivalent, ciblant les HPV16 et 18. Sur le plan ophtalmologique, la vaccination devrait diminuer l'incidence des papillomes conjonctifs dus à l'infection par HPV. En revanche, il serait intéressant d'évaluer dans un futur proche l'impact de la vaccination contre HPV sur l'incidence des néoplasies épidermoïdes oculaires, étant donné que le rôle du virus reste à définir. De plus, même si dans cette étude l'échantillon retrouvé positif était celui d'une femme, dans la littérature, ces lésions ont une prédominance masculine et HPV est ainsi plus souvent retrouvé chez les hommes, apportant un argument supplémentaire à la vaccination des garçons. En France, l'HAS a statuée en décembre 2019, en recommandant l'élargissement de la vaccination contre HPV chez tous les garçons, de 11 à 26 ans révolus.

IX. CONCLUSION

Cette étude a montré une faible prévalence d'HPV dans les échantillons de néoplasies épidermoïdes oculaires analysés, en accord avec la plupart des études publiées, ne permettant pas de conclure sur la relation de causalité entre HPV et les pathologies néoplasiques de l'œil. Néanmoins, l'implication des HPV dans ce type de pathologie n'est pas exclue pour autant. Une large étude multicentrique incluant un grand nombre de chaque type de tumeur oculaire serait plus contributive.

X. BIBLIOGRAPHIE

1. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 20 juin 2004;324(1):17-27.

2. Van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, Bandaru S, Gopalan V, Mohamoud Y, et al. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. Nucleic Acids Res. 1 janv 2013;41(D1):D571-8.

3. Bravo IG, Félez-Sánchez M. PapillomavirusesViral evolution, cancer and evolutionary medicine. Evol Med Public Health. 1 janv 2015;2015(1):32-51.

4. Payne J. On the contagiousness of common warts. 1891;Br J Dermatol(3:185-8).

5. Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. 1907;Giorn Ital Mal Venereol(48:12-17).

6. Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (SHOPE). J Exp Med. 1 oct 1935;62(4):523-48.

7. Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. “Crystalline” Virus-Like Particles from Skin Papillomas Characterized by Intranuclear Inclusion Bodies. Proc Soc Exp Biol Med. 1 oct 1949;72(1):46-50.

8. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. Virology. 20 févr 2009;384(2):260-5.

9. International HPV Reference Center | Karolinska Institutet [Internet]. [cité 8 juill 2020]. Disponible sur: https://ki.se/en/labmed/international-hpv-reference-center

10. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. Semin Cancer Biol. 1 juin 2014;26:13-21.

11. De Villiers E-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. Virology. 1 oct 2013;445(1):2-10.

12. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H zur, de Villiers E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology. 25 mai 2010;401(1):70-9.

13. Beutner KR, Becker TM, Stone KM. Epidemiology of Human Papillomavirus Infections. Dermatol Clin. 1 avr 1991;9(2):211-8.

14. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. mai 2002;2(5):342-50.

15. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. Lancet Oncol. avr 2009;10(4):321-2.

16. Mourez T, Burrel S, Boutolleau D, Pillet S. Traité de virologie médicale. 2019.

17. Morshed K, Polz-Gruszka D, Szymański M, Polz-Dacewicz M. Human Papillomavirus (HPV) – Structure, epidemiology and pathogenesis. Otolaryngol Pol. 1 sept 2014;68(5):213-9.

18. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. Virology. 1 oct 2013;445(1):35-56.

19. Morin G, Fradet-Turcotte A, Lello PD, Bergeron-Labrecque F, Omichinski JG, Archambault J. A Conserved Amphipathic Helix in the N-Terminal Regulatory Region of the Papillomavirus E1 Helicase Is Required for Efficient Viral DNA Replication. J Virol. 1 juin 2011;85(11):5287-300.

20. 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. 30 août 1994;91(18):8700-4.

21. Gnanamony M, Peedicayil A, Abraham P. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. Indian J Med Microbiol. 1 janv 2007;25(1):10.

22. Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, et al. Characterization of Events during the Late Stages of HPV16 Infectionin VivoUsing High-Affinity Synthetic Fabs to E4. Virology. 10 nov 1997;238(1):40-52.

23. Griffin H, Wu Z, Marnane R, Dewar V, Molijn A, Quint W, et al. E4 Antibodies Facilitate Detection and Type-Assignment of Active HPV Infection in Cervical Disease. PLoS ONE [Internet]. 3 déc 2012 ;7(12). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3513315/

24. Estêvão D, Costa NR, Gil da Costa RM, Medeiros R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech. 1 févr 2019;1862(2):153-62.

25. Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. Mol Cell. 1 mars 2000;5(3):557-67.

26. Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. Nat Rev Microbiol. oct 2012;10(10):681-92.

27. Okun MM, Day PM, Greenstone HL, Booy FP, Lowy DR, Schiller JT, et al. L1 Interaction Domains of Papillomavirus L2 Necessary for Viral Genome Encapsidation. J Virol. 1 mai 2001;75(9):4332-42.

28. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. J Clin Virol. 1 mars 2005;32:7-15.

29. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. Viruses. juill 2015;7(7):3863-90.

30. Pinidis P, Tsikouras P, Iatrakis G, Zervoudis S, Koukouli Z, Bothou A, et al. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. Mædica. mars 2016;11(1):48-54.

31. Yang EJ, Quick MC, Hanamornroongruang S, Lai K, Doyle LA, McKeon FD, et al. Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. Mod Pathol. juill 2015;28(7):994-1000.

32. Letian T, Tianyu Z. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. Virol J. 6 janv 2010;7(1):2.

33. Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, et al. Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. PLoS Pathog. 19 avr 2012;8(4).

34. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. Vaccine. 20 nov 2012;30:F55-70.

35. Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene. nov 2001;20(54):7888-98.

36. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. Oncogene. déc 1998;17(23):2943-54.

37. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. J Virol. 1 oct 2003;77(19):10186-201.

38. Zhou J, Stenzel DJ, Sun X-Y, Frazer IH. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. J Gen Virol. 1993;74(4):763-8.

39. Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, et al. 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. 15 janv 2004;78(2):821-33.

40. Koshiol JE, Schroeder JC, Jamieson DJ, Marshall SW, Duerr A, Heilig CM, et al. Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. Int J Cancer. 2006;119(7):1623-9.

41. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, et al. A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. Cancer Res. 15 avr 2010;70(8):3159-69.

42. Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. J Infect Chemother. 2012;18(6):807-15.

43. Routes JM, Morris K, Ellison MC, Ryan S. Macrophages Kill Human Papillomavirus Type 16 E6-Expressing Tumor Cells by Tumor Necrosis Factor Alpha- and Nitric Oxide-Dependent Mechanisms. J Virol. 1 janv 2005;79(1):116-23.

44. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine. mars 2006;24:S16-22.

45. Alain S, Hantz S, Denis F. Papillomavirus : les virus et la physiopathologie de l'infection. 2020;13:15.

46. Stanley M. HPV - immune response to infection and vaccination. Infect Agent Cancer. déc 2010;5(1):19.

47. Vu HL, Sikora AG, Fu S, Kao J. HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. Cancer Lett. févr 2010;288(2):149-55.

48. Koromilas* AE, Li S, Matlashewski* G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. Cytokine Growth Factor Rev. 1 juin 2001;12(2):157-70.

49. Leong C-M, Doorbar J, Nindl I, Yoon H-S, Hibma MH. Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. Br J Dermatol. 2010;163(6):1253-63.

50. Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini J-S, Căpîlna M, Félix S, et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. Gynecol Oncol. juill 2006;102(1):22-31.

51. Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. Int J Cancer. 2006;119(9):2105-12.

52. zur Hausen H. Human Papillomaviruses and Their Possible Role in Squamous Cell Carcinomas. In: Arber W, Henle W, Hofschneider PH, Humphrey JH, Klein J, Koldovský P, et al., éditeurs. Current Topics in Microbiology and Immunology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 1977 [cité 13 juill 2020]. p. 1-30. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-66800-5_1

53. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J. mai 1984;3(5):1151-7.

54. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat Rev Cancer. août 2010;10(8):550-60.

55. Wentzensen N, Vinokurova S, Doeberitz M von K. Systematic Review of Genomic Integration Sites of Human Papillomavirus Genomes in Epithelial Dysplasia and Invasive Cancer of the Female Lower Genital Tract. Cancer Res. 1 juin 2004;64(11):3878-84.

56. Sen S, Mandal P, Bhattacharya A, Kundu S, Roy Chowdhury R, Mondal NR, et al. Impact of viral and host DNA methylations on HPV16-related cervical cancer pathogenesis. Tumor Biol. 1 mai 2017;39(5):1010428317699799.

57. Fischer M, Uxa S, Stanko C, Magin TM, Engeland K. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. Sci Rep. 1 juin 2017;7(1):1-11.

58. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. Oncogene. déc 1999;18(53):7690-700.

59. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. Genes Dev. 15 sept 2004;18(18):2269-82.

60. Oh J-M, Kim S-H, Cho E-A, Song Y-S, Kim W-H, Juhnn Y-S. Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin–proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. Carcinogenesis. 1 mars 2010;31(3):402-10.

61. Wasson CW, Morgan EL, Müller M, Ross RL, Hartley M, Roberts S, et al. Human papillomavirus type 18 E5 oncogene supports cell cycle progression and impairs epithelial

differentiation by modulating growth factor receptor signalling during the virus life cycle. Oncotarget. 6 oct 2017;8(61):103581-600.

62. Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. Oncogene. nov 2000;19(46):5270-80.

63. Duensing S, Münger K. The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Independently Induce Numerical and Structural Chromosome Instability. Cancer Res. 1 déc 2002;62(23):7075-82.

64. Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA, et al. Human Papillomavirus Cofactors by Disease Progression and Human Papillomavirus Types in the Study to Understand Cervical Cancer Early Endpoints and Determinants. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1 janv 2009;18(1):113-20.

65. Denny LA, Franceschi S, de Sanjosé S, Heard I, Moscicki AB, Palefsky J. Human Papillomavirus, Human Immunodeficiency Virus and Immunosuppression. Vaccine. 20 nov 2012;30:F168-74.

66. Picard A, Badoual C, Hourseau M, Halimi C, Pere H, Dib F, et al. Human papilloma virus prevalence in HIV patients with head and neck squamous cell carcinoma. AIDS. 15 mai 2016;30(8):1257–1266.

67. Mooij SH, Van Santen DK, Geskus RB, Van Der Sande MAB, Coutinho RA, Stolte IG, et al. The effect of HIV infection on anal and penile human papillomavirus incidence and clearance: a cohort study among MSM. AIDS. oct 2015;1.

68. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis—Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking. JNCI Monogr. 1 juin 2003;2003(31):20-8.

69. Alotaibi HJ, Almajhdi FN, Alsaleh AN, Obeid DA, Khayat HH, Al-Muammer TA, et al. Association of sexually transmitted infections and human papillomavirus co-infection with abnormal cervical cytology among women in Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci. juin 2020;27(6):1587-95.

70. de Abreu AL, Malaguti N, Souza RP, Uchimura NS, Ferreira ÉC, Pereira MW, et al. Association of human papillomavirus, Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. Am J Cancer Res. 1 juin 2016;6(6):1371-83.

71. Campos NG, Rodriguez AC, Castle PE, Herrero R, Hildesheim A, Katki H, et al. Persistence of Concurrent Infections with Multiple Human Papillomavirus Types: A Population-based Cohort Study. J Infect Dis. 15 mars 2011;203(6):823-7.

72. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine. 21 août 2006;24:S11-25.

73. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. J Infect Dis. 15 déc 2010;202(12):1789-99.

74. Matkins PP. Sexually Transmitted Infections in Adolescents. 74(1):5.

75. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. Nat Rev Dis Primer. déc 2016;2(1):16086.

76. Li Y, Xu C. Human Papillomavirus-Related Cancers. In: Cai Q, Yuan Z, Lan K, éditeurs. Infectious Agents Associated Cancers: Epidemiology and Molecular Biology [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 23-34. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1018). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-5765-6_3

77. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. Vaccine. 21 août 2006;24:S52-61.

78. Valentino K, Poronsky CB. Human Papillomavirus Infection and Vaccination. J Pediatr Nurs. 1 mars 2016;31(2):e155-66.

79. Gavillon N, Vervaet H, Derniaux E, Terrosi P, Graesslin O, Quereux C. Papillomavirus humain (HPV) : comment ai-je attrapé ça ? Gynécologie Obstétrique Fertil. mars 2010;38(3):199-204.

80. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. Virology. oct 2013;445(1-2):21-34.

81. Haalen FMV, Bruggink SC, Gussekloo J, Assendelft WJJ, Eekhof J a. H. Warts in primary schoolchildren: prevalence and relation with environmental factors. Br J Dermatol. 2009;161(1):148-52.

82. COHEN-BEAUSSANT S. Syndrome de WHIM (Histoire Naturelle d'une cohorte de huit patients inclus dans le Registre Français des Neutropénies Chroniques Sévères, et revue de la littérature). 2012.

83. Forslund O, Iftner T, Andersson K, Lindelöf B, Hradil E, Nordin P, et al. Cutaneous Human Papillomaviruses Found in Sun-Exposed Skin: Beta-papillomavirus Species 2 Predominates in Squamous Cell Carcinoma. J Infect Dis. 15 sept 2007;196(6):876-83.

84. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev Med Virol. 2015;25(S1):2-23.

85. Petry KU, Luyten A, Justus A, Iftner A, Strehlke S, Schulze-Rath R, et al. Prevalence of low-risk HPV types and genital warts in women born 1988/89 or 1983/84 -results of WOLVES, a population-based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. BMC Infect Dis. 21 déc 2012;12(1):367.

86. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, Sanjosé S de, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. Int J Cancer. 2012;131(10):2349-59.

87. Vuyst HD, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. Int J Cancer. 2009;124(7):1626-36.

88. 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. The Laryngoscope. 2004;114(S104):1-23.

89. Lindman JP, Lewis LS, Accortt N, Wiatrak BJ. Use of the Pediatric Quality of Life Inventory to Assess the Health-Related Quality of Life in Children with Recurrent Respiratory Papillomatosis. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1 juill 2005;114(7):499-503.

90. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. Head Neck. 2013;35(5):747-55.

91. Elrefaey S, Massaro MA, Chiocca S, Chiesa F, Ansarin M. HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. Acta Otorhinolaryngol Ital. oct 2014;34(5):299-309.

92. Schmook T, Nindl I, Ulrich C, Meyer T, Sterry W, Stockfleth E. Viral warts in organ transplant recipients: new aspects in therapy. Br J Dermatol. nov 2003;149(s66):20-4.

93. Alimagham M, Amini-Afshar S, Farahmand S, Pour-Kazemi A, Pour-Reza-Gholi F, Masood S. Frequency of Infectious Skin Lesions in Kidney Transplant Recipients. :4.

94. Palefsky J. Biology of HPV in HIV Infection. Adv Dent Res. avr 2006;19(1):99-105.

95. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. Natural History and Possible Reactivation of Human Papillomavirus in Human Immunodeficiency Virus–Positive Women. JNCI J Natl Cancer Inst. 20 avr 2005;97(8):577-86.

96. Huiras E, Preda V, Maurer T, Whitfeld M. Cutaneous manifestations of immune reconstitution inflammatory syndrome. Curr Opin HIV AIDS. juill 2008;3(4):453–460.

97. Gichuhi S, Ohnuma S, Sagoo MS, Burton MJ. Pathophysiology of ocular surface squamous neoplasia. Exp Eye Res. déc 2014;129:172-82.

98. Mcnairn AJ, Guasch G. Epithelial Transition Zones: merging microenvironments, niches, and cellular transformation. Eur J Dermatol. 1 mai 2011;21(2):21-8.

99. Wirtschafter JD, Ketcham JM, Weinstock RJ, Tabesh T, McLoon LK. Mucocutaneous Junction As the Major Source of Replacement Palpebral Conjunctival Epithelial Cells. 1999;40(13):9.

100. Revue de Santé Oculaire Communautaire » Évaluation et diagnostic : une approche rationnelle [Internet]. Disponible sur: https://www.cehjournal.org/article/evaluation-et-diagnostic-une-approche-rationnelle/

101. Rapport SFO 2015 - Surface oculaire [Internet]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100023.html

102. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. Sex Transm Infect. oct 1999;75(5):317-9.

103. Egbert JE, Kersten RC. Female Genital Tract Papillomavirus in Conjunctival Papillomas of Infancy. Am J Ophthalmol. 1 avr 1997;123(4):551-2.

104. Theotoka D, Morkin MI, Galor A, Karp CL. Update on Diagnosis and Management of Conjunctival Papilloma. Eye Vis. 18 juin 2019;6(1):18.

105. Sjö N, Heegaard S, Prause JU. Conjunctival papilloma. Acta Ophthalmol Scand. 2000;78(6):663-6.

106. Chalkia AK, Bontzos G, Spandidos DA, Detorakis ET. Human papillomavirus infection and ocular surface disease (Review). Int J Oncol. 1 mai 2019;54(5):1503-10.

107. McDonnell PJ, McDonnell JM, Kessis T, Green WR, Shah KV. Detection of human papillomavirus type 6/11 DNA in conjunctival papillomas by in situ hybridization with radioactive probes. Hum Pathol. 1 nov 1987;18(11):1115-9.

108. Mincione GP, Taddei GL, Wolovsky M, Calzolari A, Mincione F. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA type 6/11 in a conjunctival papilloma by in situ hybridization with biotinylated probes. Pathologica. août 1992;84(1092):483-8.

109. Saegusa M, Takano Y, Hashimura M, Okayasu I, Shiga J. HPV type 16 in conjunctival and junctional papilloma, dysplasia, and squamous cell carcinoma. J Clin Pathol. 1 déc 1995;48(12):1106-10.

110. Nakamura Y, Mashima Y, Kameyama K, Mukai M, Oguchi Y. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase chain reaction. Br J Ophthalmol. 1 avr 1997;81(4):308-13.

111. Sjo NC. Human papillomavirus in conjunctival papilloma. Br J Ophthalmol. 1 juill 2001;85(7):785-7.

112. Minchiotti S, Masucci L, Santos MSD, Perrella E, Graffeo R, Lambiase A, et al. Conjunctival Papilloma and Human Papillomavirus: Identification of HPV Types by PCR. Eur J Ophthalmol. 1 mai 2006;16(3):473-7.

113. Sjö NC, Buchwald C von, Cassonnet P, Norrild B, Prause JU, Vinding T, et al. Human papillomavirus in normal conjunctival tissue and in conjunctival papilloma: types and frequencies in a large series. Br J Ophthalmol. 1 août 2007;91(8):1014-5.

114. Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y. Detection of human papillomavirus in pterygium and conjunctival papilloma by hybrid capture II and PCR assays. Eye. nov 2008;22(11):1442-5.

115. Bredow L, Martin G, Reinhard T, Mittelviefhaus H, Auw-Haedrich C. Recurrent conjunctival papilloma progressing into squamous cell carcinoma with change of HPV-finding during the course. Br J Ophthalmol. 1 nov 2009;93(11):1437-1437.

116. Moran DJ, Hollows FC. Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation. Br J Ophthalmol. mai 1984;68(5):343-6.

117. Sarkar P, Tripathy K. Pterygium. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558907/

118. J. Daniel Twelker, Bailey IL. Clinical Evaluation of Pterygium. 2015 [cité 4 août 2020]; Disponible sur: http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.1.3561.9364

119. Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. Prog Retin Eye Res. 1 mars 2004;23(2):195-228.

120. Reid TW, Dushku N. Does human papillomavirus cause pterygium? Br J Ophthalmol. juill 2003;87(7):806-8.

121. McDonnell JM, McDonnell PJ, Sun YY. Human Papillomavirus DNA in Tissues and Ocular Surface Swabs of Patients with Conjunctival Epithelial Neoplasia. :6.

122. Varinli S, Varinli I, Köksal Erkisi M, Doran F. Human papillomavirus in pterygium. Cent Afr J Med. janv 1994;40(1):24-6.

123. Dushku N, Hatcher SLS, Albert DM, Reid TW. p53 Expression and Relation to Human Papillomavirus Infection in Pingueculae, Pterygia, and Limbal Tumors. Arch Ophthalmol. 1 déc 1999;117(12):1593-9.

124. Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. Cornea. mars 2001;20(2):164-7.

125. Gallagher MJ, Giannoudis A, Herrington CS, Hiscott P. Human papillomavirus in pterygium. Br J Ophthalmol. juill 2001;85(7):782-4.

126. Piras F, Moore PS, Ugalde J, Perra MT, Scarpa A, Sirigu P. Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. Br J Ophthalmol. juill 2003;87(7):864-6.

127. Chen K-H, Hsu W-M, Cheng C-C, Li Y-S. Lack of human papillomavirus in pterygium of Chinese patients from Taiwan. Br J Ophthalmol. août 2003;87(8):1046-8.

128. Ateenyi-Agaba C, Weiderpass E, Smet A, Dong W, Dai M, Kahwa B, et al. Epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types and carcinoma of the conjunctiva: a pilot study. Br J Cancer. 4 mai 2004;90(9):1777-9.

129. Schellini SA, Hoyama E, Shiratori CA, Sakamoto RH, Candeias JMG. Lack of papillomavirus (HPV) in pterygia of a Brazilian sample. Arq Bras Oftalmol. août 2006;69(4):519-21.

130. Kuo K-T, Chang H-C, Hsiao C-H, Lin M-C. Increased Ki-67 proliferative index and absence of P16INK4 in CIN-HPV related pathogenic pathways different from cervical squamous intraepithelial lesion. Br J Ophthalmol. juill 2006;90(7):894-9.

131. Rodrigues FW, Arruda JT, Silva RE, Moura KKVO. TP53 gene expression, codon 72 polymorphism and human papillomavirus DNA associated with pterygium. Genet Mol Res GMR. 2008;7(4):1251-8.

132. Otlu B, Emre S, Turkcuoglu P, Doganay S, Durmaz R. Investigation of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNAs in pterygium tissue. Eur J Ophthalmol. avr 2009;19(2):175-9.

133. Tsai Y-Y, Chang C-C, Chiang C-C, Yeh K-T, Chen P-L, Chang C-H, et al. HPV infection and p53 inactivation in pterygium. Mol Vis. 1 juin 2009;15:1092-7.

134. Piecyk-Sidor M, Polz-Dacewicz M, Zagórski Z, Zarnowski T. Occurrence of human papillomavirus in pterygia. Acta Ophthalmol (Copenh). nov 2009;87(8):890-5.

135. Hsiao C-H, Lee B-H, Ngan K-W, Chuang W-Y, Yeung L, Yeh L-K, et al. Presence of human papillomavirus in pterygium in Taiwan. Cornea. févr 2010;29(2):123-7.

136. Chong PP, Tung CH, Rahman NABA, Yajima M, Chin FW, Yeng CLS, et al. Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus (HPV) in pterygia in multi-ethnic patients in the Malay Peninsula. Acta Ophthalmol (Copenh). nov 2014;92(7):e569-579.

137. Hamed-Azzam S, Edison N, Briscoe D, Mukari A, Elmalah I. Identification of human papillomavirus in pterygium. Acta Ophthalmol (Copenh). mai 2016;94(3):e195-197.

138. Chalkia AK, Derdas S, Bontzos G, Sourvinos G, Detorakis ET. Non-invasive detection of HPV DNA in exfoliative samples from ophthalmic pterygium: a feasibility study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol. janv 2018;256(1):193-8.

139. Gichuhi S, Sagoo MS, Weiss HA, Burton MJ. Epidemiology of ocular surface squamous neoplasia in Africa. Trop Med Int Health. 2013;18(12):1424-43.

140. Lauer SA, Malter JS, Meier JR. Human papillomavirus type 18 in conjunctival intraepithelial neoplasia. Am J Ophthalmol. 15 juill 1990;110(1):23-7.

141. Tuppurainen K, Raninen A, Kosunen O, Kankkunen JP, Kellokoski J, Syrjänen S, et al. Squamous cell carcinoma of the conjunctiva. Failure to demonstrate HPV DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction. Acta Ophthalmol (Copenh). avr 1992;70(2):248-54.

142. Tabrizi SN, McCurrach FE, Drewe RH, Borg AJ, Garland SM, Taylor HR. Human papillomavirus in corneal and conjunctival carcinoma. Aust N Z J Ophthalmol. août 1997;25(3):211-5.

143. Karcioglu ZA, Issa TM. Human papilloma virus in neoplastic and non-neoplastic conditions of the external eye. Br J Ophthalmol. juill 1997;81(7):595-8.

144. Toth J, Karcioglu ZA, Moshfeghi AA, Issa TM, Al-Ma'ani JR, Patel KV. The relationship between human papillomavirus and p53 gene in conjunctival squamous cell carcinoma. Cornea. mars 2000;19(2):159-62.

145. Scott IU, Karp CL, Nuovo GJ. Human papillomavirus 16 and 18 expression in conjunctival intraepithelial neoplasia. Ophthalmology. mars 2002;109(3):542-7.

146. Eng H-L, Lin T-M, Chen S-Y, Wu S-M, Chen W. Failure to detect human papillomavirus DNA in malignant epithelial neoplasms of conjunctiva by polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol. mars 2002;117(3):429-36.

147. Tulvatana W, Bhattarakosol P, Sansopha L, Sipiyarak W, Kowitdamrong E, Paisuntornsug T, et al. Risk factors for conjunctival squamous cell neoplasia: a matched case-control study. Br J Ophthalmol. avr 2003;87(4):396-8.

148. Moubayed P, Mwakyoma H, Schneider DT. High frequency of human papillomavirus 6/11, 16, and 18 infections in precancerous lesions and squamous cell carcinoma of the conjunctiva in subtropical Tanzania. Am J Clin Pathol. déc 2004;122(6):938-43.

149. Tornesello ML, Duraturo ML, Waddell KM, Biryahwaho B, Downing R, Balinandi S, et al. Evaluating the role of human papillomaviruses in conjunctival neoplasia. Br J Cancer. 13 févr 2006;94(3):446-9.

150. Sen S, Sharma A, Panda A. Immunohistochemical localization of human papilloma virus in conjunctival neoplasias: a retrospective study. Indian J Ophthalmol. oct 2007;55(5):361-3.

151. Manderwad GP, Kannabiran C, Honavar SG, Vemuganti GK. Lack of association of high-risk human papillomavirus in ocular surface squamous neoplasia in India. Arch Pathol Lab Med. août 2009;133(8):1246-50.

152. Guthoff R, Marx A, Stroebel P. No evidence for a pathogenic role of human papillomavirus infection in ocular surface squamous neoplasia in Germany. Curr Eye Res. août 2009;34(8):666-71.

153. Asadi-Amoli F, Heidari AB, Jahanzad I, Jabbarvand M. Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of conjunctiva by nested PCR: a case control study in Iran. Acta Med Iran. 2011;49(11):707-14.

154. Chauhan S, Sen S, Sharma A, Dar L, Kashyap S, Kumar P, et al. Human papillomavirus: a predictor of better survival in ocular surface squamous neoplasia patients. Br J Ophthalmol. déc 2012;96(12):1517-21.

155. Woods M, Chow S, Heng B, Glenn W, Whitaker N, Waring D, et al. Detecting human papillomavirus in ocular surface diseases. Invest Ophthalmol Vis Sci. 11 déc 2013;54(13):8069-78.

156. Afrogheh AH, Jakobiec FA, Hammon R, Grossniklaus HE, Rocco J, Lindeman NI, et al. Evaluation for High-risk HPV in Squamous Cell Carcinomas and Precursor Lesions Arising in the Conjunctiva and Lacrimal Sac. Am J Surg Pathol. avr 2016;40(4):519-28.

157. Smeets SJ, Braakhuis BJM, Abbas S, Snijders PJF, Ylstra B, Wiel MA van de, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. Oncogene. avr 2006;25(17):2558-64.

158. Houten VMM van, Snijders PJF, Brekel MWM van den, Kummer JA, Meijer CJLM, Leeuwen B van, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. Int J Cancer. 2001;93(2):232-5.

159. Alvarez-Aldana A, Martínez JW, Sepúlveda-Arias JC. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. Pathol - Res Pract. 1 févr 2015;211(2):150-5.

160. Chauhan S, Sen S, Singh N, Sharma A, Pushker N, Kashyap S, et al. Human papillomavirus in ocular malignant tumours: a study from a tertiary eye care centre in North India. Can J Ophthalmol. 1 déc 2019;54(6):688-93.

161. Estrade C, Sahli R. Comparison of Seegene Anyplex II HPV28 with the PGMY-CHUV Assay for Human Papillomavirus Genotyping. J Clin Microbiol. févr 2014;52(2):607-12.

162. IARC. Human Papillomaviruses [Internet]. Disponible sur : https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Human-Papillomaviruses-2007

XI. SERMENT DE GALIEN

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

XII. RESUME

Introduction

Les papillomavirus humains (HPV) constituent une large famille de virus, ubiquitaires, ciblant les épithéliums malpighiens où ils développent des infections fréquentes, généralement asymptomatiques et le plus souvent éliminées par la réponse immunitaire. Cependant, certains d'entre eux sont considérés comme des virus oncogènes. Ils sont en effet responsables d'environ 5% de tous les cancers confondus chez l'Homme regroupant le cancer du col de l'utérus, d'autres cancers ano-génitaux et le carcinome de l'oropharynx. Alors que l'implication des HPV dans ces cancers est largement démontrée, pour d'autres localisations, la relation causale n'est pas clairement définie. C'est le cas des néoplasies épidermoïdes de la surface oculaire qui comprennent un large spectre de tumeurs affectant la conjonctive et la cornée. Les rares études qui ont été conduites afin de déterminer la prévalence et l'implication des HPV dans ces lésions ont donné des résultats disparates ne permettant pas de conclure. La relation entre HPV et la survenue de ces pathologies néoplasiques de l'œil reste donc encore à explorer.
L'objectif de notre travail était d'étudier la prévalence d'HPV dans une série de biopsies de néoplasies épidermoïdes oculaires. Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique.

Matériel et méthodes

Les échantillons ont été recueillis sur une période de 10 ans, entre 2010 et 2020 au CHU de Poitiers, dans le service d'Anatomie et Cytopathologie pathologiques. Les biopsies incluses dans l'étude ont été déparaffinées, l'extraction de l'ADN a été réalisée sur colonnes (Qiamp DNA kit, Qiagen®), la quantité et la pureté de l'ADN ont été estimées par spectrophotométrie et la détection des HPV a été réalisée par PCR en temps réel multiplex (Anyplex II HPV28 Detection, Seegene®).

Résultats

Une seule des 26 biopsies de néoplasies épidermoïdes oculaires analysées contenait de l'ADN viral (HPV16), soit une prévalence de 3,8%. Elle provenait d'une patiente qui avait un antécédent de métastase ganglionnaire cervicale attribuée à un carcinome de l'oropharynx dans laquelle HPV16 avait également été détecté.

Conclusion

Cette étude a montré une faible prévalence d'HPV dans les échantillons de néoplasies épidermoïdes oculaires analysés, en accord avec la plupart des études publiées, ne permettant pas de conclure sur la relation de causalité entre HPV et les pathologies néoplasiques de l'œil. Néanmoins, l'implication des HPV dans ce type de pathologie n'est pas exclue pour autant. Une large étude multicentrique incluant un grand nombre de chaque type de tumeur oculaire serait plus contributive.

Mots-clés

HPV, *human papillomavirus*, œil, cancer, néoplasie épidermoïde, PCR