



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Julie GUILLET

Les papillomavirus Humains dans les cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures : optimisation de méthodes de détection et étude de populations à risque

Le 01 Avril 2016

Membres du jury :

Rapporteurs : Pr. Philippe SCHULTZ, PU-PH
Dr. Alain JUNG, HDR

CHRU de Strasbourg
Centre Paul Strauss, Strasbourg

Examineurs : Pr. Jean-Louis MERLIN, PU-PH
Dr. Gilles DOLIVET, HDR

Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy
Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy

Membres invités : Pr. Philippe JUDLIN, PU-PH
Dr. Sibylle BEVILACQUA, PH

CHRU de Nancy
CHRU de Nancy

Remerciements

A mon Maître et Directeur de thèse, Monsieur le Docteur Gilles Dolivet,

Depuis bientôt 8 ans vous n'avez cessé de me pousser, m'encourager, me soutenir... Vous m'avez accueillie à l'Institut de Cancérologie de Lorraine en tant qu'interne et c'est maintenant avec grand plaisir que j'exerce chaque semaine au sein de votre équipe. Je vous remercie pour votre confiance, votre disponibilité et vos précieux conseils dans tous les domaines. Vous m'avez initiée à la recherche et malgré les difficultés de la recherche clinique, j'y ai pris goût! Ce travail n'aurait pu voir le jour sans vous, et je vous prie d'y trouver l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

A mon co-Directeur de thèse, Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin,

Je vous remercie de m'avoir accueillie à l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'ICL, d'abord pour ma thèse d'exercice puis pour ces travaux de recherche. Vos conseils toujours simples sont si précieux! Merci pour votre aide et votre bonne humeur, je vous prie de trouver dans cette thèse l'expression de ma gratitude la plus sincère.

A Monsieur le Professeur Philippe Schultz,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Votre présence dans ce jury nous honore, nous vous remercions d'y apporter votre point de vue de chirurgien ORL et cervico-facial. Veuillez accepter nos plus sincères remerciements.

A Monsieur Alain Jung,

Vous nous faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et nous vous en remercions. Votre point de vue d'expert en biologie des tumeurs HPV-induites compte beaucoup à nos yeux. Je vous prie de croire en l'expression de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Philippe Judlin,

Je vous remercie pour votre soutien dans mes travaux de recherche ces dernières années. Votre point de vue éclairé sur les pathologies gynécologiques induites par les HPV et vos conseils dans la rédaction des protocoles nous ont été d'un grand soutien. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté si spontanément notre invitation dans ce jury. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Sibylle Bevilacqua,

Je vous remercie pour vos conseils et votre disponibilité. Votre avis d'infectiologue est nécessaire sur le sujet et je vous remercie d'avoir accepté notre invitation dans ce jury. Je vous prie de trouver dans cette thèse l'expression de toute ma gratitude.

Au Directeur de l'UMR 7039 CRAN CNRS, Monsieur Didier Wolf,

Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de votre laboratoire. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Au Directeur de l'Ecole Doctorale BiOSE, Monsieur Patrick Menu,

Je vous remercie pour votre bienveillance et votre compréhension. Vous m'avez permis d'effectuer ces travaux en quatre ans en raison de mes activités professionnelles et vous avez également tenu compte de ma jeune maternité, ce qui m'a beaucoup touchée. Veuillez trouver dans cette thèse l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Marc Martrette, Doyen de la Faculté d'Odontologie de Nancy et Responsable du Service d'Odontologie du CHRU de Nancy,

Je vous remercie pour votre aide et votre soutien ces dernières années. Je ne serais pas Maître de Conférences des Universités sans la confiance que vous m'avez accordée, et je vous en suis sincèrement reconnaissante. Vous avez également permis à ce manuscrit de voir le jour en me libérant du temps et je vous en remercie. J'espère être à la hauteur des responsabilités que vous me confiez et vous prie de trouver dans ce travail l'expression de toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Daniel Viennet, sans qui rien de tout ça n'aurait vu le jour. Je vous dédie ce travail et mon avenir, vous qui êtes parti trop tôt pour en voir l'aboutissement. De tout mon coeur, merci.

A mes parents. Papa, Maman, en voici une seconde... mais c'est la dernière, promis! Merci pour votre soutien et vos encouragements, pour votre disponibilité. Et surtout, merci de toujours croire en moi. Je vous aime.

A ma soeur, Maud. Alias, Demo, Maudus et tant d'autres. Merci d'être toujours là même si tu es parfois au bout du monde. Je croise les doigts pour que tu jettes un jour ton dévolu sur l'Est Républicain, ce serait tellement plus simple ;) Je te souhaite surtout de te trouver, et d'écrire ce que tu désires. Be you, be happy. Love love.

A mon Fred. Que de choses en 7 ans à peine. Trois thèses à nous deux, quelques mémoires, un mariage, un concours, une installation, et surtout le plus beau cadeau du monde!! Merci de m'avoir laissée poursuivre dans cette voie, même si ce n'était pas forcément la plus simple. Je t'aime.

A Léonie, mon petit soleil. Tu fais notre bonheur au quotidien, puisses tu continuer à rire ainsi toute ta vie.

Aux filles,

Emeline, Manue, Camille, Lucie, Elo, Hélène, Mel, Lisou, Cécile, Shagha, Fanélie... Merci d'être toujours là! Pour plusieurs d'entre vous c'est une amitié qui a plus de 10 ans, pour les autres j'espère qu'il en sera de même. Pour votre indéfectible soutien, quelles que soient les circonstances, merci. A nous.

Charline, ma bourrique. Tout à commencé sur les bancs de cette fac, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce qu'on a déjà vécu! Que la vie nous réserve beaucoup d'autres surprises.

A Véro et Thibaut. J'espère que vous savez à quel point vous comptez pour nous! Thibaut, je suis fière que tu sois le parrain de notre princesse ; et Véro, je suis honorée de la confiance que tu m'accordes en faisant de moi ton témoin. Merci d'être toujours présents pour nous.

A Marion, Jacques, Emilie et Charline, la Tatawin Team prend quelques rides mais elle est toujours là. Merci pour ces belles années.

A toute l'équipe de Patho de la Faculté d'Odontologie de Nancy, et particulièrement à Charlène et François : merci pour votre aide au quotidien et votre implication pour que les choses tournent au mieux...

A Céline Clément. Merci de toujours répondre présente, pour les petits détails comme pour les gros morceaux! Je suis heureuse de travailler avec toi, ton élan et ta capacité à ne jamais baisser les bras devant l'ampleur de la tâche sont une source de motivation que tu n'imagines peut-être pas....merci.

A mes collègues de la Faculté d'Odontologie et du Service d'Odontologie, vous qui m'avez formée, je ne serais pas là sans votre soutien. Quant à tous ceux qui ont passé le concours après moi, je suis ravie qu'on forme une belle équipe de jeunes!! Une pensée toute particulière pour Anne-So et son nouveau profil ;)

Aux AS de Brabois Aurélie et Marie-Jo, à Béa, à Corinne, à Julie et Kathleen. C'est aussi parce que travailler avec vous au quotidien est un plaisir que ce travail a vu le jour.

A toute l'équipe administrative de la Faculté d'Odontologie, et particulièrement à Viviane, Laetitia et Sylvie. Vous qui me connaissez depuis mon arrivée à la Fac, vous n'êtes pas prêtes de vous débarrasser de moi!!!

A l'équipe Odonto/ORL de l'ICL, merci les filles! Tout spécialement à Romina et Sophie, à Caro, vous me prouvez chaque semaine que l'on peut concilier travail et vie de famille, vous êtes mes modèles!

A l'équipe de Biologie des Tumeurs de l'ICL, et tout particulièrement à Alexandre Harlé, merci pour ton aide et ta disponibilité. Que ton investissement au quotidien soit couronné de succès.

A l'équipe d'Anatomo-pathologie de l'ICL, et notamment au Docteur Agnès Leroux.

A Julia Salleron, pour tes dons sur Excel et pour ton aide précieuse dans la rédaction des articles.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, à tous ceux qui ont supporté mon manque de disponibilité ces derniers mois, à tous ceux qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci.

**Les Papillomavirus Humains dans les cancers des
Voies Aéro-Digestives Supérieures : optimisation
de méthodes de détection et étude de
populations à risque**

Table des matières

Chapitre 1

1. Introduction bibliographique et objectifs du travail.....	p.10
1.1. Les cancers des voies aéro-digestives supérieures.....	p.11
1.2. Les modalités thérapeutiques.....	p.12
1.3. La cancérogenèse.....	p.13
1.4. Les Papillomavirus Humains.....	p.14
1.5. Les mécanismes suppresseurs de tumeur.....	p.16
1.6. HPV et oncogénèse.....	p.17
1.7. Objectifs du travail.....	p.19

Chapitre 2

2. Les Papillomavirus Humains dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures.....	p.20
2.1. Prévalence des HPV dans les cancers des VADS.....	p.21
2.2. Facteurs de risque des cancers des VADS induits par les HPV.....	p.22
2.3. Pathogénie et pronostic des cancers des VADS induits par les HPV.....	p.23
2.4. Détection des HPV dans les tumeurs des VADS.....	p.24
2.5. Détection de l'ADN des HPV dans les prélèvements tissulaires fixés au formol et inclus en paraffine.....	p.25
<i>L'essentiel</i>	p.39

Chapitre 3

3. HEFFIBUC : Etude diagnostique de détection d'HPV par frottis buccaux.....	p.40
<i>L'essentiel</i>	p.52

Chapitre 4

4. PAPILLOR : Etude de la concordance du génotype des Papillomavirus Humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital.....	p.53
4.1. Introduction.....	p.54
4.2. Contexte bibliographique.....	p.55
4.3. Justification de l'étude.....	p.57
4.4. Synopsis.....	p.59
<i>L'essentiel</i>	p.61

Chapitre 5

5. Traitements actuels et perspectives d'avenir.....	p.62
--	------

5.1. La chirurgie.....	p.63
------------------------	------

5.2. Chimiothérapie et radiothérapie.....	p.64
---	------

5.3. Thérapies ciblées.....	p.65
-----------------------------	------

5.4. Vaccination préventive.....	p.67
----------------------------------	------

5.5. Vaccination thérapeutique.....	p.69
-------------------------------------	------

<i>L'essentiel</i>	p.70
--------------------------	------

Conclusions	p.71
--------------------------	------

Bibliographie	p.72
----------------------------	------

Annexes

Annexe 1: Classification TNM des carcinomes des VADS (7 ^{ème} édition, 2009).....	p.83
--	------

Annexe 2: Protocole PAPILLOR.....	p.85
-----------------------------------	------

Liste des abréviations	p.106
-------------------------------------	-------

Liste des figures	p.108
--------------------------------	-------

Liste des tableaux	p.109
---------------------------------	-------

Chapitre 1

Introduction bibliographique et objectifs du travail

1. Introduction bibliographique et objectifs du travail

1.1. Les cancers des voies aéro-digestives supérieures

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) regroupent les tumeurs de la cavité buccale, des lèvres, du pharynx et du larynx (Figure 1)[1]. Ils sont situés au sixième rang des cancers les plus fréquents au monde [2]. En France, environ 14500 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, avec une importance prédominance masculine (74%). Le taux de mortalité dans notre pays s'élève à 28%, avec un taux de survie à 5 ans évalué à 31% [3, 4]. Ces cancers touchent principalement les hommes, avec un sex ratio en France s'élevant à 5,9 [5].

Les facteurs de risque de ces cancers sont en premier lieu la consommation d'alcool et de tabac. L'usage contemporain des deux substances semble même avoir un effet synergique [6, 7]. La prévalence du tabagisme en France chez les 15-75 ans est de 34%, ce qui en fait l'un des pays les plus consommateurs d'Europe. La situation est particulièrement préoccupante chez les jeunes : l'usage du tabac est quotidien pour 29% des jeunes de 17 ans [8, 9]. Le mésusage de l'alcool est également un problème de santé publique en France. Une étude rapporte qu'en 2012, 23% des patients hospitalisés dans des hôpitaux généraux ont une consommation excessive d'alcool. Cette surconsommation est responsable de 49 000 décès chaque année dans notre pays [10].

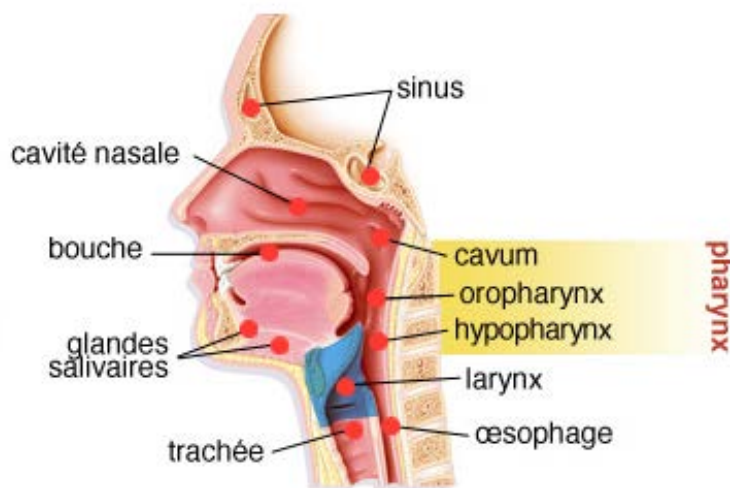


Figure 1 : schéma des voies aéro-digestives supérieures [1]

En 1983, une équipe finlandaise mettait en évidence la présence de Papillomavirus Humains (HPV) dans des lésions épidermoïdes de la cavité buccale [11]. Depuis, de nombreux travaux ont confirmé l'hypothèse d'une oncogenèse d'origine virale dans les voies aéro-digestives supérieures [12].

1.2. Les modalités thérapeutiques

Le traitement des cancers des VADS dépend essentiellement de la localisation, du stade de développement tumoral, et de l'existence de métastases locales/loco-régionales ou à distance. L'essentiel de ces informations figure dans le statut TNM attribué à chaque patient selon des critères cliniques complétés par des données d'imagerie (Annexe 1).

La chirurgie d'exérèse possède une place de choix dans l'arsenal thérapeutique, d'autant plus qu'elle a évolué ces dernières années. L'apparition de techniques moins invasives, telles que la chirurgie trans-orale au laser CO₂, la chirurgie trans-orale robotisée, l'utilisation du ganglion sentinelle ou encore de la photo-thérapie dynamique, a permis d'améliorer la prise en charge des patients [13]. Elle est généralement réalisée en première intention et peut s'accompagner d'un curage ganglionnaire cervical, effectué dans le même temps opératoire.

La radiothérapie complète souvent le traitement chirurgical. Il s'agit généralement de radiothérapie externe, pendant laquelle des doses de 55 à 70 Gy sont délivrées sur la zone de la tumeur primitive et les aires ganglionnaires. Une autre modalité de la radiothérapie peut être indiquée dans les cancers localisés des lèvres, de la cavité buccale, de l'oropharynx ou du cavum; il s'agit de la curiethérapie interstitielle, qui utilise des fils d'iridium 192 implantables [13].

La chimiothérapie n'est pas utilisée en tant que traitement adjuvant seul dans le traitement des cancers des VADS car elle n'a jamais fait ses preuves. En revanche, elle est proposée en induction dans les protocoles de préservation laryngée. Elle peut également être mise en oeuvre concomitamment à la radiothérapie dans le traitement de tumeurs très évoluées ou ayant un pro-

nostic défavorable. Les molécules essentiellement utilisées en ORL sont le 5-Fluoro-Uracile (5-FU) et les dérivés du platine (Cisplatine et Carboplatine) [13].

Les thérapies ciblées ne sont pas non plus utilisées en tant que traitement adjuvant seul dans le traitement des cancers des VADS. Néanmoins, il a été montré que 90% des carcinomes épidermoïdes des VADS surexpriment le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) [14]. Le cetuximab (Erbix[®]), anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), trouve sa place dans le traitement de certains cancers des VADS, en complément des autres thérapeutiques et notamment de la radiothérapie [15].

1.3. La cancérogenèse

La cancérogenèse est un mécanisme extrêmement complexe, encore loin d'être totalement élucidé. Néanmoins, de nombreux travaux de recherche ont permis de comprendre certains phénomènes permettant la lente transformation des cellules saines en cellules cancéreuses. En 2000, Hanahan et ses collaborateurs ont décrit six altérations cellulaires essentielles dans le développement d'une tumeur [16]. Il s'agit du maintien des signaux de prolifération, l'évitement des signaux inhibiteurs de croissance, la capacité à former des métastases, la possibilité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose (Figure 2).

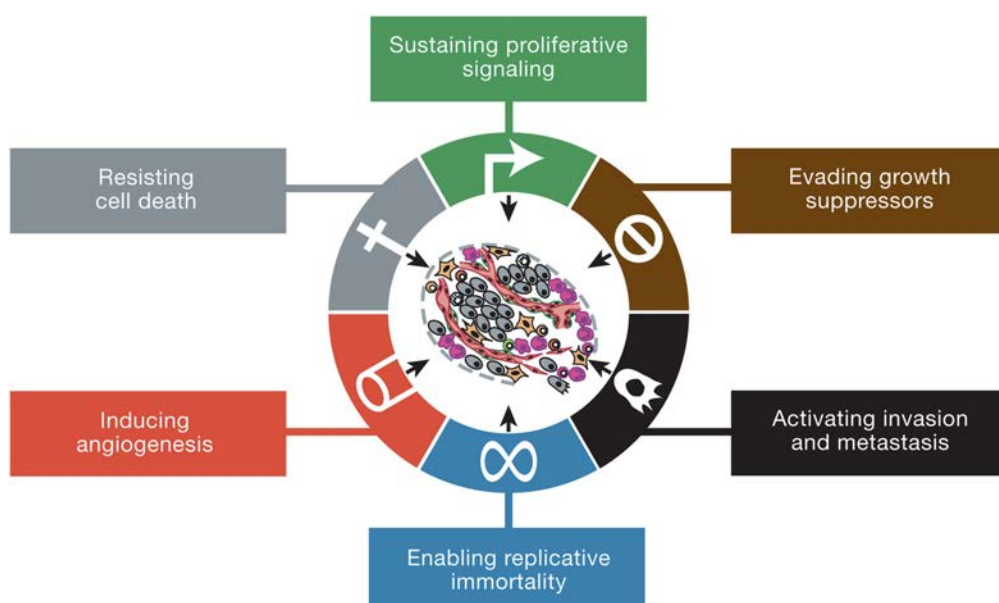


Figure 2: les caractéristiques communes des cellules cancéreuses [16]

En 2011, la même équipe a décrit deux caractéristiques indispensables à l'acquisition de ces altérations cellulaires. L'une d'entre elle est la capacité à modifier ou reprogrammer le métabolisme cellulaire afin de permettre à la cellule de supporter le processus néoplasique. La seconde est l'échappement immunitaire des cellules tumorales, notamment aux lymphocytes B et T et aux macrophages [17]. Par ailleurs, l'instabilité génomique, qui génère un grand nombre de mutations, et l'inflammation, médiée par les cellules du système immunitaire, sont capables de promouvoir la progression tumorale [18]. De nombreuses protéines sont impliquées dans la prolifération cellulaire et dans l'apoptose, notamment les protéines p53 et pRb (Rétinoblastome). Le bon fonctionnement de ces régulateurs du cycle cellulaire peut être altéré par des mutations, entraînant une prolifération accrue et non contrôlée aboutissant à la tumorigenèse. Ces modifications proviennent souvent d'une mutation chromosomique ou d'inactivations épigénétiques, pouvant être causées par des virus oncogènes tels que les HPV.

1.4. Les Papillomavirus Humains

Les HPV sont de petits virus à ADN double brin qui appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. Ils sont très résistants, notamment à la chaleur, et ont un tropisme électif pour les épithéliums pluri-stratifiés tels que la peau ou les muqueuses .

Aujourd'hui, plus de 130 types d'HPV différents ont été identifiés. Ils sont généralement classés en trois catégories selon leur pouvoir oncogène au niveau du col utérin: bas-risque (BR-HPV), potentiellement haut-risque (PHR-HPV) et haut-risque (HR-HPV). Les types les plus fréquemment rencontrés de chaque catégorie sont présentés dans le Tableau I [19, 20].

Tableau I : Classification des HPV selon leur pouvoir oncogène

HR-HPV	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
PHR-HPV	26, 53, 66
BR-HPV	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 64, 67, 69, 70, 72, 81, IS39, CP608

Les BR-HPV sont responsables de la survenue de lésions généralement bénignes, telles que des verrues vulgaires ou des condylomes acuminés. Le rôle étiologique des HR-HPV dans l'apparition de lésions pré-néoplasiques et néoplasiques au niveau du col utérin a pu être clairement établi au début des années 1980. Les progrès technologiques, la mise en place de campagnes de dépistages, ont ensuite permis de poser une évidence : les HPV sont impliqués dans près de 100% des carcinomes épidermoïdes du col utérin [21]. Le type le plus impliqué dans la cancérogenèse virale est HPV16 [22]. L'organisation génomique des HPV est commune à tous les sous-types. Ils sont composés d'un ADN circulaire à double brin, comportant 8000 paires de bases. Un seul des deux brins d'ADN est codant et présente trois régions génomiques principales (Figure 3):

- la région précoce (*Early*), qui code pour les protéines E1 à E7
- la région tardive (*Late*), qui code pour les protéines L1 et L2
- la région URR (*Upstream Regulatory Region*) ou LCR (*Long Control Region*), qui est une région non codante impliquée dans la réplication de l'ADN viral et dans la transcription des gènes viraux.

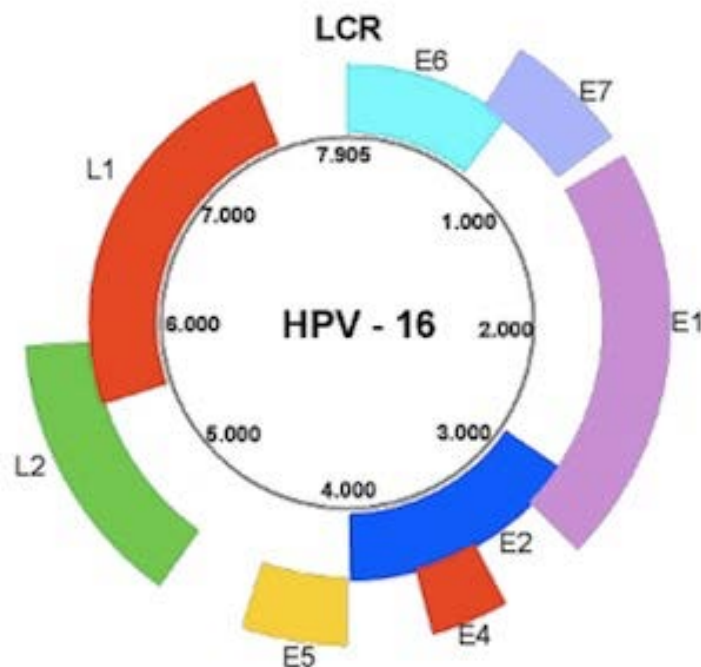


Figure 3 : schéma de l'organisation génomique d'HPV 16

La région E code pour des protéines non structurales tandis que la région L code pour les protéines de capsid [22]. La protéine E6 des HR-HPV se lie à la protéine p53 et facilite sa dégradation via l'ubiquitine. p53 est une protéine suppresseur de tumeur et son hydrolyse a de multiples conséquences cellulaires. La protéine E7 se lie à un autre suppresseur de tumeur, la protéine du rétinoblastome (pRb), et l'inactive [23].

1.5. Les mécanismes suppresseurs de tumeur

Il existe différents mécanismes suppresseurs de tumeurs, dont le plus connu est l'apoptose qui peut être induite par certaines protéines.

La fonction de la protéine p53 est altérée dans plus de 50% des cancers humains, tous types confondus. Cette protéine, lorsqu'elle est surexprimée dans une cellule, peut induire le blocage du cycle cellulaire en phase G1 et/ou G2. Cela permet à la cellule de mettre en oeuvre des réponses réparatrices de l'ADN. Dans d'autres cas, p53 entraîne une apoptose cellulaire. Dans les cellules comportant une p53 mutée, il n'y a plus d'arrêt du cycle cellulaire ni d'apoptose après un endommagement de l'ADN [24].

Il existe d'autres mécanismes inhibant la cancérogenèse, tels que la sénescence. Lorsque des protéines oncogènes sont surexprimées, la cellule est capable de déclencher des voies de signalisation conduisant à sa sénescence et donc à sa mort [25]. Le premier gène suppresseur de tumeur qui ait été identifié est le gène RB1 (Rétinoblastome 1) [26]. La protéine pRb est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, notamment dans la phase de transition entre G1 et S. L'arrêt du cycle à ce stade favorise l'entrée en sénescence de la cellule.

Trois mécanismes principaux (Figure 4), décrits par Hayflick en 1961 [27], sont impliqués dans le déclenchement de la sénescence:

- le raccourcissement des télomères
- l'accumulation de dommages sur l'ADN
- l'arrêt de la répression d'INK4a/ARF.

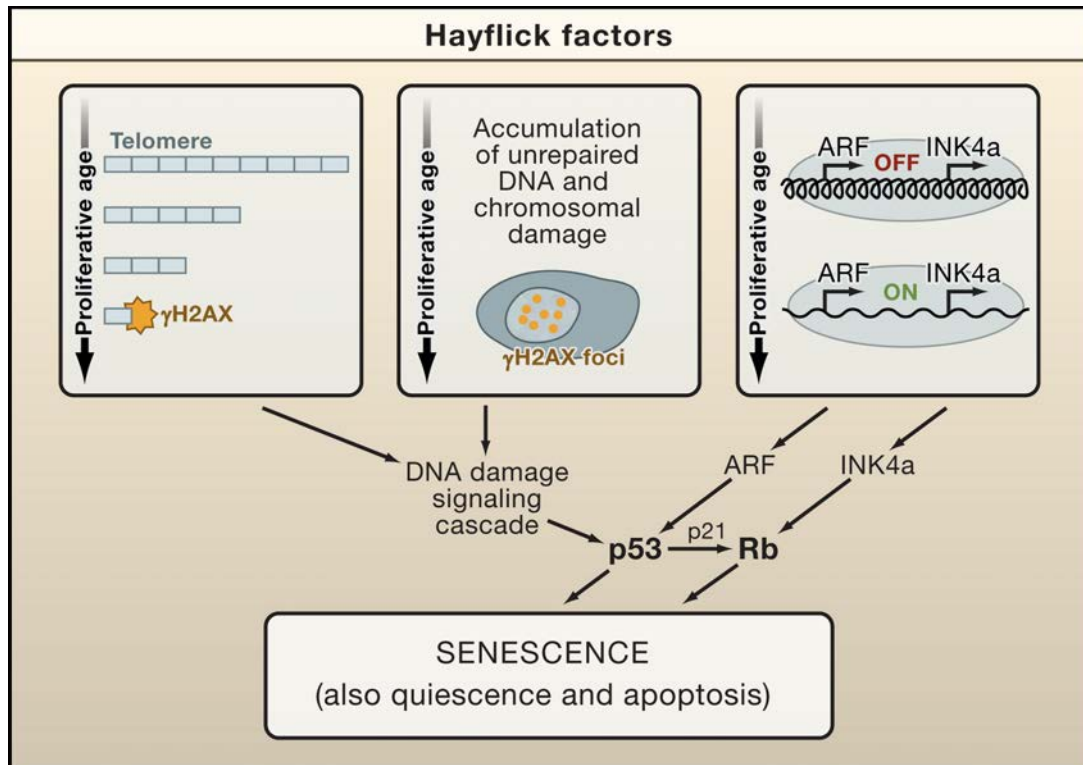


Figure 4: facteurs principaux conduisant à la sénescence (facteurs de Hayflick) [27]

Les gènes INK4a et ARF codent pour les protéines $p16^{\text{INK4a}}$ et $p14^{\text{ARF}}$. Dans les cellules saines, $p16^{\text{INK4a}}$ inhibe les kinases CD4K et CD6K. Celles-ci ne peuvent alors plus phosphoryler pRb, et le cycle cellulaire est stoppé en phase G1. C'est l'une des premières étapes de la sénescence. En parallèle, p53 est stabilisée par $p14^{\text{ARF}}$ et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 est également possible. Dans les tumeurs, une dérégulation des voies $p14^{\text{ARF}}$ /p53 et $p16^{\text{INK4a}}$ /pRb est observée. Ceci empêche alors l'arrêt du cycle cellulaire et ne freine plus le développement tumoral [27, 28].

1.6. HPV et oncogénèse

Chaque année, les HPV sont responsables de l'apparition de plus de 550 000 nouveaux cas de cancers chez l'Homme [29]. L'implication des HPV dans le cancer du col de l'utérus a été démon-

trée il y a 40 ans et les types 16 et 18 ont rapidement été mis en cause [30, 31]. C'est donc selon le modèle du cancer du col utérin que l'implication des HPV dans la cancérogenèse a été décrit. Le rôle des protéines virales E6 et E7 a été mis en exergue dès 1985 [32]. Elles ont notamment la capacité de créer un environnement cellulaire favorable à la réplication de l'ADN viral. Elles sont également impliquées dans la tumorigenèse, lorsqu'elles sont surexprimées dans les cellules basales de l'épithélium.

E6 a la capacité d'inactiver p53, interrompant ainsi les voies de l'apoptose médiée par p53. E7 induit quant à elle la dégradation de pRb, ne permettant plus l'arrêt du cycle cellulaire [33]. La dérégulation du cycle cellulaire induite par E6 et E7 permet au virus de se répliquer. Elle est résumée dans le schéma suivant (Figure 5).

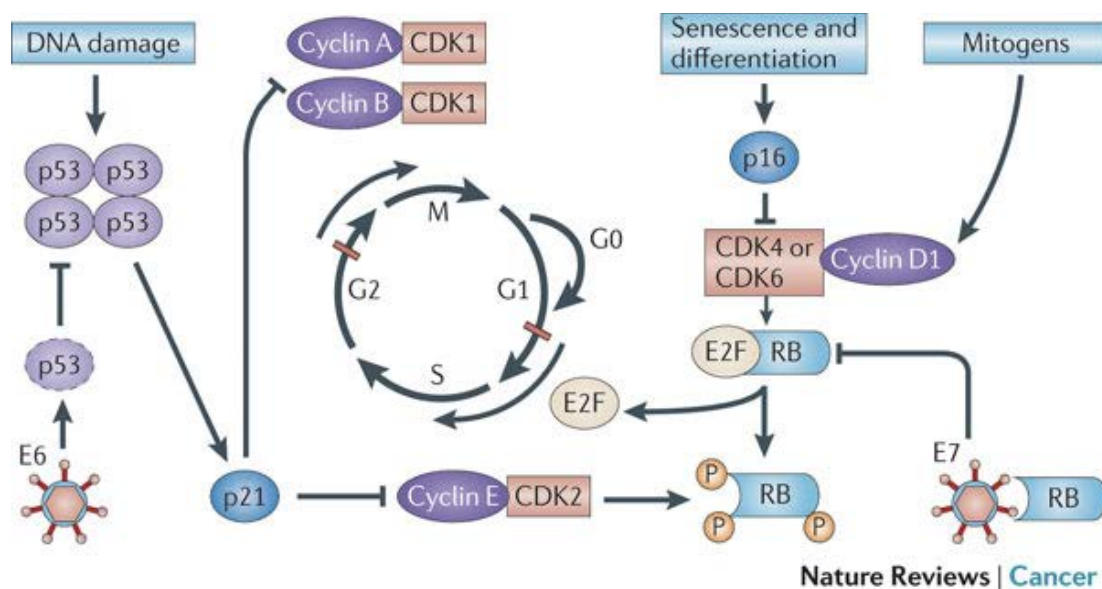


Figure 5: Dérégulation du cycle cellulaire induit par les HPV [32]

Lors d'une infection "productive" du col utérin, l'expression des protéines E6 et E7 se retrouve dans les différentes couches de l'épithélium et aboutit à la production de virions. C'est dans cette phase que l'infection est contagieuse. Lors d'une infection "oncogène", une dérégulation de l'expression d'E6 et E7 est observée dans la lame basale de l'épithélium, entraînant l'abrogation des points de contrôle du cycle cellulaire [33].

1.7. Objectifs du travail

Nous venons de rappeler à travers ce premier chapitre la cancérogenèse des voies aéro-digestives supérieures, qui est en partie commune à de nombreuses autres localisations de tumeurs épidermoïdes. Pourtant, l'implication des Papillomavirus Humains dans le développement de certaines tumeurs des VADS, et particulièrement au niveau de l'oropharynx, fait émerger de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

Dans le chapitre 2, nous aborderons l'épidémiologie des cancers des VADS induits par les HPV, ainsi que la détection de l'implication virale dans la cancérogenèse. Nous avons travaillé avec l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, où nous avons validé une méthode de détection d'ADN d'HPV sur des prélèvements tissulaires fixés au formol puis inclus en paraffine (FFIP).

Nous avons en parallèle mené une étude prospective sur 47 patients afin de déterminer la validité du frottis tumoral et du frottis en zone saine pour la détection d'HPV. Cette étude sera détaillée dans le chapitre 3.

Dans le chapitre 4 nous aborderons une autre population à risque de développer des tumeurs des VADS HPV-induites. Il s'agit des femmes porteuses d'une infection génitale par un ou plusieurs HPV à haut risque, ayant entraîné l'apparition de lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses du col utérin. L'objectif est de connaître la proportion de femmes co-infectées au niveau oral et génital. Cette thématique a fait l'objet de la rédaction du protocole d'une autre étude prospective, qui a remporté l'Appel à Projet "Jeune Chercheur" du GIRCI Est en décembre 2014.

L'ensemble des thèmes traités nous permettra de conclure par une discussion générale dans le chapitre 5, abordant notamment les thérapeutiques actuelles et la vaccination préventive contre certains types d'HPV.

Chapitre 2

Les Papillomavirus Humains dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures

2. Les Papillomavirus Humains dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures

2.1. Prévalence des HPV dans les cancers des VADS

La majorité des cancers des VADS induits par HPV sont des carcinomes épidermoïdes (CE), localisés au niveau de l'oropharynx (OP). Les localisations préférentielles de ces cancers sont, par ordre d'incidence, les amygdales et la base de la langue. On retrouve aussi des cancers HPV-induits dans la cavité buccale, l'hypopharynx, le larynx, les sinus maxillaires et plus rarement le cavum [12, 34].

Le taux de prévalence des carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures (CE-VADS) induits par HPV a été estimé à 25,6% dans le monde mais il est variable selon les pays [35]. En Europe, ce taux varie de 20 à 55% [36, 37]. Il est plus élevé aux Etats-Unis, atteignant jusqu'à 72% dans certains états. Enfin, il est estimé à 45% en Australie et 52% au Japon [35]. En France, l'étude rétrospective *EDiTH VI* a permis de retrouver une incidence de 46,5% d'HPV impliqués dans les cancers de l'oropharynx, et 10,5% dans les tumeurs de la cavité buccale [38]. Les résultats de l'étude *Papillophar* (NCT 00918710) apporteront des précisions sur la prévalence des cancers de l'oropharynx HPV-induits puisqu'il s'agit d'une étude prospective menée dans 15 centres en France [39].

L'épidémiologie des cancers des VADS a changé dans les dernières décennies. Les taux de prévalence d'HPV responsables des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx (CE-OP) semblent augmenter, tandis que la consommation d'alcool et de tabac diminue dans de nombreux pays [40, 41]. Néanmoins, la France reste quelque peu en marge de ces constats, en raison d'une consommation éthylo-tabagique toujours importante. Notre pays conserve d'ailleurs le premier rang en terme d'incidence des cancers des VADS en Europe [38]. Bien que le tabagisme diminue dans certaines tranches d'âges, il est élevé chez les jeunes : 27% des 15-19 ans et près de 45% des 20-25 ans sont des fumeurs réguliers [42]. Ces comportements expliquent en grande partie le fait

que la plupart des cancers des VADS surviennent dans la sixième ou la septième décennie, et ceci de façon stable en France sur les dernières décennies. D'autres scénarii sont observés ailleurs dans le monde, et notamment aux Etats-Unis où les CE-OP surviennent à un âge plus précoce. En parallèle, l'incidence globale de ces cancers diminue, tandis que les CE induits par les HPV sont en augmentation [40, 41]. En Europe du Nord, la même tendance a été observée, avec un essor des cancers masculins HPV-induits au niveau des VADS [43].

2.2. Facteurs de risque des cancers des VADS induits par les HPV

Le mode de transmission le plus connu des HPV à tropisme muqueux est la voie sexuelle. Il s'agit d'une transmission par contact, c'est pourquoi le préservatif ne protège pas totalement de la contamination par HPV. Il semble que l'âge du premier rapport sexuel ainsi que le nombre de partenaires au cours de la vie soient des facteurs de risque importants dans le développement de CE-OP associés à HPV [44]. La modification des mœurs, et notamment l'augmentation du nombre de partenaires sexuels avec lesquels sont pratiqués le sexe vaginal, oral et anal, est aussi en cause dans le développement de ces cancers [45, 46]. Dans de nombreux pays, l'étude de la littérature montre un changement des comportements sexuels, avec entre autres une diminution de l'âge des premiers rapports et une augmentation du nombre de partenaires au cours de la vie. Ceci semble corrélé avec l'augmentation des CE-OP induits par les HPV [47, 48], particulièrement chez les hommes jeunes, de type caucasien, et non fumeurs [40]. Le tableau II résume les différences observées entre les cancers HPV-positifs et HPV-négatifs, et notamment les facteurs de risque [44].

Tableau II : Différences entre les carcinomes épidermoïdes (CE) des VADS HPV+ et HPV- [44]

	Tumeurs HPV+	Tumeurs HPV-
Localisation	Amygdales et base de langue	Toutes localisations
Stade	Tx, T1-2	Variable
Age	Cohortes plus jeunes	Cohortes plus âgées
Sexe ratio	3 hommes / 1 femme	3 hommes / 1 femme
Facteurs de risque	Comportement sexuel	Alcool et tabac
Histologie	CE non kératinisés	CE kératinisées
Incidence	En augmentation	En diminution
Survie	Meilleure	Inchangée

2.3. Pathogénie et pronostic des cancers des VADS induits par les HPV

La cancérogenèse virale induite par les HR-HPV est connue selon le modèle du cancer du col utérin. Il semble que ce modèle soit applicable à la cancérogenèse des VADS, puisque l'on y retrouve également une dégradation de p53 par la protéine virale E6 et une inactivation de pRb médiée par E7 [33, 49]. D'autre part, il a été démontré que la protéine virale oncogène E7 induit des altérations épigénétiques entraînant une surexpression de la protéine p16^{INK4a} [50, 51].

Ces observations moléculaires confèrent aux CE induits par HPV un statut à part. En effet, les cancers des VADS engendrés par les habituels facteurs de risque que sont la consommation d'alcool et de tabac, présentent d'autres caractéristiques ; on y observe des mutations de p53, des niveaux d'expression relativement élevés de pRb, et une faible expression de la protéine p16^{INK4a} [52-54].

Bien que les patients atteints de CE-OP se présentent souvent à des stades avancés de la maladie, les cancers HPV-positifs ont montré une meilleure réponse aux différentes thérapies que ceux non induits par les HPV [55, 56]. Plusieurs études rétrospectives et prospectives menées aux USA, en Australie et en Europe ont montré que les CE-OP causés par les HPV étaient corrélés à un pronostic plus favorable [56, 57]. Diverses hypothèses ont d'ores et déjà été proposées pour

expliquer l'amélioration de la réponse aux traitements, mais de nombreux points restent à élucider. Néanmoins, il est maintenant admis que ces tumeurs HPV-induites sont plus sensibles aux radiations ionisantes et à la chimiothérapie. Plus récemment, d'autres études ont mis en exergue le rôle du micro-environnement tumoral et particulièrement son taux d'oxygénation ainsi que la réponse immunitaire qu'il provoque. Selon le statut HPV de la tumeur, il semble possible de distinguer différents modèles d'infiltrats de cellules immunitaires intra-tumorales [58]. Ces différents constats confirment que les CE-VADS induits par HPV constituent une entité clinique et biologique distincte, pour laquelle de nouvelles perspectives thérapeutiques émergent [58]. Dans ce contexte, il paraît nécessaire de détecter de façon systématique les tumeurs HPV-induites afin de proposer une prise en charge adaptée.

2.4. Détection des HPV dans les tumeurs des VADS

Il existe actuellement plusieurs techniques permettant la détection des HPV dans les échantillons tumoraux issus de patients atteints de cancers des VADS. Le "gold-standard" largement accepté pour valider l'implication virale dans la cancérogenèse des VADS est la détection des transcrits viraux E6 et E7 [59]. L'expression de ces oncogènes viraux peut être détectée par qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcriptase*) en isolant les micro-ARN du tissu tumoral. Malheureusement, la fixation au formol des tissus tumoraux, suivie de l'inclusion en paraffine, dégradent ces micro-ARN [60]. Les biopsies et les pièces opératoires issues de tumeurs des VADS étant ainsi traitées pour les examens histo-pathologiques, la détection des transcrits viraux E6 et E7 n'est pas un examen facilement utilisable en routine en cancérologie ORL.

D'autres méthodes existent, telles que la détection de l'ADN des HPV en PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Cette technique, basée sur une amplification de l'ADN, pose le problème d'une très haute sensibilité conduisant à des résultats faux-positifs. En effet, les contaminations et infections transitoires sont détectées au même titre que les infections oncogènes [61].

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) est une autre méthode, intéressante dans la mesure où elle permet l'identification des sérotypes d'HPV recherchés. Elle présente néanmoins deux inconvénients : elle est assez difficile à mettre en oeuvre et sa sensibilité n'est pas optimale (85-88%) [62, 63].

Enfin, l'utilisation des biomarqueurs de substitution de la transformation oncogène d'une infection par un HPV a été proposée. Devant le lien établi entre une transcription active d'HPV et la surexpression de p16 dans les cellules tumorales, ainsi que le faible coût et la haute sensibilité des techniques d'immunohistochimie (IHC) pour détecter cette protéine, une substitution progressive des méthodes de PCR coûteuses et contraignantes a été observée au profit de la p16-IHC [64]. Néanmoins, cette technique manque de spécificité puisqu'il a été démontré que 15 à 20% des tumeurs p16-positives étaient HPV-négatives [62, 65, 66].

Devant les limites des différents tests individuels, une équipe néerlandaise a évalué en 2012 une combinaison de tests de détection d'HPV dans différents échantillons. Il en est ressorti que la détection de p16 en IHC suivie de la recherche d'ADN d'HPV dans les prélèvements tissulaires fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) donnait des résultats équivalents au gold-standard qu'est la détection du transcrit viral E7 dans les prélèvements tissulaires congelés [67].

2.5. Détection de l'ADN d'HPV dans les prélèvements tissulaires fixés au formol et inclus en paraffine

Actuellement, il existe peu de techniques de routine pour la détection et le génotypage des HPV dans des prélèvements tissulaires FFIP issus de tumeurs des VADS [67, 68]. En gynécologie, la détection des HPV se fait rapidement et facilement à l'aide de machines automatisées, permettant le "triage" des frottis en phase liquide. Nous disposons, à l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, du système Cobas® basé sur une méthode de PCR en temps réel (Real Time Polymerase Chain Reaction) et du kit Cobas® 4800 HPV Test. Les sondes de type Taqman utilisées dans ce système lui confèrent une spécificité très élevée. Elles sont basées sur un principe de discrimination allélique comme l'illustre le schéma suivant (Figure 6).

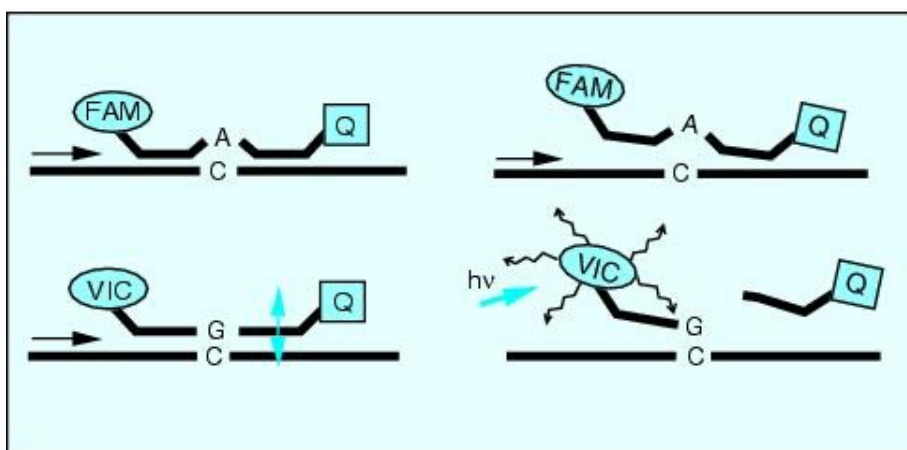


Figure 6: Principe de discrimination allélique des sondes Taqman [69]

La sonde marquée par le fluorochrome FAM s'est appariée à une séquence comportant un nucléotide différent de la séquence commune aux HPV-HR, tandis que la sonde marquée par VIC s'est appariée à une séquence parfaitement complémentaire de la séquence-cible commune aux HPV-HR. Pendant l'étape d'extension de la PCR, la Taq polymérase sectionne uniquement la sonde parfaitement hybridée à la séquence-cible. Le clivage de la sonde permet l'éloignement des extrémités 5' et 3', autorisant ainsi au fluorochrome situé en 5' d'émettre une fluorescence [69]. Ceci rend en théorie impossible l'apparition de résultats faux-positifs.

Le système Cobas® 4800 permet une détection de 12 HPV-HR grâce à une sonde consensus (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 and 68) et également d'identifier les génotypes 16 et 18 grâce à des sondes spécifiques [70-72]. Un témoin d'amplification β -globine permet de s'assurer de la bonne amplification de l'ADN pour chaque échantillon [71] et évite ainsi les faux-négatifs liés à une moindre qualité de l'ADN. Cette technique a été validée au cours de l'étude ATHENA [71] pour le triage des frottis cervico-utérins classés ASC-US (Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance) en cytologie.

L'objectif de l'étude suivante était de valider la détection d'HPV-HR par la technique Cobas® sur des prélèvements de tumeurs des VADS FFIP et des frottis buccaux et oro-pharyngés. Quarante

échantillons issus de 31 patients ont été analysés sur cet automate. Parmi ces prélèvements, 19 étaient des frottis et 21 étaient des échantillons de tissu tumoral. En parallèle, une détection d'HPV sur les mêmes échantillons a été effectuée à l'aide d'une PCR standard suivie d'une électrophorèse sur gel.

Sur les 40 échantillons analysés, 8 étaient ininterprétables car il n'y avait pas suffisamment d'ADN ou celui-ci était trop dégradé pour être amplifié. Sur les 32 prélèvements ayant pu être analysés : 8 prélèvements contenaient de l'ADN viral d'HPV selon la PCR standard suivie d'une électrophorèse sur gel, et 7 prélèvements en contenaient d'après la technique Cobas®. Deux résultats discordants ont été mis en évidence en comparant les deux techniques : HPV 6/11 a été identifié en PCR standard mais pas avec le système Cobas® et un HPV 16 a été détecté par Cobas® mais pas en PCR standard.

Les deux techniques ont donné des résultats comparables sur les 40 échantillons analysés ($k=0,911$). L'une des discordances observées s'explique par le fait que le système Cobas® ne détecte pas les HPV-BR, et donc pas les HPV 6/11. Le second résultat discordant est probablement lié à une sensibilité plus élevée de Cobas® par rapport à la PCR standard; un HPV-HR (HPV16) a été détecté dans un échantillon avec la technique Cobas® mais pas en PCR standard.

Nous avons conclu que le système Cobas® permettait une détection facile, rapide et reproductible des HPV-HR les plus fréquents sur les frottis mais aussi sur les prélèvements tissulaires fixés au formol puis inclus en paraffine.

L'article portant sur cette étude a été soumis le 23 janvier 2016 à la revue *BMC Cancer*. Il est actuellement en cours de relecture, nous l'avons inséré tel qu'il a été soumis ci-après.

Real-time PCR assay for the detection and genotype of HPV in oral and pharyngeal smears and FFPE head and neck tumors

Alexandre Harlé^{1,2,3,*}, Julie Guillet^{1,3,4,*}, Julia Salleron⁵, Marie Rouyer², Carole Ramacci², Cindy Dubois², Gilles Dolivet^{1,4}, Agnès Leroux², Jean-Louis Merlin^{1,2,3}

¹ Service de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² CNRS, UMR 7039 CRAN, Nancy, France

³ Université de Lorraine, Nancy, France

⁴ Unité de chirurgie cervico-faciale et odontologie, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁵ Cellule data management et Biostatistique, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

* contributed equally to this paper

Corresponding author:

Dr. Julie Guillet

Département de Chirurgie Cervico-Faciale et Odontologie

6 Avenue de Bourgogne, CS 30519

54519 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex

France

julie.guillet@univ-lorraine.fr

Tel. +33 383 598 447 / Fax. +33 383 598 569

Abstract (217 words)

Background Human papillomavirus (HPV) are a common cause of head and neck squamous cell carcinomas. HPV has been recognized as a potent risk factor inducing head and neck cancers, especially oropharyngeal squamous cell carcinomas and its detection is may be highly important for the management of this disease. The aim of this work was to validate a real-time PCR assay to detect quickly and accurately high-risk HPV in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) head and neck tumors and oropharyngeal smears and compare the results with the standard PCR and electrophoresis.

Methods Forty samples from 31 patients treated for a head and neck or a cervical cancer were prospectively collected and assessed for HPV contamination using standard PCR and Roche Cobas® (COBAS). Repeatability, reproducibility and limit of detection of COBAS were assessed for the validation of this method.

Results COBAS was found suitable for routine HPV detection with a very good repeatability and reproducibility (Coefficient of variation < 0.6% and 0.4% respectively). Sensitivity and specificity for COBAS were 87.5% [47.35%;99.7%] and 95.8% [78.9%;99.9%] respectively. HPV contamination detection was possible with COBAS with less than 10ng of DNAs.

Conclusions COBAS can detect accurately and rapidly HPV contamination in FFPE samples and oral smears for the management of head and neck squamous cell carcinomas.

Keywords

Head and neck cancers - Human Papillomavirus DNA tests - Formalin Fixed Paraffin Embedded tissue - Oral smears - Pharyngeal smears

Background

Human papillomavirus (HPV) are a common cause of head and neck squamous cell carcinomas. More than 150 HPV types have been described as pathogens agents in human and 40 have a genital tropism (1). HPV with an oncogenic potential are classified into two categories: high-risk (HR) and low risk (LR) oncogene, as shown in **table 1**. HPV-16 is the most frequently identified in head and neck cancers and has been recognized as human carcinogen in 1995 by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (2).

Table 1: High risk (HR) and Low risk (LR) oncogene HPV classification according to International Agency for Research on Cancer.

Classification	Types
HPV-HR	16, 18, 34, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
HPV-LR	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 80, 89

Over the last decade, the incidence of head and neck cancer did not decrease, although exposition to the usual risk factors (tobacco smoking and alcohol consumption) diminished (3). In parallel, HPV has been recognized as a potent risk factor inducing head and neck cancers, especially oropharyngeal squamous cell carcinomas in young male nonsmokers (4). An international meta-analysis shows that HPV 16 is found in 87% of oropharyngeal cancers and in 68% of cancers of the oral cavity (5).

Several studies indicate oral and genital HPV infection are not independent : same subtypes are found in oral and genital tract in a same women or in sexual partners (6). Cervical smear is the gold standard for the detection of dysplasia and cancers of the cervix. Unfortunately, there is no routine clinical use to detect oral or oropharyngeal dysplasia before their progression. Only a thorough clinical examination allows identification of suspicious lesions and biopsy is the only way to confirm diagnosis and search HPV infection. The most widely used method for the cervix is a liquid smear test : sample of cells are mixed in a liquid based cytology. This sample allows the cytology assessment of the sample and the research for an HPV infection. Nevertheless, this assay has not been designed or validated to assess oropharyngeal smears.

The detection and genotyping of HPV are important in oncology especially in genital, anal and head and neck cancers. Moreover, HPV positive head and neck tumors are more sensitive to radiotherapy than HPV negative ones (7). Formalin fixed paraffin embedded tumor biopsies can be used for HPV detection or genotyping, but DNA can be altered or fragmented because of the pre-analytical steps and cause assays failure (8). Few assays have been described for the detection and genotyping of HPV in FFPE (9). The most common used and current validated assay is using PCR followed by an electrophoresis migration (10) but requires several manual steps and more time than a real-time PCR.

The aim of this work was to validate a real-time PCR assay to detect quickly and accurately HR-HPV in FFPE head and neck tumors and oropharyngeal smears. We validated this assay according to ISO 15189 directives and French accreditation comity (COFRAC) recommendations. The Cobas® 4800 HPV kit, CE-IVD marked for the detection and genotyping of HPV in cervix smear, has been used and adapted to allow the detection and genotyping of HPV in FFPE tumors and oropharyngeal smears. We also assessed 40 samples in double blind conditions with PCR/electrophoresis assay and this new real-time PCR assay to compare the results.

Methods

Patients and samples

Forty samples from 31 patients (median age 64.2 [29 ; 93]56.6+/-15.8 ; sex ratio M/F 0.82) treated for a head and neck or a cervical cancer at Institut de Cancérologie de Lorraine, were prospectively collected for this study. Formal consent to participate under the "Ethics, consent and permissions" was obtained from each patient involved in this study and the study has been validated buy the scientific board of Institut de Cancérologie de Lorraine.

Among the 40 samples, 19 were smears and 21 were FFPE squamous cell carcinomas samples. Samples characteristics are detailed in **table 2**.

Table 2 : Samples characteristics

Sample id	Type	Localization	Histology
1	Smear	Oropharynx	No malignancy
2	FFPE tissue	Oropharynx	Squamous cell carcinoma
3	Smear	Soft palate	No malignancy
4	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy
5	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy
6	Smear	Oropharynx	No malignancy
7	FFPE tissue	Tonsil	Squamous cell carcinoma
8	FFPE tissue	Tonsil	Squamous cell carcinoma
9	FFPE tissue	Floor of the mouth	Squamous cell carcinoma
10	FFPE tissue	Retro-molar area	Squamous cell carcinoma
11	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy
12	FFPE tissue	Oral tongue	No malignancy
13	FFPE tissue	Floor of the mouth	Squamous cell carcinoma
14	FFPE tissue	Piriform sinus	Squamous cell carcinoma
15	FFPE tissue	Tonsil	Squamous cell carcinoma
16	Smear	Oropharynx	No malignancy
17	FFPE tissue	Floor of the mouth	Squamous cell carcinoma
18	FFPE tissue	Nasopharynx	No malignancy
19	FFPE tissue	Oropharynx	Squamous cell carcinoma
20	FFPE tissue	Upper jaw	No malignancy
21	Smear	Oral cavity (cheeks)	Cytonuclear anomalies whose viral origin cannot be excluded
22	Smear	Oral cavity (cheeks)	Intermediate and superficial squamous cells, without malignancy.
23	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy

24	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy
25	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy
26	FFPE tissue	Larynx	Squamous cell papilloma
27	Smear	Oropharynx	No malignancy
28	Smear	Oral cavity (cheeks)	Low grade Intra oral neoplasia
29	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy
30	Smear	Oral cavity (cheeks)	Squamous cells with few suspect (nuclear anomalies) cells
31	FFPE tissue	Maxillaire	Infiltrating warty carcinoma
32	FFPE tissue	Tonsil	Squamous cell carcinoma
33	FFPE tissue	Nasopharynx	Squamous cell carcinoma
34	FFPE tissue	Nasopharynx	Nasopharyngeal undifferentiated carcinoma
35	FFPE tissue	Vocal cord	Squamous cell carcinoma
36	FFPE tissue	Hypopharynx	Squamous cell carcinoma
37	Smear	Oral cavity (cheeks)	Squamous cells with few parakera- totic cells
38	FFPE tissue	Tonsil	No malignancy
39	Smear	Oral cavity (cheeks)	No malignancy
40	Smear	Tonsil pillar	No malignancy

Oral smears were assessed using cervexbrush® (Therapak corporation, Duarte, CA). Brush was introduced in oral cavity and brushed 5 times on internal side of the cheek, mobile tongue and anterior pillar of the soft palate or on the tumoral lesion. The brush-head was then conserved in Thinprep® (Cytoc Corp, Marlborough, MA) at room temperature.

DNA extraction

For FFPE samples, two 5µm-thick serial sections were cut from each paraffin block and collected in Eppendorf® vials. DNA was then extracted using Roche Cobas® DNA Sample preparation Kit (Roche Diagnostics, Hamburg, Germany) according to the manufacturer protocol.

Smear samples collected in ThinPrep® were centrifugated at 2000rpm for 10 minutes at room temperature. The samples were then washed with PBS and centrifugated again at 2000rpm for 10 minutes at room temperature. Supernate was eliminated and sediment was treated using 70µL of proteinase K. DNA was finally isolated using Roche Cobas® DNA Sample preparation Kit according to manufacturer protocol.

DNA quality control

DNA quality was assessed using GAPDH housekeeping gene amplification (Forward 5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA-3' ; Reverse 5'-GGG ATC TCG CTG GAA GA-3') and gel migration as previously described (11). DNA concentration was measured using NanoVue (GE Healthcare, Buc, France).

Real-time PCR procedure

Detection of HPV 16, 18 and consensus high risk HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 and 68) was assessed using Cobas® z480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) based on TaqMan probes technology and Cobas® 4800 (Roche Diagnostics) validated for the detection of HPV in cervical smears (12, 13). A total of 50µL of reactional mix constituted of 16.9µL of HPV MMX, 8.1µL of HPV Mn/Mg and 25µL of samples was added in a 96 wells plate. β -globin was used as housekeeping gene. Internal controls (HPV 16, 18, high risk consensus and β -globin plasmids) were used on each plate. PCR consisted in 50 cycles (93°C and 56°C) followed by 30 seconds of cooldown to 40°C and 10 seconds at 25°C. Data were finally assessed using LightCycler 480 SW 1.5.0 software (Roche Diagnostics) (**Figure 1**).

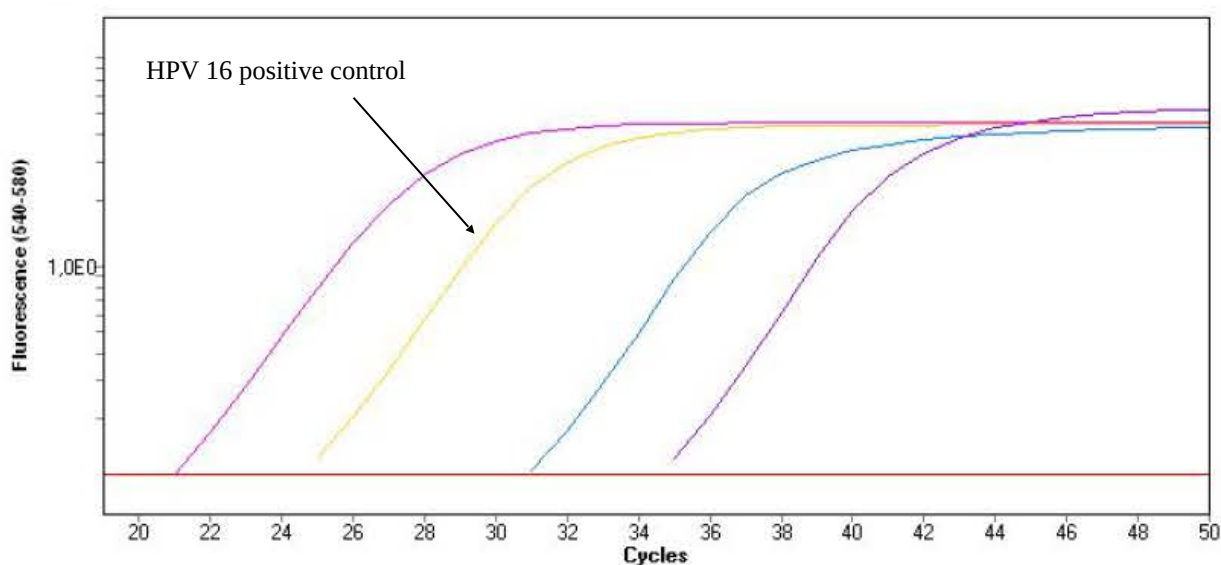


Figure 1 : Amplification curves for HPV contaminated sample.

Positive and amplification controls are also used to help interpretation. An amplification is synonym of an HPV contamination.

Real-time PCR assay validation

Repeatability, reproducibility, sensitivity and robustness were assessed for the validation of COBAS real-time PCR assay for oral smear and tumor samples.

Repeatability was measured for each HPV genotype (16, 18 and High risk) and for β -globin for oral smears and tumor. Crossing point-PCR-cycle (Cp) was measured 10 times during the same assay for each genotype and sample type. The mean, the standard deviation and coefficients of variation (CV) were calculated for each genotype and sample type.

Reproducibility was also measured for each HPV genotype and β -globin for each kind of samples.

Each sample has been assessed 15 times (5 times in 3 different assays during 3 weeks) and measured cycle threshold (Ct) used for coefficient of variation calculation. The mean, the standard deviation and CV were calculated for each genotype and sample type.

Sensitivity has been tested using control dilution from 0.4ng/µL to 6ng/µL for each HPV genotype and for each type of samples, equivalent to a total DNA input of 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 and 150ng. Finally, robustness was evaluated using variations of MMX reagent from 14 to 20µL and Mg/Mn reagent from 7 to 12µL.

Electrophoresis procedure

Specific primers for HPV 6/11, 16, 18, 33 and consensus (HPV 6, 11, 13, 15, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 61, 66 and 80) were used for the detection of HPV presence in samples. All primers are detailed in **table 3**.

Migration was assessed using 1% agarose gel with 0.5X TBE and BlueJuice™ gel loading buffer (ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) at 100 Volts for 2 hours. A total volume of 10µL of each sample was finally used for HPV assessment and a DNA size marker (Roche Diagnostics) was present on each gel. Gels were finally analyzed using Gel DocEQ (BioRad, Marne-la-coquette, France). Standard PCR with electrophoresis procedure are then mentioned as “Standard PCR” in this manuscript.

Statistical analysis and assays comparison

Repeatability and reproducibility were evaluated by the CV calculated by dividing the standard deviation by the mean.

Standard PCR procedure set as the gold standard for this study. The sensitivity for COBAS corresponded to the number of positive samples with COBAS divided by the number of positive samples with standard PCR. The specificity for COBAS correspond to the number of negative samples with COBAS divided by the number of negative samples with standard PCR procedure. The 95% confidence intervals for sensitivity and specificity were computed.

The concordance between standard PCR procedure and COBAS was assessed by the Kappa value and its 95% confidence interval. A Kappa value greater than 0.8 is considered as almost perfect agreement between tests.

Statistical analyses were performed with SAS software version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC27513 USA).

Results

Real-time PCR assay validation

Repeatability calculated CV for smear samples was 0.48%, 0.32% and 0.59% for High Risk, HPV 16 and HPV 18 respectively. Repeatability calculated CV for FFPE samples was 0.25%, 0.60% and 0.31% for High Risk, HPV 16 and HPV 18 respectively (**Table 3**).

Table 3 : Repeatability and reproducibility of Cobas® HPV assay for the detection of HPV from DNA extracted from smears and FFPE tissues.

	Repeatability						Reproducibility					
	Smears			FFPE tissue			Smears			FFPE tissue		
	High risk	HPV 16	HPV 18	High risk	HPV 16	HPV 18	High risk	HPV 16	HPV 18	High risk	HPV 16	HPV 18
Mean Ct	25,26	22,68	23,98	26,98	20,19	30,85	23,60	20,89	21,70	26,98	20,26	30,99
Standard deviation	0,12	0,07	0,14	0,07	0,12	0,10	0,09	0,19	0,10	0,10	0,08	0,04
CV	0,48%	0,32%	0,59 %	0,25%	0,60%	0,31%	0,37%	0,90%	0,48%	0,37%	0,39%	0,12%

Reproducibility calculated CV for smear samples was 0.37%, 0.90% and 0.48% for High Risk, HPV 16 and HPV 18 respectively. Reproducibility calculated CV for FFPE samples were 0.37%, 0.39% and 0.12% for High Risk, HPV 16 and HPV 18 respectively (**Table 3**).

Detection of HPV was possible in smear and FFPE samples with a minimal DNA input of 10ng (**Figure 2**) with Ct not higher than 35, except for HPV 16 FFPE sample (Ct [38.18 ; 44.9]).

No impact on the final result has been found for volumes from 14 to 16.9 μ L for MMX and 8.1 to 12 μ L for Mn/Mg for smear and FFPE samples.

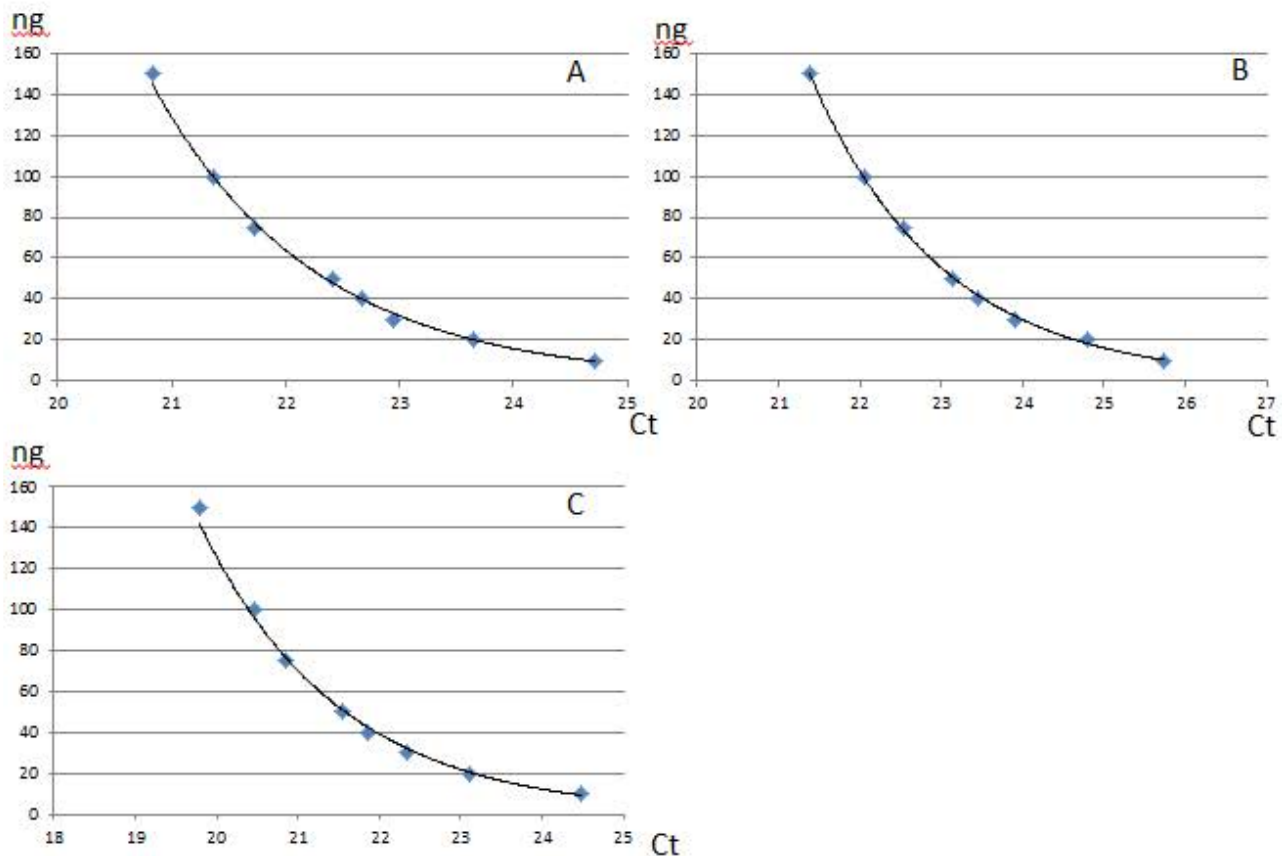


Figure 2 : Sensitivity curves of smears for HR HPV (A), HPV 16 (B) and HPV 18 (C).

The Cobas[®] assay allows the detection of an HPV contamination with 10 ng of extracted DNA.

Assays comparison

Forty samples corresponding to 31 patients were available for assay comparison. Among the 40 samples available, no DNA amplification was found for 8 samples. Among the 32 samples with interpretable results, 8 were found with HPV and 24 with no HPV contamination using the standard PCR procedure set as the gold standard for this study. Among the 8 samples found with HPV contamination, 7 were found HPV positive with COBAS. Among the 24 samples found with no HPV contamination, 23 were also found with no contamination with COBAS.

Among the 32 samples with interpretable results, sensitivity and specificity for COBAS were 87.5% [47.35%;99.7%] (7 out of 8) and 95.8% [78.9%;99.9%] (23 out of 24) respectively.

Two discordant samples have been found considering the two assays. One sample was found HPV 6/11 contaminated with standard PCR and not with COBAS. One sample was found HPV 16 positive with COBAS and not with standard PCR.

Calculated kappa were 0.911 [0.789 ;1] considering the 40 samples and 0.833 [0.610;1.00] considering the 32 samples with interpretable results.

Discussion

HPV infection is now clearly associated with an increasing incidence in oropharyngeal squamous cell carcinoma. The young adult population, non-smoker and non-drinker, is particularly exposed to these HPV-related cancers (14,15). There are currently no clinical guidelines differentiating the treatment of HPV positive and HPV negative cancers (16,17). However, research suggests that HPV expression is correlated with increased response rates to conventional treatments as radiotherapy, chemotherapy and radiochemotherapy (18-20). Moreover, patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma appear to be the most appropriate subgroup to benefit from minimally invasive trans-oral surgery (17, 21). HPV status of these tumors will probably determine their management, thus HPV detection in head and neck cancer is highly important.

The real-time PCR assay validation data proved that this method is suitable for the detection of HPV contamination in oral smears and FFPE tumors with a very good repeatability and reproducibility. Moreover, the assay was really sensitive and able to detect HPV contamination with a low DNA input of 10ng. Robustness of the assay was also very good because no impact on the final result has been found when sample, mix or coenzyme volumes were modified.

Real-time PCR assay results were comparable to standard PCR assay with a very good agreement between the two assays ($k=0.911$). Two discrepancies were found in our study. The first one is related to the HPV types. A HPV 6/11 contamination has been detected with standard PCR and not with COBAS. This difference is explained by the design of the COBAS assay which is only based on the HR-HPV detection and HPV 6 and 11 are associated to low-risk. Whereas HPV 6 and 11 are considered as low risk HPV, they have been described as an etiological factor in the development non tumoral lesions, such as genital warts (1, 22). More recently, different studies showed that these two types are also involved in the development of anal dysplasia and cancers especially in men who have sex with men (23, 24). The second discrepancy consisted in the detection of a HPV 16 contamination with COBAS and not with standard PCR assay. We think that this result can be explained by a lowest sensitivity of the standard PCR assay. Moreover, COBAS assay is based on TaqMan probes technology which has been reported to have no or few false positive results (25, 26).

Finally, in our study Ct were lower for FFPE samples for the detection of High Risk HPV and HPV 16 than oral smears samples and higher for HPV18. These results can be explained by the DNA quality used in this study. DNA extracted from FFPE tissues quality depends on the duration of fixation and sample conservation whereas DNA of oral smears have been extracted less than one week after collection (8). In another prospective study, we compared smear to the gold-standard (biopsy) in the detection of HNC. Our results showed that 100% of smears were interpretable. HPV detection was performed in all samples, and we concluded that smear has similar specificity than biopsy for HPV detection in tumors (94.4%). In this study, 13.3% of patients had a HPV-related cancer (data not published yet).

Conclusions

In conclusion, we validated here Roche Cobas® for the detection of HPV in FFPE samples and oral or pharyngeal smears. This assay is suitable for routine analysis and allows the detection of HPV contamination with a better sensitivity than standard PCR coupled to electrophoresis migration.

List of abbreviations

Cp : Crossing point-PCR-cycle

Ct : Cycle Threshold

CV : Coefficient of variations

FFPE : Formalin Fixed Paraffin Embedded

HPV : Human Papillomavirus

HR : High Risk

LR : Low Risk

PCR : Polymerase Chain Reaction

Competing interests

The authors declare having any competing interests.

Acknowledgments

The authors are grateful to “Ligue contre le cancer comité Meurthe et Moselle” for their support.

References

1. Chelimo, C., et al., Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect*, 2013. 66(3): p. 207-17.
2. Franceschi, S., The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res*, 2005. 166: p. 277-97.
3. Jegu, J., et al., Trends over three decades of the risk of second primary cancer among patients with head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2013. 49(1): p. 9-14.
4. Rietbergen, M.M., et al., Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*, 2013. 132(7): p. 1565-71.
5. Tribius, S. and M. Hoffmann, Human papilloma virus infection in head and neck cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 110(11): p. 184-90, 190e1.
6. Termine, N., et al., Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. *Oral Oncol*, 2011. 47(4): p. 244-50.
7. Pang, E., et al., Radiosensitization of oropharyngeal squamous cell carcinoma cells by human papillomavirus 16 oncoprotein E6 *I. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. 79(3): p. 860-5.
8. Bibeau, F., et al., [Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view]. *Bull Cancer*, 2009. 96(Suppl): p. S15-22.
9. Kocjan, B.J., et al., Comparative evaluation of the Abbott RealTime High Risk HPV test and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for detecting and identifying human papillomaviruses in archival tissue specimens of head and neck cancers. *Acta*, 2012. 21(4): p. 73-5.

10. Jacobs, M.V., et al., Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.*, 1995. 33(4): p. 901-5.
11. Cinatl, J., Jr., et al., Human cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 independent of the tumor suppressor protein p53. *Am J Pathol.*, 1999. 155(1): p. 285-92.
12. Stoler, M.H., et al., High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol*, 2011. 135(3): p. 468-75.
13. Cook, D.A., et al., Comparison of the Roche cobas(R) 4800 and Digene Hybrid Capture(R) 2 HPV tests for primary cervical cancer screening in the HPV FOCAL trial. *BMC Cancer*, 2015. 15(1): p. 968.
14. Dalianis, T., Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). *Int J Oncol*, 2014. 44(6): p. 1799-805.
15. Whang, S.N., M. Filippova, and P. Duerksen-Hughes, Recent Progress in Therapeutic Treatments and Screening Strategies for the Prevention and Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Viruses*, 2015. 7(9): p. 5040-65.
16. Psyrri, A., et al., Future directions in research, treatment and prevention of HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Pathol*, 2012. 6 Suppl 1: p. S121-8.
17. Mydlarz, W.K., J.Y. Chan, and J.D. Richmon, The role of surgery for HPV-associated head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2015. 51(4): p. 305-13.
18. Fakhry, C., et al., Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(4): p. 261-9.
19. Ang, K.K., et al., Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2010. 363(1): p. 24-35.
20. Bol, V. and V. Gregoire, Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 696028.
21. Boscolo-Rizzo, P., et al., New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2013. 33(2): p. 77-87.
22. Park, I.U., C. Introcaso, and E.F. Dunne, Human Papillomavirus and Genital Warts: A Review of the Evidence for the 2015 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*, 2015. 61 Suppl 8: p. S849-55.
23. Cranston, R.D., et al., Prevalence of Anal Human Papillomavirus Vaccine Types in the Bangkok Men Who Have Sex With Men Cohort Study. *Sex Transm Dis*, 2015. 42(12): p. 671-6.
24. Ong, J.J., et al., Anal HPV detection in men who have sex with men living with HIV who report no recent anal sexual behaviours: baseline analysis of the Anal Cancer Examination (ACE) study. *Sex Transm Infect*, 2015.
25. Chretien, A.S., et al., Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med*, 2013. 2(1): p. 11-20.
26. Harle, A., et al., Comparison of COBAS 4800 KRAS, TaqMan PCR and high resolution melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. *Virchows Arch*, 2013. 462(3): p. 329-35.

L'essentiel

Les Papillomavirus Humains sont clairement impliqués dans la survenue de certaines tumeurs des VADS, et tout particulièrement dans les tumeurs épidermoïdes de l'oropharynx. Leur incidence en France est encore mal connue et les études rétrospectives sont difficiles ; en effet les biopsies et pièces opératoire sont fixées au formol et incluses en paraffine (FFIP), ce qui complique la détection des HPV dans ces tissus. La technique de référence pour détecter ces virus dans les tissus tumoraux est la détection des transcrits viraux E6 et E6. L'expression de ces oncogènes viraux peut être détectée par qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcriptase*) en isolant les micro-ARN du tissu tumoral. Malheureusement, la fixation au formol dégrade ces micro-ARN, faussant la recherche des HPV.

Nous avons testé le système *Roche Cobas*[®] sur des échantillons tumoraux FFIP. Cette machine permet la détection des HPV 16 et 18 de façon spécifique, et des HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 et 68 à l'aide d'une sonde consensus. Elle a été conçue pour traiter des échantillons issus de frottis en phase liquide, dans le cadre du triage des frottis cervico-utérin étiquetés ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*).

L'objectif principal de cette étude était de déterminer la faisabilité de la détection des HPV dans des prélèvements tumoraux FFIP avec le système *Cobas*[®]. L'objectif secondaire était de vérifier l'interprétabilité de frottis effectués au niveau de la cavité buccale ou de l'oropharynx.

Nous avons testé 40 échantillons issus de 31 patients. Ces échantillons comportaient 19 frottis et 21 prélèvements tissulaires FFIP. Ils ont été traités par *Cobas*[®] et les résultats ont été comparés la technique de référence pour ce type de prélèvements, à savoir une PCR standard suivie d'une électrophorèse sur gel.

Nos résultats indiquent que le système *Cobas*[®] permet une détection des HPV en routine avec une excellente répétabilité et reproductibilité. Une sensibilité de 87,5 % et une spécificité de 95,8 % ont été retrouvées pour cette technique. De plus, la détection des HPV est possible et fiable avec moins de 10 ng d'ADN par échantillon.

Cette étude a donc montré que l'utilisation du système *Cobas*[®] permettait la détection de prélèvements tissulaires FFIP en routine. Elle nous a également permis de vérifier l'interprétabilité des frottis buccaux et oro-pharyngés. Ces résultats nous ont permis de mettre en place une étude prospective, concernant l'utilisation de frottis buccaux comme outil diagnostique. Ces travaux sont développés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

HEFFIBUC : Etude diagnostique de détection
d'HPV par frottis buccaux

3. HEFFIBUC : Etude diagnostique de détection d'HPV par frottis buccaux

La principale pathologie tumorale induite par les HPV est le cancer du col de l'utérus. Pour lutter contre cette maladie sexuellement transmissible, un dépistage a été mis en place dans de nombreux pays du monde, y compris en France. Dans notre pays, les dernières recommandations datent de juillet 2010 et s'inscrivaient dans le cadre du Plan Cancer 2009-2013. La Haute Autorité de Santé (HAS) conseille un frottis cervico-utérin (FCU) tous les trois ans aux femmes âgées de 25 à 65 ans [73]. L'efficacité du FCU a été démontrée dans le dépistage des lésions pré-cancéreuses et cancéreuses du col utérin. Permettant ainsi un diagnostic précoce, la mise en place d'une campagne de dépistage de masse a permis de diminuer la morbi-mortalité liée au cancer du col utérin.

Il n'existe pas actuellement de moyens de dépistage précoce des cancers de la cavité buccale, ce qui explique en partie une prise en charge tardive dans deux tiers des cas en France [13]. Seul un examen clinique rigoureux par un professionnel de la cavité buccale (chirurgien dentiste, ORL, stomatologue) permet le dépistage de lésions précoces, qui doivent être biopsiées. L'Union Française pour la Santé Bucco-Dentaire (UFSBD) recommande une visite annuelle chez un chirurgien-dentiste, mais seulement 59% des Français effectuent cette consultation. D'autre part, la biopsie est une technique invasive, contrairement au frottis, ce qui pousse certains chirurgiens-dentistes omnipraticiens à avoir une attitude attentiste devant l'apparition d'une lésion suspecte.

Dans ce contexte de nécessité de dépistage précoce des cancers des VADS, ainsi que devant le nombre croissant de tumeurs malignes induites par les HPV au niveau de l'oropharynx, nous avons décidé de mener une étude prospective permettant d'évaluer l'efficacité du frottis tumoral et buccal. Les objectifs de cette étude étaient multiples :

- déterminer l'efficacité du frottis tumoral (par rapport au gold-standard qu'est la biopsie) dans le diagnostic de lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses des VADS

- déterminer l'efficacité du frottis buccal pour détecter une infection par un ou plusieurs HPV-HR
- rechercher une infection par HPV au niveau buccal (en zone saine) chez les patients présentant une tumeur des VADS induite par HPV.

Nous avons donc rédigé un synopsis pour une étude prospective monocentrique visant à inclure 47 patients atteints d'une tumeur des VADS. Ce protocole a été soumis et approuvé par la Commission Scientifique de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, puis par le Comité de Protection des Personnes (CPP) Est III (n°2013-A01234-41). Les inclusions ont été menées de février 2014 à décembre 2014.

L'article concernant ce chapitre a été soumis le 18 décembre 2015 à la revue *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* et a pour titre « Human Papillomavirus detection : diagnostic study with oral smear ».

Résumé :

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures induits par les Papillomavirus Humains (HPV) constituent actuellement un sujet de recherche majeur. Néanmoins, il n'existe actuellement aucune méthode non invasive validée pour dépister une infection par les HPV dans cette région anatomique.

Le but premier de notre étude était d'évaluer l'efficacité diagnostique d'un frottis tumoral par rapport à une biopsie tumorale. Le second objectif était de rechercher la présence d'une infection par un ou plusieurs HPV grâce à un frottis de la cavité orale.

Quarante-cinq patients présentant un cancer des voies aéro-digestives supérieures ont été analysés dans cette étude. Tous ont subi une biopsie et un frottis tumoral, ainsi qu'un frottis en zone saine de la cavité buccale. L'ADN d'HPV et la protéine p16^{INK4a} ont été recherchés dans chaque échantillon.

Dans cette série, 13,3% des patients présentaient un cancer induit par un HPV-HR. HPV 16 a été identifié dans tous les cas. Nos résultats suggèrent que le frottis a une spécificité similaire (94,4%) à celle de la biopsie considérée comme étant le gold-standard pour la détection d'HPV dans les

tumeurs, mais une sensibilité plus faible (66,7%). Des cellules dystrophiques et/ou tumorales ont été retrouvées dans la cavité buccale à distance du site tumoral dans 53,3% des cas, toute localisation confondue. Une infection orale par HPV16 a été détectée chez 12,2% des patients. Nous concluons que l'infection par les HPV ne semble pas confinée dans les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures.

L'article, tel qu'il a été soumis, est inséré ci-après.

Title : Human Papillomavirus detection : diagnostic study with oral smear

Guillet J ^{1, 2, 3}, Salleron J ⁴, Harlé A ^{2,5,6}, Mastronicola R ¹, Cortèse S ¹, Phulpin B ¹, Merlin JL ^{2,5,6}, Barlier-Pagel C ⁶, Leroux A ⁶, Dolivet G ¹

¹ Institut de Cancérologie de Lorraine, Département de Chirurgie Cervico-Faciale et Odontologie, 54519 Vandoeuvre les Nancy, France

² CNRS UMR 7039 CRAN, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France

³ Université de Lorraine, Faculté d'Odontologie de Nancy, 54001 Nancy, France

⁴ Institut de Cancérologie de Lorraine, Cellule Data-Biostatistique, 54519 Vandoeuvre les Nancy, France

⁵ Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 54001 Nancy, France

⁶ Institut de Cancérologie de Lorraine, Service de Biopathologie, 54519 Vandoeuvre les Nancy, France

Corresponding author :

Guillet Julie
Institut de Cancérologie de Lorraine
Département de Chirurgie cervico-faciale et Odontologie
6 avenue de Bourgogne
54519 Vandoeuvre les Nancy
France
julie.guillet@univ-lorraine.fr
Fax : +33 3 83 15 42 58

Abstract

Papillomavirus (HPV)-related head and neck cancer is actually an important topic of research. Nevertheless, there is no validated and non invasive method to detect HPV infection in head and neck region.

The first objective of our study was to evaluate the efficiency of head and neck smear in comparison with biopsy in tumors. The second aim was to investigate the presence of HPV infection by brushing in oral cavity.

Forty-five patients with head and neck cancer were analyzed in this study. All of them underwent biopsy and brushing on tumor, and an oral smear in healthy area. HPV DNA and p16^{INK4a} protein detection have been done for each sample.

In this series, 13,3% of the patients had a HPV-related cancer. HPV 16 was implied in all cases. Our results suggested that smear has similar specificity for HPV detection in tumors (94,4%) than biopsy considered as gold-standard, but lower sensitivity (66,7%). Dystrophic and/or tumor cells have been found in oral cavity distant from tumor site for 53,3% of the patients, and HPV 16 infection in 12,2% of the cases. We conclude that HPV infection seems not to be limited in head and neck squamous cell carcinoma.

Keywords

Human Papillomavirus - Head and neck cancer - Oral smear - Oral infection

Introduction

Head and neck cancer (HNC) is the sixth most common human cancer worldwide (1). More than 90% of these cancers are squamous cell carcinomas (SCC). In France, approximately 14600 patients are diagnosed with lips, oral, pharyngeal or laryngeal cancer per year (2). Alcohol and tobacco consumption are the main risk factors for head and neck SCC (HNSCC) but Human Papillomavirus (HPV) is now clearly involved in their occurrence (3, 4).

In several countries, HPV infection is associated with an increasing incidence of head and neck SCC in young adult population. However in France, the age of onset of these cancers has not changed (2).

Prevalence rates of HPV-positive head and neck SCC is approximately 26% worldwide (5). Oropharyngeal SCC, especially tonsillar and base of tongue SCC, are the most frequently HPV-positive. HPV 16 is the high-risk HPV (HR-HPV) most common strain associated with HNSCC, accounting for up to 90% of cases (6).

Head and neck cancer or premalignant lesion diagnosis are commonly based on the analysis of biopsy. For the cervix, diagnostic of cervical intra-epithelial neoplasia (CIN) is based on the analysis of cervical smear, which is less invasive than a biopsy. Unfortunately, there is no standardized and non invasive method to detect preneoplastic lesion in oral cavity. The World Health Organization (WHO) published in 2005 a first classification for the pathological diagnosis of oral dysplasia. The concept of oral intraepithelial neoplasia (OIN) was advanced, but there is no organized oral cytology screening in any country (5, 7, 8).

Many different essays are available for HPV detection in HNSCC. Methods based on PCR amplification of HPV-DNA are the most widely applied because there are extremely sensitive. To limit the risk of false-positive results, HPV-DNA detection can be completed by p16INK4a immunohistochemistry detection. This protein is a surrogate biomarker of transforming HPV infections (4).

The role of HPV in the oral carcinogenesis is not clearly defined and the viral prevalence reported in the literature varies widely (0-100%) including in clinically normal oral mucosa (8, 9).

The aim of the study was to evaluate the efficiency of head and neck smear, and especially oral smear. The secondary objective was to investigate the presence of HPV infection in the oral cavity, distant from tumor site.

Patients and methods

Patients

This monocentric prospective study was carried out between February and November 2014 in Institut de Cancérologie de Lorraine (Nancy, France). Inclusion criteria were: age over 18, OMS status between 0 and 3, suffering from oral cavity, pharyngeal or laryngeal tumor. Diagnosis were performed on clinical and/or radiological examination.

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Exclusion criteria were : other neoplasm, cervicofacial radiotherapy in the previous year, undergoing radiotherapy or chemotherapy at the beginning of the study, patients unable to give their consent.

The study was approved by Research Ethics Committee of the institute and by Persons Protection Committee (n°2013-A01234-41).

All assessments are based either on medical files or face-to-face questionnaires: age, gender, weight, height, OMS status, cancer stage, previous medical history, surgery and dental history, alcohol and tobacco consumption. For women, history of genital HPV infection was noted.

Samples collection

All patients underwent panendoscopy for staging their cancer. During the procedure, a biopsy and a smear were performed on the tumoral tissue. An oral smear was also realized in healthy area. Samples of each patient have been collected by the same surgeon.

Smears were performed with Cervex Brush[®]. Cells were gathered by turning 5 times the brush on tissues. The top of the brush was rinsed into conservation liquid PreservCyt[®] of ThinPrep[®] Pap Test system (Hologic[©] Inc, Malborough, USA).

Biopsies were performed according to actual guidelines, formalin fixed and paraffin-embedded (FFPE).

p16 and HPV detection

To identify HPV-related head and neck SCC, we first performed a p16-immunohistochemistry (p16-IHC) then a high-risk HPV DNA detection for each sample (smears and biopsies) (10, 11).

For FFPE samples, 5µm-thick sections were cut and automatically colored (BenchMark ULTRA, Ventana Medical Systems Inc, Tucson, USA) with hematoxylin eosin saffron (HES). The presence of tumoral tissue is then monitored.

For smears, liquid containing cells was spread on microscopic slides. A Papanicolau coloration was then performed to identify tumor or dystrophic cells.

p16^{INK4a} protein expression was detected on slides by immunohisto- and immunocytochemistry, using a mouse monoclonal (E6H4) antibody specific of p16 (CINtec[®] p16 Histology, Ventana Medical Systems, Inc). 3,3-Diaminobenzidine (DAB) chromogen was used for visualisation of the reaction. Two independent observers performed evaluation of the slides and a consensus was achieved for all the cases. p16 was considered to be over-expressed if more than 70% of the tumor cells showed strong and diffuse nuclear or cytoplasmic immunostaining. This definition is consistent with clinical trial eligibility criterias in the United States (12). Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) was used for HPV detection.

For FFPE samples, two 5µm-thick serial sections were cut from each paraffin block and collected in Eppendorf[®] vials. DNA was then extracted using Roche Cobas[®] DNA Sample preparation Kit (Roche Diagnostics, Hamburg, Germany) according to the manufacturer protocol.

Smear samples collected in ThinPrep[®] were centrifugated at 2000 rpm for 10 minutes at room temperature. Then the samples were washed with PBS and centrifugated again at 2000 rpm for 10 minutes at room temperature. Supernatant was eliminated and sediment was treated using 70µL of proteinase K. DNA was finally isolated using Roche Cobas[®] DNA Sample preparation Kit according to manufacturer protocol. HPV 16, 18 and consensus HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 and 68) were detected using Cobas[®] 4800 HPV test.

Statistics

Qualitative parameters are expressed as frequency and percentage; quantitative parameters with median and range. The gold standard of this study is the HPV status on biopsy. Sensitivity of tumoral smears was defined by the number of patients with positive HPV DNA status on tumoral smears divided by the number of patients with positive HPV DNA status on biopsy. Specificity of tumoral smears was defined by the number of patients with negative HPV DNA status on tumoral smears divided by the number of patients with negative HPV DNA status on biopsy. The same computation was performed for the smear in healthy area. Sensitivities and specificities were computed with 95% confidence interval. Agreement on HPV DNA status between tumoral smears and smear in healthy area was assessed with the Kappa coefficient. A Kappa value less than 0.4 correspond to a poor agreement.

For this diagnostic study, assuming a sensitivity of 95% and expected disease prevalence of 30%, 47 patients were necessary to have a lower limit of the 95% confidence interval equal to 60%. Statistical analyses were performed with SAS software (SAS, Cary, NC, USA).

Results

Forty-seven patients (30 males and 17 females) were enrolled in the study. Two patients (males) were withdrawn from analysis: one patient withdrew his consent and biopsies of the second patient showed non tumoral tissues.

Forty-five tumor cases were finally analyzed. The median age for cancer diagnosis was 57 (24-92).

13 tumors were in oral cavity, 8 in mobile tongue, 1 in nasopharynx, 19 in oropharynx and 4 in larynx, as shown in Table 1.

Table 1 Repartition of tumor site and HPV DNA, p16 positivity and HPV related tumor

	Total	HPV DNA +	p16 +	HPV related tumor
Total	45 (100.0%)	9 (20%)	8 (17.8%)	6 (13.3%)
Oropharynx	19 (42.2%)	5 (26.3%)	4 (21.1%)	4 (21.1%)
Oral cavity	13 (28,9%)	2 (15.4%)	3 (23.1%)	2 (4.4%)
Mobile tongue	8 (17,8%)	2 (25.0%)	1 (12.5%)	0 (0.0%)
Larynx	4 (8,9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Nasopharynx	1 (2.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Results expressed as frequency and percentage n(%)

Eighty-nine percent (n=40) of tumors were squamous cell carcinomas (SCC). Other types found were small cell neuroendocrine carcinoma, spindle cell (sarcomatoid) carcinoma, diffuse large B-cell lymphoma, malignant schwannoma and melanoma.

For seven percent (n=3) of patients, biopsy did not contain tumor cells although tumoral smear showed squamous cell carcinomas. Two biopsies contained only dystrophic cells and one contained only normal and necrotic cells. Cells types found in each sample are summarized in Fig. 1.

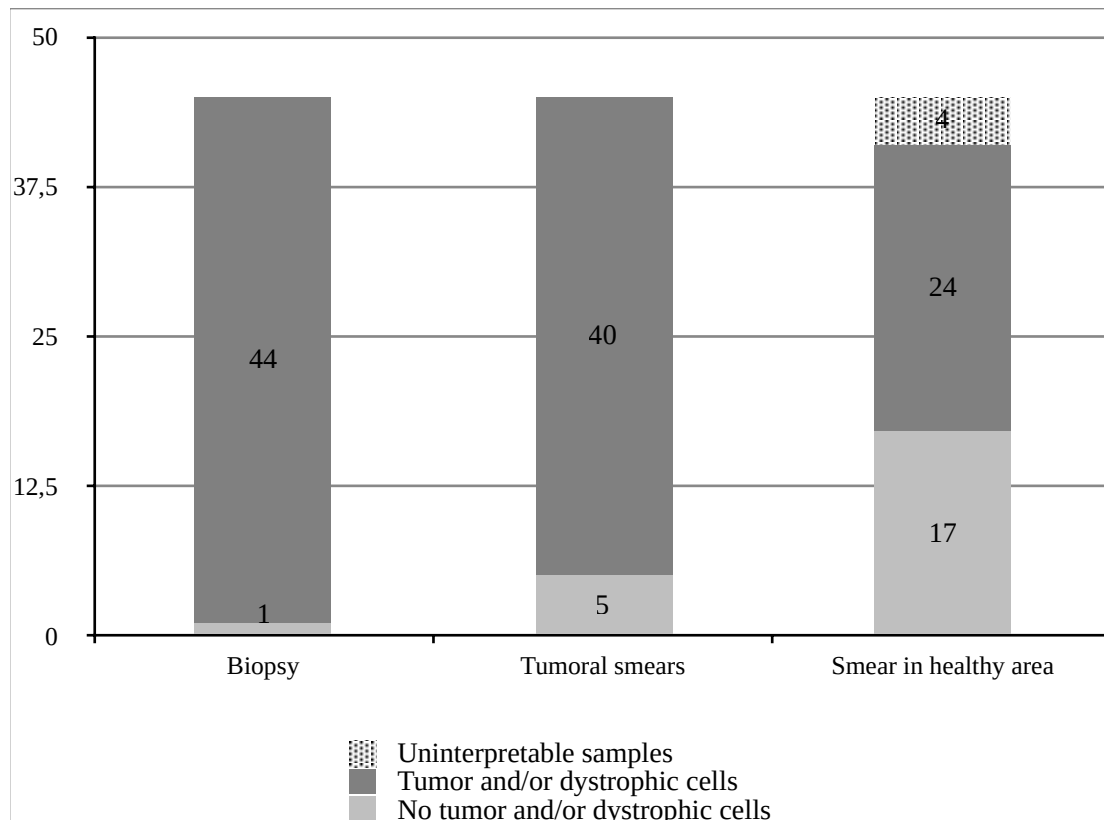


Fig. 1 Cell types identified in biopsies and smears

Twenty percent (n=9) of biopsies were HPV DNA positive and eighty percent (n=36) were HPV DNA negative. HPV 16 was implied in all HPV positive tumors. Thirteen percent (n=6) of biopsies showed that cancer were HPV16 related (Table 2). Four percent (n=2) of biopsies were p16 positive but HPV DNA negative.

Table 2 Results for biopsies, tumoral smears and healthy area smears

	Biopsy	Tumoral smears	Smears in healthy area
Interpretable samples	45 (100%)	45 (100%)	41 (91.1%)
Tumor cells	42 (93.3%)	30 (66.7%)	1 (2.2%)
Dystrophic cells	20 (44.4%)	20 (44.4%)	24 (53.3%)
<i>Tumor and/or dystrophic cells</i>	44 (97.8%)	40 (88.9%)	24 (53.3%)
HPV 16 DNA negative	36 (80.0%)	37 (82.2%)	36 (87.8%)
HPV 16 DNA positive	9 (20.0%)	8 (17.8%)	5 (12.2%)
<i>Including p16 positive</i>	6 (13.3%)	7 (15.6%)	5 (12.2%)
Sensitivity ¹ for HPV detection	-	6/9 (66.7%)	3/8 (37,5%) ²
Specificity ¹ for HPV detection	-	34/36 (94.4%)	31/33 (93.4%) ²

Sixty-seven percent (n=30) of tumoral smears contained tumor cells and forty-four percent (n=20) contained dystrophic cells. Eighteen percent (n=8) of tumoral smears were HPV DNA positive, including sixteen percent (n=7) p16 positive. HPV 16 was implied in all HPV positive smears. Four percent (n=2) of tumoral smears were p16 positive but HPV DNA negative. The sensitivity of the tumoral smears was 66.67% [95% confidence interval: 29.9%; 92.5%] (6/9) and the specificity was 94.4% [95% confidence interval: 81.3%; 99.3%] (34/36). These results are summarized in Table 2.

Three samples with HPV DNA positive on biopsy were negative with tumoral smears, and two patients with HPV DNA negative tumor were positive with smears in healthy area (Fig. 2).

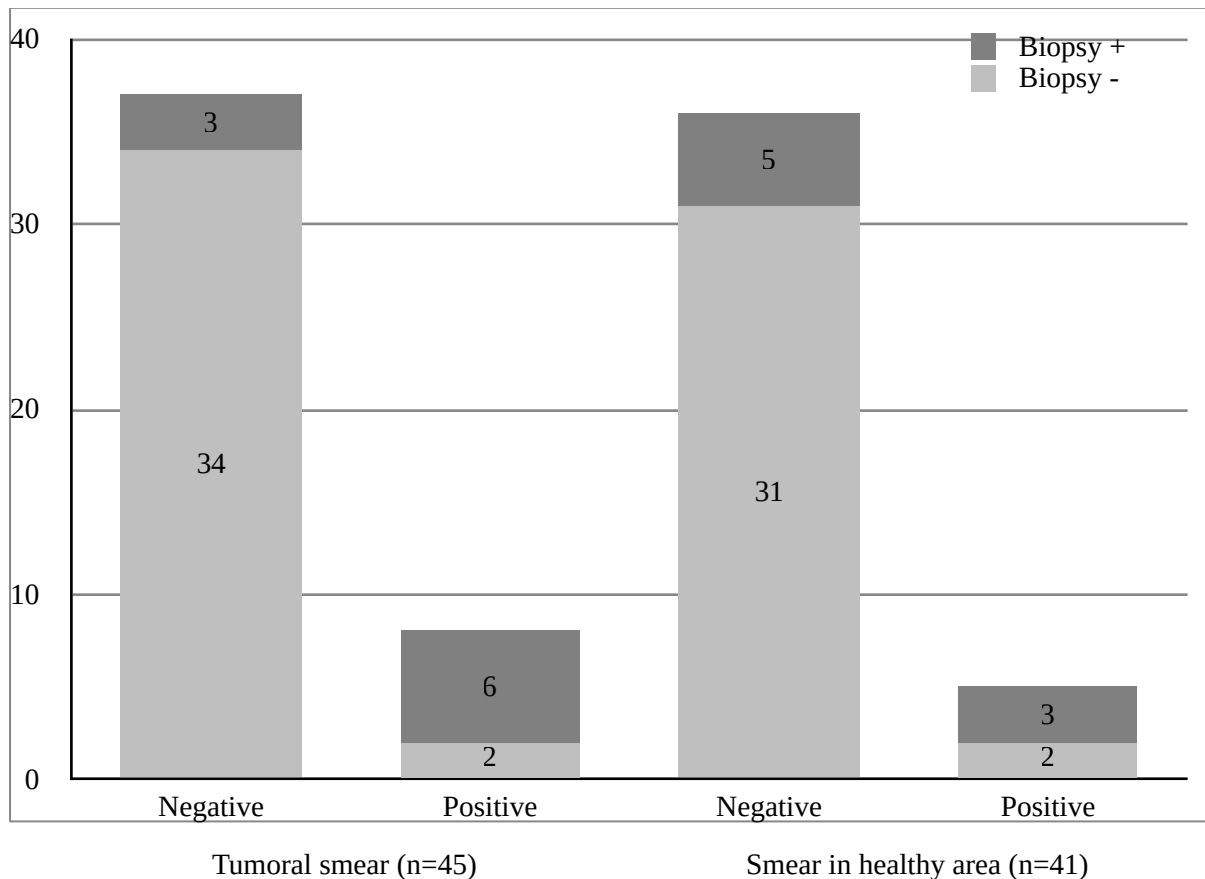


Fig. 2 HPV DNA status for tumoral and healthy area smears

Fifty-three percent (n=24) of smears in healthy area contained dystrophic cells and two percent (n=1) contained tumor cells. HPV status of smears in healthy area could be determined for 91.1% (n=41) of samples since 4 smears no contained enough cells for real time PCR (1 was HPV DNA positive on biopsy and 3 negative on biopsy). Twelve percent (n=5/41) of smears in healthy area were HPV DNA positive. HPV 16 was implied in all HPV positive smears. Among the 41 analyzable samples, the sensitivity of smears in healthy area was 37.5% [95% confidence interval: 8.5%; 75.5%] (3/5) and the specificity was 93.4% [95% confidence interval: 79.7%; 99.3%] (31/33). Five patients with HPV DNA positive biopsy were negative with smears in healthy area, but 2 negative HPV DNA on biopsy were positive with smears in healthy area (Fig. 2). All (n=5) of healthy area smears were p16 positive. These results are summarized in Table 2.

The percentage of agreement between tumoral smears and smears in healthy area was 82.9% with a kappa value equal to 0.27[-0.13; 0.66].

Discussion

Unlike patients with cervical, breast or colorectal cancer, patients with head and neck cancer (HNC) do not benefit from early detection because there is no validated screening test. The majority of French patients (2/3) with HNC consult with an advanced stage of disease (13). An earlier treatment improves the survival rate of these patients, that's why early detection is critical (14).

In our study, we compared smear to the gold-standard (biopsy) in the detection of HNC. 100% of tumor smears were interpretable, but only 88,9% contained dystrophic or tumor cells. However, 6.7% (n=3) of biopsies did not contain tumor cells although tumor smears showed squamous cell carcinomas. Smear target a wider area than biopsy, which may explain some better results with the smear. On the other hand, smear is superficial and can sometimes take only necrotic cells on the surface of the tumor. Moreover, we used Cervex Brush[®] because there is any validated oral brush available in France, and the design of a brush for cervix is not ideally suited to head and neck region.

We observed a difference in p16 expression detection between biopsy and tumoral smear (13.3% vs 15.6%). As biopsy is considered as the gold standard, we can suspect that this difference could be related to a false positive case in tumoral smears.

Compared with biopsy, our results suggested that smear has similar specificity for HPV detection in tumors (94.4%). However, the sensitivity of smear in healthy site is only around 37%. We did not find any other data in scientific literature.

In the last decade, a high correlation between transcriptionally active HPV and p16^{NK4a}-overexpression in tumor cells has been shown. Evaluating both p16^{NK4a} expression and the presence of HPV DNA is the most reliable method to identify HPV-related SCC [10, 11]. In our series, we identified (according to biopsies) that 13,3% of the patients with HNC had HPV-related tumor. This prevalence is relatively low in comparison with other studies: according to Ligier et al, the rate of HPV-related head and neck cancers in United Kingdom, Sweden or USA is much higher [15]. This could be explained by a high consumption of tobacco and alcohol in our country. However, HPV infection in head and neck is still unknown in France (14). All HPV positive cancers of our study were located in oral cavity and in oropharynx. Same characteristics are found in other countries (15).

For tumor and healthy area smears, one sample only has been collected for Papanicolau test and HPV-DNA detection. It could explain the insufficient number of cells to perform real-time PCR in four healthy area samples. 91.1% of smears in healthy area were interpretable and 53.3% contained dystrophic or tumor cells. Our results indicate that tumor cells do not remain localized only in the tumor, since 53.3% of patients present dystrophic or tumor cells dispersed in the oral cavity. Moreover, 3 patients (37.5%) with HPV16-related tumor (HPV16 DNA-positive and p16-positive) have also HPV16 current infection in oral cavity. Two of them have an oropharyngeal cancer, and the last patient has a tumor on the floor of the mouth. The anatomic proximity between larynx, pharynx and oral cavity can explain the movement of cells in the upper aerodigestive tract. But the virus appears to infect different sites and could be the cause of a second cancer, or a source of viral contamination for a partner. Transmission paths of HPV are essentially sexual but other routes of infection, as auto-inoculation or oral transmission, cannot be dismissed (16).

In conclusion, our results show that oral smear cannot be used for screening HPV infection in general population. However, it could be benefit in patients with high risk of HPV exposition, as women infected in the cervix or their sexual partner, to detect pre malignant or malignant lesion. According to our results, patients with a history of head and neck cancer could also be monitored in oral cavity, since HPV infection from oropharynx can disseminate in oral cavity. Other studies are necessary to explore these hypotheses.

References

1. Sritippho, T., P. Chotjumlong, and A. Iamaroon, Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. 16(15): p. 6193-200.
2. Binder-Foucard, F., et al., Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 2014. 62(2): p. 95-108.
3. Sturgis, E.M. and P.M. Cinciripini, Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*, 2007. 110(7): p. 1429-35.
4. Rietbergen, M.M., et al., Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*, 2013. 132(7): p. 1565-71.
5. D'Souza, G., et al., Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2007. 356(19): p. 1944-56.
6. Marur, S., et al., HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 2010. 11(8): p. 781-9.
7. Izumo, T., Oral premalignant lesions: from the pathological viewpoint. *Int J Clin Oncol*, 2011. 16(1): p. 15-26.
8. Termine, N., et al., Biopsy vs. brushing: comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol*, 2012. 48(9): p. 870-5.
9. Termine, N., et al., HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol*, 2008. 19(10): p. 1681-90.
10. Wasylyk, B., J. Abecassis, and A.C. Jung, Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in p16 should we trust? *Oral Oncol*, 2013. 49(10): p. e33-7.
11. Rietbergen, M.M., et al., Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA-negative oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer*, 2014. 134(10): p. 2366-72.
12. Jordan, R.C., et al., Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*, 2012. 36(7): p. 945-54.
13. Thariat, J., et al., [Advances in head and neck cancers on behalf of the French Intergroup ORL and GORTEC]. *Bull Cancer*, 2013. 100(10): p. 983-97.
14. Gorphe, P., et al., Treatment strategies in early-stage oropharyngeal squamous cell carcinoma: a French national survey. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2015.
15. Ligier, K., et al., Descriptive epidemiology of upper aerodigestive tract cancers in France: incidence over 1980-2005 and projection to 2010. *Oral Oncol*, 2011. 47(4): p. 302-7.
16. Chung, C.H., A. Bagheri, and G. D'Souza, Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral Oncol*, 2014. 50(5): p. 364-9.

L'essentiel

La prévalence de l'infection orale au(x) HPV n'est pas connue en France, non seulement parce qu'elle n'est pas dépistée mais également parce qu'il n'existe pas de technique de détection validée.

Nous avons mis au point une étude prospective monocentrique, sur 45 patients présentant une tumeur des VADS, dont l'objectif principal était de valider la faisabilité du frottis endo-buccal dans la détection d'HPV oraux. Pour cela, les patients ont subi un frottis tumoral et un frottis buccal en zone saine. Une recherche d'HPV a été effectuée sur chaque échantillon ainsi que sur la biopsie effectuée dans prise en charge courante du patient, à l'aide de l'automate Cobas® 4800. Une recherche de protéine p16^{INK4a} en immunohistochimie a également été réalisée sur chaque échantillon, afin de compléter la recherche d'ADN.

Nos résultats nous ont indiqués que le frottis avait une spécificité similaire à celle de la biopsie pour la détection d'HPV au niveau tumoral. En revanche, la sensibilité est plus faible. Notre série comportait 12,2 % de tumeurs induites par HPV (HPV + et p16 +). HPV 16 a été identifié dans 100 % des cas. Parmi les 6 patients présentant une tumeur HPV-induite, 5 présentaient également une infection orale (HPV + et p16 +) à HPV. De nouveau, HPV 16 a été retrouvé dans 100 % des cas. Le frottis a aussi permis de retrouver des cellules tumorales ou dystrophiques à distance de la tumeur, en zone saine de la cavité buccale, dans plus de 50% des cas.

Les résultats de cette étude ont montré que la réalisation du frottis buccal était facile et bien tolérée par les muqueuses orales. Devant l'augmentation mondiale du nombre de cancers de l'oro-pharynx induits par les HPV, la surveillance de la contamination orale nous semble capitale. C'est dans ce contexte que nous avons rédigé un autre protocole, pour une étude prospective multicentrique, dont l'objectif est de connaître la prévalence de l'infection par HPV chez des femmes présentant une infection diagnostiquée au niveau génital. Le protocole est présenté dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

PAPILLOR : Etude de la concordance du génotype des Papillomavirus Humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital

4. PAPILLOR : Etude de la concordance du génotype des Papillomavirus Humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital

4.1. Introduction

Lors d'un précédent travail ayant fait l'objet de communications affichées internationale (52th ICAAC Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012, San Francisco) et nationale (119^{ème} congrès de la SFORL Société Française d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie de la Face et du Cou 2012, Paris), nous avons étudié une population de femmes qui avaient présenté, successivement ou concomitamment, un cancer du col utérin et un cancer des VADS [74, 75]. Sur les 18 patientes de cette série, 72,2% (n=13) avaient développé en premier lieu un cancer du col utérin. La durée moyenne écoulée entre l'apparition des deux tumeurs était de 9,1 ans. 25% ne présentaient aucun facteur de risque de développer un cancer des VADS (pas de consommation d'alcool ni de tabac), et 41,7% avaient uniquement une consommation tabagique. Nous nous étions alors demandés si ces femmes avaient pu développer un carcinome épidermoïde des VADS induit par HPV, et éventuellement par le même sous-type que celui responsable de leur cancer du col utérin. L'ensemble des échantillons tumoraux (col et VADS) étant dispersé dans différents établissements en France et parfois à l'étranger, nous n'avons pu mener à bien l'objectif de cette étude. En revanche, nous avons recherché la présence d'HPV dans les échantillons de tumeurs de VADS disponibles (n=10), et la combinaison des détections d'ADN d'HPV et de protéine p16 nous ont amené à suspecter une infection virale oncogène dans 80% des échantillons (n=8).

Partant de constat, et devant l'étude de la littérature stipulant que les femmes qui ont présenté une pathologie cancéreuse HPV-induite au niveau utérin ont 6 fois plus de risque de développer une autre tumeur maligne [76], nous avons souhaité cibler cette population.

4.2. Contexte bibliographique

En 2012, le cancer utérin était le 11^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme en France [77]. Environ 32 % des femmes de 18 à 35 ans sont porteuses d'un ou plusieurs types d'HPV au niveau gynécologique, dont 8 % d'HPV-HR (essentiellement HPV 16 et HPV 18) [19, 78]. Une méta-analyse publiée 2012 concluait que 91% des lésions intra épithéliales cervicales de haut grade (CIN 3), des cancers in situ (CIS) et des cancers invasifs du col en Europe étaient induits par des HPV-HR [79]. Dans plus de 60 % des cas, la primo-infection a lieu dans les 5 premières années de la vie sexuelle. On estime qu'au cours de leur vie, plus de 70 % des individus seront porteurs d'au moins un HPV. La notion de latence de l'infection virale est capitale au niveau de la sphère génitale; bien que le pic d'infection se situe autour de l'âge de 20 ans, le pic d'apparition des cancers du col de l'utérus est au-delà de 40 ans. Lorsque l'infection génitale par un HPV-HR est persistante pendant plus de deux ans, la femme contaminée présente un risque élevé de développer une lésion pré-cancéreuse puis cancéreuse du col utérin [77].

Les HPV sont également responsables de carcinomes épidermoïdes de la cavité orale et de l'oropharynx de façon croissante depuis les 10 dernières années [12, 34, 80]. Jusqu'à maintenant, 24 types d'HPV ont été impliqués dans le développement de tumeurs de l'oropharynx. Dans 90 % des cas des cancers de l'oropharynx HPV-induits, le génotype recouvré est HPV 16 [19, 81, 82]. Cette infection est à l'origine d'une nouvelle population de patients atteints de cancers de la cavité orale et de l'oropharynx : plus jeune, souvent non exposée aux facteurs de risque habituels que sont le tabac et l'alcool [19, 83].

De nombreuses études indiquent que les infections par HPV qui se retrouvent tant au niveau cervical qu'oral ne sont pas indépendantes. La méta-analyse de Termine publiée en 2011 évalue la fréquence et la concordance des types d'HPV au niveau buccal chez des femmes infectées au niveau génital. Les résultats de cette méta-analyse montrent clairement que ces infections ne peuvent pas être dues au hasard [84]. De plus, il est admis que les femmes ayant eu un antécé-

dent de cancer du col utérin présentent un risque plus élevé de développer un cancer de la cavité buccale, ainsi que leurs partenaires [76].

Plusieurs hypothèses sont évoquées : une transmission sexuelle, une auto-inoculation ou encore l'implication d'une infection génitale jouant le rôle de «réservoir viral» [85]. Une étude a retrouvé une concordance de 75% pour un génotype d'HPV au niveau génital parmi 75 couples dans lesquels les deux partenaires sont infectés par le virus [86], ce qui présume de l'importance des pratiques sexuelles à risque. L'étude de Vogt (2013) montre la présence d'HPV au niveau génital et buccal parmi 34 couples Sud-Africains. Les couples infectés par HPV au niveau oral et/ou génital montrent une évidence de la transmission virale due aux comportements sexuels [87].

L'évolution des mœurs et des pratiques sexuelles sont mises en cause : une plus grande fréquence de rapports oro-génitaux, un nombre plus élevé de partenaires et une précocité des rapports chez les adolescents ont été retrouvés chez 72% des patients atteints d'un cancer de l'oropharynx induit par HPV 16 [88, 89].

Néanmoins, la prévalence de l'infection orale par les HPV est mal connue. Seule une étude nord-américaine menée dans la population générale, sur plus de 5 000 personnes âgées de 14 à 69 ans, a révélé une prévalence de l'infection endo-buccale d'environ 7 %, avec un pic pour les 25-30 ans et un portage plus élevé chez les hommes que chez les femmes [90]. Quelques études ont été conduites sur des populations ciblées, notamment une étude grecque, menée sur 43 femmes âgées de 20 à 57 ans et sexuellement actives, qui a retrouvé la présence d'HPV 16 simultanément au niveau génital et buccal chez 29 femmes [91]. Une étude américaine plus récente, menée sur 1812 femmes âgées de 18 à 59 ans, a retrouvé 39,8% de co-infection orale et génitale par les HPV [92].

Enfin, la prévalence d'une infection par un HPV au niveau génital et buccal ainsi que la concordance du type retrouvé au niveau des deux sites infectés sont d'autant plus élevées chez les femmes HIV positives, l'immunodéficience augmentant le risque de transmission virale [84, 87, 93].

4.3. Justification de l'étude

Les données sur la prévalence des femmes porteuses d'HPV au niveau génital et oral, la concordance du génotype retrouvé entre les deux sites infectés ainsi que les facteurs de risque proviennent d'études réalisées à l'étranger. A notre connaissance, à ce jour, il n'y a aucune donnée française publiée concernant la concordance du type d'HPV au niveau buccal chez des femmes infectées au niveau génital.

Dans l'étude de Vogt et al, la concordance d'au moins un type d'HPV existe pour 4 couples sud-africains sur les 34 couples étudiés [87], ce qui évoque la possibilité d'une transmission croisée. D'autres études portant sur de petites populations, aux USA (6 patientes) et en Afrique du Sud (16 patientes) n'ont pas révélé de concordance entre les types d'HPV retrouvés au niveau oral et génital [94, 95]. Seule l'étude de Steinau (2014) évoquée dans le précédent paragraphe évalue la concordance entre les types d'HPV retrouvés au niveau génital et oral dans une grande cohorte: une concordance totale ou partielle est observée dans respectivement 6,6 % et 37,7% des femmes [92]. Cependant, le statut HPV au niveau génital n'était pas connu lors de l'inclusion des femmes dans cette étude.

En ciblant principalement les femmes infectées par HPV-HR au niveau génital, une nouvelle étude permettrait d'obtenir une population de femmes doublement infectées suffisamment importante pour analyser la concordance du (des) génotype(s) identifié(s).

L'étude de la concordance du génotype d'HPV au niveau oral et génital permettrait de mettre en évidence le risque d'auto-transmission et de transmission croisée du virus entre les deux localisations. L'étude de la vie sexuelle des patientes incluses serait indispensable pour déterminer la part des facteurs de risques sexuels dans la contamination du second site.

Une telle étude apporterait des informations sur la nécessité d'un dépistage HPV oral chez les femmes infectées par un ou plusieurs HPV au niveau génital. Devant le nombre croissant de can-

cers des VADS, et particulièrement de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx, induits par les HPV-HR, il semble important de cibler la population à risque d'infection orale.

Nous avons donc rédigé un second synopsis, visant à connaître la proportion de femmes infectées au niveau oral lorsqu'elles ont une infection avérée par un HPV oncogène au niveau génital. Cette étude permettra également, en cas de co-infection, de connaître s'il s'agit du même type d'HPV puisque nous avons prévu un génotypage systématique de tous les échantillons. L'étude des facteurs de risque de contamination virale des patientes est prévu grâce à un auto-questionnaire anonyme, car il comporte des données dites sensibles, notamment sur la vie sexuelle des patientes.

Le protocole, intitulé PAPILLOR (n° ID RCB 2015-A00594-45), a été soumis à l'Appel à Projets "Jeunes Chercheurs" du GIRCI Est (Groupement Inter-régional de Recherche Clinique et d'Innovation) fin 2014. Il a fait partie des 19 projets lauréats sur 70 lettres d'intention déposées. Il a ensuite été soumis au CPP Est en avril 2015, qui a donné son accord pour mener cette étude multicentrique (Réf 15.05.07) en mai. Un avis favorable de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) (Réf 150528B-41) a été obtenu en mai 2015, ainsi que celui du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) (n° 15.726) en septembre 2015. L'autorisation de la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) a été accordée fin décembre 2015 (Réf DR-2015-735). Le cahier d'observation étant prêt, les visites de mise en place auront lieu prochainement, dans l'objectif de débiter les inclusions au deuxième trimestre 2016.

Nous avons inséré ci-après le synopsis de cette étude. Les objectifs détaillés de la recherche, les notes d'information destinées aux patientes qui participeront, le questionnaire anonyme qu'elles auront à compléter ainsi que les autres formulaires réglementaires ont été regroupés dans l'Annexe 2.

4.4. Synopsis de l'étude

Tableau III : Synopsis de l'étude PAPILLOR

Titre de l'étude	Etude de la concordance du génotype des papillomavirus humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital
Nom abrégé	PAPILLOR
N° ID RCB	2015-A00594-45
Promoteur	Institut de Cancérologie de Lorraine - 6 avenue de bourgogne - CS 30519 - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex
Nombre de centres	2 centres
Type d'étude	Il s'agit d'une étude prospective multicentrique
Objectifs de l'étude	<u>Objectif principal</u> : L'objectif principal est d'étudier la concordance du génotype des HPV au niveau génital et oral chez les femmes doublement infectées <u>Objectifs secondaires</u> • Evaluer la concordance complète et partielle du génotype. • Evaluer la proportion de femmes présentant un HPV au niveau oral dans une population de femmes infectées au niveau génital • Evaluer la proportion de femmes présentant un HPV haut risque au niveau oral dans une population de femmes infectées au niveau génital • Décrire l'ensemble des types d'HPV sur les deux sites • Rechercher les facteurs de risque d'HPV oral dans une population de femmes infectées au niveau génital • Evaluer la persistance et la clairance de l'infection HPV au niveau oral • Evaluer la fréquence des femmes nouvellement porteuses d'un HPV oral à 5-7 mois.
Critère principal de jugement	La concordance du génotype est définie par la présence d'au moins un type d'HPV identique entre le niveau oral et génital chez la même femme. L'ensemble des génotypes retrouvés au niveau génital et oral sera considéré.

Critères d'inclusion :	• Néoplasies intra-épithéliales cervicales de haut grade (CIN 3), de carcinome in situ (CIS) ou de cancer invasif du col utérin prouvé histologiquement • Patiente ayant un HPV au niveau génital • Patientes non vaccinées contre le HPV • Age > 18 ans. • OMS ≤ 3 • Patiente affiliée au régime de la sécurité sociale • Information de la patiente et signature du consentement éclairé
Critères de non inclusion :	• Patiente vaccinée contre le HPV (Gardasil®, Cervarix®) • Femme enceinte de plus de 10 semaines de grossesse • Patiente privée de liberté ou placée sous tutelle • Patiente ayant bénéficié d'une radiothérapie cervico-faciale datant de moins d'un an
Nombre de patientes	165 patientes
Procédure d'investigation menée et différence par rapport à la prise en charge habituelle	L'étude sera proposée aux femmes nouvellement prises en charge dans un centre spécialisé suite à la découverte d'une néoplasie intra-épithéliale de haut grade (CIN3), d'un carcinome in situ (CIS), ou d'un carcinome invasif du col utérin () suite à un dépistage du cancer du col de l'utérus, et ayant un test HPV positif. Après vérification des critères d'inclusion, une dispensation de l'information et signature du formulaire de consentement, un numéro d'inclusion sera attribué à chaque patiente en se connectant sur le site clean web (https://icl.tentelemed.com/Ctms-icl/portal/login). Les patientes bénéficieront de deux frottis (un frottis cervico-utérin et un frottis oral) le jour de l'inclusion. Les facteurs de risque d'une infection par HPV au niveau oral seront recherchés à l'aide d'un auto-questionnaire résumant les données démographiques et les comportements à risque. Un second frottis oral à 6 mois sera réalisé lors d'une visite de suivi chez le médecin prenant en charge la patiente
Evaluation des risques liés à la recherche	Les risques liés à un frottis au niveau oral sont inexistants
Calendrier	• Durée des inclusions : 24 mois • Durée de suivi des patientes : de 5 à 7 mois • Durée globale de l'étude : 30 mois

L'essentiel

La connaissance de la prévalence de l'infection orale aux HPV et sa corrélation avec des comportements "à risque" est un véritable enjeu de santé publique. On sait en effet que l'infection persistante par un HPV à haut-risque oncogène peut engendrer des lésions pré-néoplasiques ou néoplasiques. L'étude PAPILLOR, dont les inclusions sont sur le point de débiter, permettra de déterminer la prévalence de l'infection orale par un ou plusieurs HPV chez des femmes déjà infectées au niveau génital. Les résultats seront corrélés avec un questionnaire de vie sexuelle, permettant ainsi d'identifier les comportements augmentant le risque d'infection orale par HPV, mais également de mettre en oeuvre des moyens de prévention.

D'autre part, la surveillance des femmes à qui une infection orale par HPV aura été détectée sera mise en oeuvre, afin d'évaluer s'il existe une clearance virale au niveau buccal similaire à celle que l'on connaît au niveau génital.

Chapitre 5

Traitements actuels et perspectives d'avenir

5. Traitements actuels et perspectives d'avenir

Comme nous l'avons évoqué précédemment (Chapitre II), les CE des VADS induits par les HPV constituent une entité clinique distincte des autres tumeurs épidermoïdes des VADS. Actuellement, il n'existe aucune recommandation pour traiter différemment les cancers des VADS relatifs à un ou plusieurs HPV et les cancers classiquement causés par une consommation d'alcool et/ou de tabac [96, 97]. Par ailleurs, peu d'études cliniques se sont intéressées aux réponses induites par les différentes thérapeutiques selon le statut HPV de la tumeur [14].

5.1. La chirurgie

L'avènement de la chirurgie mini-invasive trans-orale, qu'elle soit laser ou robotisée, a permis des progrès considérable dans la prise en charge des patients présentant des CE-OP de stade T1/T2 [97-99]. Dans les dix dernières années, cette approche chirurgicale a permis de réduire la morbi-mortalité consécutive à la chirurgie carcinologique des VADS, tout en augmentant le nombre de préservations d'organes [100, 101]. La chirurgie trans-orale robotisée semble être une thérapeutique indiquée dans la prise en charge des patients présentant une tumeur épidermoïde de l'OP, puisque ces patients sont majoritairement plus jeunes, non fumeurs, et qu'ils bénéficient de bons taux de survie [97]. Bien que la chirurgie robotisée ait un coût très élevé par rapport à la chirurgie ouverte, le faible taux de complications et de mortalité, la réduction du temps opératoire, les bons résultats en terme de chirurgie carcinologique et la diminution des troubles post-opératoires de la déglutition, en font une technique de choix rapidement devenue populaire [100, 102]. Par ailleurs, il semblerait que la résection chirurgicale robotisée permette de diminuer les doses d'irradiation post-chirurgicale, avec un contrôle similaire de la maladie tout en diminuant les comorbidités inhérentes aux traitements [14, 100]. Une étude clinique (ECOG 3311) est actuellement en cours aux

Etats-Unis, afin de comparer la prise en charge chirurgicale et non chirurgicale chez les patients porteurs d'une tumeur HPV-positive [97].

5.2. Chimiothérapie et radiothérapie

Le Cisplatine est la molécule la plus utilisée en chimiothérapie, avec les meilleurs résultats pronostiques permettant d'observer des taux de survie de 90% à 3 ans [103]. Cet agent est notamment utilisé dans le traitement des tumeurs avancées et/ou non résécables, et reste le traitement recommandé dans les protocoles de préservation d'organes [103, 104]. Cependant, ces thérapies engendrent de nombreux effets secondaires, tels qu'une xérostomie ou une dysphagie. Ils ont également une neurotoxicité non négligeable et provoquent des insuffisances rénales [14, 103]. D'autres molécules sont régulièrement utilisées, seules ou en association, comme le Carboplatine, le 5-Fluoro-Uracile ou les taxanes [14, 105]. La tendance actuelle est évidemment à la recherche de molécules ciblant précisément les cellules tumorales, afin de diminuer au maximum les effets secondaires et les comorbidités. Aucun agent chimiothérapeutique n'a pour l'instant montré d'efficacité supérieure par rapport à un autre dans le traitement des tumeurs épidermoïdes HPV-induites.

La radiothérapie externe fait partie de la prise en charge habituelle des cancers des VADS, dans le cadre d'un traitement multi-modal [106, 107]. Cette discipline a également connu des avancées récentes, avec l'apparition de l'IMRT (Radiothérapie à Intensité Modulée), qui permet de mieux cibler les zones d'irradiation et de diminuer la dose de rayons reçue par les cellules non tumorales [108]. La radiothérapie externe a encore beaucoup d'effets secondaires sur les patients atteints de tumeurs ORL, parmi lesquels la xérostomie, la dysphagie, la fibrose tissulaire, sont les plus invalidants [100]. Les patients ayant bénéficié d'une radiothérapie cervico-faciale ont davantage de risques de développer une occlusion carotidienne ou de faire un AVC. En plus de l'altération de leur qualité de vie suite à un traitement par radiothérapie, on observe chez certains de ces patient "long-survivants" des tumeurs induites par l'irradiation [109].

Néanmoins, il semble que la réponse immunitaire de l'hôte aux traitements par chimiothérapie et/ou radiothérapie soit différente chez les patients porteurs de tumeurs HPV-induites [110]. L'une des hypothèses évoquées est la présence du gène TP53 natif dans les tumeurs HPV-induites, permettant la synthèse d'une p53 fonctionnelle. Si grâce à certains agents thérapeutiques, celle-ci n'est pas dégradée par l'oncoprotéine virale E6, elle permet aux cellules tumorales de se diriger vers une apoptose normale induite par la radio et/ou la chimiothérapie [100].

De nombreuses études ont montré qu'une approche chirurgicale première, suivie d'une radio et/ou chimiothérapie, permettait d'obtenir un bon contrôle de la maladie. Le problème majeur de ces protocoles thérapeutiques reste les effets secondaires inhérents aux traitements chirurgicaux et non chirurgicaux [102].

5.3. Thérapies ciblées

Le cetuximab (Erbix[®]) est la première et seule molécule actuellement utilisée et recommandée dans le traitement des cancers des VADS [109, 111]. Elle est utilisée en conjonction avec la radiothérapie dans le traitement des tumeurs localement avancées des VADS, car il a été prouvé que l'association cetuximab-radiothérapie augmentait significativement le taux de survie par rapport à une radiothérapie seule [103, 112]. Le cetuximab est un anticorps monoclonal de la famille des immunoglobulines G (IgG), spécifiquement dirigé contre le domaine extra-cellulaire de l'EGFR [113, 114]. Plusieurs études ont établi une corrélation entre un faible taux d'EGFR dans les tumeurs HPV-induites et une augmentation de la réponse aux thérapeutiques classiques [112, 115, 116].

D'autres études récentes ou en cours évaluent le potentiel de thérapies ciblées dans le traitement des tumeurs HPV-positives. La Figure 7 schématise les interactions entre les oncoprotéines E6 et

E7 et les voies de signalisation cellulaire, et indique le nom de thérapies ciblées pouvant inhiber ou supprimer ces interactions [14].

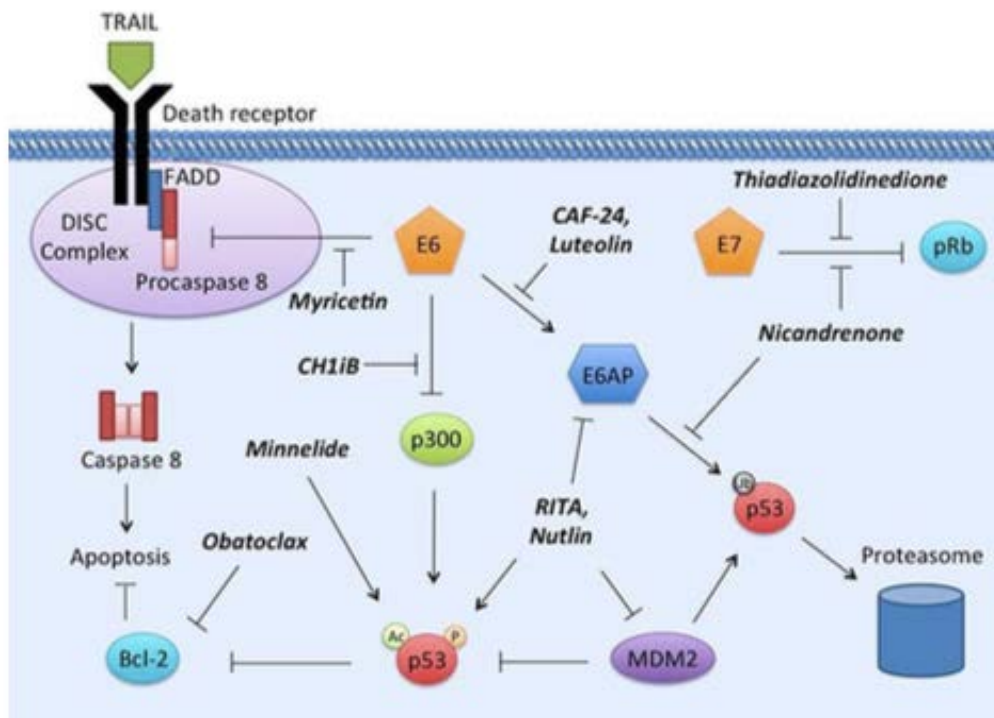


Figure 7: Voies cellulaires affectées par les oncoprotéines virales E6 et E7, et petites molécules inhibitrices pouvant interférer [14]

Les approches thérapeutiques ciblant spécifiquement les protéines oncogènes sont seulement en phase précoce de développement, contrairement aux thérapies dirigées contre les récepteurs de facteurs de croissance tels que l'EGFR [14, 117]. Néanmoins, de petites molécules inhibitrices semblent apparaître comme des options thérapeutiques efficaces et faiblement toxiques [118-120]. Des dérivés des flavonoïdes (lutéoline, CAF-24) auraient la capacité d'inhiber la dégradation de p53 en empêchant la liaison E6-E6AP (Figure 1) [14, 121].

Une autre petite molécule, largement étudiée dans plusieurs types de tumeurs, est un protecteur de p53. RITA (*Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis*) cible p53 (Figure 7) en changeant sa conformation et en empêchant ainsi sa liaison aux protéines virales telles qu'E6 ou E6AP [119]. Minnelide (Figure 7) est également une petite molécule prometteuse, car elle a montré

sa capacité *in vitro* et *in vivo* à induire une apoptose dans les tumeurs des VADS HPV-induites [120].

De nombreuses études sont actuellement en cours afin de mettre au point des thérapies ciblées spécifiquement destinées aux tumeurs des VADS induites par les HPV.

5.4. Vaccination préventive

Il existe une vaccination préventive contre certains types d'HPV. Le premier vaccin commercialisé en France en 2006 (Gardasil®, Merck & Co. Inc.) est quadrivalent. Il protège contre deux HPV-HR (types 16 et 18) et deux HPV-BR (types 6 et 11). Il est indiqué dans la prévention des lésions pré-cancéreuses du col utérin, de la vulve et du vagin, des cancers du col de l'utérus, et des verrues génitales [122]. Depuis mars 2007, il fait partie du programme de vaccination pris en charge par la Sécurité Sociale. Un autre vaccin, bivalent (Cervarix®, Glaxo Smith Kline Inc.) est commercialisé en France depuis 2008. Il protège uniquement contre les types 16 et 18 ; il est indiqué dans la prévention des lésions pré-cancéreuses et cancéreuses du col utérin [123].

Les recommandations initiales préconisaient l'administration du vaccin quadrivalent (Gardasil®) aux jeunes filles de 14 ans, et en rattrapage aux jeunes filles de 15 à 23 ans qui n'auraient pas eu de rapports sexuels, ou au plus tard, dans l'année suivant le début de la vie sexuelle. La France était alors le pays qui introduisait la vaccination le plus tardivement, les autres pays européens préconisant une vaccination dès l'âge de 11 ou 12 ans [124]. De nombreuses études ont rapporté l'importance d'introduire une immunisation précoce, c'est-à-dire avant le début de la vie sexuelle, pour une meilleure efficacité du vaccin. Le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) a modifié les recommandations en 2012, et préconise depuis une vaccination chez les jeunes filles de 11 à 14 ans, et en rattrapage jusqu'à l'âge de 20 ans [122]. Le HCSP a également souligné l'insuffisance de la couverture vaccinale contre les HPV en France (fin 2014, 17% des jeunes filles de 16 ans avaient reçu l'ensemble des doses vaccinales) [125]. Le schéma vaccinal est peu à peu adapté

pour Gardasil® et Cervarix® dans l'objectif d'améliorer l'immunisation et la couverture vaccinale [126, 127].

L'efficacité de l'immunisation contre les HPV 16 et 18 avec les vaccins bi- et quadrivalents a montré une diminution du risque d'apparition de lésions pré-néoplasiques et néoplasiques du col utérin de plus de 70% [128].

Un vaccin nonavalent protégeant contre les HPV-HR 6/11/16/18/31/33/45/52/58 a été mis au point récemment (Gardasil 9®, Merck & Co. Inc.). Ce vaccin a obtenu l'autorisation de mise sur le marché européenne en juillet 2015 mais n'est actuellement pas commercialisé en France. Les premières études indiquent une protection contre l'apparition de lésions pré-néoplasiques et néoplasiques du col utérin de près de 90% [129, 130].

Par ailleurs, l'étude EDiTH VI a permis de mettre en évidence une implication des HPV contenus dans le vaccin nonavalent dans 70,2 % des cancers anaux et 41,4 % des cancers de l'oropharynx des populations françaises étudiées [38]. D'après l'étude EDiTH VI, Riethmuller *et al.* ont calculé l'impact potentiel qu'aurait la vaccination contre les HPV sur la survenue des tumeurs épidermoïdes de l'oropharynx en France. Les estimations donnent des résultats similaires avec les vaccins quadri- et nonavalents ; la vaccination permettrait de prévenir l'apparition de plus de 40 % des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx [128].

En France, la vaccination contre les HPV n'est indiquée que pour les jeunes filles, dans la prévention des lésions génitales. Pourtant, les vaccins sont susceptibles de réduire significativement l'apparition d'autres lésions cancéreuses HPV-induites, particulièrement au niveau de l'anus et du pénis chez les hommes [131]. Dans d'autres pays du monde, et notamment en Autriche depuis novembre 2006, la vaccination cible aussi les garçons et les jeunes hommes [124]. Aux USA, la vaccination avec le vaccin quadrivalent est recommandée pour les hommes, sans âge-cible. Au Royaume-Uni, elle est recommandée pour les hommes homosexuels ou ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes [132].

5.5. Vaccination thérapeutique

Contrairement à la vaccination prophylactique, la vaccination thérapeutique serait destinée aux patients déjà infectés par un ou plusieurs types d'HPV. Elle aurait pour objectif d'initier une réponse cellulaire pouvant reconnaître et "attaquer" une infection virale persistante ou une dysplasie [96, 133]. De plus, les vaccins thérapeutiques devraient activer une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T afin de détruire les cellules infectées par les HPV [134, 135].

Les oncoprotéines virales E6 et E7 sont des cibles privilégiées dans le développement de ces vaccins car seules les cellules infectées présentent ces protéines [96, 136]. Les essais cliniques concernant ces thérapeutiques en sont à leurs débuts, et sont actuellement centrés sur la faisabilité, l'immunogénicité et la fiabilité [137].

La vaccination thérapeutique est une grande perspective d'avenir pour les patients atteints d'une tumeur des VADS HPV-induite car elle devrait améliorer considérablement la réponse aux thérapeutiques actuelles.

L'essentiel

Bien que les tumeurs épidermoïdes des VADS induites par les HPV semblent représenter des entités cliniques distinctes, leur prise en charge ne diffère actuellement pas de celle des tumeurs induites par un mésusage de l'alcool et du tabac. Néanmoins, plusieurs études récentes ont montré que ces tumeurs étaient particulièrement éligibles à la chirurgie mini-invasive trans-orale robotisée, du fait de leurs localisations préférentiellement oro-pharyngées et du stade assez précoce de leur prise en charge. D'autre part, ces tumeurs ont montré une meilleure réponse aux traitements conventionnels tels que la radiothérapie. Il en résulte que le taux de survie des patients atteints de tumeurs des VADS induites par les HPV ont un meilleur taux de survie que celles non induites par les HPV. De nouveaux traitements sont à l'étude, à partir de petites molécules inhibitrices pouvant empêcher l'interaction entre les oncoprotéines virales E6 et E7 et le cycle cellulaire normal. La vaccination thérapeutique est également en cours d'élaboration, elle serait efficace dans le traitement des infections virales persistantes et des dysplasies.

Dans ce contexte, il semble primordial de développer la prévention de l'infection par des HPV oncogènes au niveau oral. La vaccination bi- et quadrivalente disponible en France n'est actuellement pas recommandée chez les hommes alors qu'elle l'est dans d'autres pays du monde. L'extension des recommandations vaccinales pourrait permettre de limiter l'incidence des cancers des VADS.

Conclusions

L'implication des Papillomavirus Humains dans la survenue de certains carcinomes épidermoïdes des VADS, et particulièrement de l'oropharynx, n'est plus à démontrer. Néanmoins, il reste de nombreuses inconnues en France en ce qui concerne l'incidence de ces tumeurs.

Les méthodes de détection des HPV dans les frottis cervico-utérins sont fiables et utilisables en routine, ce qui n'était jusqu'à présent pas le cas pour les prélèvements tissulaires fixés au formol et inclus en paraffine. Nos travaux ont permis de mettre en évidence la possibilité de traiter ces prélèvements tissulaires avec la même technique que les frottis.

Par ailleurs, notre étude clinique HEFFIBUC a montré que près de la totalité des patients présentant une tumeur des VADS induite par HPV présentait aussi une infection orale par HPV. Ceci souligne l'importance de la surveillance de la cavité buccale, lorsque l'on sait qu'une infection persistante par HPV est un facteur de risque majeur de développer une tumeur viro-induite. Enfin, l'étude PAPILLOR permettra d'étudier l'éventuelle co-infection des régions génitale et orale chez les patientes porteuses d'un ou plusieurs HPV à haut risque oncogène au niveau génital. Les résultats seront corrélés aux réponses des patientes sur un questionnaire de vie sexuelle, dans l'objectif d'identifier les facteurs de risque de transmission d'HPV de la sphère génitale vers la sphère buccale.

La prévention de l'infection par les HPV est un véritable enjeu de santé publique. La vaccination préventive fait partie du programme de vaccination français, mais seules les jeunes filles sont ciblées tandis que d'autres pays vaccinent également les garçons et les hommes. Devant la proportion identifiée de tumeurs anales et oropharyngées induites par les HPV ciblés par les vaccins existants, se pose la question de l'extension des recommandations vaccinales en France. Il n'existe actuellement pas de traitements spécifiques aux tumeurs des VADS induites par HPV. Néanmoins, divers essais concernant des thérapies ciblées ainsi que la vaccination thérapeutique représentent des perspectives d'avenir pour les patients touchés.

Bibliographie

1. Poletto. Les voies aériennes supérieures. 2013.
2. Sritippho, T., P. Chotjumlom, and A. Iamaroon, Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. 16(15): p. 6193-200.
3. Ligier, K., et al., Descriptive epidemiology of upper aerodigestive tract cancers in France: incidence over 1980-2005 and projection to 2010. *Oral Oncol*, 2011. 47(4): p. 302-7.
4. Grosclaude, P., et al., Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim. 2013.
5. Aouba, A., et al., Mortality data in France: the main causes of death in 2008 and trends since 2000. *Bull Epiémiol Hebd*, 2011. 22.
6. Brugere, J., et al., Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. *Cancer*, 1986. 57(2): p. 391-5.
7. Dal Maso, L., et al., Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models. *Eur J Epidemiol*, 2015.
8. Bourdillon, F., Smoking: essential data in relation to the first french smoking reduction programme. *Bull Epidémiol Hebd*, 2015. (17-18)(http://www.invs.sante.fr/beh/2015/17-18/2015_17_18_0.html).
9. Gilhodes, J., et al., Incidence of major smoking-related cancers: Trends among adults aged 20-44 in France from 1982 to 2012. *Cancer Epidemiol*, 2015. 39(5): p. 707-13.
10. Paille, F. and M. Reynaud, L'alcool, une des toutes premières causes d'hospitalisation en France. *Bull Epidémiol Hebd*, 2015. (24-25)(http://www.invs.sante.fr/beh/2015/24-25/2015_24_25_1.html).
11. Syrjanen, K.J., et al., Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg*, 1983. 21(2): p. 147-53.
12. Gillison, M.L., et al., Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(9): p. 709-20.
13. Thariat, J., et al., [Advances in head and neck cancers on behalf of the French Intergroup ORL and GORTEC]. *Bull Cancer*, 2013. 100(10): p. 983-97.
14. Whang, S.N., M. Filippova, and P. Duerksen-Hughes, Recent Progress in Therapeutic Treatments and Screening Strategies for the Prevention and Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Viruses*, 2015. 7(9): p. 5040-65.
15. Kalyankrishna, S. and J.R. Grandis, Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 2006. 24(17): p. 2666-72.

16. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
18. Bertin, J., Impact des voies pRb/p53 dans la réponse à l'ABT-737 dans les cellules cancéreuses, in *Biologie, médecine, santé*. 2011, Nantes. p. 137.
19. Munoz, N., et al., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003. 348(6): p. 518-27.
20. Jung, A.C., et al., Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2010. 126(8): p. 1882-94.
21. Bosch, F.X. and N. Munoz, The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*, 2002. 89(2): p. 183-90.
22. Mougin, C., B. Bernard, and M. Lab, [Biology of papillomavirus infections. I. General characteristics]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1997. 55(6): p. 555-63.
23. Storey, A., et al., Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 1998. 393(6682): p. 229-34.
24. Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997. 88(3): p. 323-31.
25. Collado, M. and M. Serrano, Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(1): p. 51-7.
26. Lee, W.H., et al., Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*, 1987. 235(4794): p. 1394-9.
27. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961. 25: p. 585-621.
28. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 2007. 130(2): p. 223-33.
29. Parkin, D.M. and F. Bray, Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 2006. 24 Suppl 3: p. S3/11-25.
30. zur Hausen, H., Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1977. 78: p. 1-30.
31. Boshart, M., et al., A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*, 1984. 3(5): p. 1151-7.
32. Schwarz, E., et al., Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 1985. 314(6006): p. 111-4.

33. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*, 1996. 56(20): p. 4620-4.
34. Kreimer, A.R., et al., Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. 14(2): p. 467-75.
35. Chai, R.C., et al., Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. *Cancer Med*, 2015. 4(4): p. 596-607.
36. Klusmann, J.P., S.F. Preuss, and E.J. Speel, [Human papillomavirus and cancer of the oropharynx. Molecular interaction and clinical implications]. *HNO*, 2009. 57(2): p. 113-22.
37. Fischer, C.A., et al., Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer*, 2010. 126(5): p. 1256-62.
38. St Guily, J.L., et al., Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France--The EDiTH VI study. *J Clin Virol*, 2011. 51(2): p. 100-4.
39. Lacau-Saint-Guily, J., et al., PAPILLOPHAR: Impact of the human papillomavirus (HPV) status in the prognosis of oropharynx squamous cell carcinoma (OSCC), in ASCO. 2011, J Clin Oncol.
40. Chaturvedi, A.K., et al., Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*, 2008. 26(4): p. 612-9.
41. Simard, E.P., et al., Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA Cancer J Clin*, 2012. 62(2): p. 118-28.
42. Guignard, R., et al., La consommation de tabac en france et son évolution : résultats du baromètre santé 2014. *Bull Epidemiol Hebd*, 2015. 17-18: p. 281-8.
43. Nasman, A., et al., Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*, 2009. 125(2): p. 362-6.
44. Marur, S., et al., HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 2010. 11(8): p. 781-9.
45. Gillison, M.L., et al., Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(6): p. 407-20.
46. D'Souza, G., et al., Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV16-positive and HPV16-negative head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2010. 46(2): p. 100-4.
47. Bajos, N., et al., Changes in sexual behaviours: from secular trends to public health policies. *AIDS*, 2010. 24(8): p. 1185-91.

48. Herbenick, D., et al., Sexual behavior in the United States: results from a national probability sample of men and women ages 14-94. *J Sex Med*, 2010. 7 Suppl 5: p. 255-65.
49. Antonsson, A., et al., Human papillomavirus status and p16(INK4A) expression in patients with mucosal squamous cell carcinoma of the head and neck in Queensland, Australia. *Cancer Epidemiol*, 2015. 39(2): p. 174-81.
50. McLaughlin-Drubin, M.E., C.P. Crum, and K. Munger, Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(5): p. 2130-5.
51. Dreyer, J.H., et al., pRb and CyclinD1 Complement p16 as Immunohistochemical Surrogate Markers of HPV Infection in Head and Neck Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2015.
52. Boyle, J.O., et al., The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res*, 1993. 53(19): p. 4477-80.
53. Hafkamp, H.C., et al., A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer*, 2003. 107(3): p. 394-400.
54. Psyrri, A., P. Gouweris, and J.B. Vermorken, Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. *Curr Opin Oncol*, 2009. 21(3): p. 201-5.
55. Lindquist, D., et al., Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Mol Oncol*, 2007. 1(3): p. 350-5.
56. Nevens, D. and S. Nuyts, HPV-positive head and neck tumours, a distinct clinical entity. *B-ENT*, 2015. 11(2): p. 81-7.
57. Ang, K.K., et al., Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2010. 363(1): p. 24-35.
58. Mirghani, H., et al., Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. *Cancer Treat Rev*, 2015. 41(10): p. 844-52.
59. Basu, P., et al., Sensitivity of APTIMA HPV E6/E7 mRNA test in comparison with hybrid capture 2 HPV DNA test for detection of high risk oncogenic human papillomavirus in 396 biopsy confirmed cervical cancers. *J Med Virol*, 2015.
60. Wang, H.Y., et al., Diagnostic performance of HPV E6/E7, hTERT, and Ki67 mRNA RT-qPCR assays on formalin-fixed paraffin-embedded cervical tissue specimens from women with cervical cancer. *Exp Mol Pathol*, 2015. 98(3): p. 510-6.
61. Snijders, P.J., A.J. van den Brule, and C.J. Meijer, The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol*, 2003. 201(1): p. 1-6.

62. Smeets, S.J., et al., A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*, 2007. 121(11): p. 2465-72.
63. Schache, A.G., et al., Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(19): p. 6262-71.
64. Lewis, J.S., Jr., p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*, 2012. 6 Suppl 1: p. S75-82.
65. Dahlstrand, H., et al., Human papillomavirus accounts both for increased incidence and better prognosis in tonsillar cancer. *Anticancer Res*, 2008. 28(2B): p. 1133-8.
66. Wasylyk, B., J. Abecassis, and A.C. Jung, Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in p16 should we trust? *Oral Oncol*, 2013. 49(10): p. e33-7.
67. Rietbergen, M.M., et al., Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*, 2013. 132(7): p. 1565-71.
68. Kocjan, B.J., et al., Comparative evaluation of the Abbott RealTime High Risk HPV test and INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test for detecting and identifying human papillomaviruses in archival tissue specimens of head and neck cancers. *Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat*, 2012. 21(4): p. 73-5.
69. Verstuyft, C., et al., [A new, rapid and robust genotyping method for CYP2C9 and MDR1]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2003. 61(3): p. 305-9.
70. Castle, P.E., et al., Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*, 2011. 12(9): p. 880-90.
71. Stoler, M.H., et al., High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol*, 2011. 135(3): p. 468-75.
72. Wright, T.C., Jr., et al., Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol*, 2011. 136(4): p. 578-86.
73. Recommandations pour le dépistage du cancer du col de l'utérus en France, H.A.d.S. (HAS), Editor. 2010: www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-11/fiche_de_synthese_recommandations_depistage_cancer_du_col_de_luterus.pdf.
74. Guillet, J., et al. Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma and Human Papillomavirus-associated Cancers in Women. 2012. San Francisco, California: Proceedings of the 52th ICAAC abstr "L2-302".
75. Guillet, J., et al., Succession de carcinomes épidermoïdes du col utérin et de l'oropharynx : rôle de l'autocontamination par HPV. Analyse d'une série de 18 cas. *Annales Françaises d'Oto-Rhino-Laryngologie et de pathologie cervico-faciale*, 2012. 129(4S).

76. Coglianò, V., et al., Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*, 2005. 6(4): p. 204.
77. INCa, Les cancers en France. 2014: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers>.
78. Guardado-Estrada, M., et al., The distribution of high-risk human papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. *PLoS One*, 2014. 9(10): p. e109406.
79. Guan, P., 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): p. 2349-59.
80. Hong, A.M., et al., Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine*, 2010. 28(19): p. 3269-72.
81. Muñoz, N., Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*, 2000. 19(1-2): p. 1-5.
82. Herrero, R., et al., Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(23): p. 1772-83.
83. Garbuglia, A.R., Human papillomavirus in head and neck cancer. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(3): p. 1705-26.
84. Termine, N., et al., Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. *Oral Oncol*, 2011. 47(4): p. 244-50.
85. Peixoto, A.P., et al., Asymptomatic oral human papillomavirus (HPV) infection in women with a histopathologic diagnosis of genital HPV. *J Oral Sci*, 2011. 53(4): p. 451-9.
86. Lorenzon, L., et al., Prevalence of HPV infection among clinically healthy Italian males and genotype concordance between stable sexual partners. *J Clin Virol*, 2014. 60(3): p. 264-9.
87. Vogt, S.L., et al., Concordant Oral-Genital HPV Infection in South Africa Couples: Evidence for Transmission. *Front Oncol*, 2013. 3: p. 303.
88. D'Souza, G., et al., Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2007. 356(19): p. 1944-56.
89. D'Souza, G., et al., Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e86023.
90. Gillison, M.L., et al., Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*, 2012. 307(7): p. 693-703.
91. Adamopoulou, M., et al., Prevalence of human papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women. *Gynecol Oncol*, 2013. 129(2): p. 395-400.

92. Steinau, M., et al., Prevalence of cervical and oral human papillomavirus infections among US women. *J Infect Dis*, 2014. 209(11): p. 1739-43.
93. Fakhry, C., et al., Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(12): p. 4479-85.
94. Smith, E.M., et al., HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2004. 12(2): p. 45-56.
95. Marais, D.J., et al., Cervical human papillomavirus (HPV) infection and HPV type 16 antibodies in South African women. *J Clin Microbiol*, 2008. 46(2): p. 732-9.
96. Psyrri, A., et al., Future directions in research, treatment and prevention of HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Pathol*, 2012. 6 Suppl 1: p. S121-8.
97. Mydlarz, W.K., J.Y. Chan, and J.D. Richmon, The role of surgery for HPV-associated head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2015. 51(4): p. 305-13.
98. Ford, S.E., et al., Transoral robotic versus open surgical approaches to oropharyngeal squamous cell carcinoma by human papillomavirus status. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2014. 151(4): p. 606-11.
99. Lorincz, B.B., N. Jowett, and R. Knecht, Decision management in transoral robotic surgery: Indications, individual patient selection, and role in the multidisciplinary treatment for head and neck cancer from a European perspective. *Head Neck*, 2015.
100. Genden, E.M., The role for surgical management of HPV-related oropharyngeal carcinoma. *Head Neck Pathol*, 2012. 6 Suppl 1: p. S98-103.
101. Urban, D., J. Corry, and D. Rischin, What is the best treatment for patients with human papillomavirus-positive and -negative oropharyngeal cancer? *Cancer*, 2014. 120(10): p. 1462-70.
102. Boscolo-Rizzo, P., et al., New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2013. 33(2): p. 77-87.
103. Adams, A.K., T.M. Wise-Draper, and S.I. Wells, Human papillomavirus induced transformation in cervical and head and neck cancers. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(3): p. 1793-820.
104. Hamoir, M., et al., The role of neck dissection in the setting of chemoradiation therapy for head and neck squamous cell carcinoma with advanced neck disease. *Oral Oncol*, 2012. 48(3): p. 203-10.
105. Malhotra, B., et al., Carboplatin-pemetrexed in treatment of patients with recurrent/metastatic cancers of the head and neck; superior outcomes in oropharyngeal primaries. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 362.
106. Nichols, A.C., et al., Early-stage squamous cell carcinoma of the oropharynx: radiotherapy vs. trans-oral robotic surgery (ORATOR)--study protocol for a randomized phase II trial. *BMC Cancer*, 2013. 13: p. 133.

107. Vermeer, D.W., et al., Radiation-induced loss of cell surface CD47 enhances immune-mediated clearance of human papillomavirus-positive cancer. *Int J Cancer*, 2013. 133(1): p. 120-9.
108. McBride, S.M., et al., Intensity-modulated versus conventional radiation therapy for oropharyngeal carcinoma: long-term dysphagia and tumor control outcomes. *Head Neck*, 2014. 36(4): p. 492-8.
109. Bonilla-Velez, J., et al., Impact of human papillomavirus on oropharyngeal cancer biology and response to therapy: implications for treatment. *Otolaryngol Clin North Am*, 2013. 46(4): p. 521-43.
110. Bol, V. and V. Gregoire, Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 696028.
111. Sepiashvili, L., et al., Novel insights into head and neck cancer using next-generation "omic" technologies. *Cancer Res*, 2015. 75(3): p. 480-6.
112. Martinez-Useros, J. and J. Garcia-Foncillas, The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 2015. 51(5): p. 423-30.
113. Dorsey, K. and M. Agulnik, Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Drugs*, 2013. 73(4): p. 315-25.
114. Fumagalli, I., et al., Cytotoxic effect of lapatinib is restricted to human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Onco Targets Ther*, 2015. 8: p. 335-45.
115. Kumar, B., et al., Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007. 69(2 Suppl): p. S109-11.
116. Burtneess, B., et al., Afatinib versus placebo as adjuvant therapy after chemoradiation in a double-blind, phase III study (LUX-Head & Neck 2) in patients with primary unresected, clinically intermediate-to-high-risk head and neck cancer: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 2014. 15: p. 469.
117. Duenas-Gonzalez, A., et al., Emerging drugs for cervical cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2012. 17(2): p. 203-18.
118. Smukste, I., et al., Using small molecules to overcome drug resistance induced by a viral oncogene. *Cancer Cell*, 2006. 9(2): p. 133-46.
119. Zhao, C.Y., et al., Rescue of p53 function by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation. *Cancer Res*, 2010. 70(8): p. 3372-81.
120. Caicedo-Granados, E., et al., Wild-type p53 reactivation by small-molecule Minnelide in human papillomavirus (HPV)-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2014. 50(12): p. 1149-56.

121. Cherry, J.J., et al., Structure based identification and characterization of flavonoids that disrupt human papillomavirus-16 E6 function. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e84506.
122. ANSM. Gardasil. www.ansm.sante.fr/Activites/Surveillance-des-medicaments/Medicaments-faisant-l-objet-d-un-plan-de-gestion-des-risques/Medicaments-faisant-l-objet-d-un-Plan-de-Gestion-des-Risques-PGR2/GARDASIL 2015.
123. ANSM. Cervarix. <http://ansm.sante.fr/Activites/Surveillance-des-medicaments/Medicaments-faisant-l-objet-d-un-plan-de-gestion-des-risques/Medicaments-faisant-l-objet-d-un-Plan-de-Gestion-des-Risques-PGR2/CERVARIX> 2015.
124. Levy-Bruhl, D., et al., The current state of introduction of HPV vaccination into national immunisation schedules in Europe: results of the VENICE 2008 survey. *Eur J Cancer*, 2009. 45(15): p. 2709-13.
125. Collange, F., et al., General practitioners' attitudes and behaviors toward HPV vaccination: A French national survey. *Vaccine*, 2016. 34(6): p. 762-8.
126. HCSP. Infections à HPV : nouveau schéma vaccinal du vaccin Cervarix®. 2014.
127. HCSP. Infections à HPV : nouveau schéma vaccinal du vaccin Gardasil®. 2014.
128. Riethmuller, D., et al., [Expected impact of a quadrivalent HPV vaccine in France]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2009. 38(5): p. 389-95.
129. Serrano, B., et al., Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*, 2012. 7(1): p. 38.
130. HPV vaccine works against nine viral types. *Cancer Discov*, 2014. 4(1): p. OF2.
131. Denis, F., Actualité de la vaccination papillomavirus en France. *Médecine Thérapeutique / Pédiatrie*, 2015. 18(3).
132. Di Mario, S., et al., Are the Two Human Papillomavirus Vaccines Really Similar? A Systematic Review of Available Evidence: Efficacy of the Two Vaccines against HPV. *J Immunol Res*, 2015. 2015: p. 435141.
133. Kumar, S., M. Biswas, and T. Jose, HPV vaccine: Current status and future directions. *Med J Armed Forces India*, 2015. 71(2): p. 171-7.
134. Lin, K., et al., Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *J Formos Med Assoc*, 2010. 109(1): p. 4-24.
135. Best, S.R., K.J. Niparko, and S.I. Pai, Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngol Clin North Am*, 2012. 45(4): p. 807-22.
136. Ma, B., et al., Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2012. 17(4): p. 469-92.

137. Ramshankar, V. and A. Krishnamurthy, Human papilloma virus in head and neck cancers-role and relevance in clinical management. *Indian J Surg Oncol*, 2013. 4(1): p. 59-66.

ANNEXES

Annexe 1 : Classification TNM des carcinomes des VADS (7^{ème} édition, 2009)

	Stade T	Critères
	Tis	Carcinome in situ
Lèvres et cavité buccale	T1	$T \leq 2$ cm
	T2	$2 \text{ cm} < T \leq 4$ cm
	T3	$T > 4$ cm
	T4a lèvres	T franchissant l'os cortical, envahissant le nerf alvéolaire inférieur, le plancher buccal ou le revêtement cutané (nez ou menton)
	T4a cavité buccale	T franchissant l'os cortical, envahissant les muscles profonds/extrinsèques de la langue, le sinus maxillaire, ou le revêtement cutané de la face.
	T4b lèvres et cavité buccale	T envahissant l'espace masticateur, les lames ptérygoïdes, ou la base du crâne, ou l'artère carotide interne.
Oropharynx	T1	$T \leq 2$ cm dans sa plus grande dimension
	T2	$2 \text{ cm} < T \leq 4$ cm dans sa plus grande dimension
	T3	$T > 4$ cm dans sa plus grande dimension ou extension à la face linguale de l'épiglotte
	T4a	T envahissant une ou plusieurs des structures suivantes: le larynx, les muscles profonds/extrinsèques de la langue, le ptérygoïde médian, le voile dur ou la mandibule.
	T4b	T envahissant une ou plusieurs des structures suivantes: le muscle ptérygoïde latéral, les lames ptérygoïdes, le nasopharynx latéral, la base du crâne, ou l'artère carotide interne
Hypopharynx	T1	T limitée à un des sites de l'hypopharynx et/ou ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
	T2	T envahissant plus d'un site de l'hypopharynx, ou un site adjacent, ou mesurant $2 \text{ cm} < T \leq 4$ cm dans sa plus grande dimension, sans fixation de l'hémilarynx
	T3	$T > 4$ cm dans sa plus grande dimension ou avec fixation de l'hémilarynx ou extension à l'œsophage
	T4a	T envahissant une ou plusieurs des structures suivantes: cartilage thyroïde ou cricoïde, os hyoïde, thyroïde, œsophage ou parties molles (graisse souscutanée, muscles pré-laryngés)
	T4b	T envahissant les fascias prévertébraux, l'artère carotide interne ou les structures médiastinales
Larynx, région sus-glottique	T1	T limitée à un site anatomique avec mobilité normale des cordes vocales

	T2	T envahissant la muqueuse de plus d'un site anatomique, ou la glotte ou une région en dehors de la région sus glottique (par exemple, muqueuse de la base de langue, vallécule, paroi médiane du sinus piriforme) sans fixation du larynx
	T3	T limitée au larynx avec fixation d'une ou des cordes vocales, et/ou envahissant une ou plusieurs des structures suivantes : région rétro-cricoïdienne, espace pré-épiglottique, espace para-glottique, et/ou face interne du cartilage thyroïde
	T4a	T franchissant le cartilage thyroïde et/ou envahissant les tissus au-delà du larynx (par exemple, trachée, tissus mous du cou incluant les muscles profonds/extrinsèques de la langue, muscles sous-hyoïdiens, thyroïde, œsophage)
	T4b	T envahissant l'espace prévertébral, l'artère carotide interne ou les structures médiastinales
Larynx, région glottique	T1	T limitée à une ou aux deux cordes vocales (pouvant intéresser la commissure antérieure ou postérieure) avec mobilité normale
	T1a	T limitée à une corde vocale
	T1b	T intéressant les deux cordes vocales
	T2	T étendue à la région sus-glottique ou sous-glottique, et/ou avec diminution de mobilité des cordes vocales
	T3	T limitée au larynx avec fixation des cordes vocales et/ou envahissant l'espace paraglottique et/ou la face interne du cartilage thyroïde
	T4a	T franchissant la face externe du cartilage thyroïde et/ou étendue au delà du larynx (trachée, tissus mous du cou incluant les muscles profonds/extrinsèques de la langue, muscles sous-hyoïdiens, thyroïde, oesophage)
	T4b	T envahissant l'espace prévertébral, l'artère carotide interne ou les structures médiastinales
Larynx, région sous-glottique	T1	T limitée à la sous-glotte
	T2	T étendue à une ou aux deux cordes vocales avec mobilité normale ou diminuée
	T3	T limitée au larynx avec fixation d'une corde vocale
	T4a	T envahissant le cartilage thyroïde ou cricoïde et/ou étendue au delà du larynx (trachée, tissus mous du cou incluant les muscles profonds/extrinsèques de la langue, muscles sous-hyoïdiens, thyroïde, oesophage)
	T4b	T envahissant l'espace prévertébral, l'artère carotide interne ou les structures médiastinales

	Stade N	Critères
Toute localisation tumorale confondue	NX	Pas d'évaluation
	N0	Pas de métastase
	N1	1 seul ganglion homolatéral ≤ 3 cm
	N2-N2a	1 seul ganglion homolatéral > 3 et ≤ 6 cm
	N2b	multiples ganglions homolatéraux ≤ 6 cm
	N2c	ganglions bilatéraux et/ou controlatéraux ≤ 6 cm
	N3	ganglion(s) > 6 cm
	Stade M	Critères
Toute localisation tumorale confondue	MX	Pas d'évaluation
	M0	Pas de métastase à distance
	M1	Métastase à distance

Annexe 2 : Protocole PAPILLOR



Institut de Cancérologie de Lorraine

Etude de la concordance du génotype des papillomavirus humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR	Dr Julie Guillet Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de bourgogne CS 30519 54 519 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Email : j.guillet@nancy.unicancer.fr Tel : 03.83.59.84.47
PROMOTEUR	Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de bourgogne CS 30519 54 519 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex Tel : 03 83 59 84 00 – Fax : 03 83 59 83 76

1. Objectifs détaillés de la Recherche

a) Objectif principal

L'objectif principal est d'étudier la concordance du génotype des HPV au niveau génital et oral chez les femmes doublement infectées

b) Objectifs secondaires

- Evaluer la concordance complète et partielle du génotype.
- Evaluer la proportion de femmes présentant un HPV au niveau oral dans une population de femmes infectées au niveau génital
- Evaluer la proportion de femmes présentant un HPV haut risque au niveau oral dans une population de femmes infectées au niveau génital
- Décrire l'ensemble des types d'HPV sur les deux sites
- Rechercher les facteurs de risque d'HPV oral dans une population de femmes infectées au niveau génital
- Evaluer la persistance et la clairance de l'infection HPV au niveau oral
- Evaluer la fréquence des femmes nouvellement porteuses d'un HPV oral à 6 mois.

2. Critères d'évaluation

a) Critère principal

La concordance du génotype est définie par la présence d'au moins un type d'HPV identique entre le niveau oral et génital chez la même femme. L'ensemble des génotypes retrouvés au niveau génital et oral sera considéré.

b) Critères secondaires

- La concordance est considérée comme complète si les mêmes types d'HPV ont été détectés sur les deux sites ou partielle lorsque au moins 1 mais pas tous les types d'HPV ont été détectés sur les deux sites.
- Les facteurs de risque d'HPV oral suivant seront analysés : tabagisme actuel ou passé, consommation régulière d'alcool, nombre de partenaire sexuels, comportements sexuels à risque.
- La persistance de l'infection sera définie par la détection du même génotype d'HPV oral entre les deux tests. La clairance sera un premier prélèvement oral HPV positif puis le prélèvement à 6 mois négatif.

3. Sélection des participants à la recherche

a) Critères d'inclusion

- Néoplasies intra-épithéliales cervicales de haut grade (CIN 3), de carcinome in situ (CIS) ou de cancer invasif du col utérin prouvé histologiquement
- Patiente ayant un HPV au niveau génital
- Patientes non vaccinées contre le HPV
- Age >18 ans.
- OMS ≤ 3
- Patiente affiliée au régime de la sécurité sociale
- Information de la patiente et signature du consentement éclairé

b) Critères de non-inclusion

- Patiente vaccinée contre HPV (Gardasil®, Cervarix®)
- Femme enceinte de plus de 10 semaines de grossesse
- Patiente privée de liberté ou placée sous tutelle
- Patiente ayant bénéficié d'une radiothérapie cervico-faciale datant de moins d'un an

c) Population étudiée et faisabilité

L'étude sera proposée aux femmes nouvellement prises en charge dans un centre spécialisé suite à la découverte d'une néoplasie intra-épithéliale de haut grade (CIN3), d'un carcinome in situ (CIS), ou d'un cancer invasif du col utérin () suite à un dépistage du cancer du col de l'utérus, et ayant un dépistage à HPV positif. .

A la maternité régionale du CHU de Nancy, 150 femmes par an bénéficient d'une conisation pour le traitement d'une néoplasie intra-épithéliale cervicale de haut grade (CIN 3), d'un carcinome in situ (CIS) ou d'un cancer invasif du col utérin. A cela s'ajoutent les patientes traitées à l'Institut de Cancérologie de Lorraine. En considérant une période de recrutement de deux ans, moins d'une patiente sur deux devra donc accepter de participer à l'étude.

4. Déroulement pratique de la recherche

Il s'agit d'une étude ouverte prospective multicentrique.

Après vérification des critères d'inclusion, dispensation de l'information et signature du formulaire de consentement, un numéro d'inclusion sera attribué à chaque patiente en se connectant sur le site clean web (<https://icl.tentelemed.com/Ctms-icl/portal/login>). Les patientes auront un frottis cervical et un frottis oral effectués le jour de l'inclusion. Les facteurs de risque d'une infection par HPV au niveau oral seront recherchés à l'aide d'un auto-questionnaire résumant les données démographiques et les comportements à risque. Cet auto-questionnaire ne sera pas joint au dossier médical de la patiente.

Un second frottis oral à 5-7 mois sera réalisé lors d'une visite de suivi standard.

Si le frottis s'avère positif, un retour sera fait de la part du médecin habilité à faire les prélèvements au médecin prenant en charge la patiente qui s'appliquera à donner les informations et recommandations nécessaires à la patiente.

a) Bilan d'inclusion

Le bilan d'inclusion comprendra :

Le recueil du consentement éclairé signé après information de la patiente

Le recueil, la vérification et la validation des critères d'inclusion/exclusion

L'examen clinique initial

Le remplissage d'un questionnaire anonyme sur les antécédents et les pratiques sexuelles des patientes

b) Prélèvements

Les patientes auront :

- à J 0 (correspondant au jour de l'inclusion de la patiente dans l'étude): un frottis cervico-utérin et un frottis oral qui seront effectués par le médecin en charge de la patiente, à l'aide d'une cytobrosse.

- J + 5 à 7 mois : un frottis oral sera effectué à l'aide d'une cytobrosse dans le cadre du suivi gynécologique de la patiente.

Tous les prélèvements seront acheminés en flux tendu et à température ambiante au Laboratoire de Virologie – CHU Nancy (Dr V. Vénard, Hôpital Central - CHU Nancy-Brabois, rue de Neufchâteau, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy) via un transporteur désigné par le promoteur. Le génotypage d'HPV sera réalisé grâce à une trousse commerciale (INNO-LIPA® HPV GENOTYPING EXTRA, Fujirebio Diagnostic AB, France) selon les instructions décrites par le fournisseur.

c) Sortie d'étude

Les critères de sortie d'étude sont :

Apparition d'un second cancer nécessitant une radiothérapie cervico-faciale

Vaccination contre HPV au cours de l'étude

La patiente pourra sortir de l'étude à tout moment si elle retire son consentement sur simple demande.

d) Durée de l'étude

- Durée des inclusions : 24 mois

Durée de suivi des patientes : 5-7 mois

Durée globale de l'étude : 31 mois

e) Tableau récapitulatif du déroulement de l'essai

PÉRIODE	INCLUSION	5 À 7 MOIS APRÈS LE PREMIER FROTIS
Information et signature du consentement éclairé	X	
Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion	X	

Examen clinique initial	X	
frottis cervical	X	
frottis oral	X	x
Auto-questionnaire	X	

5. Bénéfices et risques pour les personnes se prêtant à la recherche

a) Bénéfices

Il y existe un bénéfice individuel direct pour les patientes participant à l'étude. Les résultats des génotypes des frottis cervico-utérin et buccaux seront transmis aux patientes par le médecin qui les prend en charge dans le cadre de leur maladie, dans un délai de 4 semaines suivant la réalisation des frottis. Ces patientes seront informées et conseillées par leur médecin sur les recommandations à adopter (prévention, soins bucco-dentaires, visite gynécologique...). A ce titre, un dépliant résumant les soins et les moyens de prévention à adopter lorsqu'une femme est porteuse d'une infection orale par HPV sera donné à la patiente par le médecin.

D'autre part, cette étude permettra d'évaluer la pertinence de la mise en place d'un dépistage d'HPV oral systématique chez les femmes qui présentent des HPV au niveau génital. En effet, à l'issue de cette étude, le pourcentage de femmes porteuses d'un HPV oral dans cette population de femmes infectées par un HPV génital sera connu. Dans un second temps, la balance coût/bénéfice pourra être étudiée. D'autre part, cette étude permettra de mieux connaître le degré de dépendance de ce virus entre les deux localisations et d'améliorer la compréhension des modalités de transmission. Les résultats de l'étude pourraient ainsi influencer la stratégie vaccinale contre HPV.

b) Risques

Certaines femmes ont un ressenti désagréable lors d'un frottis au niveau génital. Cependant, cet examen est habituellement indolore. De petits saignements sans gravité peuvent se produire à la suite des prélèvements.

Les risques liés à un frottis au niveau oral sont inexistant.

Le frottis n'entraîne aucun risque d'évolution ou de dissémination de la maladie.

6. Aspects statistiques

a) Nombre de sujets nécessaires

L'objectif est d'obtenir 30 patientes doublement infectées. Ce nombre de 30 patients se justifie comme suit en se basant sur la précision de l'estimation par intervalle de confiance à 95% de la concordance du génotype d'HPV entre le niveau oral et génital.

D'après Steinau et al., (2014), on peut estimer que 50% des femmes doublement porteuses seront concordantes pour au moins un type d'HPV entre le niveau oral et génital. Si cette donnée se vérifie dans notre population, nous serons en mesure de démontrer que la fréquence inconnue des femmes présentant une concordance sur le type d'HPV entre le niveau génital et oral est comprise entre 33% et 66%.

D'après la méta-analyse de Termine et al. (2011), on peut estimer que 20% des femmes ayant un HPV au niveau génital présentent également un HPV oral. Afin d'obtenir 30 patientes avec un double portage, 150 patientes avec un portage HPV au niveau génital devront donc être incluses.

D'après Guan et al.(2012) environ 10% des patientes avec des néoplasies intra-épithéliales cervicales de haut grade (CIN 3), de carcinome in situ (CIS) ou de cancer invasif du col utérin prouvé histologiquement pourront ne pas présenter d'HPV au niveau génital lors du premier frottis. Ces patientes ne pourront donc pas être analysées pour les objectifs de cette étude et seront donc **considérées comme des « screening failure »**. Afin d'obtenir 150 patientes analysables, il sera nécessaire de cibler 165 patientes.

b) Analyse statistique

Pour l'objectif principal :

La concordance du génotype sera quantifiée par le pourcentage et son intervalle de confiance à 95% des femmes présentant au moins un type d'HPV identique entre le niveau buccal et génital. Ce calcul sera effectué chez les femmes doublement infectées.

Pour les objectifs secondaires :

La concordance complète du génotype sera quantifiée par le pourcentage de femmes présentant les mêmes types d'HPV sur les deux sites. La concordance partielle du génotype sera quantifiée par le pourcentage des femmes présentant au moins 1 type mais pas tous les types d'HPV identiques entre les deux sites. Ces pourcentages seront calculés sur le nombre de femmes doublement infectées et seront accompagnés de l'intervalle de confiance à 95%.

Le pourcentage de femmes ayant un HPV oral au sein de la population de l'étude (les femmes ayant un HPV au niveau génital) sera calculé ainsi que son intervalle de confiance à 95%.

Les facteurs de risque d'HPV oral seront recherchés. Pour ce faire, des analyses bivariées seront réalisées par des tests du Chi-deux ou du Fisher Exact. Les paramètres ayant un niveau de significativité inférieur à 0.2 en analyses bivariées seront introduits dans un modèle de régression logistique multivariée. La simplification de ce modèle sera effectuée par une procédure de sélection pas à pas avec remise en cause. La stabilité du modèle final sera vérifiée par la méthode du Bootstrap (Sauerbrei et al., 1992).

La persistance de l'infection, la clairance ainsi que la fréquence des femmes nouvellement porteuse d'un HPV buccal à 6 mois seront décrits avec l'intervalle de confiance à 95%. Un test de Mac Nemar sera effectué sur le statut HPV au niveau génital entre J0 et 6 mois pour en étudier l'évolution.

Une description par type d'HPV sur les deux sites sera effectuée. En fonction des effectifs, des sous-analyses ou des analyses de sensibilités pour les HPV à haut risque seront effectuées.

Fiche 1 : Notice d'information patiente

Etude de la concordance du génotype des papillomavirus humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital

PAPILLOR

N° ID RCB : 2015-A00594-45

Promoteur : Institut de Cancérologie de Lorraine

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandœuvre-lès-Nancy

Investigateur Coordonnateur : Dr Julie Guillet

Institut de Cancérologie de Lorraine

6 Avenue de Bourgogne CS 30519 – 54519 Vandœuvre-lès-Nancy

Madame,

Votre médecin vous propose de participer à une étude visant à évaluer le risque de transmission du virus HPV présent au niveau du col de l'utérus vers la bouche et la gorge. Avant de vous décider à participer à cette étude, il est important que vous en compreniez les objectifs.

Vous présentez une infection par HPV (Papillomavirus Humains) au niveau génital, ayant entraîné une lésion pré-cancéreuse ou cancéreuse sur votre col utérin. Ces virus, dont il existe plusieurs types, peuvent aussi infecter les muqueuses de votre bouche et/ou de votre gorge, c'est pourquoi nous vous proposons de les rechercher.

Vous pouvez poser à votre médecin toutes les questions qui pourraient vous venir à l'esprit. Vous devez prendre le temps de réfléchir et vous pouvez discuter de cette participation avec les membres de votre famille, vos amis ou votre médecin traitant.

➤ **Quel est l'objectif de l'étude ?**

Il existe plusieurs types d'HPV. Certains d'entre eux sont susceptibles de provoquer le développement de lésions pré-cancéreuses ou de cancers, au niveau du col de l'utérus, de la bouche ou de la gorge.

Sachez que toutes les infections par HPV n'entraînent pas systématiquement l'apparition de lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses. Au niveau génital, il peut exister une élimination spontanée de ce virus par votre système immunitaire. Il est possible qu'il en soit de même au niveau buccal. Selon le type d'HPV dont vous êtes porteuse, l'élimination peut être plus ou moins rapide.

L'objectif de cette étude est d'identifier le(s) type(s) d'HPV présent(s) au niveau du col de l'utérus et dans la bouche, et d'essayer d'en comprendre les modes de transmission.

➤ **Qu'est-ce que votre participation à l'étude implique pour vous ?**

En participant à cette étude, vous acceptez que les données médicales vous concernant soient recueillies et analysées. Le traitement de votre maladie ne sera pas modifié que vous acceptiez ou non de participer à l'étude.

La transmission de ce virus se fait essentiellement par contact, et c'est la voie sexuelle qui semble la plus incriminée. Nous avons donc besoin de renseignements concernant vos antécédents et vos habitudes de vie. Le questionnaire que vous devrez remplir dans le cadre de cette étude est anonyme et ne comportera jamais votre nom. Nous vous conseillons de le compléter seule. Nous vous demandons d'y répondre le plus honnêtement possible. Ce questionnaire ne figurera pas dans votre dossier médical étant donné son caractère confidentiel. Votre médecin est bien sûr à votre disposition pour répondre à vos questions.

Par ailleurs, plusieurs prélèvements seront réalisés au cours de l'étude (1 frottis génital et 2 frottis buccaux).

➤ **Quel est le déroulement de l'étude ?**

Vous bénéficierez d'un frottis gynécologique standard et d'un frottis de bouche, sur lesquels une recherche d'HPV sera effectuée.

Le frottis buccal est indolore et très rapide. Le résultat de la recherche virale effectuée sur le prélèvement sera comparé à celui de votre frottis gynécologique. Un deuxième frottis de bouche sera effectué environ 6 mois après le premier lors d'une visite de contrôle dans le cadre de votre prise en charge, et afin de vérifier si le « statut HPV » de votre bouche a changé : positif devenu négatif ou vice-versa. Vous serez tenue informée des résultats de ces prélèvements par votre médecin.

Tous les prélèvements seront analysés au Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy-Brabois (Laboratoire de Virologie - Hôpital Adultes CHU de Nancy Brabois 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy, Dr Venard, chef de service).

➤ **Combien de personnes participeront à cette étude ?**

165 patientes seront nécessaires afin d'obtenir un résultat pertinent.

➤ **Quelle est la durée de votre participation à cette étude ?**

La durée de votre participation à cette étude sera d'environ 6 mois, du jour du premier frottis au second prélèvement.

➤ **Quels sont les bénéfices attendus ?**

Cette étude pourrait permettre d'apporter des informations sur la nécessité de la mise en place d'un dépistage systématique d'HPV au niveau de la bouche chez les femmes infectées au niveau génital.

Elle pourrait également apporter une aide dans la compréhension des modes de transmission du virus. Enfin, les résultats de l'étude pourraient ainsi influencer la stratégie vaccinale contre HPV.

➤ **Quels sont les risques possibles ?**

Les risques liés à un frottis de la bouche sont inexistants.

➤ **Vos droits**

Vous n'êtes en aucun cas obligée de prendre part à l'étude. Vous êtes libre d'accepter ou de refuser cette étude. Si vous accepter, vous êtes libre de changer d'avis à tout moment sans aucun préjudice pour la prise en charge de votre maladie.

Après analyse de toutes les données pour toutes les patientes, vous serez informée des résultats globaux de cette étude par l'intermédiaire du médecin qui vous suit dans le cadre de cette étude si vous en faites la demande.

➤ **Aspect confidentiel des données**

Les informations vous concernant sont strictement confidentielles et anonymisées. Les données vous concernant enregistrées à l'occasion de cette étude feront l'objet d'un traitement informatisé par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Conformément à la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, modifiées par la loi n°2004-801 du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification concernant vos données. Vous pourrez exercer ces droits à tout moment auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de cette étude.

L'Institut de Cancérologie de Lorraine est propriétaire des données, en contrôlera l'utilisation et prendra toutes les mesures nécessaires pour en assurer la protection.

Cette étude est réalisée conformément aux dispositions du Code de la Santé Publique relatives aux recherches biomédicales. Dans ce cadre, elle a reçu

- l'avis favorable du Comité de Protection de Personnes CPP EST III en date du xx/xx/2014.

Une autorisation auprès de l'ANSM en date du

Le promoteur a souscrit une assurance garantissant sa responsabilité civile pour couvrir les éventuelles conséquences préjudiciables de cette étude (NOM A PRECISER).

➤ **Des questions ?**

L'étude est menée dans votre établissement de soins sous la responsabilité du Docteur.....

Celui-ci reste à votre disposition pour vous donner les renseignements complémentaires.

Fiche 2 : Formulaire De Consentement

Etude de la concordance du génotype des papillomavirus humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital

PAPILLOR

N° ID RCB : 2015-A00594-45

Promoteur

Institut de Cancérologie de Lorraine
6 Avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy

Investigateur Coordonnateur

Dr Julie Guillet
Institut de Cancérologie de Lorraine - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy

Je, soussignée,

Prénom et Nom :

Adresse.....

reconnais avoir été informée par le Docteur.....de l'objet et des modalités de l'étude qui m'est proposée, et accepte, en toute connaissance de cause et en toute liberté, d'y participer.

Il m'a été remis une note d'information concernant cette étude. Son objectif, ses contraintes et sa durée de réalisation m'ont été clairement expliqués, et j'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais.

Je comprends que je suis libre d'accepter ou non de participer à cette étude, et que je peux demander à tout moment de m'en retirer sans avoir à en préciser les raisons, et sans compromettre la qualité des soins qui continueront à m'être prodigués, ni ma relation avec l'équipe soignante. La signature de ce consente-

ment ne décharge en rien l'Institut de Cancérologie de Lorraine de ses responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par les lois.

Je confirme être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime.

J'ai bien noté que les données me concernant resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation qu'aux membres de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, leurs représentants, tout prestataire sous contrat avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine et aux différentes autorités réglementaires à condition que l'Institut de Cancérologie de Lorraine s'engage à faire respecter la confidentialité des données conformément à la loi n°78-17 du 06 janvier 1978.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette étude fassent l'objet d'un traitement informatisé par l'Institut de Cancérologie de Lorraine ou pour son compte. J'ai bien noté que mon droit d'accès et de rectification prévu par la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, modifiée par la loi n°2004-801 du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel, s'exerce à tout moment auprès de l'Institut de Cancérologie de Lorraine par l'intermédiaire du médecin qui me suit pour cette étude.

J'accepte librement de participer à cette étude dans les conditions précisées dans ce document.

J'ai bien noté qu'il me sera remis un exemplaire du présent formulaire de consentement signé.

La patiente	Le médecin participant
Nom/Prénom (en lettre capitales):	Nom/Prénom (en lettre capitales):
Date :.....	Date :.....
Signature de la patiente :	Signature

Fiche 3 : Auto-questionnaire patiente

Etude de la concordance du génotype des papillomavirus humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital

PAPILLOR

N° ID RCB : 2015-A00594-45

Le questionnaire que vous devrez remplir dans le cadre de cette étude est totalement anonyme. Il ne comportera jamais votre nom et ne sera pas inclus dans votre dossier médical. Nous vous conseillons de le compléter seule et vous demandons d'y répondre le plus honnêtement possible. Votre médecin est bien sûr à votre disposition pour répondre à vos questions.

Date d'aujourd'hui :/...../.....

1. Votre âge : ans

2. Avez-vous fumé: ☐ Oui ☐ Non

Si oui, combien de cigarettes en moyenne par jour ?/jour

Pendant/depuis combien de temps ? ans

3. Consommez-vous de l'alcool quotidiennement ? ☐ Oui ☐ Non

Si oui, combien de verres par jour ?/jour

4. Avez-vous une activité sexuelle ? ☐ Oui ☐ Non

Si oui, à quel âge avez-vous eu votre premier rapport sexuel ? ans

5. Avez-vous un partenaire sexuel actuellement : ☐ Oui ☐ Non

Si oui, depuis combien de temps :

☐ moins d'1 mois
 ☐ 1 à 6 mois
 ☐ 6 à 12 mois
 ☐ plus d'1 an

6. Combien de partenaires sexuels différents avez-vous eu ? :

☐ 1
 ☐ de 2 à 5
 ☐ de 5 à 10
 ☐ plus de 10

7. Sur de courtes périodes (1 à 3 mois), vous est-il arrivé d'avoir plusieurs partenaires?

☐ Oui
 ☐ Non

8. Avez-vous déjà pratiqué la fellation (rapport bouche-sexe) ? ☐ Oui ☐ Non

Si oui, avec combien de partenaires : ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ou plus

9. Au cours des 6 derniers mois, vous avez utilisé un préservatif :

	Toujours	Souvent	Parfois	Jamais	Non concernée
Lors des rapports sexuels avec pénétration (vaginale ou anale)	☐	☐	☐	☐	☐
Lors des rapports sexuels avec fellation (rapport bouche -sexe)	☐	☐	☐	☐	☐

10. Avez-vous déjà eu une maladie sexuellement transmissible telle que « Blennorrhagie gonococcique, Chlamydie, Herpès génital, Syphilis, Infections à mycoplasme ou à trichomonas, etc... » ?

☐ Oui
 ☐ Non

Si oui, laquelle ?

11. Avez-vous un suivi gynécologique régulier par un médecin (1 fois par an) ?

☐ Oui
 ☐ Non
☐ C'est ma 1^{ère} consultation

12. Avez-vous déjà eu une lésion génitale due aux Papillomavirus : verrue génitale, condylome ou lésion pré-cancéreuse du col utérin ? ☐ Oui ☐ Non

Fiche 4 : Recommandations à destination des patientes infectées par HPV au niveau oral

Etude de la concordance du génotype des papillomavirus humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital
--

PAPILLOR

N° ID RCB : 2015-A00594-45

Promoteur

Institut de Cancérologie de Lorraine
6 Avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy

Investigateur Coordonnateur

Dr Julie Guillet
Institut de Cancérologie de Lorraine - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy

Madame,

Vous avez accepté de participer à l'étude PAPILLOR qui vise à rechercher la présence de Papillomavirus Humains (HPV) dans votre bouche.

Votre frottis buccal a montré une infection par HPV.

Sachez que toutes les infections par HPV n'entraînent pas systématiquement l'apparition de lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses. Comme vous le savez, vous bénéficierez d'un second frottis dans environ 6 mois afin de vérifier si vous êtes toujours porteuse de ce virus.

Au niveau génital, il peut exister une élimination spontanée de ce virus par votre système immunitaire. Il est possible qu'il en soit de même au niveau buccal. Selon le type d'HPV dont vous êtes porteuse, l'élimination peut être plus ou moins rapide.

Nous vous conseillons donc une surveillance régulière (2 fois par an) chez votre médecin traitant ou votre chirurgien dentiste habituel, afin de vérifier l'absence de lésions dans votre bouche. Ces lésions ne sont pas forcément des lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses, il peut s'agir de petites lésions bénignes comme des papillomes.

N'hésitez pas à contacter le médecin qui vous a remis cette note et qui reste à votre disposition pour répondre à vos questions.

Fiche 5 : Procédure de gestion et de collecte des frottis

1. Objet

Décrire les différentes étapes pour la gestion et le stockage des frottis de patientes incluses dans l'essai PAPILLOR.

2. Domaine d'application

Cette procédure s'applique à l'essai clinique PAPILLOR, promu par l'institut de Cancérologie de Lorraine ICL (loi n°88-1138 du 20 décembre 1988 dite Huriet-Sérusclat relative à la Protection des Personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales, modifiée par la loi de santé publique n°2004-806 du 09 août 2004, BPC).

3. Attribution d'un n° d'enregistrement

Avant toute réalisation de frottis, un n° d'enregistrement doit être attribué à chaque patiente éligible ayant consenti à participer à l'étude.

Pour ce faire, l'investigateur ou une personne désignée par l'investigateur devra compléter le formulaire d'enregistrement de la patiente via l'eCRF et l'outil CleanWeb© (<https://icl.tentelemed.com/Ctms-icl/portal/login>), après vérification des critères de sélection et signature par la patiente et l'investigateur de la Note d'Information et Consentement destinée aux personnes participant au protocole de recherche PAPILLOR.

- ***Ce numéro d'enregistrement devra être noté sur chaque flacon***

4. Kits nécessaires pour les prélèvements

Un kit par patiente regroupant l'ensemble des flacons, brosses de prélèvement (cytobrosse) et étiquettes nécessaires sera fourni par l'ICL, et doit être obligatoirement utilisé par le centre pour chaque patiente ayant reçu un n° d'enregistrement.

- ***Les étiquettes doivent être complétées entièrement avant d'être collées sur les flacons.***

5. Calendrier et Procédure des prélèvements

Pour toutes les patientes incluses dans l'étude

Un frottis génital et deux frottis buccaux seront réalisés au cours de l'essai

Ces prélèvements sont à effectuer :

à J 0 (jour de l'inclusion de la patiente dans l'étude): un frottis cervico-utérin et un frottis oral seront effectués par le médecin en charge de la patiente, à l'aide d'une cytobrosse (Rovers®Cervex-Brush®).

J + 5 à 7 mois : un frottis oral sera effectué à l'aide d'une cytobrosse dans le cadre du suivi gynécologique de la patiente. L'ensemble de ces frottis seront réalisés au sein de la maternité régionale universitaire de Nancy (10 avenue docteur Heydenreich, Nancy).

Procédure détaillée

Tous les prélèvements seront acheminés en flux tendu et à température ambiante au Laboratoire de Virologie – CHU Nancy (Dr V. Vénard, Hôpital Central - CHU Nancy-Brabois, rue de Neufchâteau, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy) via un transporteur désigné par le promoteur. Le génotypage d'HPV sera réalisé grâce à une trousse commerciale (INNO-LIPA® HPV GENOTYPING EXTRA, Fujirebio Diagnostic AB, France) selon les instructions décrites par le fournisseur.

Fiche 6 : Fiche fournisseur de la trousse commerciale INNO-LIPA® HPV GENOTYPING EXTRA, Fujirebio Diagnostic AB, France

Line probe assay, based on the reverse hybridization principle, designed for the identification of 28 different genotypes of the human papillomavirus (HPV) by detection of specific sequences in the L1 region of the HPV genome. The assay uses the proven SPF10* primer set for the highly sensitive amplification of most clinically relevant HPV genotypes. The assay covers all currently known high-risk HPV genotypes and probable high-risk HPV genotypes (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) as well as a number of low-risk HPV genotypes (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) and some additional types (69, 71, 74).

* For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

NOTE: This product is sold under licensing arrangements between Innogenetics N.V. and Invitrogen IP Holdings, Inc. The purchase price of this product includes limited, nontransferable rights under European Patent Numbers 0401037; 0522884; and 0415755 and corresponding foreign patents, other than United States patents, owned by Invitrogen Corporation to use only this amount of the product to practice the claims in said patents solely for activities of the purchaser in detection of human papillomavirus (HPV) within the field of human diagnostics. No other rights are conveyed.

Patent protected: EP patent 1012348B; US patent 6,482,588B.

One strip – one test for the identification of the most relevant HPV genotypes

- **Genotypes**

- o Detects 28 HPV genotypes
- o SPF10 provides high sensitivity due to the precision of the short 65-base pair PCR product
- o HPV types identified by INNO-LiPA™ HPV Genotyping Extra:
 - High risk: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 Probable high risk: 26, 53, 66
Low risk: 6, 11, 40, 43, 44, 54, 7 Additional types: 69, 71, 74
- o SPF10 permits simultaneous detection of multiple genotypes in a single sample

- **Controls**

Special HPV control lines to confirm and detect the presence of a broad range of mucosal HPV genotypes plus additional controls to monitor sample processing (hDNA line, conjugate control line).

- **Streamlining**

Easy and ready-to-use master mix, with Taq DNA polymerase provided for minimum manipulation steps and hands-on time

- **Applications**

- o Proven quality performance on cervical scrapes and paraffin-embedded (FFPE) material ³
- High flexibility in testing algorithm with HPV Primer Mix SPF10 RUO Real-Time PCR application

- **Automation**

Fully automated processing of the strips is possible using Auto-LiPA™ 48 or AutoBlot 3000H (MedTec Inc.). Automated and objective interpretation of the strips is provided with LiRAS® for LiPA HPV v2 (Art. no. 81492, CE).

Fiche 7 : Notification d'un Événement Indésirable Grave - EIG

A faxer au 03 83 59 83 76

 Institut de Cancérologie de Lorraine Alexis Vautrin Ensemble, construisons l'avenir	FICHE DE DECLARATION D'ÉVENEMENT INDESIRABLE GRAVE A faxer dûment complétée dans <u>les 24 heures ouvrées</u> au 03.83.59.83.76	
Etude de la concordance du génotype des papillomavirus humains au niveau génital et oral dans une population de femmes infectées au niveau génital N° IDRCB : Investigateur Coordonnateur : Dr Julie Guillet , Institut de Cancérologie de Lorraine, 6, avenue de Bourgogne CS 30519 - 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Tél : 03.83.59.84.47 e-mail : j.guillet@nancy.unicancer.fr	☐ 1^{ère} notification Date : __ / __ / __ ☐ Rapport de suivi n°: __ Date : __ / __ / __	
Identification patiente Nom __ Prénom __ Date de naissance __ / __ / __ N° du centre __ N° Inclusion __ __ Poids (kg) __ __ __ Taille (cm) __ __ __	Critère de gravité ☐ décès ☐ mise en jeu du pronostic vital ☐ nécessité d'hospitalisation ☐ invalidité / incapacité temporaire ou permanente ☐ anomalie, malformation congénitale ☐ autres toxicités médicalement significatives	

Désignation de l'EIG

Date de l'événement __/__/__

Causalité établie par l'investigateur :

- ☐ Evénement raisonnablement lié au frottis
- ☐ Evénement raisonnablement lié à la procédure du frottis
- ☐ Evénement non lié à l'étude
- ☐ Ne peut se prononcer

Médicaments concomitants

Si nécessaire compléter sur une autre feuille

Nom

Forme Voie
Posologie Date de début
Date de fin

.....
.....__/__/__
__/__/__

.....
.....__/__/__
__/__/__

.....
.....__/__/__
__/__/__

.....
.....__/__/__
__/__/__

.....
.....__/__/__
__/__/__

Antécédents médicaux et chirurgicaux :

Dates

Fiche 8 : Liste des centres participants

EQUIPE	TITRE NOM PRENOM	INSTITUTION	SERVICE	ADRESSE	FONCTION
équipe 1	Dr Julie Guillet MCU-PH	Institut de Cancérologie de Lorraine UMR 7039 CNRS CRAN	Département de chirurgie cervico- faciale et odontologie	6, avenue de bourgogne 54 519 Vandœuvre- lès-Nancy Ce- dex	Investigateur principal
	Dr Shaghayegh Ameloot- Yaribaght	Institut de Cancérologie de Lorraine	Service de chirurgie	6, avenue de bourgogne 54 519 Vandœuvre- lès-Nancy Ce- dex	Investigateur
	Dr Gilles Dolivet	Institut de Cancérologie de Lorraine	Département de chirurgie cervico- faciale et odontologie	6, avenue de bourgogne 54 519 Vandœuvre- lès-Nancy, Ce- dex	Co-coordonnateur
	Pr Jean-Louis Merlin	Institut de Cancérologie de Lorraine	Unité de Biologie des Tumeurs	6, avenue de bourgogne 54 519 Vandœuvre- lès-NancyCe- dex	Collaborateur scientifique
équipe 2	Pr Philippe Judlin	Maternité Régio- nale Universitaire de Nancy	Service de Gynécologie	10 Avenue Docteur Heydenreich 54000 Nancy	Investigateur
	Dr Thierry Routiot	Maternité Régio- nale Universitaire de Nancy	Service de Gynécologie	10 Avenue Docteur Heydenreich 54000 Nancy	Co investigateur
	Dr Cécile Mezan de Malartic	Maternité Régio- nale Universitaire de Nancy	Service de Gynécologie	10 Avenue Docteur Heydenreich 54000 Nancy	Co investigateur
équipe 3	Dr Véronique Vénard	CHU Nancy Brabois	Laboratoire de Virologie	rue de Neuf- château 54511 Vandœuvre- lès-Nancy	Plateaux techniques

Liste des abréviations

5-FU	5-Fluoro-Uracile
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ASCUS	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BR-HPV	HPV à Bas Risque oncogène
CCTIRS	Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé
CE	Carcinome Epidermoïde
CE-OP	Carcinome Epidermoïde de l'OroPharynx
CIN	Cervical Intra-epithelial Neoplasia
CIS	Carcinome in Situ
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CPP	Comité de Protection des Personnes
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FFIP	Fixé au Formol et Inclus en Paraffine
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GIRCI	Groupement Inter-régional de Recherche Clinique et d'Innovation
HCSP	Haut Conseil de la Santé Publique
HPV	Papillomavirus Humains
HR-HPV	HPV à Haut Risque oncogène
IgG	Immunoglobuline G
IHC	Immuno-Histo-Chimie
IMRT	Radiothérapie à Intensité Modulée
LCR	Long Control Region
OP	Oropharynx
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHR-HPV	HPV Potentiellement à Haut Risque oncogène

qRT	quantitative Reverse Transcriptase
RB	Rétinoblastome
RITA	Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis
TNM	Tumor Node Metastasis
URR	Upstream Regulatory Region
VADS	Voies Aéro-Digestives Supérieures

Liste des figures

- Figure 1 : schéma des voies aéro-digestives supérieures
- Figure 2 : les caractéristiques communes des cellules cancéreuses
- Figure 3 : schéma de l'organisation génomique d'HPV 16
- Figure 4 : facteurs principaux conduisant à la sénescence (facteurs de Hayflick)
- Figure 5 : dérégulation du cycle cellulaire induit par les HPV
- Figure 6 : principe de discrimination allélique des sondes Taqman
- Figure 7: voies cellulaires affectées par les oncoprotéines virales E6 et E7, et petites molécules inhibitrices pouvant interférer

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des HPV selon leur pouvoir oncogène

Tableau II : Différences entre les carcinomes épidermoïdes (CE) des VADS HPV+ et HPV-

Tableau III : Synopsis de l'étude PAPILLOR

Les Papillomavirus Humains (HPV) sont responsables de près de 100% des cancers du col utérin. Récemment, ces HPV sont apparus comme étant aussi la cause de certaines tumeurs des voies aéro-digestives supérieures, et particulièrement des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx. En France, la proportion des tumeurs oropharyngées HPV-induites est mal connue, notamment parce que le dépistage viral n'est pas recommandé. De plus, il est difficile d'évaluer la proportion de tumeurs HPV positives dans les tumorothèques car les échantillons tumoraux sont fixés dans du formol puis incluses en paraffine (FFIP), ce qui complexifie les techniques de détection. Nous avons, au cours de nos travaux, testé une méthode de détection des HPV à haut risque oncogène indiquée pour le traitement des frottis en phase liquide. Nous l'avons mise à l'épreuve sur des prélèvements FFIP et comparée à la technique de référence qu'est la PCR (Polymerase Chain Reaction) suivie d'une électrophorèse sur gel. Nos résultats indiquent que cette technique est applicable aux prélèvements tissulaires et apparaît même comme étant plus sensible. En France, deux tiers des patients atteints de tumeurs des VADS sont pris en charge à des stades tardifs. Ceci s'explique en partie par l'absence de dépistage organisé de ces cancers. Nous avons donc mené une étude prospective sur des patients atteints d'une tumeur des VADS afin de tester le frottis oral comme technique de dépistage des cancers mais également des infections par les HPV. Nos résultats indiquent que le frottis a une spécificité proche de celle de la biopsie (94,4%) pour le dépistage des cancers des VADS, mais une moindre sensibilité (66,7%). Cette étude nous a permis de mettre en évidence une tumeur HPV-induite dans 12,2% des cas. Parmi eux, nous avons détecté grâce à un frottis buccal (en zone saine) une infection par un HPV à haut risque oncogène dans 53,3% des cas. L'OMS a classé les HPV comme agents carcinogènes depuis 1995, et a établi que les patientes ayant développé un cancer du col utérin avaient un risque 6 fois plus élevé de développer une autre tumeur HPV-induite. Dans ce contexte, nous avons prévu une étude prospective multi-centrique visant à dépister une infection orale par un HPV oncogène chez des patientes porteuses d'une lésion pré-néoplasique ou néoplasique du col utérin. Le taux de co-infection des deux sites anatomiques est inconnu chez les femmes infectées au niveau génital. Dans la mesure où l'infection orale pourrait être à l'origine d'une seconde localisation tumorale, il semble important d'en connaître la proportion afin de proposer par la suite un suivi particulier aux populations « à risque ». Au-delà des traitements des cancers avérés se pose la question de la vaccination préventive, qui existe contre les HPV 16 et 18 dans la prévention des cancers du col utérin. Le type 16 étant retrouvé dans 90% des tumeurs épidermoïdes de l'oropharynx HPV-induites, l'extension des recommandations vaccinales apparaît comme une nouvelle question de santé publique.

Mots-clés : Papillomavirus Humains, Frottis buccal, Cancer des VADS, Infection orale, Dépistage

The Human Papillomavirus (HPV) are involved in almost 100% of cervical cancers. Recently, HPVs have been recognized as the cause of tumors of the upper aerodigestive tract, especially of squamous cell carcinoma of the oropharynx. In France, the proportion of oropharyngeal HPV-related tumors is unknown, partly because viral testing is not in guidelines. Moreover, assess the proportion of HPV-positive tumors in tumor banks is difficult because the tumor samples were fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE), which complicates detection techniques. We tested a high risk HPV detection method, indicated for liquid based pap smear, on FFPE samples. We compared this technique to the gold-standard : PCR (Polymerase Chain Reaction) followed by electrophoresis. Our results indicate that this technique is applicable to FFPE samples and even appears to be more sensitive. The majority of French patients (2/3) with head and neck consult with an advanced stage of disease. This is explained in part by the lack of organized screening of these cancers, contrary to breast, prostate, cervical, or colorectal cancers. But an early treatment is essential to increase the survival rate. We therefore conducted a prospective study on patients with head and neck tumors to test the oral brushing as screening cancer and HPV detection. We found tumor and/or dystrophic cells in 97.8% of patients with biopsy, and in 88.9% of patients by brushing. Compared with biopsy, our results suggested that smear has similar specificity for HPV detection in tumors (94.4%), but lower sensitivity (66.7%). This study has shown an HPV-related tumor in 12.2% of cases. Among them, we detected by brushing (in healthy area) an oral infection by high-risk HPV in 53.3% of cases. WHO has classified HPV as carcinogenic agents since 1995, and determined that patients who developed cervical cancer are six-times more likely to develop another HPV-related tumor. In this context, we have planned a multicenter prospective study to detect oral HPV infection in patients with a pre-neoplastic or neoplastic lesion of the cervix. Co-infection rate of the two anatomical sites is unknown in women infected with genital level. Insofar oral infection could be the cause of a second tumor location, it seems important to know how much women are co-infected to propose thereafter a special monitoring. The preventive vaccination, which exists against HPV 16 and 18 in the prevention of cervical cancer, is a future perspective. Because HPV 16 is found in 90% of HPV-related squamous cell carcinoma of the oropharynx, extending vaccine recommendations emerge as a new public health issue.

Keywords : Human Papillomavirus, Oral smear, Head and neck cancer, Oral infection, Screening