

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ACP</b>	: Anatomie et Cytologie Pathologiques
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>BPV</b>	: <i>Bovine papillomavirus</i> (Papillomavirus bovin)
<b>c.à.d.</b>	: C'est-à-dire
<b>CD</b>	: Cluster de différenciation
<b>CE</b>	: Carcinome épidermoïde
<b>cf.</b>	: <i>Confer</i> (se référer à)
<b>DES</b>	: Diplôme d'Etudes Spécialisées
<b>dNTPs</b>	: <u>Désoxyribonucléosides Triphosphate</u>
<b>DPV</b>	: <i>Deer papillomavirus</i> (Papillomavirus des cervidés)
<b>EBV</b>	: Epstein-Barr Virus
<b>EGF</b>	: <i>Epidermal Growth Factor</i> (Facteur de croissance épidermique)
<b>FISH</b>	: <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> ( <u>Hybridation in situ en fluorescence</u> )
<b>GADPH</b>	: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>HALD</b>	: Hôpital Aristide Le Dantec
<b>H&amp;E</b>	: Hématoxyline et Eosine
<b>HPV</b>	: <i>Human papillomavirus</i> (Papillomavirus humain)
<b>HR-HPV</b>	: <i>High Risk - Human papillomavirus</i> (Papillomavirus humain de haut risque)

<b>IARC</b>	:	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Centre international de recherche sur le cancer)
<b>IHC</b>	:	Immunohistochimie
<b>ISH</b>	:	<i>In Situ Hybridization</i> (Hybridation in situ)
<b>Kpb</b>	:	Kilo paires de bases
<b>LR-HPV</b>	:	<i>Low Risk - Human papillomavirus</i> (Papillomavirus humain de bas risque)
<b>MALT</b>	:	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i> (Tissu lymphoïde associé aux muqueuses)
<b>MgCL2</b>	:	Chlorure de magnésium
<b>MTS1</b>	:	<i>Multiple Tumor Suppressor 1</i>
<b>OMS</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAS</b>	:	<i>Periodic acid-Schiff</i> (Acide périodique de Schiff)
<b>pb</b>	:	Paire de bases
<b>PCR</b>	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Amplification en chaîne par polymérase)
<b>pRb</b>	:	La protéine du rétinoblastome
<b>RT-PCR</b>	:	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<b>SPSS</b>	:	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>VADS</b>	:	Voies aéro-digestives supérieures
<b>VIH</b>	:	Virus de l'immunodéficience humaine

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Coupe anatomique sagittale médiane passant par les VADS.
- Figure 2** : Représentation de la localisation des sinus paranasaux au niveau de la face.
- Figure 3** : Vue postérieure d'une coupe anatomique frontale passant par le pharynx.
- Figure 4** : Situation anatomique des amygdales et représentation schématique de l'anneau de Waldeyer.
- Figure 5** : Configuration anatomique du larynx.
- Figure 6** : Coupe histologique d'un épithélium respiratoire.
- Figure 7** : Coupe histologique d'une muqueuse malpighienne non kératinisée au niveau des VADS.
- Figure 8** : Coupe histologique passant par l'épithélium intermédiaire au niveau du nasopharynx.
- Figure 9** : Coupe histologique au niveau d'une crypte amygdalienne.
- Figure 10** : Représentation schématique de l'organisation génomique d'un HPV.
- Figure 11** : Schéma simplifié de la cancérogenèse induite par les HPV de haut risque.
- Figure 12** : Coupe histologique d'un carcinome épidermoïde HPV-induit au niveau des amygdales.
- Figure 13** : Aspect microscopique caractéristique d'un carcinome épidermoïde des VADS associé au HPV.
- Figure 14** : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes des VADS en fonction de l'âge.
- Figure 15** : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes des VADS en fonction du sexe.
- Figure 16** : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes des VADS en fonction des habitudes alcoololo-tabagiques des patients et de leur sexe.

**Figure 17** : Les différents types de HPV retrouvés dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.

**Figure 18** : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes en fonction de leur siège précis au sein des VADS.

**Figure 19** : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale en fonction de leur localisation précise.

**Figure 20** : Le degré de différenciation des carcinomes épidermoïdes en fonction de leur statut HPV.

**Figure 21** : Le degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes en fonction de leur statut HPV.

**Figure 22** : Données de la PCR pour la recherche du HPV.

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** : Classification des HPV.
- Tableau II** : Distribution des différents types de HPV selon leur tropisme.
- Tableau III** : Classification des HPV selon leur potentiel oncogène.
- Tableau IV** : Avantages et inconvénients des principales techniques de détection des HPV au niveau des tissus.
- Tableau V** : Classification histologique des tumeurs épithéliales malignes primitives au niveau des VADS.
- Tableau VI** : Caractéristiques histopathologiques des carcinomes épidermoïdes oropharyngés conventionnels (non associés aux HPV) *versus* carcinomes épidermoïdes oropharyngés associés aux HPV.
- Tableau VII** : La terminologie couramment utilisée dans le diagnostic des carcinomes épidermoïdes associés aux HPV des VADS est sujette à confusion et prête à de fausses interprétations.
- Tableau VIII** : Détails des séquences nucléotidiques des amorceuses utilisées pour la recherche des HPV.
- Tableau IX** : Prévalence des carcinomes épidermoïdes associés aux HPV par site anatomique précis au sein des VADS.
- Tableau X** : Prévalence des carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS dans les études ayant adopté une méthodologie similaire à la nôtre.
- Tableau XI** : Prévalence des carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS dans la race noire.

# S O M M A I R E

**Introduction .....** ..... 17

## Première partie : rappels et revue de la littérature

<b>I. Rappel anatomique sur les voies aéro-digestives supérieures .....</b>	20
I.1. Le tractus sino-nasal .....	20
I.2. La cavité orale .....	22
I.3. Le pharynx .....	22
I.3.1. Le nasopharynx .....	24
I.3.2. L'oropharynx .....	24
I.3.3. L'hypopharynx .....	25
I.4. Le larynx .....	26
<b>II. Rappel histologique sur la muqueuse des VADS .....</b>	29
II.1. Structure de base d'un épithélium de type respiratoire .....	29
II.2. Structure de base d'un épithélium épidermoïde .....	31
II.3. Topographie de la répartition des muqueuses respiratoire et malpighienne au sein des VADS .....	32
II.4. Particularités de la zone d'affrontement entre les épithéliums respiratoire et épidermoïde et caractéristiques de l'épithélium cryptique amygdalien .....	33
<b>III. Rappels virologiques .....</b>	36
III.1. Historique – Généralités .....	36
III.2. Structure et organisation génomique des HPV .....	37
III.3. Classification des HPV .....	39
III.3.1. Classification basée sur le séquençage génomique .....	39
III.3.2. Classification basée sur le tropisme tissulaire .....	43

III.3.3.	Classification basée sur le potentiel oncogène .....	43
III.4.	Les protéines virales .....	44
III.4.1.	Les protéines " non oncogènes " .....	45
III.4.2.	Les protéines " oncogènes " .....	45
III.5.	Le cycle biologique des HPV .....	47
<b>IV.</b>	<b>HPV et cancérogenèse au niveau des VADS .....</b>	<b>48</b>
IV.1.	HPV et carcinomes épidermoïdes des VADS : une simple association ou une relation de causalité ? .....	48
IV.2.	Mode de contamination des muqueuses des VADS par le HPV .....	50
IV.3.	Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse HPV-induite .....	51
<b>V.</b>	<b>Techniques de détection des HPV .....</b>	<b>54</b>
V.1.	Détection des HPV sans précision du type .....	54
V.1.1.	Identification directe de l'une des composantes structurales des HPV .....	54
V.1.1.1.	Technique PCR .....	54
V.1.1.2.	La technique d'hybridation in-situ .....	57
V.1.1.3.	La technique du transfert d'ADN .....	57
V.1.1.4.	Identification de l'ARN messager des oncoprotéines E6 ou E7 .....	58
V.1.2.	Identification indirecte des HPV .....	59
V.1.2.1.	L'immunohistochimie pour la protéine p16 .....	59
V.1.2.2.	L'identification par l'aspect microscopique des tissus cancérisés .....	60
V.2.	Génotypage des HPV .....	61
<b>VI.</b>	<b>Signes cliniques et profil épidémiologique des carcinomes épidermoïdes associés et non associés aux HPV au niveau des VADS .....</b>	<b>61</b>
VI.1.	Signes cliniques des carcinomes épidermoïdes des VADS .....	66
VI.2.	Profil épidémiologique général des carcinomes épidermoïdes des VADS .....	67
VI.2.1.	Epidémiologie descriptive .....	67

VI.2.1.1.	Incidence et répartition géographique .....	67
VI.2.1.2.	Âge et sexe .....	68
VI.2.2.	Epidémiologie analytique .....	68
VI.2.2.1.	La consommation alcoololo-tabagique .....	68
VI.2.2.2.	Les facteurs viraux .....	70
VI.2.2.3.	Les facteurs nutritionnels .....	70
VI.2.2.4.	Autres facteurs .....	71
VI.3.	Profil épidémiologique des carcinomes des VADS associés aux HPV .....	71
VI.3.1.	Epidémiologie descriptive .....	71
VI.3.1.1.	Incidence, prévalence, répartition géographique et raciale .....	71
VI.3.1.2.	Âge et sexe .....	72
VI.3.2.	Epidémiologie analytique .....	73
VI.3.2.1.	Le type du HPV .....	73
VI.3.2.2.	Le comportement sexuel .....	73
VI.3.2.3.	La consommation alcoololo-tabagique .....	74
VI.3.2.4.	Le statut VIH .....	74
<b>VII.</b>	<b>Aspects anatomopathologiques des carcinomes épidermoïdes associés et non associés aux HPV au niveau des VADS .....</b>	<b>74</b>
VII.1.	Aspects macroscopiques .....	75
VII.2.	Aspects microscopiques .....	76
VII.3.	Aspects pronostiques .....	80

## **Deuxième partie : notre étude**

### **A / Patients, matériel, et méthodes**

I.	Type de l'étude .....	85
II.	Cadre et période de l'étude .....	85
III.	Patients et matériel de l'étude .....	86

III.1. Critères d'inclusion .....	86
III.2. Critères de non inclusion .....	86
<b>IV. Méthodologie et traitement des données .....</b>	<b>86</b>
IV.1. Recueil des données .....	86
IV.2. Prise en charge des prélèvements biopsiques .....	87
IV.3. Recherche de HPV .....	88
IV.4. Traitement des données .....	90

## B / Résultats

<b>I. Données générales .....</b>	<b>92</b>
<b>II. Données épidémiologiques descriptives .....</b>	<b>92</b>
II.1. La prévalence .....	92
II.2. L'âge .....	93
II.3. Le sexe .....	94
<b>III. Données épidémiologiques analytiques .....</b>	<b>94</b>
III.1. Les habitudes alcoololo-tabagiques .....	94
III.2. La notion de sexe oral .....	96
III.3. Le type du HPV .....	97
<b>IV. Données anatomo-pathologiques .....</b>	<b>98</b>
IV.1. Type des prélèvements tumoraux .....	98
IV.2. Siège des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués .....	98
IV.3. Données histopathologiques .....	101
IV.3.1. Forme histologique des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués .....	101
IV.3.2. Degré de différenciation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués ..	101
IV.3.3. Degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués ...	102
<b>IV. Données de la PCR .....</b>	<b>103</b>

## C / Discussion

### C1 / Les données épidémiologiques et anatomopathologiques

<b>I.      Données épidémiologiques descriptives .....</b>	<b>107</b>
I.1. La prévalence .....	107
I.2. L'âge .....	100
I.3. Le sexe .....	111
<b>II.     Données épidémiologiques analytiques .....</b>	<b>111</b>
II.1. Les habitudes alcoololo-tabagiques .....	111
II.2. La notion de sexe oral .....	113
II.3. Le type du HPV .....	114
<b>III.    Données anatomo-pathologiques .....</b>	<b>114</b>
III.1. Le siège des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués .....	114
III.2. Données histopathologiques .....	116
III.2.1. Forme histologique des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués .....	116
III.2.2. Degré de différenciation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués .....	117
III.2.3. Degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués .....	118

### C2 / Les données de la PCR

<b>I.      Paramètres ayant rendu la PCR non contributive dans le groupe A .....</b>	<b>121</b>
<b>II.     Paramètres ayant rendu la PCR non contributive dans le groupe B .....</b>	<b>123</b>
II.1. Les paramètres inhérents au geste chirurgical ou à l'acte biopsique ( <i>prefixation parameters</i> ) .....	123
II.2. La durée de préfixation ( <i>prefixation time</i> ) .....	124
II.3. Matériel et méthodes : les paramètres de la fixation elle-même ( <i>intrafixation parameters</i> ) .....	124

II.3.1.	Le type du fixateur .....	125
II.3.2.	La température à laquelle a été faite la fixation .....	125
II.3.3.	La durée de la fixation .....	126
II.3.4.	Le volume du fixateur .....	127
II.4.	Matériel et méthodes : la durée et les conditions d'archivage des blocs de paraffine de nos patients .....	127
II.4.1.	La durée de conservation des blocs de paraffine .....	127
II.4.2.	Les conditions d'archivage des blocs de paraffine .....	128
II.5.	Matériel et méthodes : les paramètres relatifs à la technique d'extraction de l'ADN à partir des blocs de paraffine .....	129
<b>Conclusion et recommandations .....</b>		132
<b>Références .....</b>		136
<b>Annexes .....</b>		159

# Introduction

Chaque année, environ 650 000 nouveaux cas de cancers des VADS sont diagnostiqués de par le monde [1]. Le carcinome épidermoïde et ses variantes constituent à eux seuls plus que 90 % de l'ensemble de ces cancers [2-4]. Ainsi, toutes localisations confondues, les carcinomes épidermoïdes des VADS se placent en 6<sup>ème</sup> position sur l'échelle mondiale des incidences des cancers [4]. De ce fait, ils constituent un véritable problème de santé publique. Il est bien admis actuellement que les 2 principaux facteurs de risque de ces tumeurs sont le tabagisme et la consommation d'alcool [2, 3, 5].

En 1983, Syrjänen *et al.* étaient les premiers à suggérer un possible rôle du HPV dans la cancérogenèse d'un certain nombre de carcinomes épidermoïdes de la cavité orale [6]. Depuis, plusieurs autres études se sont intéressées à cette hypothèse, et nombre important d'entre elles ont prouvé de façon formelle que le potentiel oncogène des HPV intéressait aussi une bonne part des carcinomes des VADS [7-11]. Les données récentes de la littérature affirment que parmi tous les carcinomes épidermoïdes des VADS, la prévalence de ceux qui sont associés aux HPV varie de 21,95 % à 29,5 % [12-15]. L'intérêt que revêt l'identification de ces carcinomes des VADS associés aux HPV n'est pas uniquement d'ordre académique, mais a bel et bien des conséquences pratiques. En effet, les carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS sont réputés être plus radiosensibles que ceux qui en sont dépourvus, et sont donc de meilleur pronostic [14, 16-22]. De plus, ces cancers associés aux HPV se caractérisent par un profil épidémiologique particulier, et présentent des aspects morphologiques assez caractéristiques qui les distinguent de leurs homologues non associés aux HPV [23-25].

Plusieurs techniques sont disponibles pour l'identification des HPV au sein des proliférations tumorales malignes des VADS [26]. Pour les échantillons tissulaires tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine, la technique PCR semble celle qui assure la détection du génome des HPV avec les meilleures sensibilité et spécificité [26].

Peu d'études africaines, en l'occurrence en Afrique de l'Ouest, ont tenté d'évaluer la prévalence des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV et d'en dégager les principales particularités épidémiologiques et anatomopathologiques [15].

Nous nous sommes donc intéressés à ce sujet, et nous avons mené ce travail dont les objectifs étaient de :

- décrire les profils épidémiologiques (descriptif et analytique) des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV à Dakar ;
- rapporter les aspects histologiques de ces cancers au Sénégal et les comparer aux données de la littérature ;
- évaluer la technique PCR pour la recherche des HPV dans les blocs de paraffine de nos patients.

Première partie :

Rappels & revue de  
la littérature

## **I. Rappel anatomique sur les voies aéro-digestives supérieures :**

Les voies aéro-digestives supérieures (VADS) ont deux fonctions principales : l'une alimentaire avec la prise d'aliments et la déglutition, l'autre respiratoire avec notamment la phonation. Stricto sensu, et d'un point de vue anatomique, les VADS représentent l'ensemble des structures anatomiques cavitaires empruntées physiologiquement aussi bien par l'air que par les aliments. Elles correspondent donc à la cavité orale, l'oropharynx et l'hypopharynx. Par extension, du fait de leurs rapports anatomiques intimes avec les structures sus-citées, et considérant la possibilité des fausses routes alimentaires, la plupart des anatomistes y rajoutent également le larynx, le nasopharynx, les fosses nasales, et les sinus paranasaux (figure 1) [2, 27, 28].

### **I. 1. Le tractus sino-nasal :**

Le tractus sino-nasal comprend les fosses nasales et les sinus paranasaux.

Situées au niveau de la face, les fosses nasales constituent l'orifice supérieur de l'appareil respiratoire. Elles représentent 2 couloirs aériens séparés par une cloison nasale ostéo-cartilagineuse, s'ouvrant en avant vers l'extérieur par les narines, et en arrière sur le rhinopahrynx par les choanes. Elles sont limitées latéralement par la lame osseuse des cornets, et leur plancher répond à la voûte palatine.

Les sinus paranasaux sont des cavités remplies d'air où l'orifice d'entrée et celui de la sortie ne font qu'un. Ils sont reliés aux fosses nasales par des petits orifices appelés ostia, et sont contenus dans les os crâniens. On les divise en quatre groupes (figure 2) :

- les sinus maxillaires (2), situés sous chacune des deux orbites dans les os maxillaires ;
- les sinus frontaux (2), au-dessus des yeux et du nez, dans l'os frontal, et formant la partie dure du front ;
- les sinus ethmoïdaux (10 à 20), entre les cavités nasales et les orbites, au sein de l'os éthmoïde ;
- les sinus sphénoïdaux (2), au centre de la base crânienne dans l'os sphénoïde.

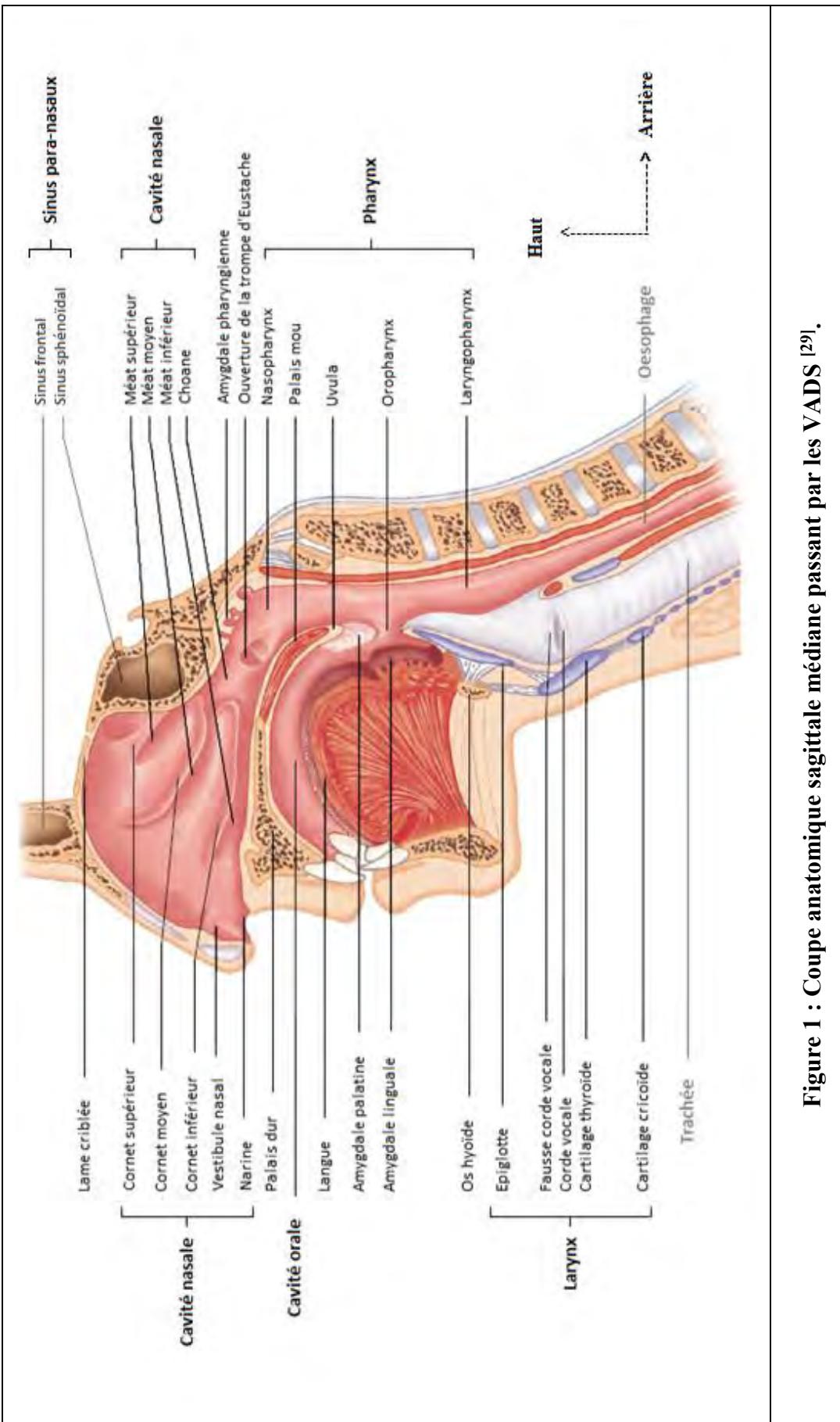
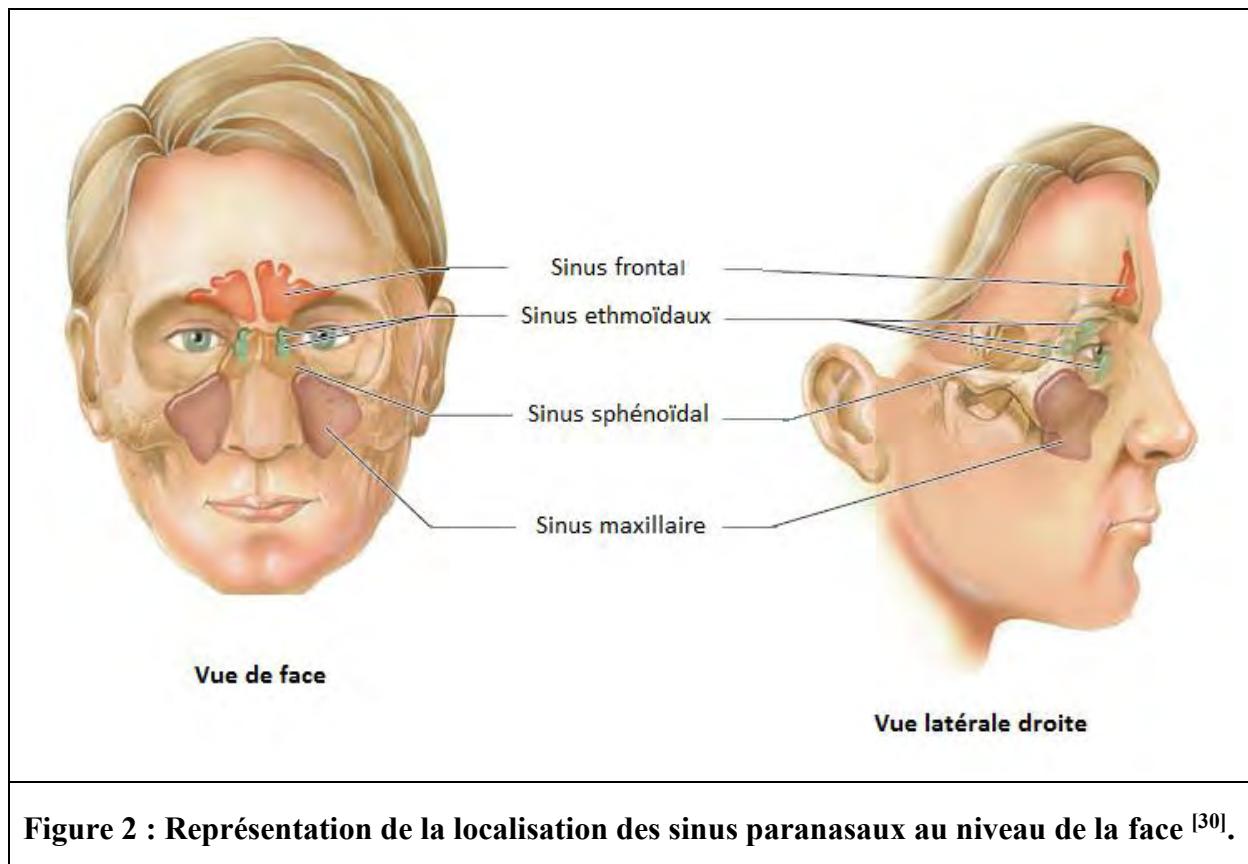


Figure 1 : Coupe anatomique sagittale médiane passant par les VADS [29].



**Figure 2 : Représentation de la localisation des sinus paranasaux au niveau de la face [30].**

### I. 2. La cavité orale :

La cavité orale est une cavité irrégulière limitée antérieurement par les deux lèvres (au niveau du vermillon), latéralement par la face interne des 2 joues, en bas par le plancher buccal, en haut par le palais (osseux dans sa partie antérieure ou voûte palatine, et musculaire mou dans sa partie postérieure ou voile du palais), et en arrière par un orifice la faisant communiquer avec l'oropharynx : l'isthme du gosier. Elle contient la langue buccale (les 2/3 antérieurs de la langue) et les 2 arcades dentaires supérieure et inférieure. Ces dernières, quand la bouche est fermée, divisent la cavité orale en 2 parties : le vestibule de la bouche en dehors d'elles, et la cavité orale proprement dit en dedans.

### I. 3. Le pharynx :

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

est un organe impair et médian, comparable à un entonnoir irrégulier étendu depuis la base du crâne jusqu'au bord inférieur du cartilage cricoïde, et se continue par l'œsophage cervical. Il est anatomiquement divisé en 3 étages : un étage supérieur ou nasopharynx, un étage moyen ou oropharynx, et un étage inférieur ou hypopharynx (figure 3) [31].

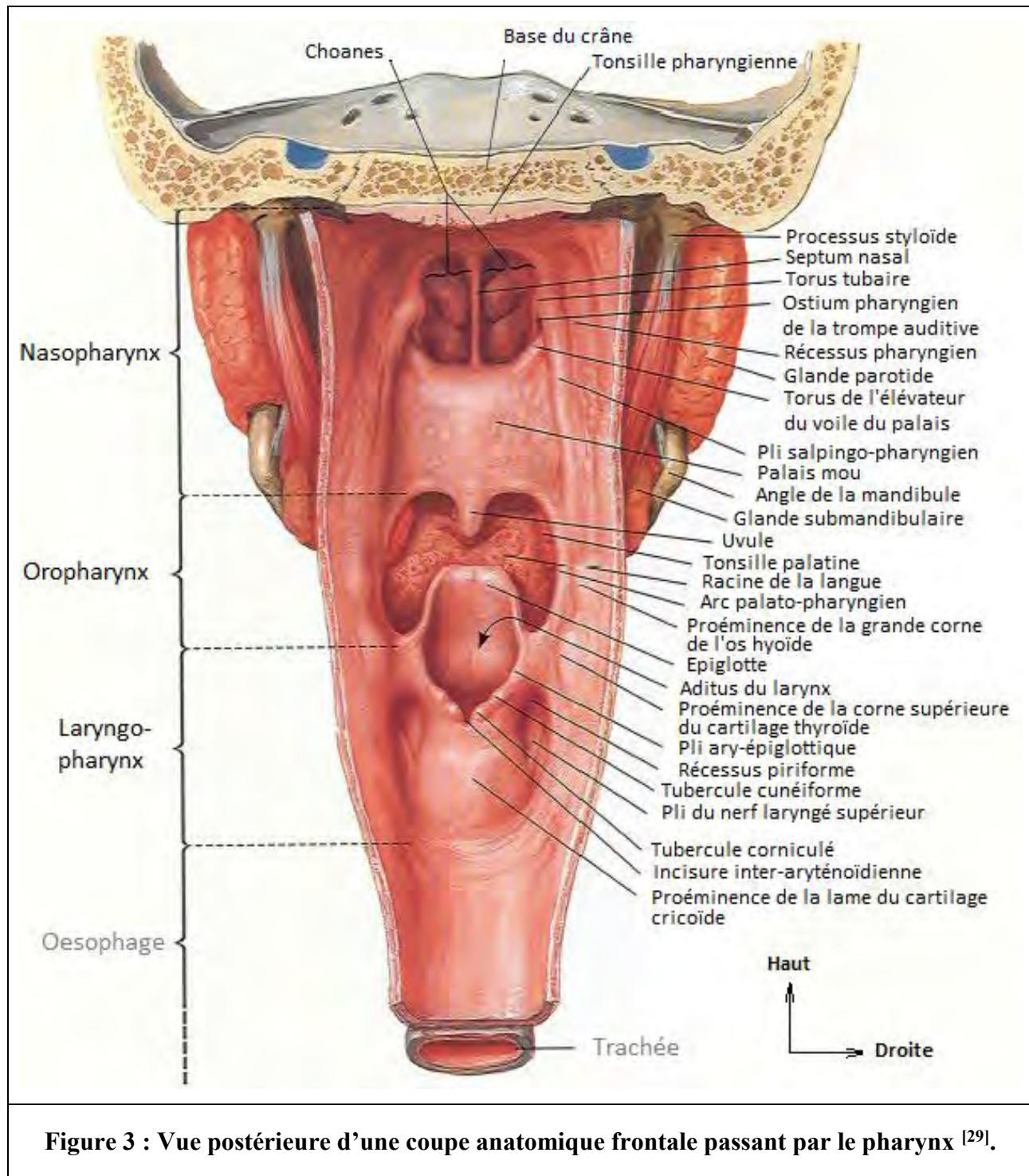


Figure 3 : Vue postérieure d'une coupe anatomique frontale passant par le pharynx [29].

### *I. 3. 1. Le nasopharynx :*

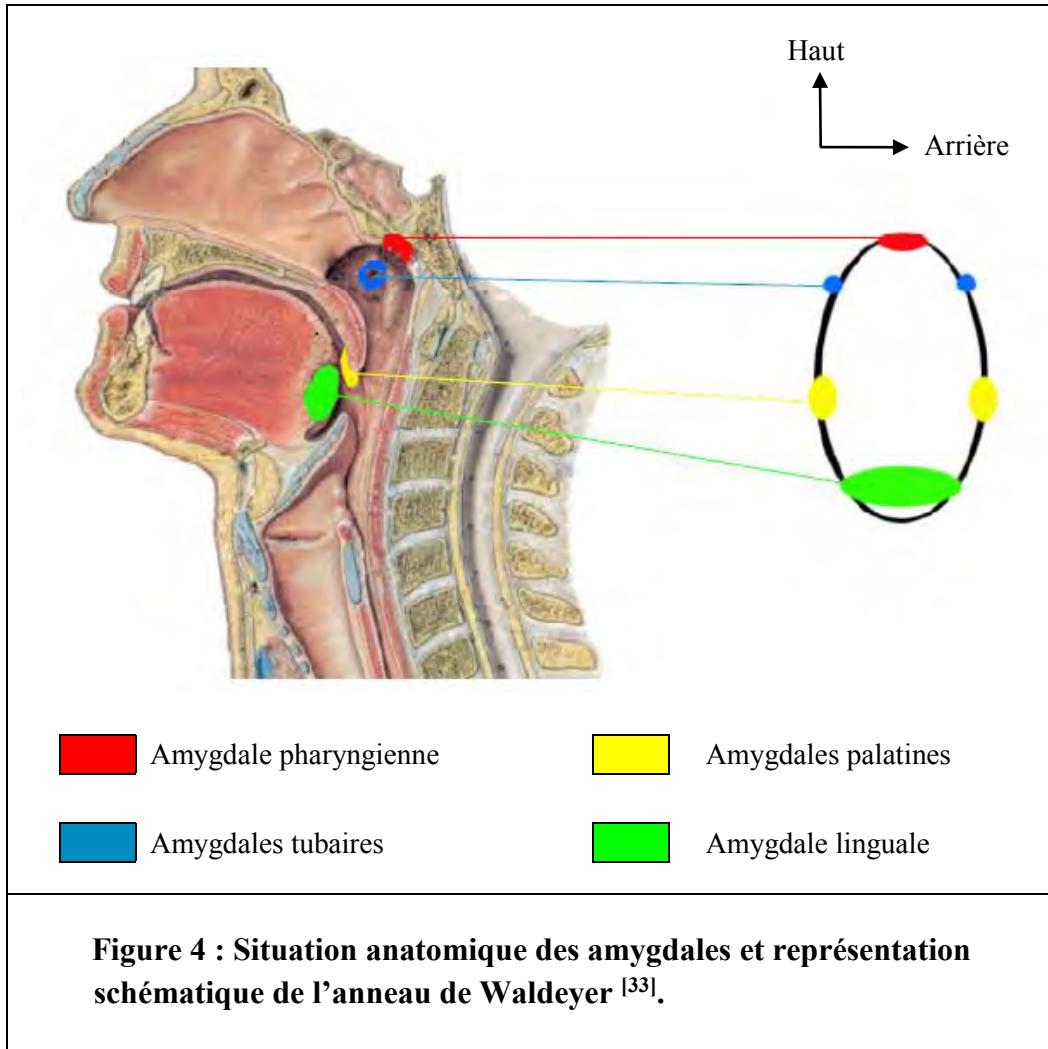
Appelé également rhinopharynx ou cavum, il forme la partie supérieure du pharynx, et constitue en fait l’arrière-cavité des fosses nasales où il forme une voie de passage pour l’air lors du processus de respiration. Il est situé sous la base du crâne, en arrière des choanes, au-dessus de l’oropharynx, et en avant des 2 premières vertèbres cervicales. Les parois latérales sont musculo-aponévrotiques et dans chacune d’elles s’abouche l’orifice de la trompe d’Eustache. En haut, le toit du cavum est osseux répondant au plancher du sinus sphénoïdal. En bas, il communique avec l’oropharynx, duquel il n’est que partiellement séparé par une cloison musculo-membraneuse mobile formant le voile du palais [31, 32]. Cette dernière, par son bord postérieur, ferme le cavum et l’isole de l’oropharynx uniquement lors de la déglutition.

### *I. 3. 2. L’oropharynx :*

C’est la cavité moyenne du pharynx. Il est limité dans sa partie supérieure par le voile du palais et dans sa partie inférieure par le corps de l’os hyoïde. La face postérieure de l’oropharynx répond à l’arc antérieur de l’atlas, au corps de l’axis et à la troisième vertèbre cervicale. Il comporte deux faces latérales occupées, d’avant en arrière, par les piliers antérieurs du voile du palais, les amygdales palatines, les piliers postérieurs et par deux gouttières formant les angles latéraux du pharynx. Il s’ouvre en avant dans la cavité buccale en regard de la face dorsale de la langue [31, 32].

Il est à noter que l’oropharynx, ou carrefour oropharyngé, présente certaines particularités immuno-anatomiques qui lui donnent une importance particulière au sein des VADS. En effet, les constituants du MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue* ou tissu lymphoïde associé aux muqueuses) y sont particulièrement développés. Ces amas de tissu lymphoïde forment les amygdales. Il existe quatre paires d’amygdales, les amygdales palatines, les amygdales tubaires situées autour de l’orifice de la trompe d’Eustache, les amygdales pharyngiennes (appelées aussi adénoïdes ou végétations) qui se trouvent dans la paroi postérieure du rhinopharynx, et les amygdales linguales sur la face dorsale pharyngienne de la langue. En fait, ces différentes amygdales sont disposées en cercle autour de l’oropharynx et constituent une entité anatomique appelée anneau de Waldeyer (figure 4) [33]. De par sa situation, le carrefour oropharyngé constitue une voie d’entrée naturelle pour les substances étrangères ainsi que pour les pathogènes, virus ou bactériens. En tant que tissu lymphoïde situé à ce niveau, l’anneau amygdalien de Waldeyer réalise donc une surveillance immunologique très importante pour l’organisme.

Juste en dessous de l'oropharynx, les voies aériennes et digestives se séparent anatomiquement en hypopharynx qui débouche sur l'œsophage cervical, et en larynx qui s'ouvre sur la trachée.



### I. 3. 3. L'hypopharynx :

Appelé encore le laryngopharynx ou pharynx laryngé, il constitue la partie inférieure du pharynx. Il est interposé entre l'oropharynx et l'œsophage cervical, s'étendant du niveau de l'os hyoïde en haut, au sphincter supérieur de l'œsophage en regard de la sixième vertèbre cervicale en bas. Il est situé en arrière du larynx qu'il circonscrit partiellement de chaque côté. L'hypopharynx est divisé en une paroi pharyngée postérieure, les 2 sinus piriformes, et la région rétro-cricoïdienne [34]. La paroi pharyngée postérieure est en rapport direct avec l'espace rétrapharyngé qui est un espace

compris entre les vertèbres et autres muscles et ligaments pré-vertébraux en arrière, et le pharynx en avant. C'est un espace avasculaire et agraisseux, qui est juste composé de quelques nœuds lymphatiques, et communique caudalement avec le médiastin. Les sinus piriformes ont la forme d'une gouttière en doigt de gant, et sont constitués d'une partie supérieure membraneuse et d'une partie inférieure cartilagineuse. Ils se continuent par des prolongements qui convergent dans un sens antéro-postéro-cranio-caudal, un peu à l'image d'un toboggan, où ils joignent l'espace rétracricoïdien [35]. Ce dernier, en rapport avec la face postérieure des 2 cartilages arytenoïdes et le chaton cricoïdien, se termine vers le bas au niveau de la jonction pharyngo-œsophagienne ou bouche de Killian [34].

#### I. 4. Le larynx (figure 5) :

Le larynx est un organe impair et médian, situé à la partie moyenne de la gaine viscérale du cou et qui occupe la partie supérieure de la région infra-hyoïdienne. Il est formé par un squelette cartilagineux (11 cartilages dont 3 impairs et médians et 4 cartilages pairs) suspendu à l'os hyoïde. Les différents cartilages sont unis par des articulations, des membranes, des ligaments et des muscles ; constituant ainsi l'armature du larynx.

Grossièrement, il a la forme d'une pyramide triangulaire à base postéro-supérieure répondant au pharynx et à l'os hyoïde, et à sommet inférieur répondant à l'orifice supérieur de la trachée. Ses limites sont représentées en haut par le bord supérieur du cartilage thyroïde qui répond au corps de la 4<sup>ème</sup> vertèbre cervicale, et en bas au cartilage cricoïde en face du bord inférieur de la 6<sup>ème</sup> vertèbre cervicale [36].

La Configuration interne de la cavité laryngée est divisée en trois étages par deux replis :

- Les trois étages du larynx sont :
  - l'étage supérieur ou vestibule laryngé limité en haut par l'aditus laryngé, et en bas par la fente vestibulaire entre les plis vestibulaires ;
  - l'étage moyen limité en haut par les cordes vocales supérieures, et en bas par les cordes vocales inférieures ;
  - l'étage inférieur ou infra glottique en continuité en bas avec la trachée.

- Les deux replis sont :
  - les cordes vocales supérieures ou plis vestibulaires ou bandes ventriculaires ou fausses cordes vocales, sous-tendues par le muscle thyro-aryténoïdien latéral et le ligament thyro-aryténoïdien supérieur ;
  - les cordes vocales inférieures, sous-tendues par le ligament et le muscle vocal ; et limitant entre elles la fente de la glotte.

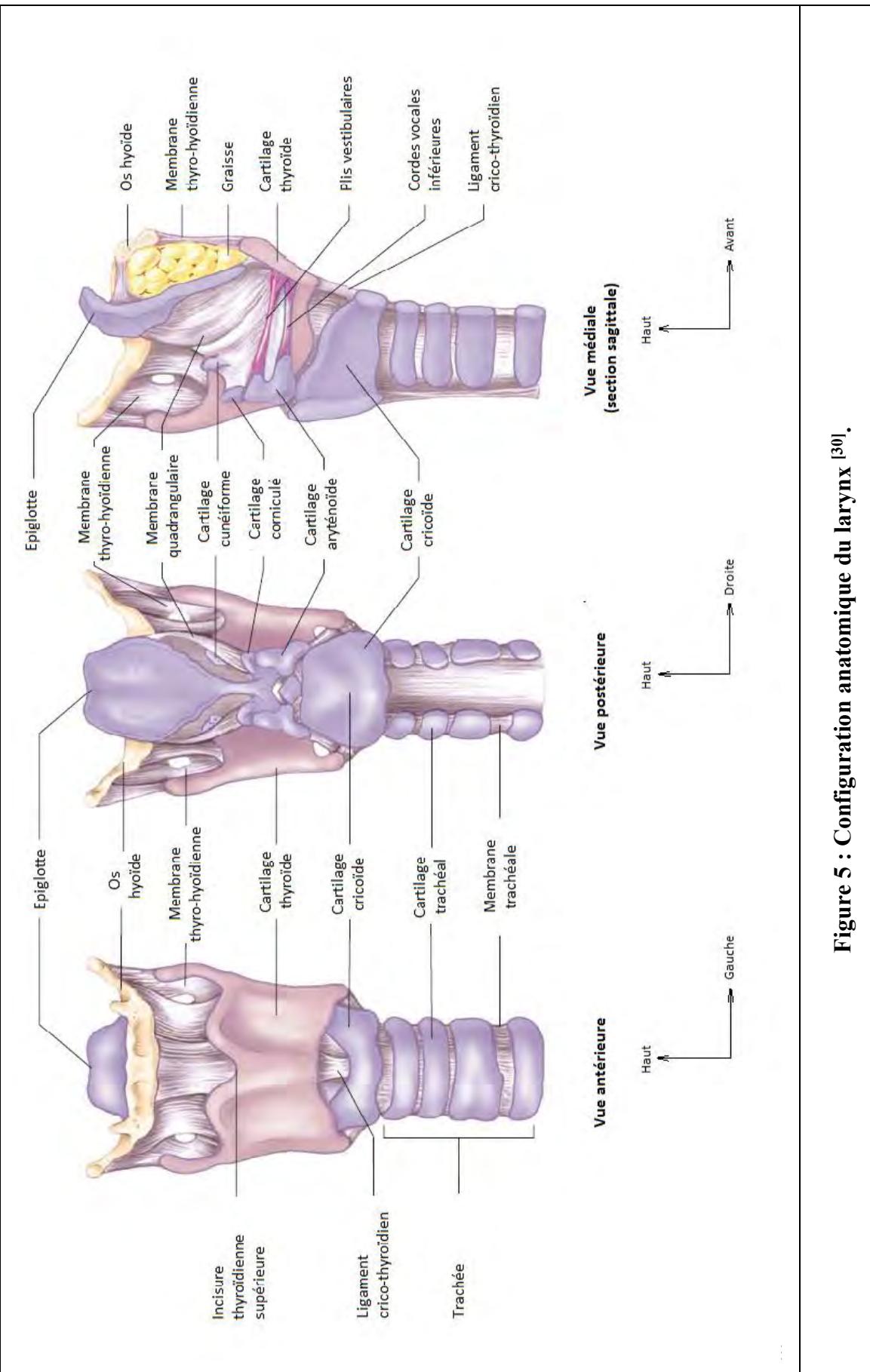


Figure 5 : Configuration anatomique du larynx [30].

## **II. Rappel histologique sur la muqueuse des VADS :**

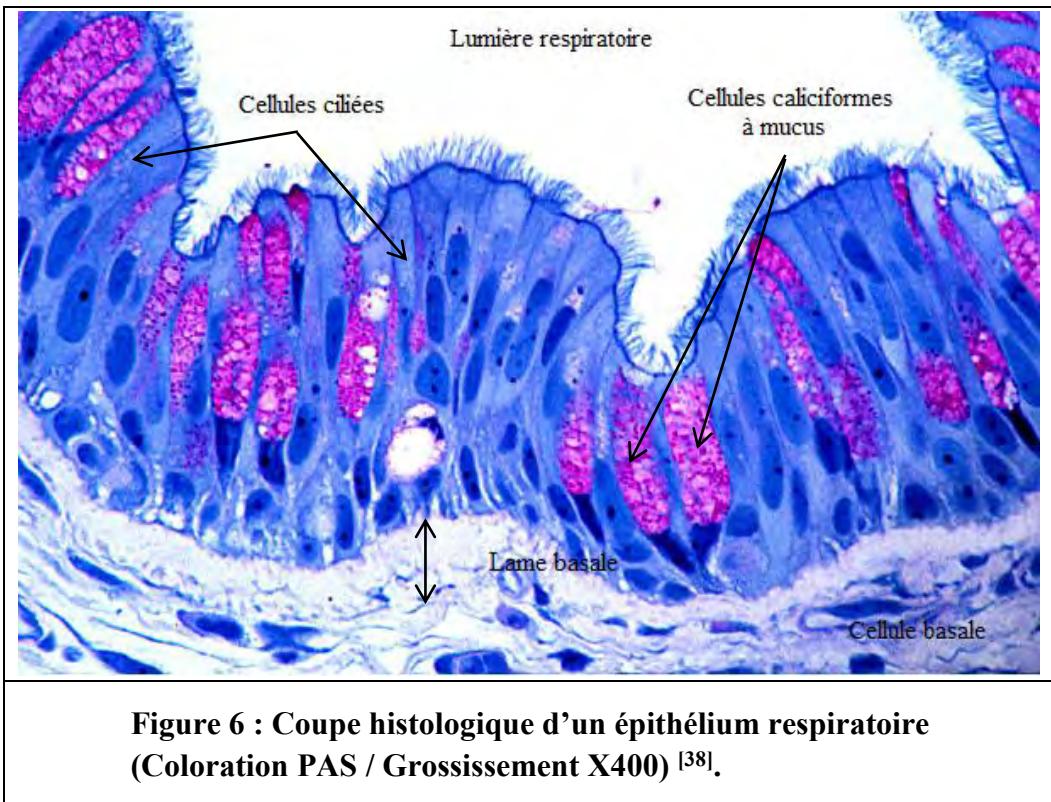
Une muqueuse est toujours composée de trois structures. Un épithélium de revêtement reposant sur une lame basale, et un tissu conjonctif lâche vascularisé et innervé appelé chorion. L'épithélium et le chorion sont séparés physiquement par cette lame basale constituée principalement de collagène de type IV et de laminine. La structure de l'épithélium de revêtement et par extension, d'une muqueuse, reflète toujours la fonction de l'organe ou de la cavité qu'il tapisse. Ainsi, deux grands types d'épithéliums sont retrouvés au sein des différentes cavités qui composent les VADS : un épithélium respiratoire au niveau des voies de conduction aériennes et un épithélium de type épidermoïde au sein des voies ayant une composante digestive [37, 38].

Nous allons voir successivement : la structure de base d'un épithélium de type respiratoire, la structure de base d'un épithélium de type épidermoïde, la topographie de la répartition de ces 2 types d'épithélium au sein des VADS, ainsi que les particularités de leur zone d'affrontement.

### **II. 1. Structure de base d'un épithélium de type respiratoire :**

L'épithélium respiratoire est un épithélium cylindrique simple pseudostratifié. Il est dit cylindrique car la plupart des cellules qui le composent sont plus hautes que larges. Il est qualifié de simple, car il ne présente qu'une seule assise cellulaire reposant sur la lame basale. Si chaque cellule est en contact direct avec la membrane basale, ce ne sont pas toutes qui atteignent le versant luminal. En conséquences, même si les cellules de cet épithélium possèdent une polarité certaine reflétée par la position basale de leurs noyaux, ces derniers ne sont pas alignés les uns à côtés des autres, mais plutôt étagés sur des hauteurs différentes et lui confèrent ainsi cet aspect "pseudo" stratifié.

L'épithélium respiratoire est composé de trois principaux types cellulaires, à savoir : la cellule basale, la cellule ciliée, et la cellule caliciforme à mucus (figure 6).



La cellule basale n'atteint pas la lumière de la cavité que cet épithélium tapisse, et son noyau est donc retrouvé dans le tiers inférieur de la hauteur épithéliale. Elle joue un rôle primordial dans la vie de la muqueuse respiratoire car c'est une cellule progénitrice capable de se diviser et de se différencier en tous les autres types cellulaires.

La cellule ciliée est la plus abondante dans ce type d'épithélium. Grâce aux 200 à 300 cils vibratiles de son pôle apical, cette cellule est entièrement dévouée au fonctionnement du système de clairance des voies de conduction aériennes : l'escalator muco-ciliaire. La cellule ciliée a un noyau localisé dans le tiers supérieur de son cytoplasme, et possède de nombreuses mitochondries nécessaires au fonctionnement de ses cils vibratiles et de ses pompes ioniques membranaires.

Le troisième type cellulaire rencontré au sein de l'épithélium respiratoire est représenté par la cellule caliciforme à mucus. Comme son nom l'indique, cette dernière a pour fonction de sécréter du mucus qui est retrouvé tout au long de l'appareil respiratoire. Ce mucus est nécessaire pour, d'une part le piégeage des particules inhalées, et d'autre part leur élimination via l'escalator muco-ciliaire. Cette cellule possède un noyau situé à son pôle basal, et un pôle apical dilaté et clair. Ce dernier est

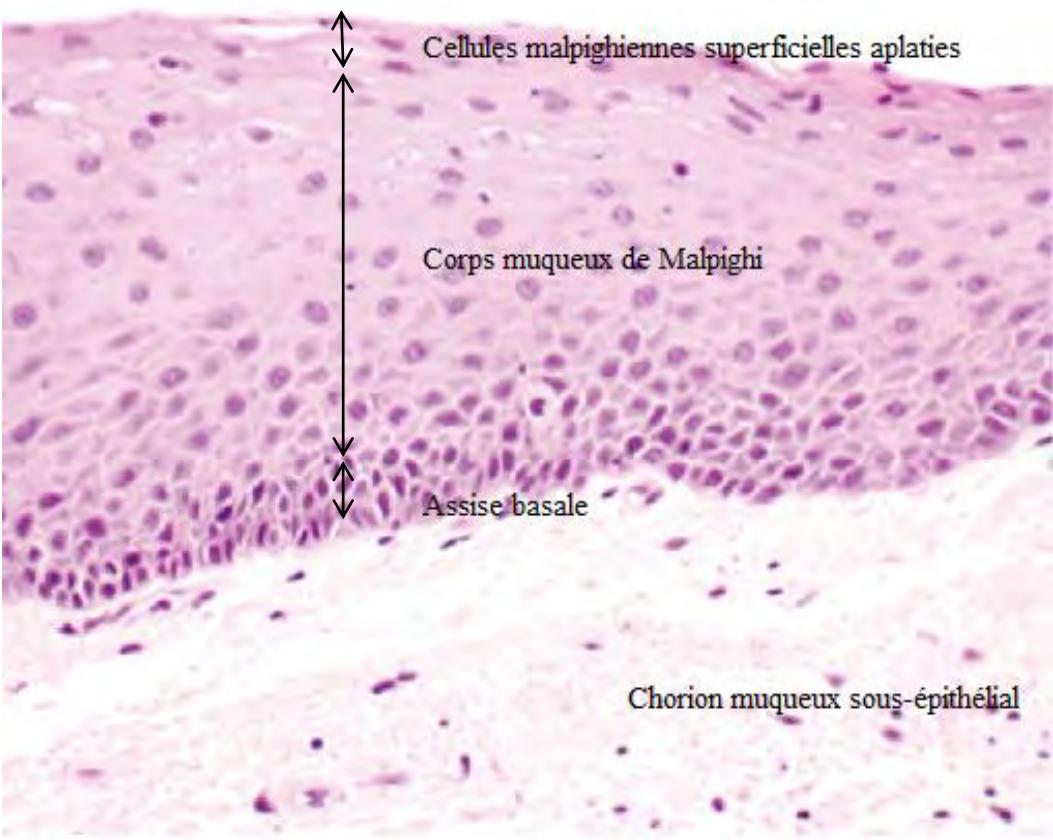
rempli d'une variété de glycoprotéines qui apparaissent claires en coloration H&E et rouges ou violettes en coloration PAS : les grains de mucine.

Notons enfin que, à côté de ces 3 principales cellules, on trouve d'autres types cellulaires disséminés au sein de l'épithélium respiratoire. Il s'agit essentiellement des mélanocytes (retrouvés de façon plus dense chez les sujets de race noire) [39], et des lymphocytes intra-épithéliaux qui sont virtuellement tous des lymphocytes de phénotype T CD8+ [40].

## **II. 2. Structure de base d'un épithélium épidermoïde (appelé encore épithélium malpighien ou pavimenteux stratifié non kératinisé) :**

Sauf au niveau du palais, des gencives, et de la face dorsale de la langue (où les forces de mastication sont assez importantes nécessitant une muqueuse kératinisée mécaniquement plus résistante), la muqueuse malpighienne au niveau des VADS est de type non kératinisé. Cette muqueuse est revêtue donc par un épithélium constitué de plusieurs assises cellulaires qui lui confèrent son aspect stratifié, mais dépourvu des couches granuleuse et cornée.

Depuis la lame basale jusqu'aux couches superficielles, ces assises cellulaires subissent de nombreux changements morphologiques et fonctionnels. Les cellules basales donnent naissance par mitoses successives aux cellules qui vont progressivement gagner la surface épithéliale. Les cellules basales sont légèrement plus hautes que larges, puis deviennent polygonales et beaucoup plus larges dans les couches intermédiaires, et finissent par s'aplatir à la surface épithéliale (figure 7). Au cours de cette progression, les cellules vont graduellement se différencier jusqu'à présenter des signes de dégénérescence. Les cellules dégénératives de la surface sont constamment remplacées par des cellules migrantes des couches plus profondes de l'épithélium. La surface épithéliale se trouve ainsi régulièrement et entièrement renouvelée.



**Figure 7 : Coupe histologique d'une muqueuse malpighienne non kératinisée au niveau des VADS (Coloration H&E / Grossissement X400) [38].**

Notons enfin que, à côté de ces cellules malpighiennes et comme constaté dans l'épiderme, 4 autres cellules "non épithéliales" se trouvent généralement disséminées au sein de l'épithélium épidermoïde des VADS. Il s'agit des mélanocytes, des cellules de Merkel, des cellules de Langerhans, et des lymphocytes.

### **II. 3. Topographie de la répartition des muqueuses respiratoire et malpighienne au sein des VADS :**

De façon sommaire, les voies de conduction "exclusivement" aériennes sont tapissées par un épithélium de type respiratoire. Celles qui sont en contact aussi bien avec l'air qu'avec le bol alimentaire (plus consistant et susceptible d'être plus agressif pour la muqueuse) sont plutôt tapissées

par un épithélium malpighien, mécaniquement plus résistant. De façon plus précise, la cartographie de la répartition des muqueuses respiratoire et malpighienne au niveau des VADS est comme suit :

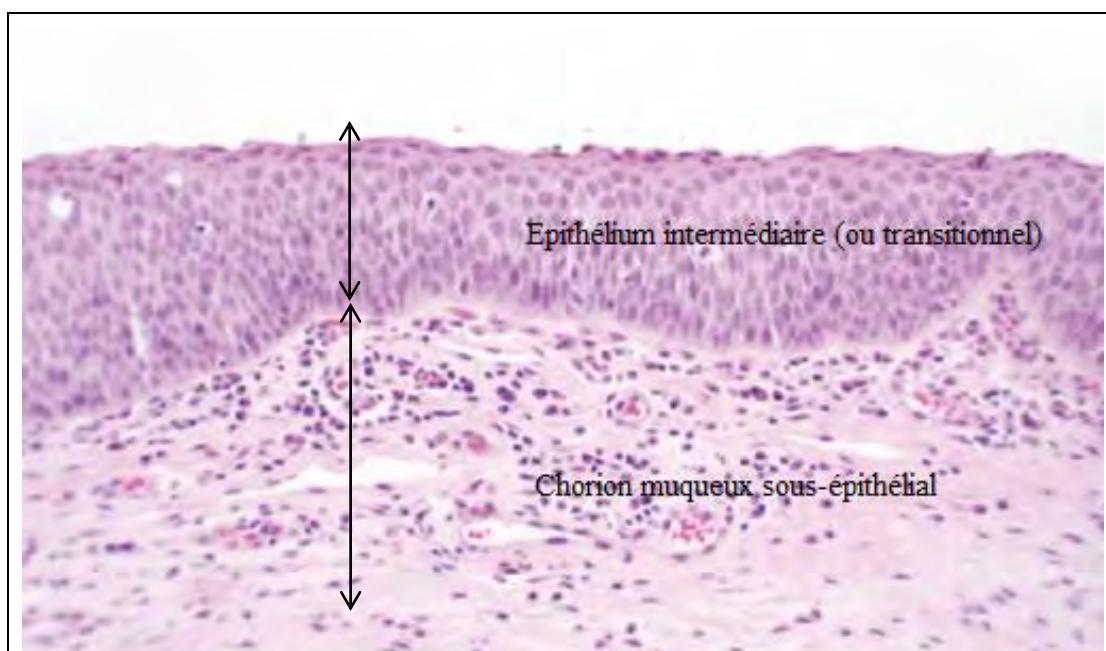
Le vestibule nasal est tapissé d'une muqueuse malpighienne qui est en continuité avec la peau. A partir du " limen nasi " (une crête située sur la paroi nasale latérale et séparant le vestibule des fosses nasales proprement dites), cette muqueuse malpighienne se transforme graduellement en une muqueuse de type respiratoire qui va s'étendre pour couvrir la totalité des sinus para-nasaux et une partie du cavum. En effet, ce dernier n'est recouvert d'une muqueuse respiratoire qu'essentiellement au niveau de la région rétro-choanale et du toit de sa paroi postérieure. La muqueuse malpighienne quant à elle, se trouve localisée au niveau des parties inférieures des parois nasopharyngiennes antérieure et postérieure ainsi qu'au niveau de la moitié antérieure des parois latérales. Le reste du cavum, incluant la partie postérieure de ses parois latérales ainsi que le tiers moyen de sa paroi postérieure, présente " un mosaïcisme muqueux " faisant alterner des plages de muqueuse respiratoire et malpighienne. L'ensemble de la cavité buccale, de l'oropharynx, et de l'hypopharynx, présente à décrire une muqueuse de type épidermoïde sauf au niveau des amygdales pharyngiennes qui se trouvent revêtues d'un épithélium cilié pseudostratifié. L'analyse histologique des larynx obtenus à partir de nouveau-nés montre que, à l'exception des cordes vocales, l'ensemble du larynx est initialement recouvert d'un épithélium de type respiratoire. L'épithélium épidermoïde apparaît à l'âge de 6 mois, et commence à remplacer graduellement l'épithélium respiratoire, créant là aussi un " mosaïcisme muqueux ". La face linguale (ou antérieure) de l'épiglotte est invariablement tapissée par un épithélium malpighien. Ce dernier recouvre également la face laryngée (ou postérieure) de l'épiglotte, mais uniquement dans sa partie supérieure avant de fusionner avec l'épithélium respiratoire sur le reste de l'épiglotte.

#### **II. 4. Particularités de la zone d'affrontement entre les épithéliums respiratoire et épidermoïde et caractéristiques de l'épithélium cryptique amygdalien :**

La jonction entre l'épithélium cylindrique cilié respiratoire et l'épithélium épidermoïde peut survenir de façon abrupte, mais se fait le plus souvent via une " une zone de transition". Cette dernière peut consister juste en quelques cellules ou bien s'étendre sur une longueur de 1 à 2 millimètres. Elle est faite de cellules cylindriques qui sont remplacées graduellement par des petites cellules d'allure basaloïde ou des cellules malpighiennes métaplasiques immatures. Cette zone de transition n'est en fait qu'une zone épithéliale métaplasique semblable à celle retrouvée au niveau de la jonction " exocol-endocol" au niveau du col utérin. Selon plusieurs auteurs, il semble que c'est à

ce niveau d'affrontement squamo-cylindrique que le HPV infecte volontiers la muqueuse des VADS comme évènement qui prélude à la transformation maligne [7].

Microscopiquement, comparée aux épithéliums respiratoire et épidermoïde adjacents, la zone de transition paraît souvent architecturalement désorganisée (figure 8). Elle est faite de plusieurs assises de cellules basaloïdes aux noyaux hyperchromatiques avec de nombreuses figures de mitoses confinées à la couche basale. Cette trouvaille normale peut prêter à confusion et pousser le pathologiste inaverti à la confondre avec une lésion dysplasique ou un carcinome in-situ, particulièrement sur coupes histologiques fixées par congélation. Une attention particulière est donc requise dans l'analyse microscopique de ces zones de transition, afin de ne pas porter à l'excès le diagnostic de lésion précancéreuse des VADS.

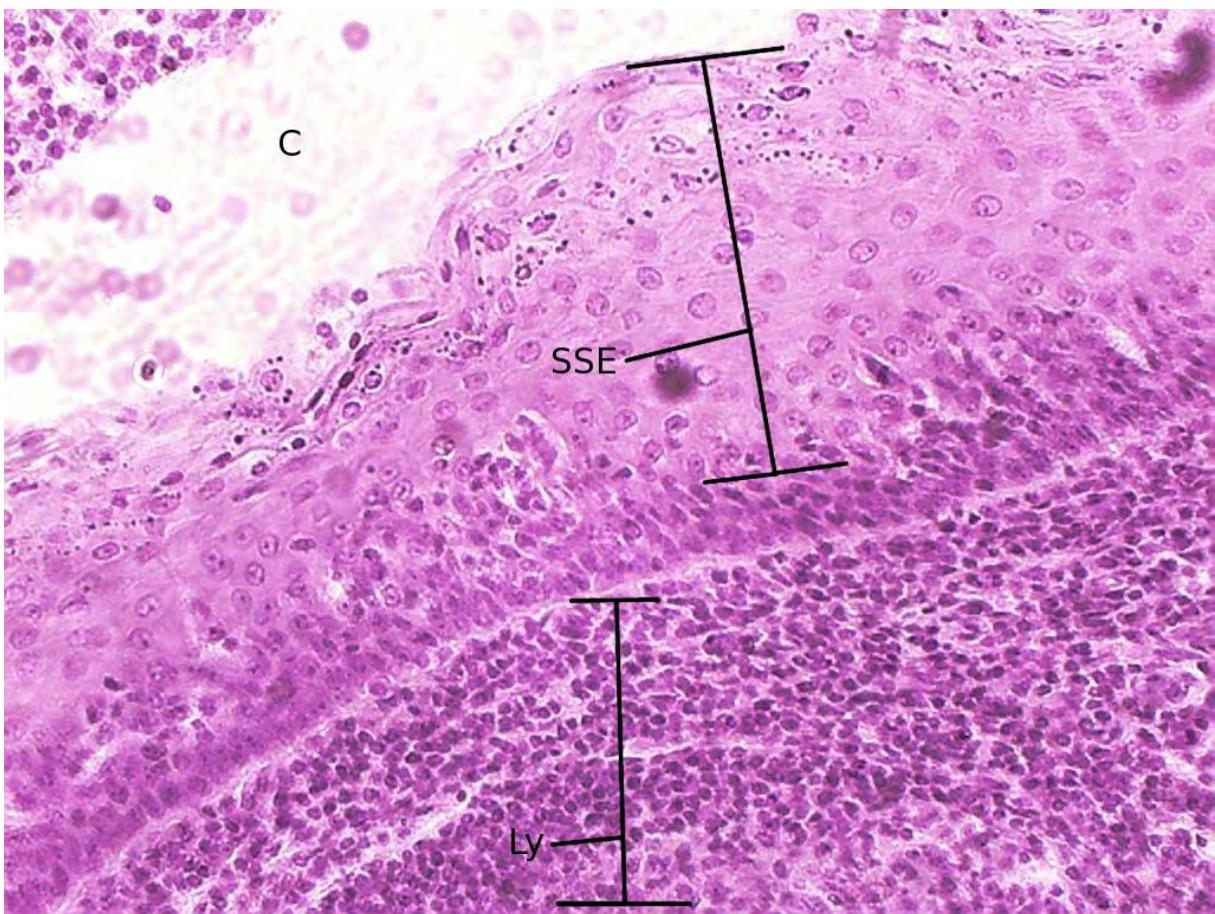


**Figure 8 : Coupe histologique passant par l'épithélium intermédiaire au niveau du nasopharynx (Coloration H&E / Grossissement X100) [38].**

Notez l'aspect basaloïde des cellules donnant l'impression au faible grossissement d'une désorganisation architecturale.

Il existe au niveau de l'oropharynx des structures particulières : les amygdales palatines. Les amygdales palatines sont constituées de masses importantes de tissu lymphoïde contenant de nombreux follicules lymphoïdes identiques à ceux retrouvés dans les ganglions lymphatiques. Elles

sont recouvertes d'un épithélium de type malpighien qui s'y invagine profondément pour former les cryptes amygdaliennes (figure 9). Si la surface amygdalienne et l'entrée de la crypte sont recouvertes d'un épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé bien structuré et peu infiltré par les lymphocytes, il n'en est pas de même au niveau des bases cryptiques. En effet, à ce niveau où l'épithélium malpighien " fusionne " avec le tissu lymphoïde sous-jacent, les cellules épithéliales prennent une apparence plus basaloïde que malpighienne. Ces cellules sont souvent traversées par de nombreux lymphocytes, rendant la ligne de démarcation séparant l'épithélium du tissu lymphoïde désorganisée, floutée, et prêtant à confusion avec une prolifération carcinomateuse. A noter aussi, que le passage des différents éléments inflammatoires dans la lumière des cryptes lors du processus de reconnaissance des antigènes, crée une zone de fragilité mécanique semblable à celle constatée au niveau de la jonction endocol – exocol. Selon certains auteurs, cette notion est importante à connaître, car la fréquence relativement importante des carcinomes épidermoïdes HPV-induits au niveau de l'oropharynx serait expliquée par le tropisme que présente le HPV pour ces zones de fragilité mécanique.



**Figure 9 : Coupe histologique au niveau d'une crypte amygdalienne (Coloration H&E / Grossissement X200) [38].**

C = Crypte – SSE = Epithélium malpighien (*Stratified Squamous Epithelium*) – Ly = Tissu lymphoïde.

### III. Rappels virologiques :

#### III. 1. Historique – Généralités :

L'hypothèse de l'infectiosité de la verrue commune fut soulevée en 1907 par Ciuffo [41], qui démontra que des extraits acellulaires de cette lésion étaient transmissibles d'humain à humain via inoculation intradermique. En 1934, Les Docteurs Brous et Beard furent les premiers à rapporter le potentiel oncogène du HPV [42]. Dans les années 1970, suite aux travaux du virologue allemand Harald Zur Hausen, le HPV a été identifié comme la principale cause du cancer du col de l'utérus [43]. Au début des années 1980, les génotypes 16, 18, 31 et 33 ont été détectés dans ces lésions, et une association entre l'infection au HPV et certains cancers de la sphère ORL a été notée [44]. En

1995, l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer a classé les génotypes 16 et 18 du HPV comme étant des cancérogènes humains [41].

Initialement, en raison de la similarité de leurs capsides non-enveloppées et de leur génome commun d'ADN circulaire à double brin, les HPV étaient classés avec les polyomavirus au sein d'une même famille : celle des *Papovaviridae*. On reconnut par la suite que ces deux groupes de virus différaient par la taille et l'organisation de leurs génomes, et qu'ils ne présentaient aucune similarité dans leurs séquences nucléotidiques. Ils furent donc séparés par le " Comité International de Taxonomie des Virus " en deux familles distinctes : les Papillomaviridae et les Polyomaviridae.

Les HPV sont donc très anciens et ont évolué dans le temps parallèlement à leurs hôtes, en se conférant ainsi une spécificité d'espèce. Les virus papillomateux sont d'ailleurs identifiés par leur hôte naturel : HPV pour "*Human papillomavirus*", BPV pour "*Bovine papillomavirus*", ou encore DPV pour "*Deer papillomavirus*". A ce jour, une centaine de types de HPV a été identifiée, et le génome complet de presque tous ces types a été séquencé [45].

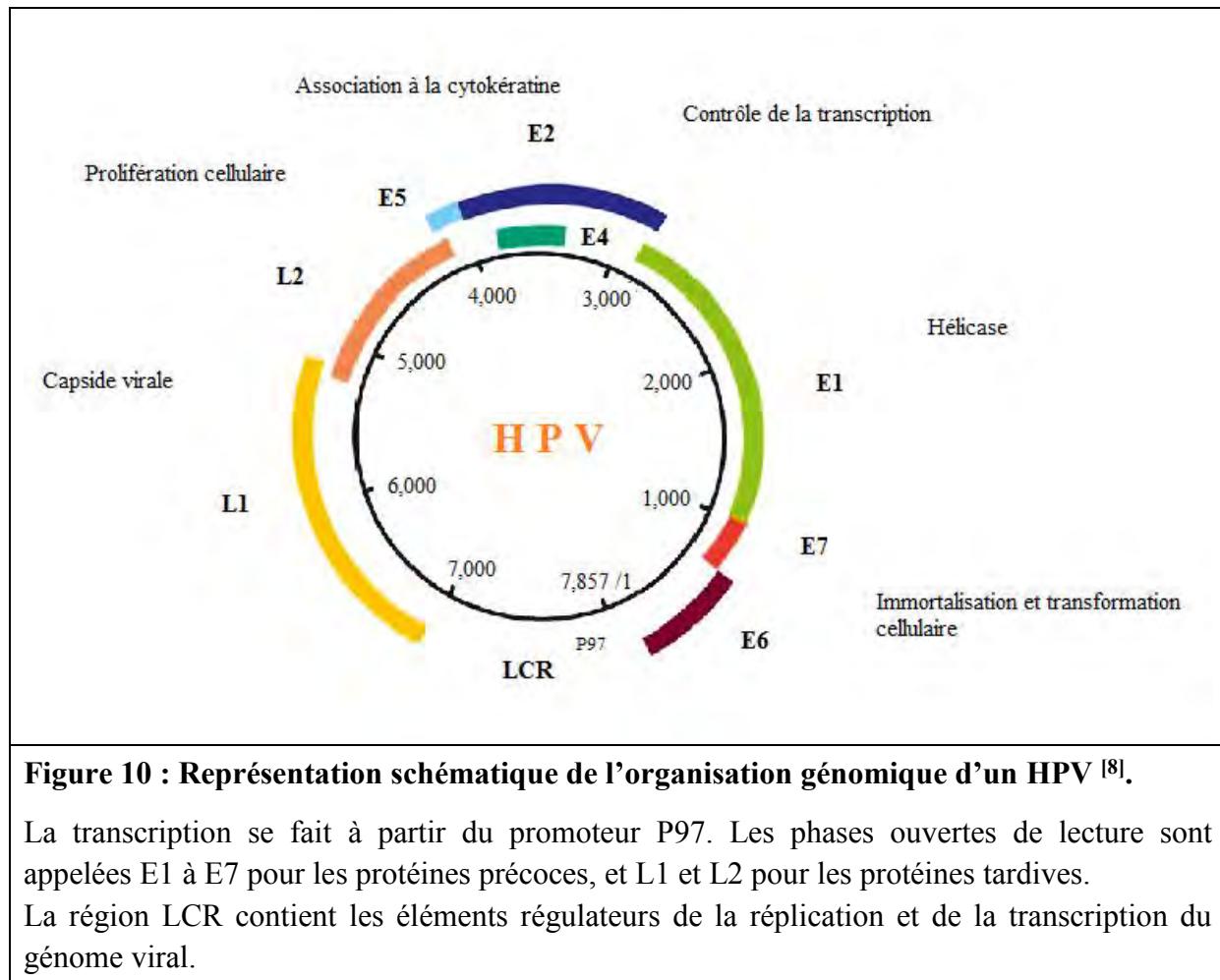
### **III. 2. Structure et organisation génomique des HPV (figure 10) :**

Les HPV sont des virus à ADN, non enveloppés, et de petite taille (52 à 55 nm de diamètre). Leur capsidé virale à symétrie icosaédrique est composée de 72 capsomères. Cette capsidé renferme une molécule d'ADN circulaire bicaténaire composée d'environ 7,9 Kpb. Malgré les différences de séquences pouvant exister entre chacun des types de HPV, l'organisation du génome leur est commune. Ainsi, les phases ouvertes de lecture (POL) ou séquences codantes, sont situées sur un seul brin de l'ADN viral et sont groupées en 2 régions distinctes : la région précoce " E " (*Early*) et la région tardive " L " (*Late*). Il existe également une troisième région non codante appelé " LCR " (*Long Control Region*) [45].

La région précoce " E " représente 50% du génome viral. Elle est composée de gènes codant pour les protéines non structurales impliquées dans la réPLICATION virale (E1 et E2), de gènes impliqués dans la régulation de la transcription (E2), dans la maturation des particules virales (E4), et dans le processus de transformation cellulaire (E5, E6 et E7) [46].

La région tardive "L" code les protéines structurales constitutives de la capsidé virale : la protéine majeure de capsidé L1 et la protéine mineure de capsidé L2. Lors d'une infection virale

productive, ces deux protéines sont exprimées exclusivement dans les cellules bien différenciées de la partie supérieure de l'épithélium malpighien.



La région non codante " LCR " est de taille variable. Elle représente 7 à 11% du génome viral, et se trouve située entre les séquences L1 et E6/E7. Elle est aussi appelée URR (*Upstream Regulatory Region*) car elle contient les promoteurs des gènes précoces, ainsi que des séquences de régulation de la réplication et de la transcription de l'ADN viral [47]. Les séquences régulatrices sont situées en *cis* en amont de ces promoteurs et contiennent des sites de fixation spécifiques de facteurs transrégulateurs d'origine cellulaire ou virale. Parmi les facteurs cellulaires, on retrouve les facteurs AP1, NF1, Sp1 et les récepteurs aux stéroïdes qui activent la transcription des gènes précoces ; alors que les facteurs p53, YY1, Oct-1 et les récepteurs de l'acide rétinoïque l'inhibent. Ces facteurs présentent une spécificité cellulaire ou tissulaire qui contribue au tropisme des papillomavirus [47].

La transcription des gènes précoces est aussi influencée par des facteurs d'origine virale et notamment la protéine E2 qui contrôle la transcription de E6 et E7. L'expression des gènes L1 et L2 est contrôlée par des promoteurs situés en amont de leur position et dont l'activation semble être dépendante de l'état de différenciation cellulaire [48].

### **III. 3. Classification des HPV :**

La famille des *Papillomaviridae* comporte de très nombreux virus infectant diverses espèces de mammifères. Ce sont les virus humains qui ont été le plus étudiés, et une centaine de types de HPV ont été actuellement identifiés par séquençage complet de leur génome. Cependant, sur la base des nombreuses séquences subgénomiques disponibles dans les bases de données, il est estimé que le nombre réel de types d'HPV est beaucoup plus élevé [49].

Trois schémas de classification des HPV sont classiquement rapportés dans les données de la littérature internationale selon que l'on s'intéresse à leur structure génomique, leur tropisme tissulaire, ou encore leur pouvoir oncogène.

#### *III. 3. 1. Classification basée sur le séquençage génomique (classification taxonomique) :*

En fonction des homologies de séquences et des analyses phylogénétiques, les papillomavirus sont subdivisés en genres, familles, et types. Au sein des différents types de papillomavirus, on peut identifier des sous-types et des variants.

C'est la séquence nucléotidique du gène L1, codant pour la protéine majeure de capsid, qui sert de base à la classification des papillomavirus. Pour qu'un nouveau type d'HPV soit reconnu, il faut que le génome complet du virus ait été séquencé et que sa séquence L1 présente une divergence de plus de 10 % avec la séquence L1 du type connu le plus proche génétiquement. Une différence de 2 à 10 % définit l'appartenance à un sous-type et une différence de moins de 2 % définit un variant [45]. Ainsi les virus initialement dénommés HPV 46, HPV 55 et HPV 64 sont maintenant considérés comme les sous-types respectifs de HPV 20, HPV 44 et HPV 34, en raison d'homologies supérieures à 90 %.

Les différents types de papillomavirus qui présentent une homologie de séquence L1 supérieure à 70 %, sont classés au sein d'une même espèce. Cette dernière est désignée par un numéro.

Les différentes espèces sont regroupées en genres (alpha-papillomavirus, bêta-papillomavirus, etc.). L'appartenance à un même genre est définie par une homologie de séquence L1 supérieure à 60 %. Les HPV se répartissent dans les genres alpha-papillomavirus, beta-papillomavirus, gamma-papillomavirus, mu-papillomavirus et nu-papillomavirus. La classification taxonomique des HPV est présentée dans le tableau I.

**Tableau I : Classification des HPV [49].**

Genre	Espèce	Type principal	Autres types	Commentaires
Alpha - papillomavirus	1	HPV 32	HPV 42	Bas risque, lésions orales ou Génitales
	2	HPV 10	HPV 3, 28, 29, 78, 94	Bas risque, lésions cutanées, parfois muqueuses
	3	HPV 61	HPV 62, 72, 81, 83, 84, 86, 87, 89	Bas risque, lésions muqueuses
	4	HPV 2	HPV 27, 57	Verrues vulgaires
	5	HPV 26	HPV 51, 69, 82	Haut risque, lésions muqueuses
	6	HPV 53	HPV 30, 56, 66	Haut risque, lésions muqueuses
	7	HPV 18	HPV 39, 45, 59, 68, 70, 85	Haut risque, lésions muqueuses
	8	HPV 7	HPV 40, 43, 91	Bas risque, lésions cutanées et muqueuses
	9	HPV 16	HPV 31, 33, 35, 52, 58, 67	Haut risque, lésions muqueuses
	10	HPV 6	HPV 11, 13, 44, 74	Bas risque, condylomes et papillomatose laryngée
	11	HPV 34	HPV 73	Haut risque, lésions muqueuses
	12	RhPV 1		Papillomavirus singe Rhésus
	13	HPV 54		Bas risque, lésions muqueuses
	14	HPV 90		Bas risque, lésions muqueuses
	15	HPV 71		Bas risque, lésions muqueuses

Tableau I (suite) : Classification des HPV [49].				
Genre	Espèce	Type principal	Autres types	Commentaires
<b>Bêta - papillomavirus</b>	1	HPV 5	HPV 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25, 36, 47, 93	Lésions cutanées, généralement bénignes. Lésions parfois malignes : épidermo-dysplasie verruciforme, immunodéprimés
	2	HPV 9	HPV 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80	Lésions cutanées, généralement bénignes. Lésions parfois malignes : épidermo-dysplasie verruciforme, immunodéprimés
	3	HPV 49	HPV 75, 76	Lésions cutanées bénignes
	4	HPV 92		Lésions cutanées pré-cancéreuses et cancéreuses
	5	HPV 96		Lésions cutanées pré-cancéreuses et cancéreuses
<b>Gamma - papillomavirus</b>	1	HPV 4	HPV 65, 95	Lésions cutanées
	2	HPV 48		Lésions cutanées
	3	HPV 50		Lésions cutanées
	4	HPV 60		Lésions cutanées
	5	HPV 88		Lésions cutanées
<b>Mu – papillomavirus</b>	1	HPV 1		Verrues vulgaires plantaires
	2	HPV 63		Verrues vulgaires plantaires
<b>Nu – papillomavirus</b>	1	HPV 41		Lésions cutanées, retrouvé dans les carcinomes cutanés

### *III. 3. 2. Classification basée sur le tropisme tissulaire :*

La diversité génétique des HPV s'accompagne d'une diversité biologique qui s'exprime notamment dans leur tropisme tissulaire. En effet, on distingue habituellement les HPV à tropisme cutané et ceux à tropisme muqueux. Cependant, il est à noter que cette distinction n'est pas aussi absolue, vu que certains types de HPV ne présentent pas un tropisme strict pour la peau ou les muqueuses, comme c'est bien mentionné dans le tableau II.

<b>Tableau II : Distribution des différents types de HPV selon leur tropisme [49].</b>	
<b>Tropisme</b>	<b>Types</b>
<b>cutané</b>	1, 2, 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 36, 37, 38, 41, 47, 48, 49, 50, 57, 60, 63, 65, 75, 76, 80, 88, 92, 93, 95, 96.
<b>Muqueux</b>	6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90.
<b>Mixte</b>	3, 7, 10, 28, 29, 40, 43, 78, 91, 94.

Les HPV à tropisme muqueux se localisent essentiellement au niveau des muqueuses anogenitales, et certains d'entre eux infestent également les muqueuses de la sphère oropharyngée. Ils appartiennent généralement au genre alpha-papillomavirus, alors que les HPV à tropisme cutané appartiennent essentiellement aux genres bêta-papillomavirus, gamma-papillomavirus, mu-papillomavirus, et nu-papillomavirus [49].

### *III. 3. 3. Classification basée sur le potentiel oncogène :*

Le pouvoir oncogène des HPV concerne essentiellement les HPV à tropisme muqueux. On distingue les HPV dits à haut risque (HR-HPV pour *high-risk* HPV), qui sont ceux que l'on peut retrouver dans des lésions de haut grade ou des carcinomes invasifs, et les HPV dits à bas risque

(LR-HPV pour *low-risk* HPV), qui sont retrouvés dans des lésions ne présentant pas un risque avéré d'évolution maligne.

Le tableau III présente la répartition des principaux types d'HPV en fonction de leur potentiel oncogène [8, 50]. Cette répartition, étant basée sur le risque de cancer du col de l'utérus associé au HPV, n'a pris donc en considération que ceux qui sont à tropisme muqueux.

Tableau III : Classification des HPV selon leur potentiel oncogène [49].	
Classification	Types
<b>Haut risque</b>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
<b>Haut risque probable</b>	26, 53, 66, 68, 73, 82
<b>Bas risque</b>	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

En ce qui concerne les HPV à tropisme cutané, il n'y a pas actuellement de classification en virus à bas risque ou haut risque, bien que certains types d'HPV cutanés soient indiscutablement associés au développement de carcinomes cutanés [49].

#### **III. 4. Les protéines virales :**

Les protéines traduites par les HPV sont classiquement réparties en " oncoprotéines " et protéines " non oncogènes ".

### *III. 4. 1. Les protéines "non oncogènes" :*

La protéine E1 est à l'origine de réPLICATION de l'ADN viral, alors que la séquence du gène E2 code pour au moins deux ou trois protéines agissant comme des facteurs de transcription et de modulation de l'ADN viral. Ensemble, E1 et E2 forment un complexe qui recrute des polymérases de la cellule hôte, nécessaires à la réPLICATION de l'ADN viral [51]. La protéine E2 semble aussi réguler l'expression d'autres gènes précoceS. En effet, certains mentionnent sa répression de l'expression des protéines E6 et E7 en inhibant l'activation du promoteur p97. Cependant, il semble que ceci ne se produit que lorsque l'ADN du HPV est intégré dans le génome de la cellule hôte (et non sous sa forme épisomale) [52]. E3 est un petit gène qui n'existe seulement que dans quelques types de HPV. Il n'est pas connu pour être exprimé en tant que protéine et son rôle demeure encore mal élucidé. La protéine E4 est exprimée plus tardivement dans le cycle cellulaire du HPV et module l'organisation des virions. On la retrouve exclusivement dans les couches épithéliales en différentiation [53]. E5 stimule l'activité transformante du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF pour *Epidermal Growth Factor*), menant à une augmentation du taux de la prolifération cellulaire. Contrairement à E4, E5 est exprimé préocemment dans le cycle de vie du HPV [53].

### *III. 4. 2. Les protéines oncogènes ou encore "oncoprotéines" :*

E6 et E7 sont des protéines oncogènes pouvant être surexprimées lors d'une infection par un HPV de haut risque. Cette surexpression est responsable d'une perte de la régulation du cycle cellulaire et d'une immortalisation des cellules. C'est en raison de leur capacité de dérèglement des mécanismes suppresseurs de tumeurs, que les protéines E6 et E7 ont été étudiées le plus.

- La protéine E7 :

La protéine E7 des HR-HPV est une oncoprotéine de 100 acides aminés capable de former une liaison de forte affinité avec la protéine du rétinoblastome (pRb). Sous sa forme hypophosphorylée, la protéine pRb est un suppresseur actif des tumeurs. En effet, c'est sous cette forme que pRb est capable de se lier au facteur de transcription E2F et de le séquestrer, prévenant ainsi l'entrée des cellules en phase S [54-57]. Le complexe E2F/pRb agit donc comme un répresseur de transcription.

Au cours d'un cycle cellulaire normal, pRb est phosphorylée par les cyclines D1/CDK4 et E/CDK2 ce qui cause la dissociation pRb/E2F. Le facteur de transcription E2F est ainsi libéré et active la transcription des gènes impliqués dans la poursuite du cycle cellulaire.

Au cours d'une infection par un HR-HPV, la protéine E7 peut se lier à pRb sous sa forme active hypophosphorylée, et empêche ainsi l'interaction E2F/pRb. En conséquence, l'inhibition du facteur de transcription E2F par pRb est levée, et E2F se trouve alors surexprimé. Ainsi, le contrôle de la transition des phases G1/S est perdu, le cycle cellulaire n'est plus contrôlé, et une prolifération cellulaire aberrante aura lieu [54-58]. De plus, E7 stimule la dégradation de pRb via le protéasome ce qui amplifie le phénomène de prolifération cellulaire [54].

- La protéine E6 :

Chez les HR-HPV, E6 est une protéine oncogène capable de se lier à la protéine p53 et d'induire sa dégradation [56, 59]. p53 est une protéine suppresseur de tumeur exprimée en réponse à des dommages de l'ADN [54]. Au cours d'un processus tumoral, des signaux de stress cellulaire activent cette protéine, causant ainsi un arrêt de la croissance cellulaire et/ou l'apoptose de la cellule. Lorsque p53 est dégradée via son interaction avec E6, il se produit un emballement du cycle cellulaire qui se traduit par une forte instabilité chromosomique permettant l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire.

De plus, E6 interagit avec d'autres protéines telles que :

- Les protéines PDZ des jonctions serrées dont elle induit la dégradation, ce qui résulte en une perturbation du contrôle de la prolifération, de la polarité, et de l'adhésion cellulaire [54, 55, 60].
- Les télomérases hTERT dont elle restaure l'activité, ce qui inhibe la sénescence et la mort cellulaire naturelle [54, 55].

En conclusion, ces oncoprotéines et les différentes interactions biomoléculaires qu'elles initient, participent largement à l'immortalisation cellulaire et à l'initiation du processus de cancérogenèse ; sur lequel on reviendra avec plus de détails dans un chapitre ultérieur (cf. chapitre IV.3.).

### **III. 5. Le cycle biologique des HPV :**

Le HPV est un virus qui présente un tropisme spécifique pour les épithéliums stratifiés muqueux ou squameux. Ce tropisme est expliqué par le fait que la réPLICATION du génome du HPV, ainsi que l'expression de ses gènes " E " et " L, sont intimement liées au processus de différenciation kératinocytaire [61]. Lors d'une infection naturelle, suite à un microtraumatisme ou autre lésion tissulaire, le HPV pénètre dans l'épithélium stratifié spécifiquement au niveau de l'assise basale. Cette spécificité est due aux interactions de la capsidE virale avec les molécules d'alpha-6-intégrine et les molécules de sulfate d'héparine, présentes essentiellement au niveau de la matrice extracellulaire enrobant la couche basale [62, 63]. Le virus pénètre ensuite dans la cellule par endocytose, par des modes différents selon le génotype impliqué. Une fois dans le cytoplasme, le virus migre activement vers le noyau cellulaire grâce au réseau de microtubules et de filaments d'actine du cytosquelette.

Pour profiter de la machinerie cellulaire, le virus doit alors passer la membrane nucléaire. La capsidE virale étant plus grande que le diamètre des pores nucléaire, elle est démantelée, et le génome viral encore lié aux protéines L1 et L2 est adressé au noyau grâce aux séquences de localisation nucléaire situées sur ces 2 protéines [16, 17].

Dans le noyau, la réPLICATION de l'ADN des HPV est dépendante des enzymes de la cellule et se déroule en 3 phases distinctes : d'établissement, de maintien et d'amplification.

La phase d'établissement consiste en la multiplication limitée du génome viral dans sa forme épisomale à raison de 50 à 100 copies par cellules. Cette phase a lieu dans les couches basales de l'épithélium, et le nombre de copies virales peut ainsi être maintenu quasi constant pendant de nombreuses années [53, 64].

Dans la phase de maintien, le génome viral se réplique avec l'ADN cellulaire au cours de la phase S. Ici, au cours de cette phase, Il s'agit d'un cycle non productif : c'est-à-dire que seule les protéines précoces sont exprimées [65].

La troisième phase correspond à la phase d'amplification : phase productive du cycle viral. Elle est dépendante des différentes étapes de la différenciation des cellules épithéliales, et débute donc dans les cellules supra-basales. Elle se caractérise par une réPLICATION très active du génome

viral (1000 à 10 000 copies par cellule), par une forte expression des protéines précoces, et surtout par l'activation des promoteurs des gènes tardifs dans les couches les plus superficielles. Cette dernière résulte en l'expression des protéines L1 et L2 de la capsid, permettant ainsi l'encapsidation du génome viral et la formation de nouveaux virions dans le noyau cellulaire [65]. Vu que les HPV ont un cycle non lytique, les virions matures et nouvellement formés seront donc libérés dans le milieu extérieur au cours de la desquamation des cellules épithéliales les plus superficielles, avant de se libérer et réinfecter d'autres cellules basales. Le cycle biologique des HPV est ainsi bouclé.

L'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule hôte ne fait pas partie du cycle normal du virus car elle empêche la production de nouveaux virions. En effet, l'intégration est précédée par la linéarisation du génome viral suite à une rupture aléatoire dans la région E1/E2, ce qui entraîne une perte d'expression de la protéine E2 qui ne régule donc plus la transcription des gènes transformants E6 et E7. Aujourd'hui, l'intégration est considérée comme étant l'un des événements les plus précoce de la cancérogenèse HPV-induite [53].

Classiquement, on considère que l'ADN des HPV est maintenu sous forme épisomale dans les lésions précurseurs des cancers, alors qu'il est retrouvé intégré dans les lésions invasives. Cependant, il est à noter que plusieurs études de biologie moléculaire ont conclu à l'existence de formes mixtes (ADN à la fois sous forme épisomale et sous forme intégrée) au sein de la même lésion [65].

## **IV. HPV et cancérogenèse au niveau des VADS :**

### **IV. 1. HPV et carcinomes épidermoïdes des VADS : une simple association ou une relation de causalité ? :**

Comme précédemment mentionné, les HPV peuvent être classés selon leur type, leur tropisme, ou encore leur pouvoir oncogène. Ce dernier n'est pas le même pour tous les types de HPV, et la plupart des auteurs s'accordent pour une classification binaire catégorisant les HPV en HPV à haut ou bas risque oncogène [8, 49]. L'OMS quant à elle, et toujours par rapport au pouvoir oncogène des HPV, a opté pour une catégorisation plus élaborée définissant 4 groupes de HPV [66]:

- les HPV du groupe 1 : HPV certainement cancérogènes pour l'homme,
- les HPV du groupe 2A : HPV probablement cancérogènes pour l'homme,
- les HPV du groupe 2B : HPV pouvant être cancérogènes pour l'homme,
- les HPV du groupe 3 : HPV inclassables quant à leur cancérogénicité pour l'homme.

Cependant, ces différentes classifications se sont basées essentiellement sur le pouvoir oncogène des HPV vis-à-vis de la muqueuse cervicale utérine, et leur rôle dans le déterminisme des carcinomes des VADS, n'a commencé à être mieux compris qu'au cours de la dernière décennie.

En effet, si l'implication des HPV dans les cancers des VADS a été suspectée dès le début des années 80 par une équipe finlandaise [6], ce lien a demeuré longtemps controversé. Ce n'est qu'au fil des années que des arguments de plus en plus convaincants sont venus corroborer et étayer cette hypothèse. Ces arguments retrouvés et rapportés dans plusieurs études peuvent être résumés ainsi [7-11] :

Tout d'abord, des données de l'ordre de l'épidémiologie descriptive, à savoir :

- une corrélation parfaitement significative entre les incidences des carcinomes épidermoïdes invasifs du col utérin ou du pénis et celles des carcinomes épidermoïdes invasifs de la cavité orale ;
- un risque statistiquement significatif et augmenté de la survenue d'un carcinome épidermoïde des VADS chez des patientes chez qui le diagnostic d'un carcinome invasif du col utérin a été déjà porté ;
- une fréquence des carcinomes de la cavité orale, du pharynx, et de l'œsophage ; 2 fois plus élevée chez des femmes ayant eu un carcinome in-situ du col utérin comparativement à celles qui en sont indemnes.

Aussi, des données de l'ordre de l'épidémiologie analytique, se rapportant aux particularités anatomo-cliniques des carcinomes des VADS associés aux HPV comparativement à ceux qui n'y sont pas associés ; à savoir :

- un âge de patients plus jeune ;
- des conditions socio-économiques plus élevées ;
- une consommation alcoololo-tabagique moins marquée, voire absente ;

- des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques) distinctives ;
- des altérations génétiques caractéristiques ;
- Un pronostic meilleur avec un taux global de survie plus élevé.

En 2007, ces constatations ont amené l'IARC à juger qu'il y avait suffisamment d'arguments pour considérer certains types de HPV (surtout le type 16) comme étant un facteur de risque indépendant pour les carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale et de l'oropharynx. Concernant les autres localisations des carcinomes associés aux HPV au sein des VADS (hypopharynx, larynx ...), leurs études ont été limitées par leur faible prévalence comparativement à ceux de l'oropharynx et de la cavité buccale. Néanmoins, vu que les types de HPV et les altérations génétiques qui y ont été retrouvés sont les mêmes, et constatant qu'ils répondent au même profil épidémiologique et anatomo-clinique, il semble que la reconnaissance de ces mêmes types de HPV comme étant des cancérogènes indépendants pour tous les carcinomes épidermoïdes des VADS n'est qu'une question de temps [23].

#### **IV. 2. Mode de contamination des muqueuses des VADS par le HPV :**

Il est bien établi actuellement que l'infection par le HPV est une infection sexuellement transmissible, responsable de plus de 95% des cancers du col de l'utérus [67].

Suite à un cas de papillomatose laryngée qui a été rapporté chez un médecin ayant traité plusieurs condylomes ano-génitaux par laser [68], certains travaux ont tenté de prouver la présence de l'ADN des HPV dans le vaporisat dégagé lors de tels actes. Cependant, leurs résultats se sont avérés contradictoires et non concluants [69, 70]. Ainsi, à ce jour, et malgré le rapport de ce cas anecdotique, il est à retenir que la contagiosité aérienne de ces virus n'a pas été démontrée.

Il semble donc que chez l'adulte, l'infection des VADS par le HPV passe quasi inévitablement par une infection de la cavité orale, de laquelle l'infection peut se propager par contiguïté vers les autres sites des VADS. Cette infection de la cavité orale se produit vraisemblablement via une transmission oro-génitale. En effet, plusieurs études ont montré l'existence de corollaires entre l'infection orale par HPV et certains aspects du comportement sexuel des patients qui en sont atteints, et qui peuvent être résumés comme suit [9, 71-73] :

- âge du premier rapport sexuel plus précoce ;
- nombre de partenaires sexuels plus important ;
- pratiques sexuelles oro-génitales ou oro-anales plus fréquentes.

Cependant, d'autres recherches ont trouvé que certains sujets porteurs d'une infection oropharyngée à HPV, ne se sont jamais adonnés à des pratiques sexuelles oro-génitales ou oro-anales [74-77]. Pour trouver une explication rationnelle à ces cas de figure, certains auteurs ont émis l'hypothèse d'une infection à HPV contractée à la naissance par transmission verticale de mère à enfant (telle que incriminée dans le développement de la papillomatose laryngée chez l'enfant). Cette infection ascendante se serait déclarée à l'âge adulte suite à des modifications immunitaires générales ou loco-régionales au niveau des VADS. Cette hypothèse, aussi séduisante fut-elle, semble néanmoins peu probable vu que la clairance des infections ORL à HPV, chez la plupart des sujets, se produit au bout de 2 ans après l'avoir contractée [78]. De même, le profil épidémiologique des papillomatoses laryngées chez l'enfant qui est bien différent de celui observé chez l'adulte, affaiblit encore cette hypothèse [79].

Pour conclure, il faut retenir que le " sexe oral " demeure la principale, mais non l'unique, source des infections des VADS par le HPV. D'autres modes de contamination restent donc envisageables dans l'attente de futurs travaux qui en étayeraient les mécanismes pathogéniques.

#### **IV. 3. Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse HPV-induite :**

Comme déjà mentionné, les HPV sont des virus à fort tropisme pour les muqueuses malpighiennes. Ce tropisme s'explique en grande partie par le fait que le cycle biologique même des HPV est étroitement lié aux différentes étapes de différenciation des cellules malpighiennes, depuis la couche basale jusqu'aux couches les plus superficielles [80]. En effet, la première étape de la cancérogenèse HPV-induite, consiste en l'infection des cellules proliférantes et non encore différencierées de l'assise épithéliale basale, suivie de l'expression de certains gènes viraux précoces, notamment les gènes E6 et E7. Le produit de traduction de ces derniers, à savoir les oncoprotéines E6 et E7, s'expriment essentiellement au niveau des cellules de la couche épineuse et/ou granuleuse. Ces oncoprotéines induisent l'entrée des cellules malpighiennes en phase S du cycle cellulaire, et permettent ainsi la réplication du génome viral [80]. Les protéines tardives L1 et L2 quant à elles, sont exprimées au niveau des couches les plus superficielles, encapsulent le génome viral, et donnent donc naissance à des virions matures [53].

C'est l'expression des oncoprotéines précoces E6 et E7 qui est largement responsable du dérèglement des différentes voies de prolifération et de différentiation cellulaire, en perturbant les mécanismes de signalisation intra-cellulaires [56, 65]. Cette perturbation consiste essentiellement en l'inactivation fonctionnelle des oncosuppresseurs p53 et pRB [56].

pRB a un mécanisme de suppression tumorale, qui bloque le cycle cellulaire en phase G1 via la séquestration du facteur de transcription E2F. Ce " frein moléculaire " est donc essentiel, car sans lui, la cellule serait toujours en division cellulaire. L'inactivation de pRB, médiée par l'oncoprotéine précoce E7, se produit suite à sa phosphorylation. Il en résulte l'augmentation du taux libre du facteur de transcription E2F, qui se traduit à son tour par une prolifération cellulaire aberrante ainsi qu'une augmentation de l'inhibiteur p16 de kinase dépendante des cyclines ( $p16^{INK4a}$ ) [57, 81]. C'est cette constatation même qui a amené certains auteurs à considérer que la surexpression de p16 comme étant un marqueur fiable du dérèglement cellulaire induit par les HPV biologiquement actifs [82-84].

Le ciblage de pRB par E7 résulte également en une augmentation du taux de l'oncosuppresseur p53, ce qui compromet la croissance cellulaire en augmentant sa susceptibilité à l'apoptose programmée.

On s'attend ainsi à une réduction du risque prolifératif tumoral de la cellule exprimant E7 en s'orientant vers son propre suicide par apoptose, mais c'est à ce niveau qu'intervient l'oncoprotéine E6 en neutralisant ce processus. En effet, cette dernière recrute une protéine ligase qui lui est associée ; avant de se lier à p53 pour former un complexe trimérique qui activera sa propre dégradation dans les protéasomes [60].

Ainsi, l'action combinée et synergique des oncoprotéines E6 et E7 résulte en :

- la perte de contrôle normal du cycle cellulaire,
- l'accumulation d'altérations génétiques et,
- l'abrogation de l'apoptose dépendante de p53.

Le schéma qui suit résume brièvement les étapes clés de la cancérogenèse induite par les HPV (figure 11).

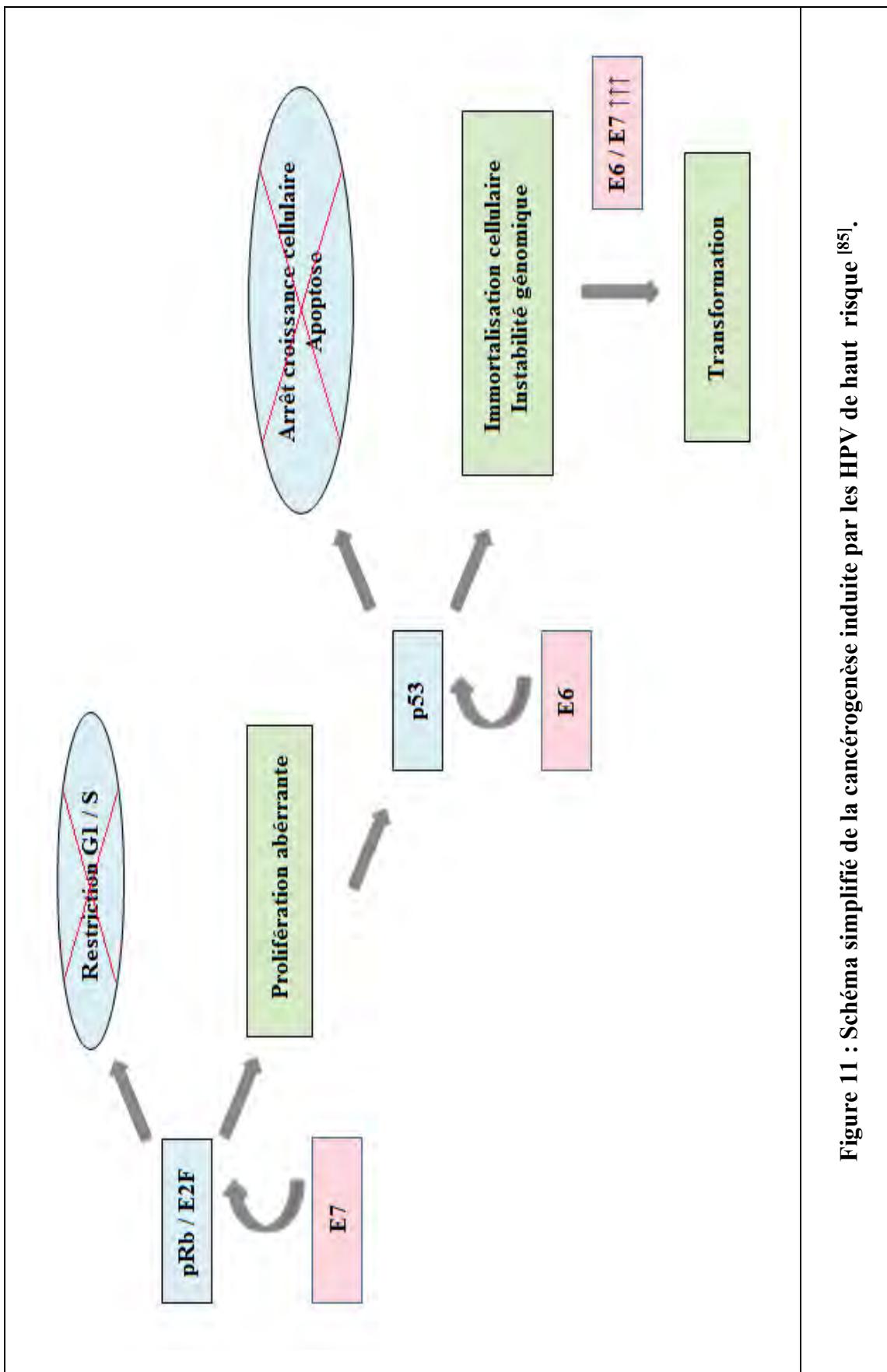


Figure 11 : Schéma simplifié de la cancérogenèse induite par les HPV de haut risque [85].

## V. Techniques de détection des HPV :

L'identification des HPV dans les fragments tissulaires peut se résumer à la simple détection de leur présence sans en spécifier le type, ou bien s'étendre au génotypage précis du virus retrouvé.

### V. 1. Détection des HPV sans précision du type :

Ici, le résultat obtenu indique juste l'absence ou la présence d'un ou de plusieurs HPV sans identification du (ou des) génotype(s) présent(s) dans l'échantillon. Pour ce faire, 2 approches sont classiquement opposées : la première vise la mise en évidence directe de l'une des composantes virales des HPV (ADN, ARNm ou protéines virales exprimées) ; alors que la deuxième se base sur la reconnaissance de signes indirects (morphologiques ou biologiques) induits par l'infection aux HPV dans un tissu donné.

#### V. 1. 1. *Identification directe de l'une des composantes structurales des HPV :*

Plusieurs techniques sont actuellement disponibles. Chacune présente des avantages et des inconvénients. Le choix de l'une ou de l'autre de ces techniques dépend largement de sa fiabilité en termes de sensibilité et spécificité, de son coût et sa disponibilité, et des habitudes du laboratoire considéré. Nous ne prétendons pas à une revue exhaustive de ces différentes techniques, mais nous nous contentons plutôt d'en citer les plus couramment utilisées et **déjà validées pour la recherche des HPV dans les carcinomes épidermoïdes des VADS**.

##### V. 1. 1. 1. Technique d'amplification génique en chaîne par polymérase (PCR) :

La PCR est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique in vitro. Cette amplification nécessite tout d'abord la lyse et l'extraction de l'acide nucléique contenu dans les cellules à tester, et sera suivie par une étape de révélation de la séquence nucléotidique amplifiée, généralement par le biais de réactions colorimétriques [86-88].

A partir d'une très faible quantité d'acide nucléique de l'ordre de quelques picogrammes, la PCR permet de multiplier avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard, une séquence

d'ADN connue et spécifique nommée "amplicon". Ce processus est rendu possible grâce l'utilisation d'une séquence marquée d'oligonucléotides de synthèse complémentaire de l'amplicon, appelée "amorce spécifique" ("*primer*" en anglais).

Cette technique a depuis longtemps fait ses preuves dans le domaine de la détection du HPV, pouvant même détecter jusqu'à une seule copie du génome viral à l'intérieur d'une cellule infectée, ce qui la rend très sensible [51]. Les amorces employées peuvent détecter une vaste gamme de types de HPV :

- soit en amplifiant une région du génome viral commune à plusieurs types et hautement conservée à travers l'espèce, telle que la séquence génomique codant pour la protéine L1: technique dite "PCR consensus" [86, 89, 90] ;
- soit en amplifiant une région unique et spécifique d'un type donné de virus, ce qui permet à la fois de détecter le virus et d'identifier le génotype impliqué : technique dite "PCR spécifique de type" [86, 89, 90].

Néanmoins, il est à noter que la PCR permet de déceler la présence d'ADN viral sans toutefois informer quant à son statut physique (épisomal ou intégré) ou à l'expression des gènes vitaux [26].

Pour les techniques de "PCR consensus", servant donc à la détection d'un large groupe de HPV sans en spécifier les types, 3 couples d'amorces sont couramment utilisées [91-94] :

- les amorces PGMY09/11, amorces de 20 paires de bases (pb) qui conduisent à un amplicon de 450 pb ;
- les amorces GP5+/GP6+ conduisent à un amplicon de 150 pb, et donc à une amplification de l'ADN beaucoup plus sensible ;
- les amorces SPF10 conduisent à un amplicon de 65 pb, donc à une détection très sensible.

La PCR peut être utilisée aussi bien sur des tissus congelés que sur des tissus fixés et préservés dans la paraffine, bien que son efficacité soit moindre dans ce dernier cas [95, 96].

En effet, en utilisant la technique de la PCR, Smeets *et al.* [97] ont procédé à la recherche de l'ADN des HPV dans des spécimens de carcinomes épidermoïdes des VADS, conservés respectivement par congélation et par fixation au formol suivie d'une inclusion en paraffine. Ils ont démontré que la prévalence du virus était diminuée de moitié dans le deuxième cas, témoignant ainsi d'une moindre sensibilité de cette technique pour les tissus conservés dans la paraffine.

Paradoxalement, de l'ADN de HPV fut détecté par PCR dans des spécimens de tumeurs conservés dans de la paraffine dont les tissus congelés en avaient démontré l'absence par la même technique de détection, représentant donc des faux-positifs et une moindre spécificité [97].

Outre sa relative disponibilité et son accessibilité, les avantages de la PCR résident donc dans sa grande sensibilité, surtout pour les tissus congelés. Ses désavantages consistent essentiellement en sa faible spécificité et l'occurrence de faux-positifs. Elle demeure cependant la technique la plus utilisée pour détecter l'ADN viral, seule ou en conjonction avec d'autres modalités diagnostiques [12, 13, 98].

Afin de gagner en sensibilité, une variante de la technique PCR nommée "la PCR nichée" (*nested PCR*) a été mise au point. Elle consiste en une première amplification, suivie d'une deuxième amplification des produits de l'amplification initiale. La deuxième amplification étant faite à partir d'amorces situées à l'intérieur de la séquence initiale. Ainsi, on peut par exemple commencer par l'amplification d'une séquence de 441pb à l'intérieur du gène L1, suivie par l'utilisation d'amorces nichées amplifiant une deuxième séquence de 335 paires de bases située à l'intérieur même de la première séquence de 441 pb. Ce gain en sensibilité a été prouvé dans une étude menée en Afrique du Sud par Kay *et al.* [99], qui a démontré que la PCR consensus par des amorces PGMY09/PGMY11 n'a détecté que 29% seulement de la totalité des spécimens contenant des HPV diagnostiqués par la PCR nichée.

Notons cependant, que le revers de la médaille de ce gain en sensibilité des méthodes utilisant des amorces nichées, s'est soldé par un taux élevé de faux-positifs et son corollaire qui est la perte en spécificité.

#### V. I. I. 2. La technique d'hybridation in-situ (ISH) :

C'est une technique qui est très proche, dans son principe, du Southern et du Northern Blot. Comme eux, elle repose sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique marquée (ADN ou ARN) avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. La principale différence est que les Southern et Northern Blot se font sur des broyats de tissus, alors que l'ISH s'effectue sur une coupe histologique de tissu. Les sondes utilisées sont marquées par des bases radioactives ou fluorescentes (FISH), afin de rendre l'ADN viral visible au microscope et quantifiable à l'aide de méthodes colorimétriques [100].

L'un des avantages de la technique d'ISH par rapport à la PCR consensus, est donc son utilisation sur des coupes histologiques. Ceci permet non seulement de détecter la présence du matériel génétique des HPV dans un spécimen, mais aussi sa localisation cellulaire exacte. Ainsi, selon le statut physique de l'ADN des HPV, le signal visuel obtenu au microscope sera soit diffus en cas d'ADN épisomal, soit ponctuel et de siège nucléaire s'il est intégré au génome de la cellule hôte [26]. A noter que ce renseignement qu'offre l'ISH quant au statut physique de l'ADN n'est pas forcément corrélé à son activité biologique. En effet, bien que l'intégration du génome viral soit fréquemment retrouvée dans les cancers ORL avancés, certaines études stipulent que même l'ADN épisomal pourrait s'avérer biologiquement actif et jouer un rôle crucial dans l'initiation et le développement tumoral [101].

Si l'ISH est réputée être une technique assez spécifique, son plus gros désavantage demeure son manque de sensibilité. Effectivement, bien que des améliorations de la technique aient mené à la capacité de détecter jusqu'à une seule copie d'ADN viral par cellule [102], sa sensibilité dans la détection des HPV n'est généralement fiable qu'en présence d'au moins une dizaine de copies du génome viral par cellule. La sensibilité de l'ISH est donc moindre que celle de la PCR dans la détection des HPV sur des échantillons de tumeurs ORL fixés au formol et inclus en paraffine. Elle diminue encore davantage si l'ISH a été pratiquée sur des échantillons frais et conservés par congélation [97, 103].

#### V. I. I. 3. La technique du transfert d'ADN :

Mieux connue sous le nom de *Southern Blot* (en hommage à son inventeur écossais Edwin Southern), il s'agit là aussi d'une technique d'hybridation par sonde, utilisée pour détecter l'ADN

viral sans que les cellules tumorales ne soient conservées [104]. Cette méthode se déroule de la façon suivante : après extraction de l'ADN, des enzymes de restriction sont employées pour le fragmenter, avant que les fragments obtenus ne soient séparés selon leur taille par un processus d'électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments d'ADN bicaténaire obtenus par digestion enzymatique sont par la suite dénaturés en brins d'ADN monocaténaire moyennant un traitement alcalin du gel d'électrophorèse. Ces derniers sont enfin transférés sur une membrane, où des sondes d'ADN (ou parfois d'ARN) étiquetées sont logées. En présence de conditions physico-chimiques bien définies, l'hybridation des sondes marquées avec l'ADN cible se fait selon la règle de complémentarité des bases azotées, et sera ultérieurement révélée par des techniques d'autoradiographie.

Malgré que la technique de *Southern Blot*, dans des conditions idéales, pourrait théoriquement détecter même une copie unique d'ADN viral par cellule ; plusieurs études ont souligné sa sensibilité de loin inférieure que celle de la PCR [9, 105].

#### V. I. I. 4. Identification de l'ARN messager des oncoprotéines E6 ou E7 :

La présence d'ADN du HPV dans un échantillon tumoral n'indique pas nécessairement l'expression de ses gènes viraux [97, 106, 107]. En effet, peu importe la localisation de son matériel génétique dans la cellule, l'activité biologique du HPV se manifeste plutôt par l'expression de l'ARNm des oncogènes E6 et E7, nécessaire à la transformation tumorale [54, 55, 108]. Ainsi, des procédés permettant à la fois de détecter la présence des HPV dans un spécimen tumoral et de prouver en plus son activité biologique, ont été mis au point. Il s'agit des 2 premières techniques déjà sus-citées (la PCR et l'ISH), mais qui sont utilisées cette fois-ci dans des modalités différentes.

- La transcriptase inverse – amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) :

Cette méthode emploie une transcription inverse afin de créer une séquence d'ADN à partir d'un ARNm. Cette séquence d'ADN est ensuite amplifiée à l'aide d'une PCR conventionnelle. Malgré une sensibilité et une spécificité élevées, la RT-PCR est peu utilisée en raison de la lenteur du processus et des difficultés d'usage. De plus, cette technique requiert l'emploi de tissus congelés, beaucoup plus difficiles à manipuler et à conserver que les tissus paraffinés [26]. Même si des études récentes ont su démontrer une sensibilité et une spécificité parfaites de la RT-PCR sur des tissus paraffinés comparées à celles obtenues sur des tissus congelés ; ceci n'a été validé que pour des tissus infectés

au HPV de type 16 [97, 103]. L'emploi de la RT-PCR demeure lourd d'un point de vue technique, et serait difficile à employer dans des études à grande échelle en raison de ces limitations pratiques.

- L'ISH avec utilisation de "ribosondes" :

Pour identifier l'ARNm de E6 et E7, on peut aussi employer l'ISH avec des sondes complémentaires d'ARN (ribosondes). Le principe est donc similaire à celui de l'identification d'ADN par ISH, et permet ainsi l'identification et la localisation de l'ARNm des oncoprotéines virales. Cette technique fut déjà employée pour détecter la transcription d'ARNm de E6/E7 dans des cancers des amygdales [109]. L'ISH d'ARNm serait moins sensible que la RT-PCR, mais tout aussi spécifique quant à l'activité biologique du HPV [26].

#### *V. I. 2. Identification indirecte des HPV :*

##### *V. I. 2. 1. L'immunohistochimie (IHC) pour la protéine p16 :*

La protéine p16, appelée encore MTS1 pour *multiple tumor suppressor 1*, est une protéine dotée d'un pouvoir onco-supresseur, dont le gène est localisé en 9p21 [110]. C'est une protéine qui est surexprimée dans les spécimens de carcinomes épidermoïdes des VADS HPV-induits, et a surtout été étudiée par IHC. Puisque la majorité des tumeurs HPV-induites expriment fortement p16, l'utilisation de l'IHC pour la mise en évidence de cette protéine comme technique de détection des HPV, semble être un outil diagnostique hautement sensible. Ce constat a été corroboré par plusieurs études qui ont rapporté une forte corrélation entre la présence de p16 et celle d'ADN des HPV (détecté par PCR ou ISH) [62, 103, 111-117]. Cependant, cette excellente sensibilité de cette méthode est contrecarrée par une spécificité un peu douteuse et qui a été remise en question dans plusieurs travaux [62, 97, 106, 115, 116, 118, 119]. En effet, il a été démontré que certaines tumeurs contenant un HPV biologiquement actif et exprimant bien les protéines E6 et E7, n'exprimaient pas p16 [103, 106]. Paradoxalement, d'autres recherches ont prouvé que, dans un certain nombre d'échantillons de carcinomes épidermoïdes des VADS, p16 était surexprimée alors que l'on notait l'absence d'E6 / E7 ou même de l'ADN viral des HPV [97, 118]. Pour expliquer ces faits, certains auteurs sont allés jusqu'à suggérer l'existence d'un sous-type de tumeurs non liées au HPV, mais dont les caractéristiques histologiques et pronostiques sont semblables à celles des tumeurs HPV-induites. [120, 121].

*V. I. 2. 2. L'identification par l'aspect microscopique des tissus cancérisés :*

Les carcinomes épidermoïdes des VADS HPV-induits présentent microscopiquement une morphologie cellulaire et une architecture tumorale assez caractéristiques, sur lesquelles on reviendra en détails dans le chapitre "Aspects anatomopathologiques des carcinomes épidermoïdes des VADS associés et non associés aux HPV". Ce phénotype tumoral distinct et reconnaissable à l'examen histologique demeure cependant non spécifique, ni de la présence des HPV, ni encore plus du statut de leur activité biologique. Vu l'inévitable variabilité inter-observateurs dans l'interprétation microscopique des échantillons tumoraux, et vu la présence de techniques de biologie moléculaire beaucoup plus pertinentes et fiables (qu'on vient de décrire) ; la détection des HPV par l'analyse histologique demeure donc désuète et revêt plutôt juste un caractère d'orientation.

Le tableau qui suit, résume les principaux avantages et inconvénients des différentes techniques d'identification des HPV (Tableau IV).

<b>Tableau IV : Avantages et inconvénients des principales techniques de détection des HPV au niveau des tissus [26].</b>		
<b>Méthode de détection</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>PCR</b>	Bonne sensibilité De plus en plus disponible	Faible spécificité Utilisation difficile
<b>ISH</b>	Bonne spécificité	Faible sensibilité
<b>Southern Blot</b>	Bonne spécificité	Faible sensibilité
<b>ARNm E6/E7</b>	Bonne sensibilité Bonne spécificité	Nécessité de tissus congelés Utilisation difficile
<b>IHC de p16</b>	Très haute sensibilité Largement disponible	Spécificité douteuse
<b>Morphologie</b>	Toujours disponible Non coûteuse	Corrélation imparfaite Reproductibilité inter et intra-observateurs douteuse

## V. 2. Génotypage des HPV :

Chaque virus HPV a son "empreinte génétique" qui le caractérise et définit son type. Cette empreinte n'est autre qu'une séquence nucléotidique localisée dans son génome et qui lui est spécifique. Génotyper un HPV, passe obligatoirement donc par des techniques de biologie moléculaire qui permettent le séquençage du génome. Ainsi, les 3 premières techniques sus-décrivées, à savoir, la PCR, l'ISH, et la *Southern Blot* ; sont donc également utilisables pour le génotypage des HPV. Elles gardent les mêmes modalités d'utilisation avec la seule différence que, au lieu d'employer des sondes reconnaissant une séquence nucléotidique commune à tous les HPV (localisée en l'occurrence en L1), on utilise des sondes qui identifient une séquence génétique caractéristique et spécifique d'un type précis de HPV.

Une note particulière est à signaler tout de même concernant une "variante" de la PCR appelée "PCR à puces d'ADN", et qui commence à devenir une technique de référence en matière de génotypage viral [86].

Globalement, cette technique se déroule de la manière suivante. La PCR HPV de genre est réalisée avec des amorces fluorescentes, puis le produit PCR est hybridé sur une lame. Cette lame contient les sondes spécifiques des génotypes d'HPV recherchés, déposées sous forme de spots bien distincts. Les puces applicables au diagnostic sont des puces avec 5 à 100 sondes différentes par lame. Le produit PCR étant fluorescent aucune étape de révélation n'est nécessaire et, après lavage de la lame, la lecture se fait directement sur un scanner qui localise l'hybride cible-sonde et en déduit le génotype [122]. Cette technique est simple, sensible et rapide. Elle permet également de détecter les différents types dans les infections HPV multiples.

## VI. Signes cliniques et profil épidémiologique des carcinomes épidermoïdes associés et non associés aux HPV au niveau des VADS :

Avant de rapporter le profil clinico-épidémiologique des carcinomes épidermoïdes des VADS (associés et non associés aux HPV), il nous a semblé judicieux de rappeler la classification des différentes tumeurs épithéliales malignes primitives rencontrées à ce niveau. A vrai dire, il n'y a pas une véritable classification histologique intitulée " classification des tumeurs des VADS ", mais plutôt une classification dépendante de l'organe. Nous avons donc revu les différentes classifications

proposées par l'OMS pour chaque organe qui appartient aux VADS telles que précédemment définies, et nous en proposons une synthèse globale rapportée dans le tableau V. Cette synthèse a été élaborée en se basant sur les différentes classifications histologiques rapportées dans le bouquin "Pathologie et génétique des tumeurs de la tête et du cou ", publié par l'OMS en 2005 [3]. La fréquence de chaque type de tumeur étant mentionnée à chaque fois où elle a été précisée.

**Tableau V :**

**Classification histologique des tumeurs épithéliales malignes primitives au niveau des VADS.  
(adaptée à partir des classifications OMS des tumeurs de la tête et du cou [3].)**

Siège	Type histologique	Fréquence	
<b>Fosses nasales &amp; Sinus paranasaux</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinome épidermoïde (C.E.) conventionnel           <ul style="list-style-type: none"> <li>C.E. dans sa forme verrueuse</li> <li>C.E. dans sa forme papillaire</li> <li>C.E. dans sa forme basaloïde</li> <li>C.E. à cellules fusiformes</li> <li>C.E. acantholytique</li> <li>Carcinome adénosquameux</li> </ul> </li>   <li>- Carcinome lymphoépithelial</li>   <li>- Carcinome sinonal indifférencié</li> </ul>	<p>Le carcinome épidermoïde et ses variantes constituent à eux seuls plus que 50 % des tumeurs épithéliales malignes primitives rencontrées au niveau du tractus sino-nasal.</p> <p>Rare</p> <p>Très rare (une centaine de cas rapportés à ce jour).</p> <p>Les adénocarcinomes sur tractus sinonassal sont assez fréquents et occupent la troisième place après les C.E. et le carcinome adénoïde kystique.</p> <p>Assez fréquents (le plus fréquent étant le carcinome adénoïde kystique, suivi du carcinome mucoépidermoïde).</p> <p>Rares</p>
<b>Tumeurs neuroendocrines</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumeurs neuroendocrines           <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoïde typique</li> <li>Carcinoïde atypique</li> <li>Carcinome à petites cellules de type neuroendocrine</li> </ul> </li> </ul>	

**Tableau V**  
**(suite) :** Classification histologique des tumeurs épithéliales malignes primitives au niveau des VADS.  
 (adaptée à partir des classifications OMS des tumeurs de la tête et du cou [3].)

Siège	Type histologique	Fréquence
Nasopharynx	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinome nasopharyngé</li> <li>    Carcinome non kératinisant</li> <li>    Carcinome épidermoïde kératinisant</li> <li>    Carcinome épidermoïde dans sa forme basaloïde</li>   <li>- Adénoarcinome papillaire nasopharyngien</li>   <li>- Carcinomes des glandes salivaires accessoires</li> </ul>	<p>Plus que 90 % des carcinomes primitifs du cavum. La forme non kératinisante est la plus fréquente (75 à 99 % des carcinomes nasopharyngés), suivie de la forme kératinisante (1 à 25 %).</p> <p>Rare</p> <p>Rares (les plus rencontrés étant le carcinome adénoïde kystique et le carcinome muco-épidermoïde).</p>
Hypopharynx & Larynx	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinome épidermoïde (C.E.) conventionnel</li> <li>    C.E. dans sa forme verrueuse</li> <li>    C.E. dans sa forme basaloïde</li> <li>    C.E. dans sa forme papillaire</li> <li>    C.E. à cellules fusiformes</li> <li>    C.E. acantholytique</li> <li>    Carcinome adénosquameux</li>   <li>- Carcinome lymphoépithéial</li>   <li>- Carcinome à cellules géantes</li> </ul>	<p>Le carcinome épidermoïde et ses variantes constituent les tumeurs épithéliales malignes primitives les plus fréquentes rencontrées à ce niveau (95 % des carcinomes primitifs du larynx et 90 % des carcinomes primitifs de l'hypopharynx).</p> <p>Rare</p> <p>Extrêmement rare</p> <p>Rares (les plus rencontrés étant le carcinome adénoïde kystique et le carcinome muco-épidermoïde).</p>

**Tableau V**  
 (suite) : **Classification histologique des tumeurs épithéliales malignes primitives au niveau des VADS.**  
 (adaptée à partir des classifications OMS des tumeurs de la tête et du cou [3].)

Siège	Type histologique	Fréquence
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinome épidermoïde (C.E.) conventionnel           <ul style="list-style-type: none"> <li>C.E. dans sa forme verrueuse</li> <li>C.E. dans sa forme basaloïde</li> <li>C.E. dans sa forme papillaire</li> <li>C.E. à cellules fusiformes</li> <li>C.E. acantholytique</li> <li>Carcinome adénosquameux</li> <li>Carcinome cuniculatum</li> </ul> </li>   <li>- Carcinome lymphoépithelial</li> </ul>	<p>Le carcinome épidermoïde et ses variantes constituent à eux seuls plus que 90 % des tumeurs épithéliales malignes primitives rencontrées au niveau de l'oropharynx et de la cavité orale.</p> <p>0.8 à 2 % des carcinomes primitifs rencontrés à ce niveau.</p>
<b>Oropharynx &amp; Cavité orale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinomes des glandes salivaires accessoires</li> <li>Carcinome à cellules acineuses</li> <li>Carcinome mucoépidermoïde</li> <li>Carcinome adénoïde kystique</li> <li>Adénocarcinome polymorphe de bas grade</li> <li>Adénocarcinome à cellules bassales</li> <li>Carcinome épithelial-myoépithelial</li> <li>Carcinome à cellules claires, sans autre spécificité</li> <li>Cystadénocarcinome</li> <li>Adénocarcinome mucineux</li> <li>Carcinome oncocytaire</li> <li>Carcinome caniculaire</li> <li>Carcinome myoépithelial</li> <li>Carcinome ex adénome pléomorphe</li> </ul>	<p>Les carcinomes des glandes salivaires accessoires constituent 1.1 à 3.3 % de l'ensemble des tumeurs épithéliales malignes primitives rencontrées au niveau de l'oropharynx et de la cavité orale. Les plus fréquents observés à ce niveau étant le carcinome adénoïde kystique, le carcinome mucoépidermoïde, et l'adénocarcinome polymorphe de bas grade.</p>

## **VI. 1. Signes cliniques des carcinomes épidermoïdes des VADS :**

Associés ou non aux HPV, les carcinomes épidermoïdes des VADS ont une présentation clinique qui est la même que celle de tout autre cancer prenant naissance à ce niveau [3, 123]. La symptomatologie de ces tumeurs est assez variée et dépend largement de l'organe atteint.

C'est ainsi qu'au niveau du tractus sino-nasal et du nasopharynx, la symptomatologie de ces tumeurs est dominée essentiellement par des signes d'ordre rhinologique (obstruction nasale, écoulement sanguinolent, épistaxis ...), des signes otologiques (acouphènes, hypoacusie ...), des signes oculaires (paralysie oculomotrice, exophtalmie ...), ou encore des signes neurologiques (céphalées, algie faciale, diplopie ...) [3, 123, 124].

Au niveau de l'hypopharynx et du larynx, ce sont la gêne pharyngée, l'odynophagie, la dysphagie, les crachats hémoptoïques, la dysphonie, et la dyspnée qui viennent généralement révéler un processus néoplasique malin [3, 34, 125].

Au niveau de la cavité orale et de l'oropharynx, la symptomatologie est souvent assez vague à type d'une gêne pharyngée, d'une gêne à la mastication ou à l'élocution [3]. Plus rarement, il s'agit d'une perception par la pointe de la langue d'une modification du relief muqueux oral [3].

Notons cependant, qu'aucun de ces signes pris isolément ne revêt un caractère alarmant sans le contexte épidémiologique dans lequel il s'est présenté, et qui fera l'objet du chapitre suivant.

L'examen physique quant à lui, couplé à l'exploration endoscopique, s'acharnera à mettre en évidence la masse tumorale suspecte ; et à bien examiner les aires ganglionnaires cervicales et supra-claviculaires à la recherche d'adénopathies suspectes. En effet, la constatation d'une ou de plusieurs adénomégalias cervicales évoluant de façon chronique constitue une circonstance de découverte fréquente et classique des tumeurs malignes des VADS. Par exemple, rien que pour le carcinome nasopharyngé, des adénopathies cervicales uni- ou bilatérales sont retrouvées dans au moins 70 % des cas [3].

## **VI. 2. Profil épidémiologique général des carcinomes épidermoïdes des VADS :**

### *VI. 2. 1. Epidémiologie descriptive :*

#### *VI. 2. 1. 1. Incidence et répartition géographique :*

Le carcinome épidermoïde est la tumeur maligne la plus fréquente au niveau des VADS, avec 616 000 nouveaux cas enregistrés à travers le monde en l'an 2000 [2]. Cette incidence n'est pas partout la même, aussi bien au sein même des VADS, que quant à sa distribution géographique. Ce fait a emmené certains auteurs à opter pour une " classification épidémiologique " de ces tumeurs, dans laquelle les paramètres épidémiologiques pour chaque classe prédefinie sont sensiblement les mêmes [126]. Cette classification proposée par Lefebvre *et al.* reconnaît ainsi 3 groupes, définis comme suit [126] :

- Groupe " cavité buccale – oro et hypopharynx – larynx "
- Groupe " fosses nasales - cavités nasosinusienes "
- Groupe " nasopharynx "

Considérant le groupe " cavité buccale – oro et hypopharynx – larynx ", le carcinome épidermoïde est le cancer le plus rencontré à ce niveau où il constitue à lui seul plus que 90% de l'ensemble des néoplasies épithéliales primitives [3]. L'Europe est le continent le plus touché avec une incidence annuelle (après ajustement sur la population mondiale) de 26 pour 100 000 hommes et de 2,4 pour 100 000 femmes ; la plus forte incidence étant enregistrée en France [126]. Quant au groupe " fosses nasales - cavités nasosinusienes ", le carcinome épidermoïde devient moins fréquent ici, mais représente tout de même un peu plus que 50% des cancers épithéliaux observés à ce niveau [3]. En dehors du Japon, on n'observe pas de zones géographiques de prédilection pour ces tumeurs [126]. Enfin, pour le groupe " nasopharynx ", c'est le type histologique " carcinome totalement indifférencié de type nasopharyngé " qui devient le plus fréquent [3, 126]. Il a une répartition géographique et ethnique bien particulière : l'Asie du Sud-Est est la région de plus forte incidence (20 pour 100 000 habitants), suivie à un degré moindre des pays du Maghreb (5 à 15 pour 100 000 habitants), alors que ce cancer est rare ailleurs dans le monde (moins de 1 pour 100 000 habitants) [3, 126].

### VI. 2. 1. 2. Âge et sexe :

Hormis les cas des carcinomes observés au niveau du nasopharynx, le pic d'incidence de ces tumeurs ailleurs au niveau des VADS se situe globalement vers l'âge de 60 ans [3, 126]. Quant aux carcinomes nasopharyngés, les données relatives à l'âge au moment du diagnostic qui ont été rapportées, sont issues essentiellement d'études faites dans les pays de forte incidence (le Sud-Est asiatique) et les pays d'incidence intermédiaire (les pays maghrébins). Dans ces contrées, l'incidence de ces tumeurs augmente vers l'âge de 30 ans pour atteindre un pic d'incidence entre 40 et 60 ans [3], avec toutefois une particularité pour les populations maghrébines où deux pics se dessinent : l'un vers 10-20 ans, et l'autre vers 60 ans [126].

Concernant la distribution selon le sexe, globalement, une prédominance masculine est notée quel que soit le siège de la tumeur ; avec un sexe-ratio allant de 1,5 au niveau du tractus sino-nasal à 3 au niveau du cavum et du larynx [3].

### VI. 2. 2. Epidémiologie analytique (les facteurs de risque) :

#### VI. 2. 2. 1. La consommation alcoololo-tabagique :

Le rôle de la consommation alcoololo-tabagique dans la survenue des carcinomes épidermoïdes et autres types de tumeurs malignes au niveau des VADS est indubitable et bien avéré depuis plusieurs décades [2, 3, 126, 127].

Le tabac est incontestablement le cancérigène le plus évident, et agirait de 3 façons :

- par ses composants cancérigènes, avec plus de 30 agents reconnus comme carcinogènes certains (hydrocarbures aromatiques polycycliques et nitrosamines en particulier) ; véhiculés par la fumée ou dissous dans la salive ;
- par ses composants toxiques (nicotine) et son action sur le système artériel ;
- par sa température de combustion (environ 850°) qui engendre une brûlure chronique et constitue donc une agression thermique certaine.

Les effets cancérigènes de l'alcool sont par contre plus difficiles à apprécier. En effet l'éthanol lui-même n'a aucun rôle cancérigène. En revanche, les boissons alcoolisées peuvent

contenir des substances qui en ont un, comme les esters de phorbols contenus dans les apéritifs anisés. L'éthanol, outre qu'il peut être associé à de telles substances, semble aussi intervenir de trois façons :

- par irritation locale proportionnelle à la concentration d'éthanol ;
- par dégradation de l'état général et des moyens de défense de l'organisme (insuffisance hépatique, carences nutritionnelles, défaut de stockage de vitamine A) ;
- comme solvant des agents cancérigènes du tabac.

Bien que les mécanismes cancérigènes du tabac et de l'alcool sont différents, l'association des deux est si souvent retrouvée qu'il ne serait pas logique de les envisager séparément. De plus, la consommation de tabac des patients qui ne consommaient pas de boissons alcoolisées n'était pas statistiquement différente de celle des patients qui en consommaient. De la même façon, la consommation d'alcool des patients qui reconnaissaient un tel abus mais qui ne fumaient pas était semblable à celle de ceux qui reconnaissaient une intoxication mixte [126].

Cependant, il est à rappeler que si ces deux facteurs de risque sont souvent associés, le risque relatif de survenue de cancer dû à leur consommation simultanée n'est pas le même qu'en cas de prise isolée de l'un ou de l'autre [126, 127]. En effet, depuis les travaux de Rothman et Keller [128], il a été bien établi que le risque relatif était de 1 chez les " non-buveurs-non-fumeurs ", qu'il s'élevait à 2,33 chez les " grands fumeurs-non-buveurs ", à 2,43 chez les " grands buveurs-non-fumeurs ", et beaucoup plus à 15,5 chez les " grands buveurs-grands fumeurs ".

La consommation alcoolo-tabagique est un facteur de risque retrouvé de façon quasi constante pour les carcinomes épidermoïdes du groupe " cavité buccale – oro et hypopharynx – larynx ". En effet, dans certaines études, jusqu'à 99% des patients atteints d'un carcinome à ce niveau ont rapporté avoir été fumeurs et/ou buveurs d'alcool [126, 129]. Par contre, l'alcoolo-tabagisme n'a été que rarement retrouvé dans les carcinomes épidermoïdes du tractus sino-nasal, et n'a pratiquement jamais été incriminé dans les carcinomes du nasopharynx [3, 126].

A noter enfin, que l'influence du type de tabac sur le siège de la tumeur n'est pas encore clairement établie. Il est habituel de dire que la chique, la pipe et le cigare prédisposent plutôt aux cancers buccaux, les cigarettes manufacturées aux cancers du larynx, et les cigarettes « roulées » aux cancers pharyngés ; mais aucune étude rigoureuse n'a analysé ces corrélations [126, 127].

#### VI. 2. 2. 2. Les facteurs viraux :

- L'Epstein-Barr Virus (EBV) :

L'EBV est un virus ubiquitaire puisque l'on considère que les quatre cinquièmes de la population mondiale seraient porteurs sains de ce virus. Selon les cas et les régions, il serait responsable soit de la mononucléose infectieuse, soit du lymphome de Burkitt, soit du cancer nasopharyngé [126]. Indépendamment de l'origine ethnique, l'association de l'EBV avec le carcinome nasopharyngé dont témoigne la présence quasi constante de l'ADN viral dans les cellules tumorales, en fait un facteur de risque indéniable pour les carcinomes du cavum [2, 3, 126, 127].

- Le HPV :

Comme nous venons de le voir, le tabac et l'alcool constituent les principaux facteurs de risque des carcinomes épidermoïdes des VADS. Suite aux campagnes de sensibilisation et de lutte anti-tabac débutées dans les années 70, la consommation tabagique a considérablement régressé de par le monde. Malgré cette importante régression, l'incidence des carcinomes des VADS est restée assez stable durant les 3 dernières décades [12, 24, 51, 130, 131]. Cette stabilité est en grande partie expliquée par l'émergence d'une nouvelle entité de carcinomes des VADS : ceux qui sont liés aux HPV. En effet, selon les contrées, ces néoplasies HPV-induites représenteraient jusqu'à 30 % de l'ensemble des carcinomes observés au niveau des VADS [12, 129, 131-133]. Le profil épidémiologique des patients qui en sont atteints sera détaillé dans le prochain chapitre (chapitre VI. 3.).

#### VI. 2. 2. 3. Les facteurs nutritionnels :

Les facteurs nutritionnels ne sont pas classiquement considérés comme étant des facteurs de risque des carcinomes du tractus sino-nasal. Par contre, ailleurs au niveau des VADS, ils ont été bien reconnus et identifiés comme tels. C'est ainsi que les produits alimentaires conservés par salaison, riches en nitrosamines volatiles et en agents bactériens mutagènes, ont été largement impliqués dans la cancérogenèse des carcinomes nasopharyngés [3, 126, 127]. De même, le type du régime alimentaire semble influencer le risque relatif de développer un carcinome épidermoïde au niveau du groupe " cavité buccale – oro et hypopharynx – larynx ". En effet, la moindre incidence de ces carcinomes en cas d'alimentation riche en légumes et en fruits est une notion incontestable [3, 126,

127]. Le risque de cancer oropharyngé étant par exemple trois à cinq fois moindre selon l'importance relative de ce type d'alimentation. Cette constatation a d'ailleurs supporté la recherche de chimio-prévention par rétinoïdes ou caroténoïdes [3, 126]. Notons enfin le cas particulier du syndrome de Plummer-Vinson, où un carcinome épidermoïde de localisation rétro-crico-aryténoïdienne est retrouvé dans plus que 50% des cas. La correction de l'anémie sidéropénique (observée invariablement dans ce syndrome) par l'apport de fer dans l'alimentation réduit considérablement le risque de survenue de ce carcinome [126].

*VI. 2. 2. 4. Autres facteurs :*

Plusieurs autres facteurs ont été reconnus comme étant des facteurs de risque de survenue de carcinomes épidermoïdes au niveau des VADS. Citons l'exemple du nickel, du chlorophénol et des poussières de l'industrie textile pour le tractus sino-nasal ; d'une certaine prédisposition génétique pour le nasopharynx ; de la mauvaise hygiène bucco-dentaire pour la cavité orale ; de l'amiante et du RGO pour le larynx [2, 3, 126, 127].

**VI. 3. Profil épidémiologique des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV:**

*VI. 3. 1. Epidémiologie descriptive :*

*VI. 3. 1. 1. Incidence, prévalence, répartition géographique et raciale :*

Le rôle du virus HPV est maintenant reconnu dans la cancérogenèse des carcinomes épidermoïdes des VADS. Depuis l'an 2000, plusieurs centaines d'articles scientifiques ont été publiés sur le rôle de l'HPV dans les cancers des VADS. Il en ressort que la relation de cause à effet des HPV avec les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx et la base de la langue est actuellement bien établie. Au niveau des autres sites des VADS, même si de l'ADN viral a été retrouvé au niveau du tissu tumoral, la relation de causalité n'a pas été toujours prouvée de façon certaine [5, 130, 134]. La plupart des données épidémiologiques consistantes et fiables qui ont été rapportées dans la littérature, sont donc issues de travaux ayant traité essentiellement le profil épidémiologique des carcinomes épidermoïdes associés aux HPV au niveau de l'oropharynx.

L'analyse de ces données montre que l'importance de la présence du HPV dépend non seulement de la localisation de la tumeur, mais aussi de l'origine géographique et ethnique [134]. C'est ainsi, qu'au cours de ces 3 dernières décades, les carcinomes épidermoïdes associés aux HPV ont vu leur incidence augmenter considérablement aussi bien aux Etats-Unis [132], qu'au Canada [133], qu'en Australie [131], et qu'en Europe [129]. En Europe, c'est dans les pays scandinaves que la prévalence est la plus forte [12, 129, 134]. Dans une méta-analyse portant sur 5046 cas de carcinomes épidermoïdes des VADS (toutes localisations confondues), colligés à partir de 60 études provenant de 26 pays différents ; la prévalence d'une infection par le HPV était de 25,9 % [12]. L'oropharynx était une localisation préférentielle de l'infection par le HPV avec une prévalence de 35,6 % ; suivi du larynx et de la cavité orale avec des fréquences respectives de 24% et 23,5% [12].

Quant à l'origine ethnique, il semble que les carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV sont beaucoup moins fréquents chez la race noire que chez la race caucasienne [130, 132]. En effet, dans une étude assez récente, il a été constaté que la prévalence du HPV dans les carcinomes des VADS était seulement de 4% chez la race noire contre 34% chez la race caucasienne [135].

#### VI. 3. 1. 2. Âge et sexe :

Les données concernant l'âge au moment du diagnostic des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV, demeurent un peu controversées. En effet, la comparaison des moyennes d'âge des patients présentant un carcinome associé aux HPV avec celle de ceux qui en sont dépourvus ; n'a pas toujours abouti aux mêmes constats. C'est ainsi que même si, dans la plupart des études, la moyenne d'âge dans le premier groupe était significativement inférieure à celle du deuxième [129-132] ; d'autres travaux ont conclu à l'absence de toute différence d'âge statistiquement significative entre les 2 groupes [136, 137].

En revanche, les études qui se sont intéressées au sexe-ratio ont vu leurs résultats concordants : les carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV étaient plus fréquents chez l'homme que chez la femme avec un sexe-ratio allant de 2,5 jusqu'à 5,4 [138-142].

## *VI. 3. 2.      Epidémiologie analytique :*

### *VI. 3. 2. 1.    Le type du HPV :*

Les différents types de HPV n'ont ni le même tropisme ni le même pouvoir oncogène vis-à-vis de la muqueuse des VADS. Toutes localisations confondues, le HPV de type 16, le plus prévalent au niveau des lésions malignes du col utérin, est aussi le plus fréquemment retrouvé au niveau des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV [12, 24, 143-145]. En effet, Selon la méta-analyse de Kreimer *et al.* qui a porté sur plus de 5000 cas [12], la fréquence du HPV 16 parmi l'ensemble des HPV isolés était de 86,7 % au niveau de l'oropharynx, de 58,2 % au niveau de la cavité orale, et de 69,2 % au niveau du larynx. Vient en deuxième position le HPV de type 18, qui a plutôt une prédisposition pour la cavité orale alors qu'il est rarement isolé au niveau de l'oropharynx. Effectivement, toujours selon la même méta-analyse [12], la prévalence du HPV 18 au niveau de la cavité orale était de 34,1 %, de 17 % au niveau du larynx, et de 2,8 % seulement au niveau de l'oropharynx. A côté des HPV 16 et 18, d'autres types ont été aussi isolés au niveau des VADS mais dans des proportions ne dépassant pas les 15 % [12, 143]. Il s'agit essentiellement des types 33, 35, 45, et 58 [143]. A noter enfin, qu'une double infection par 2 types différents de HPV a été aussi notée. Miller *et al.* [146] ont estimé que jusqu'à 24% des carcinomes associés aux HPV des VADS peuvent être le siège d'une double infection ; les 2 types les plus fréquemment retrouvés en association étant les types 16 et 18.

### *VI. 3. 2. 2.    Le comportement sexuel :*

Actuellement, il est unanimement admis que certaines habitudes sexuelles font partie intégrante du profil épidémiologique des patients atteints d'un carcinome HPV (+) des VADS. Ces pratiques sexuelles qui majorent le risque relatif de survenue de tels cancers peuvent être résumés comme suit [63, 71, 147-149] :

Le risque d'avoir un carcinome associé au HPV au niveau des VADS est d'autant plus important que :

- si l'activité sexuelle a débuté à un âge plus jeune,
- si le nombre de partenaires sexuels est important,
- si le sujet s'adonne à la pratique du " sexe oral ".

#### VI. 3. 2. 3. La consommation alcoololo-tabagique :

Plusieurs travaux ont démontré que les carcinomes HPV (+) des VADS ne sont généralement pas associés à une histoire de consommation alcoololo-tabagique [12, 24, 51, 130, 132]. Cependant, ce constat n'a pas été toujours avéré. En effet, même si la fréquence de l'association entre ces 2 facteurs de risque ne dépassait pas les 50 % des cas dans la plupart des séries, certains auteurs ont trouvé que seulement 20% des patients atteints d'un carcinome des VADS HPV (+) n'étaient ni fumeurs, ni buveurs [150].

Quoiqu'il en soit, à ce jour, l'impact de cette association demeure mal élucidé : aucune étude n'a tranché si ces 2 facteurs de risque agiraient de façon indépendante ou bien de façon synergique.

#### VI. 3. 2. 4. Le statut VIH :

Il en va de soi que plus la prévalence des infections orales au virus HPV est importante, plus le risque de développer un carcinome épidermoïde associé à ce virus est augmenté. S'il est bien connu que les lésions néoplasiques du col utérin dues aux virus HPV sont plus fréquentes chez les femmes VIH-positives, l'impact du statut VIH sur la persistance des infections orales à HPV a été longuement débattu. Dans une étude publiée en 2004 et ayant porté sur 586 patients dont 190 étaient VIH-séropositifs, Kreimer *et al.* se sont penchés sur la question et ont évalué l'impact de l'infection par le VIH sur la persistance d'une infection orale à HPV [147]. Ils sont parvenus au résultat que, de façon statistiquement significative, la prévalence de l'infection orale par le HPV était plus importante chez les patients VIH-positifs. Le HPV de type 16 était le type le plus isolé chez ces patients.

### **VII. Aspects anatomopathologiques des carcinomes épidermoïdes associés et non associés aux HPV au niveau des VADS :**

A ce jour, les différentes classifications OMS des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués au niveau des VADS ne reconnaissent pas encore ceux qui sont associés aux HPV comme étant une variante à part entière [3]. Néanmoins, du fait des particularités pathologiques qu'ils présentent, certains auteurs tendent déjà à les considérer comme étant une entité anatomo-clinique bien distincte, au profil évolutif particulier [24]. Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser essentiellement sur les

aspects anatomo-pathologiques des carcinomes des VADS associés aux HPV. Les particularités de ces aspects étant naturellement définies et relatées comparativement à ceux des carcinomes non liés aux HPV.

### **VII. 1. Aspects macroscopiques :**

Classiquement, au niveau des VADS, les carcinomes épidermoïdes associés aux HPV se présentent macroscopiquement comme étant des masses tumorales fermes avec une prolifération sous-muqueuse plus large et débordant sur la composante muqueuse [24]. Il est bien évident que cet aspect macroscopique ne présente aucune particularité propre à ce type de carcinome, et qu'il peut être partagé par plusieurs autres processus néoplasiques malins. Dans la limite de notre revue des données de la littérature, nous avons essayé de dégager certains aspects qui, sans en être pathognomoniques, revêtent un caractère d'orientation vers ces carcinomes. Ces aspects macroscopiques "évacuateurs" peuvent être résumés ainsi :

- Par rapport au siège, ces carcinomes associés aux HPV se localisent volontiers au niveau de l'oropharynx, et plus particulièrement au niveau des amygdales palatines et linguales [9]. Ce fait serait expliqué, entre autres, par l'existence à ce niveau de cryptes amygdaliennes dont l'épithélium de revêtement présente une fragilité mécanique semblable à celle retrouvée au niveau de la zone d'affrontement endo-exocellulaire (cf. chapitre "rappels histologiques").
- Au niveau de la cavité buccale et de l'oropharynx, les carcinomes épidermoïdes associés aux HPV se déclarent généralement sans passer par des lésions précancéreuses visibles cliniquement telles que la leucoplasie ou l'érythroplasie [24]. En effet, selon plusieurs études, ces deux dernières manifestations cliniques n'ont été vues, au plus, que dans 30% des carcinomes associés aux HPV [7, 151].
- Contrairement aux autres carcinomes épidermoïdes dont la genèse est favorisée par l'imprégnation alcoololo-tabagique, ceux qui sont liés aux HPV ne présentent pas généralement un caractère de multifocalité, mais intéressent plutôt un seul site primaire [152].
- Les proliférations tumorales associées aux HPV, et ayant métastasé au niveau des nœuds ganglionnaires cervicaux, présentent souvent des remaniements kystiques macroscopiquement visibles [153].

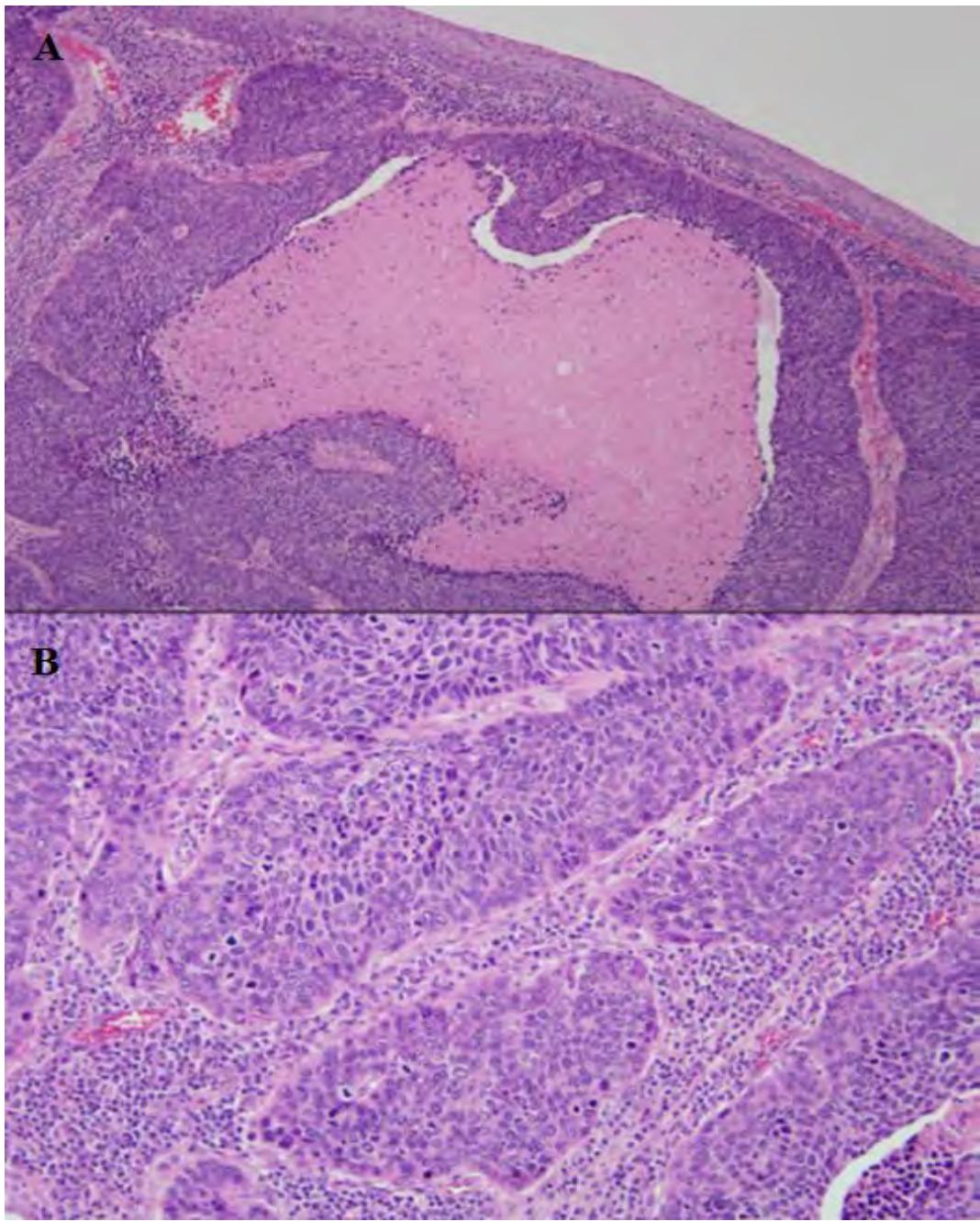
## VII. 2. Aspects microscopiques :

La plupart des descriptions microscopiques des carcinomes épidermoïdes associés aux HPV rapportées dans la littérature, sont celles de cancers prenant naissance au niveau de l’oropharynx. Ces derniers ont une présentation histopathologique assez caractéristique qui les distingue des carcinomes épidermoïdes conventionnels non associés aux HPV [9, 16, 24].

En effet, les carcinomes épidermoïdes HPV-induits ressemblent plutôt à la variante basaloïde de laquelle, parfois, ils ne peuvent même pas être distingués microscopiquement [23, 154]. Cet aspect histologique consiste donc en une prolifération tumorale maligne, faite de lobules expansifs et infiltrants, constitués de cellules ovoïdes aux limites cellulaires peu nettes. Ces cellules tumorales présentent un haut rapport nucléo-cytoplasmique, et sont dotées de noyaux hyperchromatiques sans nucléole bien défini [23-25, 155-157]. La kératinisation est souvent absente ou présente de façon discrète et focale [23-25, 155, 156]. Le stroma est souvent infiltré de nombreux lymphocytes et généralement dépourvu de réaction desmoplastique [23-25, 155]. Typiquement, la tumeur prend naissance à partir du fond des cryptes des amygdales palatines ou linguales, alors que l’épithélium de surface ne présente aucun signe de dysplasie [16, 24] (figure 12). L’ensemble de ces caractéristiques histopathologiques est résumé dans le tableau qui suit (tableau VI).

**Tableau VI : Caractéristiques histopathologiques des carcinomes épidermoïdes oropharyngés conventionnels (non associés aux HPV) versus carcinomes épidermoïdes oropharyngés associés aux HPV [24].**

	Carcinome épidermoïde conventionnel	Carcinome épidermoïde associé aux HPV
<b>Origine de la prolifération tumorale</b>	L’épithélium de surface	L’épithélium cryptique
<b>Dysplasie de l’épithélium de surface</b>	Présente	Absente
<b>Architecture</b>	Ilots et cordons irréguliers	Lobules infiltrants
<b>Réaction desmoplastique</b>	Proéminente	Souvent absente
<b>Kératinisation</b>	Proéminente	Minime voire absente
<b>Différenciation</b>	Moyennement différencié	Souvent une apparence basaloïde



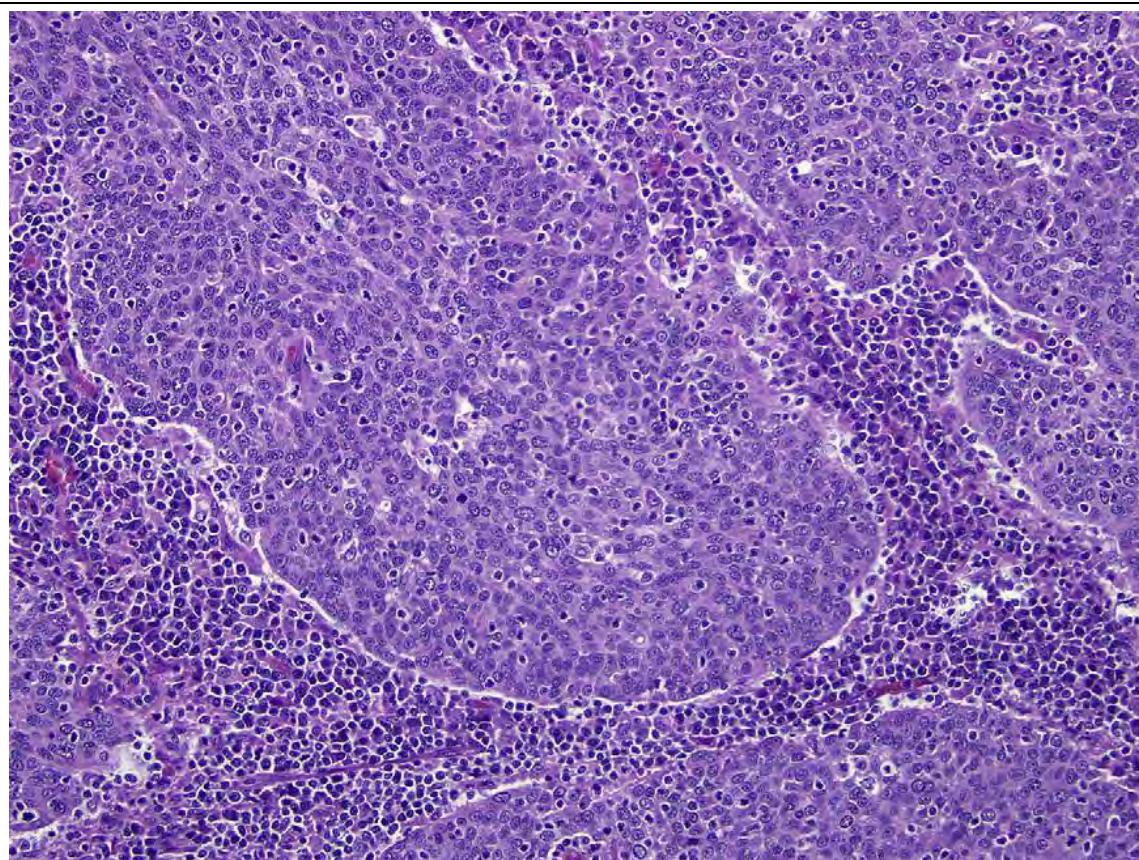
**Figure 12 : Coupe histologique d'un carcinome épidermoïde HPV-induit au niveau des amygdales [155].**

**A :** Une prolifération tumorale lobulaire centrée par une large plage de nécrose et se développant au niveau des cryptes. Notez l'absence de lésions dysplasiques au niveau de l'épithélium de surface (Coloration H&E / Grossissement x40).

**B :** A un plus fort grossissement, la tumeur paraît formée de petits lobules de cellules basaloïdes sans signes de kératinisation et largement infiltrés par des lymphocytes (Coloration H&E / Grossissement x200).

Ces particularités microscopiques sont plutôt notées au sein des carcinomes associés aux HPV prenant naissance au niveau des amygdales de l'oropharynx ; car c'est à ce niveau qu'ils sont le plus fréquemment observés et, en conséquence, étaient le plus et le mieux décrits.

En revanche, au niveau des autres sites des VADS, seuls l'aspect basaloïde et l'absence de kératinisation ont été considérés comme étant assez caractéristiques et évocatrices de carcinomes associés aux HPV [9, 109] (figure 13).



**Figure 13 : Aspect microscopique caractéristique d'un carcinome épidermoïde des VADS associé au HPV (Coloration H&E / Grossissement x250) [24].**

Notez l'absence de signes de kératinisation et l'aspect basaloïde des lobules tumoraux infiltrants : lobules formés de cellules ovoïdes à fusiformes, aux limites cytoplasmiques mal définies, à haut rapport nucléo-cytoplasmique et sans nucléoles proéminents.

Selon une étude assez récente, c'est l'expression de l'oncoprotéine virale E6 qui serait à l'origine de ces particularités microscopiques [158]. Cette constatation explique en grande partie

pourquoi ces particularités sont aussi notées dans les carcinomes épidermoïdes associés aux HR-HPV observés dans d'autres sites anatomiques tels que le pénis ou la vulve [154]. Notons cependant que si l'aspect basaloïde et peu kératinisant est assez évocateur des carcinomes épidermoïdes HPV-induits, d'authentiques carcinomes épidermoïdes conventionnels ou même verruqueux ont été également décrits en association avec le HPV, parfois dans des proportions dépassant les 50% [7].

La revue des différentes données de la littérature traitant cet aspect et publiées à ce jour, nous a permis de relever une constatation importante à souligner. En effet, les différentes classifications OMS des carcinomes épidermoïdes prenant naissance au niveau des VADS, reconnaissent la forme basaloïde comme étant une variante bien distincte, mais n'attirent pas encore l'attention sur la ressemblance de cette variante avec les carcinomes associés aux HPV [3]. Or, si la variante basaloïde des carcinomes épidermoïdes est reconnue être une forme agressive de pronostic plus mauvais que la forme conventionnelle, celle qui est associée aux HPV s'est avérée beaucoup moins agressive et d'un meilleur pronostic (cf. chapitre suivant). En termes plus simples, sur le plan pratique, les carcinomes épidermoïdes présentant un aspect basaloïde sont eux-mêmes scindés en deux sous-groupes aux pronostics différents : ceux qui sont associés aux HPV, et ceux qui n'y sont pas associés [154, 159, 160]. Il en résulte donc, vis-à-vis du clinicien, une confusion et de possibles choix thérapeutiques mal adaptés. En effet, quand le pathologiste conclut à un carcinome épidermoïde basaloïde, les médecins traitants souvent " prêchent par excès " et instaurent une thérapeutique agressive qui s'avère non justifiée si cet aspect basaloïde était HPV-induit. Pour pallier ce problème d'interprétation, et quand la présence d'un HPV est suspectée sans pouvoir être prouvée formellement, certains pathologistes ont proposé d'utiliser la formule "carcinome épidermoïde avec un aspect basaloïde" plutôt que "carcinome épidermoïde dans sa forme basaloïde" [154]. Mais il n'est pas évident qu'un clinicien inaverti se rend compte de cette subtilité et ce qui en découlera comme impact thérapeutique. Du fait de la fréquente absence de kératinisation dans ces carcinomes, d'autres auteurs ont proposé d'attirer l'attention du clinicien sur ce fait en concluant simplement à " carcinome épidermoïde non kératinisant " [154]. Là aussi, cette suggestion ne résout pas le problème car l'absence de kératinisation n'est pas si évocatrice de l'origine HPV du carcinome. De plus, le terme " carcinome non kératinisant " est utilisé par la classification OMS pour désigner une variante du carcinome nasopharyngé, indépendamment de la présence du HPV [3]. Le tableau suivant récapitule les différentes conclusions proposées pour attirer l'attention sur la très probable relation entre le carcinome diagnostiqué et le HPV, ainsi que les limites de ces formulations (tableau VII).

**Tableau VII : La terminologie couramment utilisée dans le diagnostic des carcinomes épidermoïdes associés aux HPV des VADS est sujette à confusion et prête à de fausses interprétations [154].**

Termes diagnostiques	Limitations
Carcinome épidermoïde basaloïde	Les carcinomes basaloïdes des VADS sont souvent des carcinomes HPV-induits qui constituent en fait une entité clinique et biologique bien distincte des carcinomes basaloïdes non associés aux HPV.
Carcinome épidermoïde présentant un aspect basaloïde	La subtile distinction entre carcinome basaloïde et carcinome épidermoïde avec un aspect basaloïde n'est souvent pas comprise par les cliniciens.
Carcinome épidermoïde peu différencié	Cela implique que la tumeur est de haut grade et agressive, alors que ce n'est pas le cas des carcinomes associés aux HPV.
Carcinome épidermoïde non kératinisant	Formulation qui n'attire pas suffisamment l'attention sur la possible association de la tumeur aux HPV.

Pour conclure, il semble que la solution optimale pour résoudre ce problème passe inévitablement par une concertation multidisciplinaire, en l'occurrence, la communication entre le pathologiste et le clinicien. A défaut, en l'absence d'une preuve biologique formelle de la présence d'un HR-HPV alors que son association au carcinome est fortement suspectée ; le pathologiste se doit de le noter de façon claire et explicite dans la conclusion finale de son compte-rendu.

### VII. 3. Aspects pronostiques :

Il est généralement admis que les carcinomes épidermoïdes des VADS liés aux HPV sont de meilleur pronostic que ceux qui n'y sont pas associés. En effet, plusieurs études ont conclu que même si les carcinomes associés aux HPV sont diagnostiqués à des stades plus avancés, ils sont plus radio-sensibles et s'accompagnent d'un taux de survie plus important [16-21, 132]. Mais une lecture critique des publications mentionnant ces constatations met en exergue une nuance qui passe souvent inaperçue.

En effet, au niveau des VADS, le pronostic des carcinomes associés aux HPV n'est meilleur que lorsque ces derniers sont localisés au niveau de l'oropharynx. Même si plusieurs articles portent un intitulé traitant l'impact clinique et pronostique de ces carcinomes au niveau de " la tête et du cou ", l'analyse de leurs " matériels et méthodes " montre qu'ils ne se sont intéressés en fait qu'à ceux localisés au niveau de l'oropharynx ou avaient une majorité écrasante de cas localisés à ce niveau. Ceci peut être facilement expliqué par le fait que le site de prédilection des carcinomes épidermoïdes liés aux HPV est l'oropharynx. Ainsi, même si une analyse a tenté d'évaluer le pronostic de ces tumeurs au niveau de toutes les VADS, le nombre de tumeurs localisées au niveau de l'oropharynx l'emporte souvent largement sur les autres sites, biaisant ainsi en partie l'évaluation globale de leur pronostic. Deux grandes études cependant se sont penchées sur ce problème et ont évalué le pronostic de ces tumeurs en prenant en compte la localisation tumorale précise au sein même des VADS. La première est celle menée par *Gillison et al.* en l'an 2000 et qui a inclus 253 cas de carcinomes épidermoïdes des VADS dont 60 seulement étaient localisés au niveau de l'oropharynx [9]. Elle a conclu que la présence de HPV n'a amélioré les taux de survie à 2 ans et à 5 ans que pour les tumeurs ayant émergé à partir de l'oropharynx, alors que pour les autres localisations ces paramètres pronostiques étaient sensiblement les mêmes. La deuxième étude était celle menée par *Ragin et Taioli* et publiée en 2007 [13]. Il s'agit en fait de la première méta-analyse ayant visé à évaluer l'impact de la présence des HPV sur le pronostic des carcinomes qui lui sont associés au niveau de toutes les VADS. Elle a intéressé 23 études qui ont porté sur un total de 1747 cas. Les conclusions de cette méta-analyse ont corroboré les constatations de *Gillison et al.* : les carcinomes HPV-induits au niveau de l'oropharynx sont de meilleurs pronostic avec un risque de récidive moindre que ceux qui n'y sont pas associés. Par contre, pour les autres localisations non oropharyngées le pronostic était sensiblement le même voire plus mauvais [13]. Ces deux études ont conclu donc que, au niveau des VADS, l'impact de la présence de HPV sur le pronostic des carcinomes qui lui sont associés est dépendant du site : les carcinomes épidermoïdes HPV-induits ne sont de meilleur pronostic par rapport à ceux qui en sont dénués que lorsque ces cancers sont localisés au niveau de l'oropharynx [9, 13].

Cependant, 2 autres méta-analyses plus récentes parues respectivement en 2010 et en 2012 ont démontré que, même si le gain en survie est beaucoup plus important pour les carcinomes HPV-induits au niveau de l'oropharynx, il demeure meilleur pour toutes les autres localisations au sein des VADS [14, 22]. Il nous semble ainsi permis de conclure que le meilleur pronostic attribuable à la présence des HPV dans les carcinomes de l'oropharynx est bien réel et indéniable ; alors que l'impact de la présence de ces virus sur le pronostic des tumeurs non oropharyngées demeure

controversé. D'autres travaux sont donc nécessaires pour pouvoir statuer sur ce point de façon consensuelle et définitive.

Notons enfin que ce gain en survie n'a été noté que pour les patients traités par radiothérapie. Il est expliqué par une meilleure radiosensibilité des tumeurs associées aux HPV par rapport à celles qui en sont dépourvues [9, 13, 16-21, 132].

\*

Deuxième partie :

Notre étude

# Patients, Matériel & Méthodes

## **I. Type de l'étude :**

Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive et analytique des particularités des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV comparativement à ceux qui en sont dépourvus.

Etant donné que l'élaboration de ce travail ait nécessité des moyens techniques assez poussés et coûteux dont on ne dispose pas à Dakar, la collaboration avec le service de bio-pathologie de l'Institut Curie de Paris a été sollicitée. Nous nous sommes contentés donc **d'une étude préliminaire** concernant 90 patients uniquement.

## **II. Cadre et période de l'étude :**

Les cas sur lesquels notre étude a porté ont été tous recrutés sur une période de 18 mois, allant du 1<sup>er</sup> janvier 2008 au 30 Juin 2009. Ce travail a eu lieu dans le laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (A.C.P.) de l'Hôpital Aristide le Dantec (H.A.L.D.) de Dakar. Ce laboratoire constitue le centre de référence en matière d'A.C.P. à Dakar et même dans tout le Sénégal. Il comporte 01 professeur titulaire, 02 assistants, et une vingtaine de médecins en cours de spécialisation pour l'obtention du D.E.S. en A.C.P. Il gère une moyenne de 3 000 prélèvements histologiques par an (biopsies et pièces opératoires).

Les services d'origine des 90 patients de notre travail étaient :

- le service de stomatologie de l'H.A.L.D. (26 patients) ;
- le service d'O.R.L. de l'H.A.L.D. avant qu'il ne soit délocalisé dans " l'Hôpital de Fann " (64 patients).

### **III. Patients et matériel de l'étude :**

#### **III. 1. Critères d'inclusion :**

Les 90 patients qu'on a inclus dans cette étude préliminaire étaient ceux dont le compte rendu anatomo-pathologique final a conclu de façon formelle à un carcinome épidermoïde des VADS.

#### **III. 2. Critères de non inclusion :**

- ***Pour la recherche de HPV par PCR***, ont été exclus de l'étude les cas dont les blocs de paraffine étaient altérés ou non retrouvés après dépouillement de nos archives.
- ***Pour l'étude épidémiologique et anatomo-pathologique***, afin de pouvoir procéder à une analyse comparative entre le groupe des patients aux tumeurs HPV (+) et celui des patients aux carcinomes HPV (-) ; ont été exclus de ce cadre les patients chez qui la PCR n'a pas été contributive. La PCR a été qualifiée de non contributive chaque fois qu'elle n'avait pas permis de statuer de façon formelle sur la présence ou l'absence de HPV dans les fragments tissulaires de nos patients (c.à.d. les patients au statut HPV indéterminé).

### **IV. Méthodologie et traitement des données :**

#### **IV. 1. Recueil des données :**

Pour chaque patient retenu pour notre étude, on a procédé à la collecte de certaines données d'ordre épidémiо-clinique et histopathologique, et avons tenté de déterminer le statut HPV de sa tumeur.

Ces différents paramètres recherchés pour élaborer ce travail sont mentionnés dans la fiche d'enquête standardisée rapportée dans l'annexe n°1.

Les paramètres épidémiologiques n'ayant pas toujours été notés sur les bulletins de demande d'analyse pathologique qui nous ont été adressés, nous avons complété le recueil des données manquantes en se référant aux archives de leurs services d'origine.

#### **IV. 2. Prise en charge des prélèvements biopsiques :**

Les prélèvements biopsiques qu'on avait reçus étaient contenus dans des récipients étanches, remplis d'un fixateur choisi par le médecin préleveur. Même si le formol était le fixateur généralement employé par ces médecins, son degré de dilution et sa qualité échappaient donc au contrôle du pathologiste.

Les prélèvements biopsiques ne nous étaient pas transmis directement par les médecins préleveurs, mais étaient confiés aux patients. Le délai que mettaient ces derniers pour nous acheminer leurs biopsies variait de quelques heures à quelques jours.

Une fois les biopsies arrivées dans notre service, les techniciens de notre laboratoire évaluaient grossièrement la qualité du formol utilisé. Si son odeur était trop forte (formol non dilué) ou bien trop faible (formol très dilué), ils procédaient au remplacement de ce fixateur par du formol préparé dans notre service. Cette préparation était faite en diluant au 1/10<sup>ème</sup> une solution aqueuse non tamponnée de formaldéhyde à 40% (dilution à l'eau de robinet).

Les biopsies reçues étaient mises dans des cassettes puis introduites dans un automate de déshydratation et d'inclusion en paraffine Leica® TP 1020. A leur sortie de l'automate, les biopsies étaient enrobées dans de la paraffine fondu qui est laissée se refroidir à température ambiante.

Après la coupe au microtome et la confection de lames colorées à l'H&E, les blocs de paraffine étaient archivés dans de petites armoires en bois gardées dans notre service à température ambiante.

La durée de fixation des biopsies étant un élément important pouvant altérer les résultats de la PCR, nous avons essayé de la déterminer pour les différents cas inclus dans notre étude. Malheureusement, les données de nos archives ne nous ont pas permis de préciser cette durée pour des biopsies datant de 6 à 7 ans.

Les habitudes de notre service étant toujours les mêmes, et pour avoir une idée **approximative**, nous avons donc calculé la durée moyenne de fixation dans le formol de 200 prélèvements biopsiques choisis au hasard sur une période de 4 mois (Juin – Septembre 2014). Elle était de 4,5 jours (108 heures) avec des extrêmes allant de 1 à 21 jours.

Or, la durée moyenne de fixation de 4,5 jours qu'on a calculée ne reflète que la période durant laquelle les biopsies ont été maintenues dans le formol dans notre laboratoire. Si on y ajoute l'intervalle de temps écoulé entre la date du prélèvement et la date de sa réception dans notre service ; la moyenne de la durée totale de fixation devient de 7,9 jours avec une extrême allant jusqu'à 48 jours.

#### **IV. 3. Recherche de HPV :**

La recherche des virus HPV a été effectuée dans l'unité de recherche en bio-pathologie de l'Institut Curie de Paris, sous la direction du Dr. Xavier SASTRE-GARAU.

Tous les prélèvements tissulaires qu'on leur a envoyés étaient sous forme de blocs de paraffine obtenus selon les règles d'usage employés en A.C.P. (comme expliqué dans le chapitre précédent). Pour chaque bloc, l'extraction de l'ADN a été faite à partir de 4 sections de paraffine de 15 µm d'épaisseur. Cette extraction ainsi que le déparaffinage ont été faits par le kit " NucleoSpin Tissue ® " selon les recommandations et les instructions du fabricant (Macherey-Nagel, France). Dans l'attente de son utilisation, l'ADN isolé a été ensuite conservé à une température de -20°C. La recherche du matériel génomique des HPV sur cet ADN a été faite par la technique dite " PCR consensus ", qui reconnaît de manière non spécifique 24 types différents de HPV.

La PCR " consensus " a été réalisée dans un volume de 50 µl contenant de l'eau ultra pure, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 1 µM d'amorces générées, 1.25 unité de Taq Gold DNA polymerase (Life Technology, Foster City, Canada) et son tampon concentré une fois. Les cycles suivants furent réalisés successivement 45 fois : 1 minute à 94 °C pour la dénaturation, 2 minutes à 40 °C pour l'hybridation, et 1 minute 30 secondes à 72 °C pour l'elongation.

Dans un deuxième temps, on a procédé au génotypage des virus HPV qu'on a retrouvés par la technique dite " PCR spécifique de type ". Pour chaque utilisation de la PCR, la quantité de l'ADN extrait de nos blocs a été contrôlée au NanoDrop, et sa qualité a été contrôlée par l'amplification

d'un gène témoin dit gène de " ménage " : ici, le gène de la GADPH (la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase). Les amorces employées dans la " PCR consensus " sont les amorces " GP5+/GP6+ " ; et les amorces utilisées dans la " PCR spécifique de type " sont celles qui reconnaissent les HPV de type 6, 11, 16, 18, 33, et 45. Les séquences nucléotidiques de ces différentes amorces utilisées sont représentées dans le tableau qui suit (tableau VIII).

**Tableau VIII : Détails des séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la recherche des HPV.**

Amorce utilisée	Séquence nucléotidique (5' → 3')
HPV 6/11 Forward	ATGTTATGGCAGCACAGTTA
HPV 6/11 Reverse	TTGCACTATAAGCGTAGGTC
HPV 16 Forward	GTGGACCGGTCGATGTATGT
HPV 16 Reverse	CATGCAATGTAGGTGTATCT
HPV 18 Forward	GCAGCACAGAAAACAGTCCA
HPV 18 Reverse	CGCCATTGTAGTTACCTGA
HPV 33 Forward	AGTCAAAATGGCGACACAAA
HPV 33 Reverse	ACTAATTCCCTGCAACGTA
HPV 45 Forward	CGGGAAACACTGCAAGAAA
HPV 45 Reverse	GCTTCATCGTTTCCTCCT
GP5+	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	AAAAATAAAACTGTAAATCATATT
GAPDH Forward	CATCCCTCTCCCCACACAC
GAPDH Reverse	AGTCCCAGGGCTTGATTG

La PCR " spécifique de type " a été réalisée dans un volume de 50 µl contenant de l'eau ultra pure, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.7 µM d'amorces spécifiques, 1.25 unité de Taq Gold DNA polymerase (Life Technologies <sup>TM</sup>, France) et son tampon concentré une fois. Les cycles suivants furent réalisés successivement 35 fois : 1 minute à 94 °C pour la dénaturation, 1 minute à 55 °C pour l'hybridation, et 1 minute à 72 °C pour l'elongation.

Les produits obtenus à partir de ces 2 PCR ont été visualisés sur un gel d'Agarose à 2% coloré par le kit SYBR Safe<sup>TM</sup> (Life Technology, Foster City, Canada).

#### **IV. 4. Traitement des données :**

Une analyse descriptive a été réalisée en ce qui concerne les différents éléments recueillis dans la fiche de renseignement, à savoir :

- L'âge ;
- le sexe ;
- la notion de consommation tabagique et/ou alcoolique ;
- la notion de sexe oral dans les habitudes ;
- le siège exact de la tumeur ;
- la nature du prélèvement qui nous a été adressé ;
- les aspects microscopiques de la tumeur ;
- le statut HPV de la tumeur ;
- le type de HPV retrouvé si la tumeur était HPV positive.

Dans un deuxième temps, on a essayé de voir s'il y avait une corrélation statistiquement significative entre certains de ces paramètres et le statut HPV de la tumeur.

La saisie et l'exploitation des données ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS<sup>®</sup> version 16.0 pour Windows<sup>XP</sup> 2007. La formule de normalité a permis de vérifier la distribution gaussienne de l'échantillon. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées au moyen du test de Student pour séries indépendantes. Les comparaisons de pourcentages ont été réalisées par le test Chi 2 de Pearson. En cas d'effectifs insuffisants, le test exact bilatéral de Fisher a été appliqué. Dans tous les tests statistiques, le seuil de signification (p) a été fixé à 0,05.

# Résultats

## **I.      Données générales :**

Les noms, les prénoms, les dates de prélèvement, et les services d'origine de tous les patients de notre étude, ont été mentionnés sur les demandes d'analyse anatomo-pathologique qui nous ont été adressées (100 % des cas). En s'aidant de ces éléments, nous avons procédé au dépouillement des archives des services concernés afin de relever les différentes données épidémio-cliniques recherchées dans notre grille de travail (annexe 1). Les données anatomo-pathologiques ont été recueillies à partir de nos comptes rendus finaux.

Notons qu'au total, sur les 90 patients qui ont fait l'objet de notre travail, 26 étaient recrutés du service de stomatologie de l'HALD, et 64 étaient recrutés à partir du service d'ORL de l'HALD (avant sa délocalisation dans " l'Hôpital de Fann ").

Pour les données d'ordre épidémiologique et anatomo-pathologique, afin de pouvoir procéder à une analyse comparative entre le groupe des patients aux tumeurs HPV (+) et celui des patients aux carcinomes HPV (-) ; seuls les résultats des patients chez qui la PCR a été contributive ont été présentés (cf. chapitre " Patients, matériels, et méthodes ").

Dans notre étude, la PCR a été contributive chez 54 patients seulement parmi 90 (60%). Parmi ces 54 patients, 16 étaient recrutés à partir du service de stomatologie, et 38 étaient suivis au service d'ORL.

## **II.      Données épidémiologiques descriptives :**

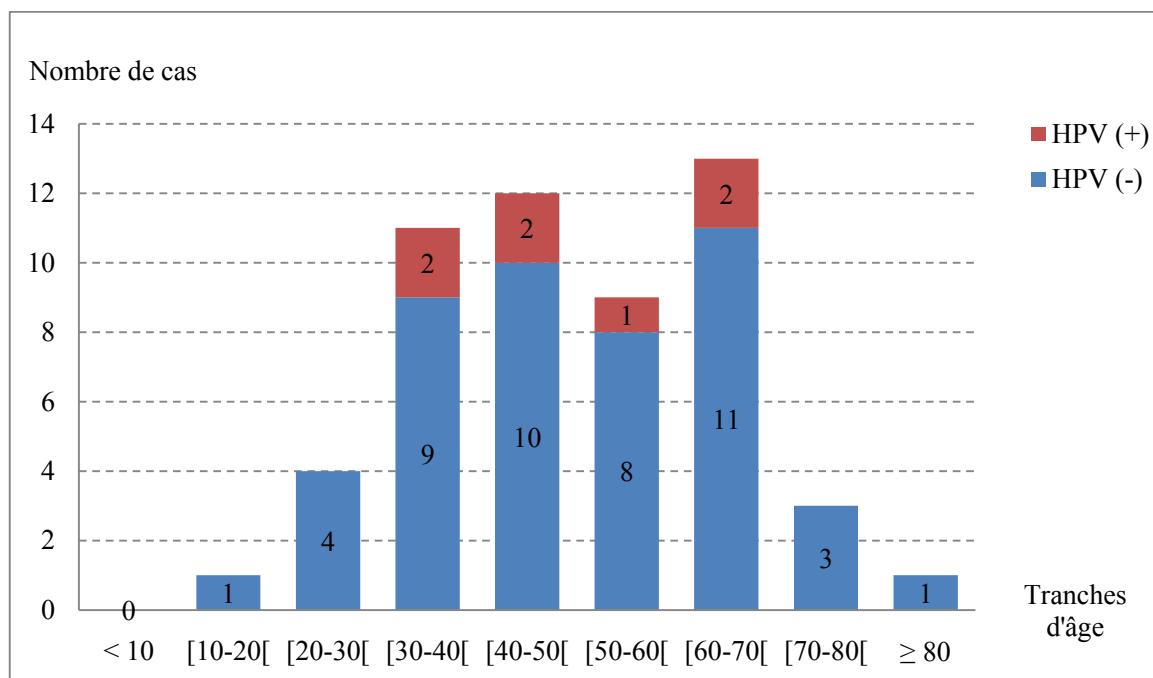
### **II.      1. La prévalence :**

Parmi les 54 patients dont la PCR a été contributive, 7 seulement avaient un carcinome épidermoïde au statut HPV (+). Dans notre étude, la prévalence des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV était donc de 12,96 %.

## II. 2. L'âge :

Dans notre série, l'âge des malades a été toujours précisé (100% des cas). Pour les 7 patients qui avaient un carcinome épidermoïde HPV (+), la moyenne d'âge était de  $47,43 \text{ ans} \pm 12,38$ , avec une médiane de 42 ans, et des extrêmes allant de 35 à 66 ans. Pour les 47 patients au statut HPV (-), la moyenne d'âge était de  $47,89 \text{ ans} \pm 16,13$ , avec une médiane de 49 ans, et des extrêmes allant de 15 à 85. Le test de Student n'a pas objectivé de différence statistiquement significative entre ces 2 moyennes.

Nous avons également procédé au partage de l'ensemble de ces 54 patients par tranche d'âge et en fonction du statut HPV de leurs tumeurs (figure 14).

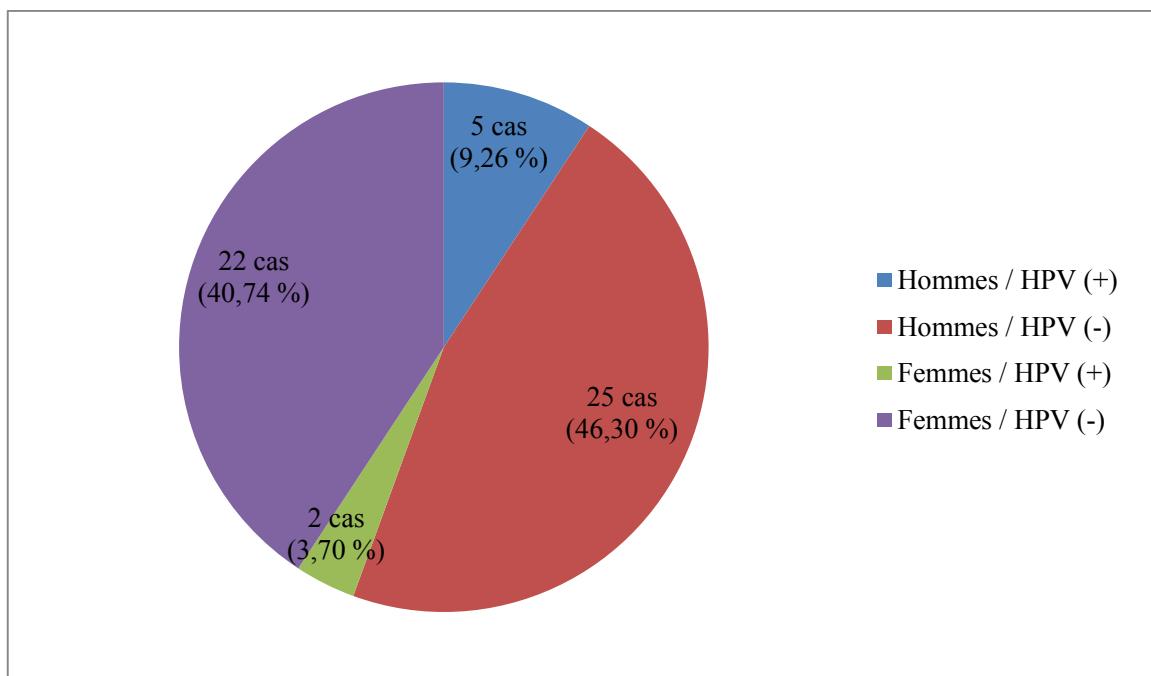


**Figure 14 : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes des VADS en fonction de l'âge.**

Le test exact de Fisher n'a pas objectivé de différence significative entre les tranches d'âge de ces patients et leur statut HPV.

## **II. 3. Le sexe :**

Chez les 54 patients dont la PCR a été contributive, le sexe a été également précisé dans 100% des cas. Dans le groupe au statut HPV (+) (7 patients), il y avait 5 hommes et 2 femmes, soit un sexe-ratio de 2,5. Les 47 patients du groupe HPV (-) étaient répartis en 25 hommes et 22 femmes, soit un sexe-ratio de 1,14. Les pourcentages des sexes des patients en fonction de leur statut HPV est récapitulé dans la figure qui suit (figure 15).



**Figure 15 : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes des VADS en fonction du sexe.**

## **III. Données épidémiologiques analytiques :**

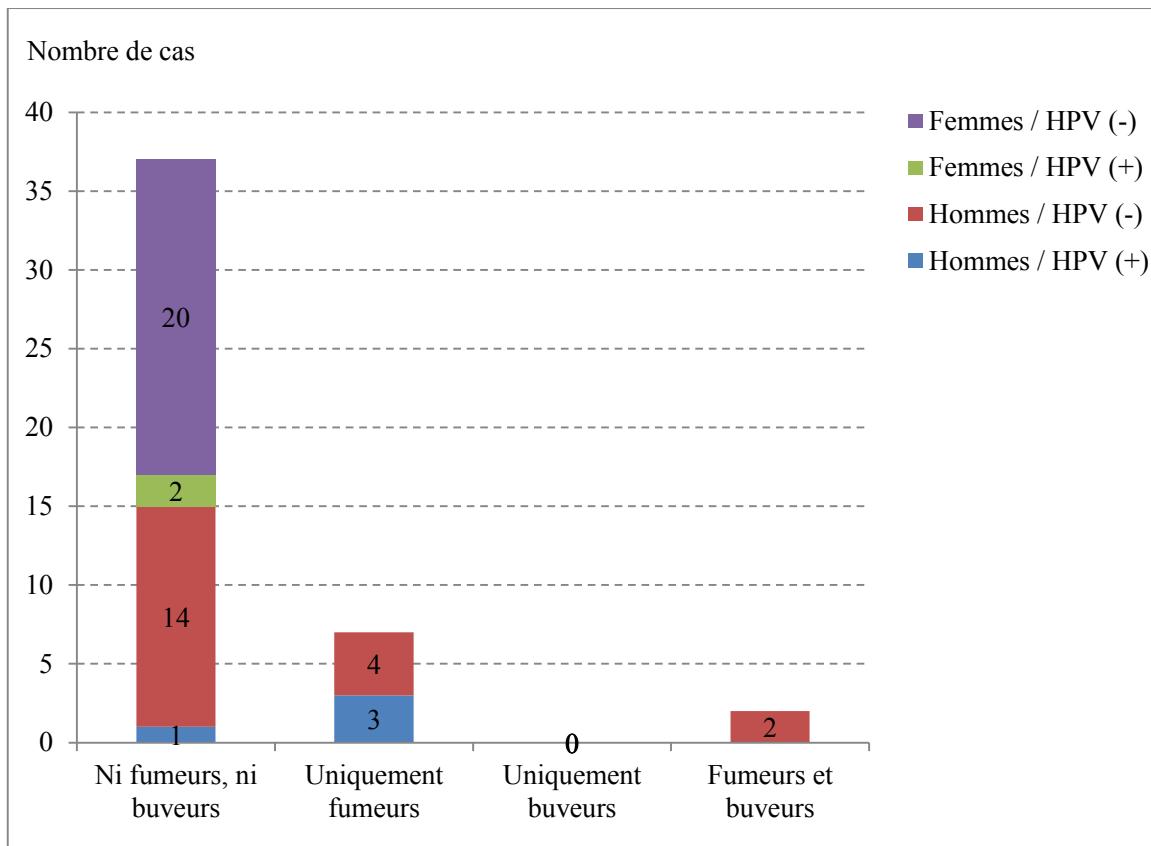
### **III. 1. Les habitudes alcoololo-tabagiques :**

La consommation tabagique et/ou alcoolique n'a été rapportée que chez 46 patients parmi 54, soit dans 85,15 % des cas seulement.

Chez les 7 patients du groupe HPV (+), les habitudes alcooloo-tabagiques ont été précisées chez 6 patients uniquement (85,71 % des cas). Parmi ces 6 patients, 3 étaient ni fumeurs ni buveurs (2 de sexe féminin et un patient de sexe masculin) ; et 3 étaient uniquement fumeurs (tous de sexe masculin). Chez ces 3 hommes fumeurs, la consommation tabagique a été quantifiée à 10 PA chez un patient, à 2,5 PA chez le deuxième, alors qu'elle n'a pas été évaluée chez le troisième.

Dans le groupe au statut HPV (-), les habitudes alcooloo-tabagiques ont été précisées chez 40 patients parmi 47, soit dans un pourcentage de 85,1. Sur ces 40 patients, 34 étaient ni fumeurs ni buveurs (14 hommes et 20 femmes), 4 étaient uniquement fumeurs (tous de sexe masculin), et 2 étaient à la fois fumeurs et buveurs (également de sexe masculin). Chez les 4 patients uniquement fumeurs, la consommation tabagique a été quantifiée à 38 PA chez l'un, à 2 PA chez un autre, et elle n'a pas été précisée chez les 2 autres. Chez le 2 patients à la fois fumeurs et buveurs, la consommation tabagique n'a été mentionnée que chez l'un d'eux, et a été quantifié à 25 PA. Quant à la consommation alcoolique, ni le type de la boisson alcoolisée, ni la durée de la consommation, n'ont été précisés.

La figure n° 16 illustre de façon simple les habitudes alcooloo-tabagiques de ces 46 patients en tenant compte aussi bien du sexe du patient que du statut HPV de son carcinome épidermoïde.



**Figure 16 : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes des VADS en fonction des habitudes alcoololo-tabagiques des patients et de leur sexe.**

Au total, pour les 46 patients chez qui les habitudes alcoololo-tabagiques ont été précisées :

- 50 % de ceux ayant un carcinome HPV (+) étaient fumeurs et/ou buveurs (3 patients sur 6) ;
- 15 % de ceux ayant un carcinome HPV (-) étaient fumeurs et/ou buveurs (6 patients sur 40).

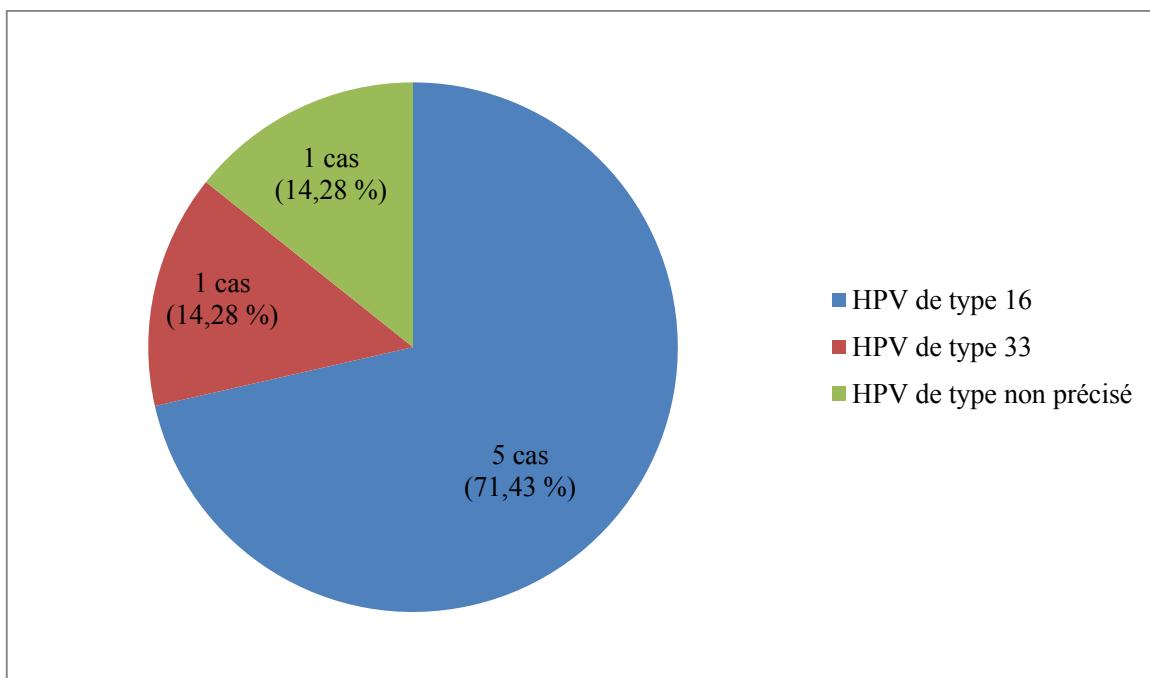
Il n'y avait pas été trouvé d'association statistiquement significative entre les habitudes alcoololo-tabagiques des patients et le statut HPV de leurs tumeurs.

### **III. 2. La notion de sexe oral :**

Nous avons revu tous les dossiers des 54 patients sur lesquels notre étude a porté. La notion du sexe oral dans les habitudes de ces malades n'a jamais été mentionnée.

### **III. 3. Le type du HPV :**

Parmi les 55 blocs ayant permis une analyse PCR contributive, le matériel génomique des HPV a été identifié dans 7 blocs seulement, correspondant à 7 patients différents. Dans ces 7 cas, aucune co-infection par 2 types de HPV différents ou plus n'a été notée. Le génotypage précis du virus HPV isolé n'a été possible que dans 6 cas seulement : dans 5 cas il s'agissait d'un HPV de type 16, et dans un cas il s'agissait d'un HPV de type 33 (figure 17).



**Figure 17 : Les différents types de HPV retrouvés dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.**

A noter que, en se référant aux sondes qu'on a utilisées dans la technique " PCR spécifique de type ", le 7<sup>ème</sup> HPV non typé ne peut être en aucun cas de type 6, 11, 16, 18, 33 ou 45.

Dans notre étude, une association statistiquement significative a été retrouvée entre le HPV de type 16 et la localisation hypopharyngée ( $p = 0,048$  selon le test exact de Fisher).

## **IV. Données anatomo-pathologiques :**

### **IV. 1. Type des prélèvements tumoraux :**

Tous les échantillons tumoraux reçus dans le cadre de notre étude, et sur lesquels la technique PCR a été appliquée, consistaient en des prélèvements biopsiques (100 % des cas).

### **IV. 2. Siège des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :**

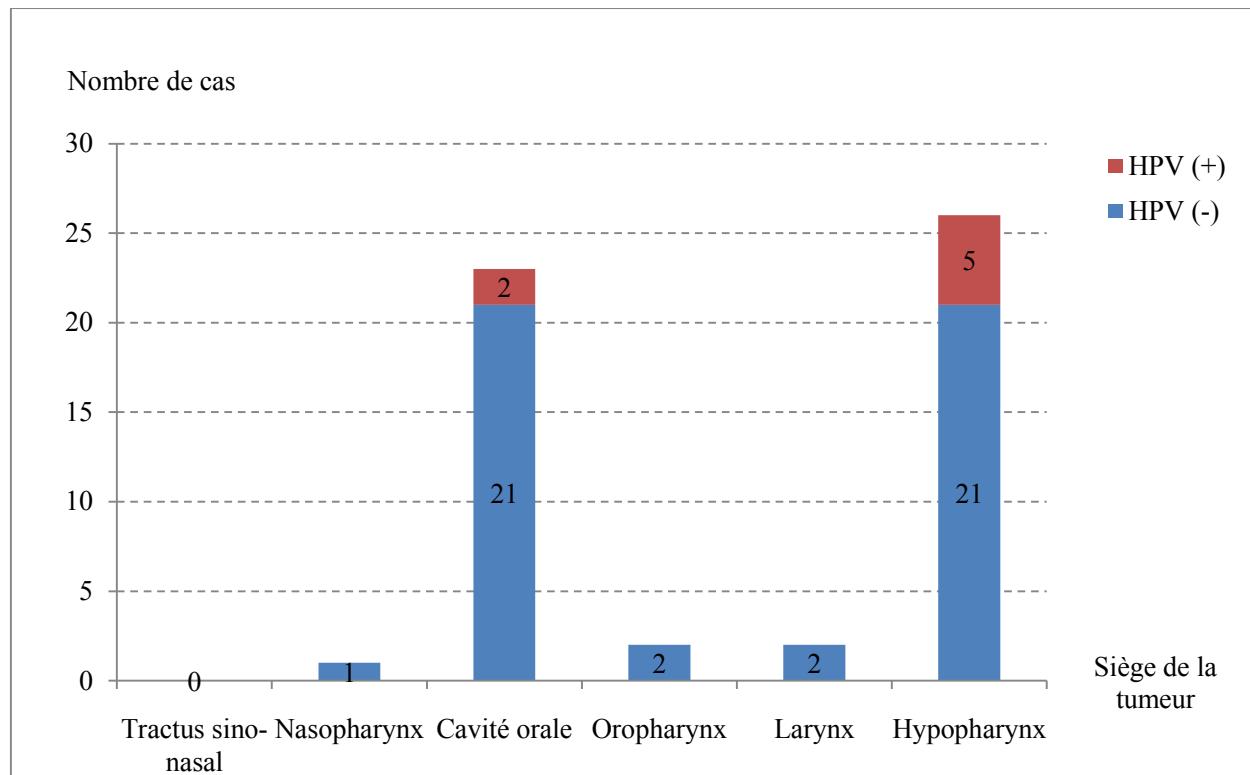
Chez les 54 patients dont le statut HPV de leurs carcinomes épidermoïdes a pu être déterminé, le siège exact de la tumeur au sein même des VADS a été toujours précisé sur les bulletins d'analyse anatomopathologique qui nous ont été adressés (100 % des cas).

Parmi les 7 cas de carcinomes épidermoïdes associés à un HPV, 5 cas étaient de localisation hypopharyngée (71,43 %), alors que les 2 autres étaient localisés au niveau de la cavité orale (28,57 %).

Pour les 47 cas restants et chez qui aucun HPV n'a été identifié dans leurs prélèvements tumoraux, les localisations tumorales notées étaient les suivantes :

- 21 cas localisés au niveau de l'hypopharynx (44,68 %),
- 21 cas localisés au niveau de la cavité orale (44,68 %),
- 02 cas localisés au niveau de l'oropharynx (base de la langue) (4,26 %),
- 02 cas localisés au niveau du larynx (4,26 %),
- 01 cas localisé au niveau du nasopharynx (2,12 %).

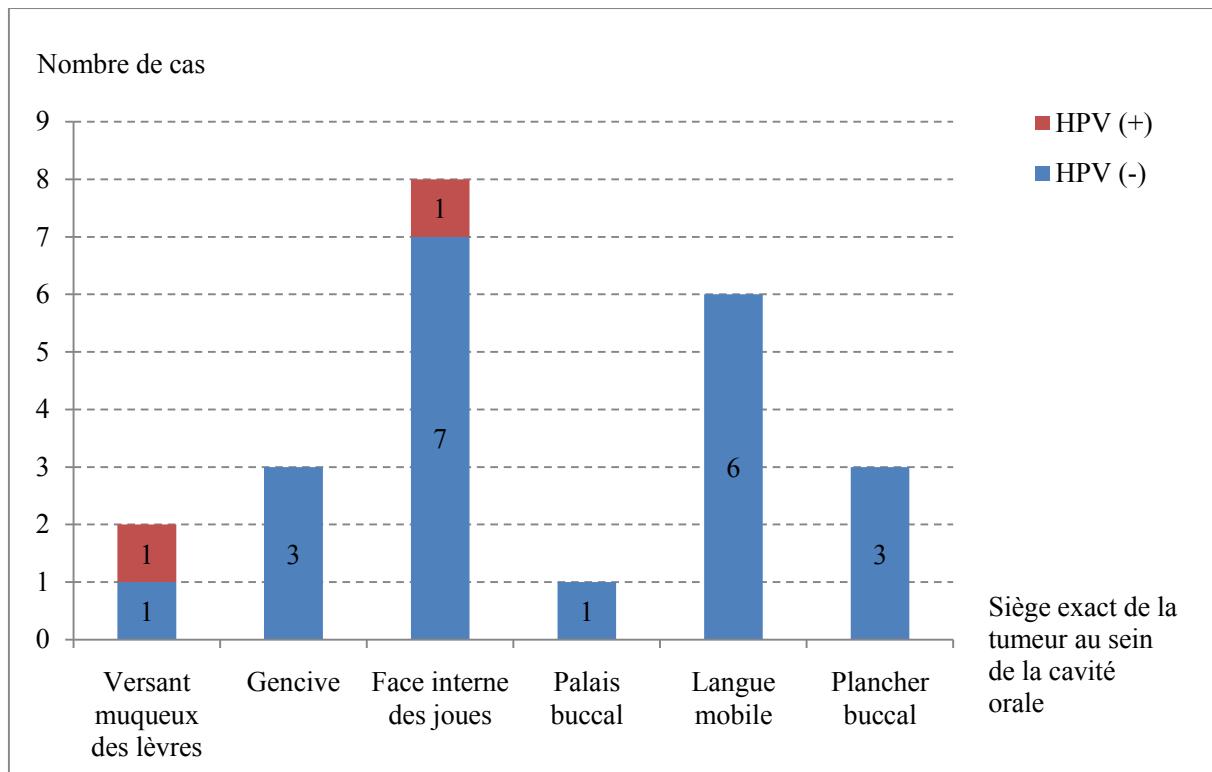
Ces résultats sont récapitulés dans la figure n° 18.



**Figure 18 : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes en fonction de leur siège précis au sein des VADS.**

On n'a pas trouvé d'association statistiquement significative entre le statut HPV du carcinome épidermoïde et son siège anatomique précis au niveau des VADS.

Pour l'ensemble des 23 tumeurs diagnostiquées au niveau de la cavité orale (02 cas HPV (+) et 21 cas HPV (-)), leur siège précis et leur statut HPV sont détaillés dans la figure qui suit (figure 19).



**Figure 19 : Le statut HPV des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale en fonction de leur localisation précise.**

Les prévalences des carcinomes épidermoïdes associés aux HPV en fonction de leur localisation précise au sein des VADS sont rapportées dans le tableau qui suit (tableau IX).

**Tableau IX : Prévalence des carcinomes épidermoïdes associés aux HPV par site anatomique précis au sein des VADS.**

Site anatomique	Nombre total de carcinomes épidermoïdes	Nombre de carcinomes épidermoïdes HPV (+)	Prévalence
Nasopharynx	1	0	0 %
Cavité orale	23	2	8,7 %
Oropharynx	2	0	0 %
Larynx	2	0	0 %
Hypopharynx	26	5	19,23 %

#### **IV. 3. Données histopathologiques :**

##### *IV. 3. 1. Forme histologique des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :*

Pour les 54 patients qui ont fait l'objet de notre travail, le diagnostic histopathologique final posé n'a reconnu aucune variante particulière du carcinome épidermoïde. Les 54 carcinomes épidermoïdes diagnostiqués étaient donc dans 100 % des cas de forme conventionnelle, et ce, quel que soit leur statut HPV.

##### *IV. 3. 2. Degré de différenciation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :*

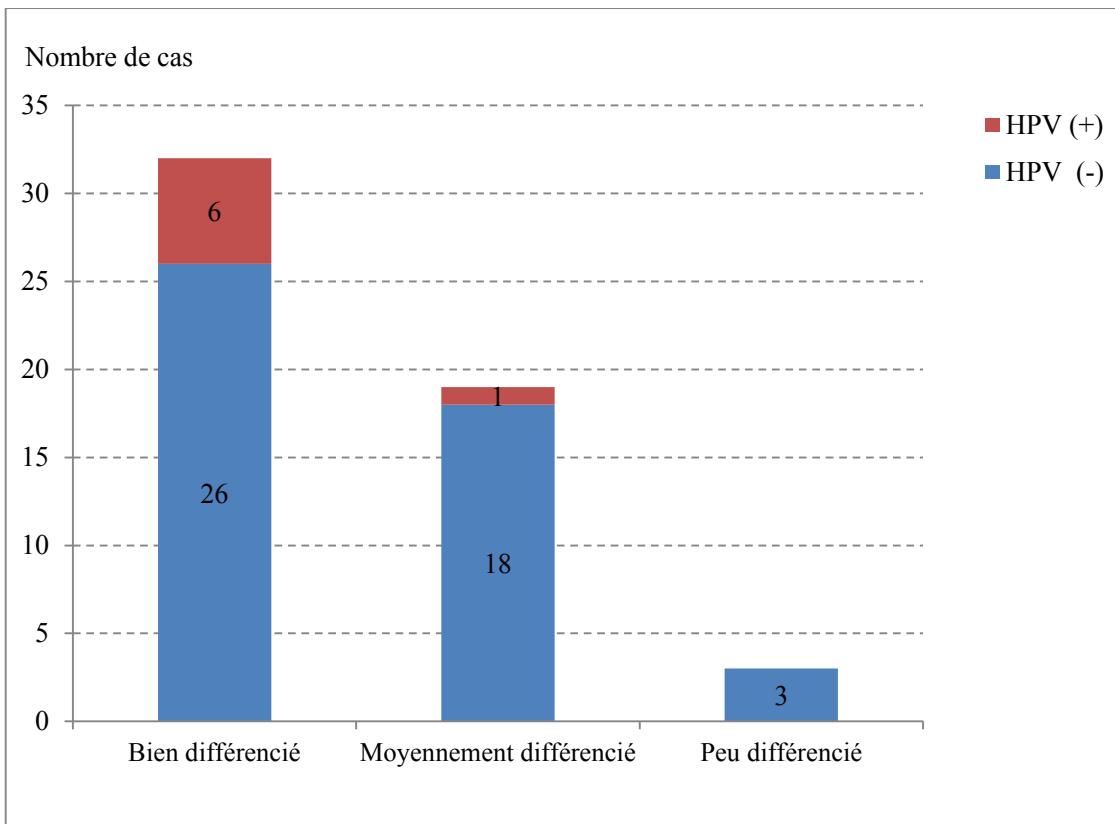
Comme précédemment mentionné, l'analyse histologique des prélèvements biopsiques sur lesquels a porté notre étude, a conclu qu'il s'agissait dans tous les cas d'un carcinome épidermoïde dans sa forme conventionnelle. Quant au degré de différenciation de ces carcinomes, il s'est avéré que 32 cas (59,26 %) étaient des carcinomes épidermoïdes bien différenciés, 19 cas (35,18 %) étaient moyennement différenciés, 3 cas (5,56 %) étaient peu différenciés ; alors qu'aucun cas de carcinome complètement indifférencié n'a été observé.

Considérant le statut HPV de ces tumeurs, parmi les 7 cas qui ont été diagnostiqués HPV (+), 6 cas (85,71 %) étaient bien différenciés et 1 cas seulement (14,29 %) était moyennement différencié.

Pour les 47 cas de carcinomes HPV (-) : 26 étaient bien différenciés (55,32 %), 18 étaient moyennement différenciés (38,3 %), et 3 seulement étaient peu différenciés (6,38 %).

On n'a pas trouvé de relation statistiquement significative entre le degré de différenciation de ces tumeurs et leur statut HPV.

La figure n° 20 illustre le degré de différenciation des carcinomes épidermoïdes de notre étude en fonction de leur statut HPV.

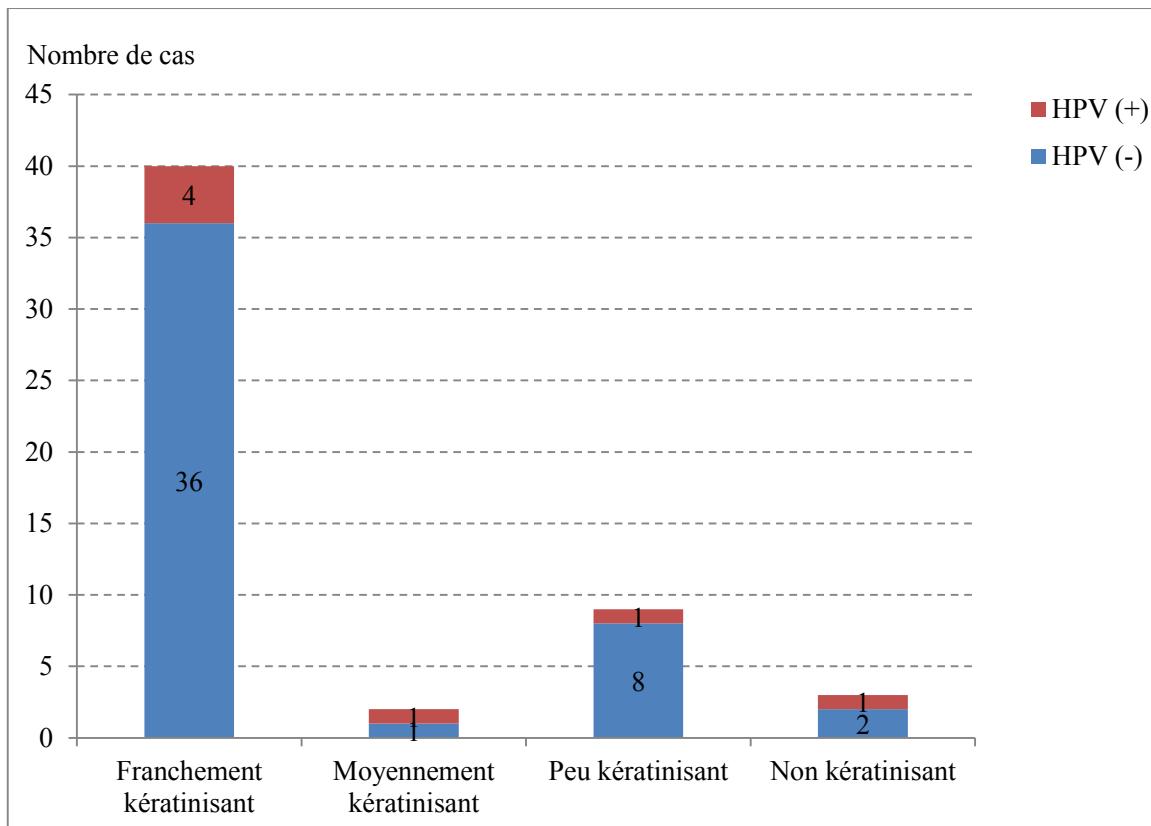


**Figure 20 : Le degré de différenciation des carcinomes épidermoïdes en fonction de leur statut HPV.**

*IV. 3. 3. Degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :*

Les 54 cas de carcinomes épidermoïdes diagnostiqués étaient franchement kératinisants dans 40 cas (74,07 %), moyennement kératinisants dans 2 cas (3,7 %), peu kératinisants dans 9 cas (16,67 %), et non kératinisants dans 3 cas (5,56 %).

Considérant le statut HPV de ces tumeurs, parmi les 7 carcinomes au statut HPV (+), 4 cas (57,14 %) étaient franchement kératinisants, 1 cas (14,29 %) était moyennement kératinisant, 1 cas (14,29 %) était peu kératinisant, et 1 cas aussi (14,29 %) était non kératinisant (figure 21).



**Figure 21 : Le degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes en fonction de leur statut HPV.**

Pour les 47 cas de carcinomes épidermoïdes HPV (-), 37 étaient donc franchement ou moyennement kératinisants (78,72 %) ; et 10 étaient peu ou pas kératinisants (21,28 %). Quant aux 7 cas de carcinomes épidermoïdes HPV (+), la kératinisation était franche ou moyenne dans 5 cas (71,43 %) ; alors qu'elle était faible ou absente dans 2 cas (28,57 %).

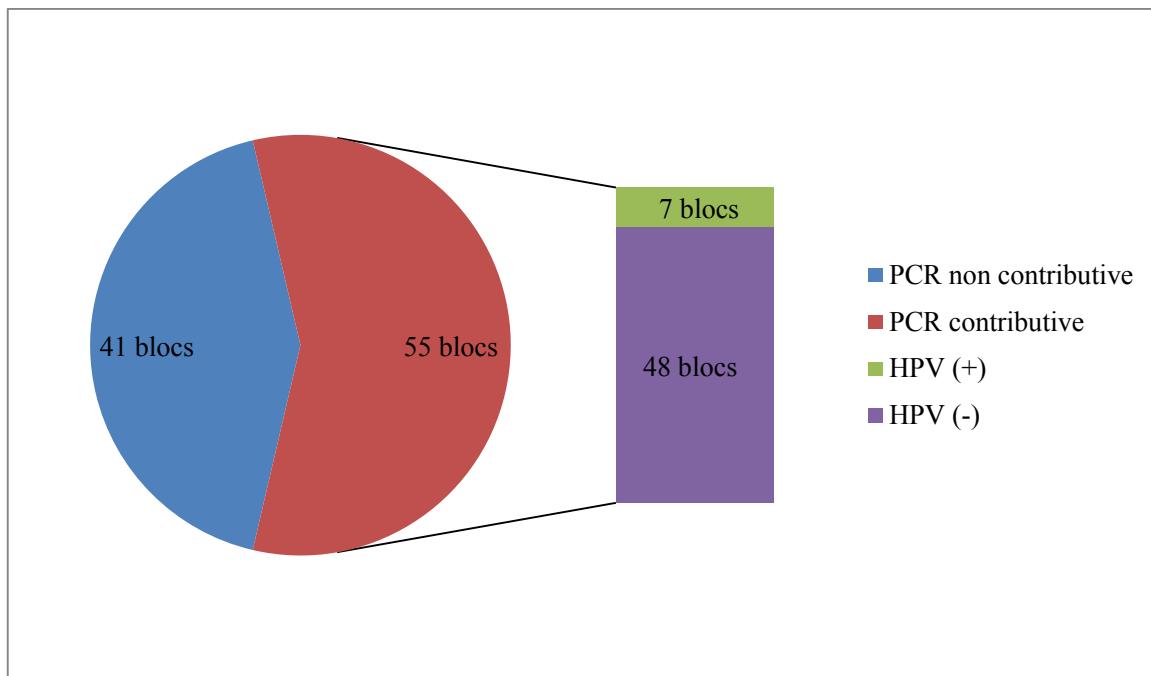
Aucune association statistiquement significative n'a été retrouvée entre le degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes des VADS et leur statut HPV.

## V. Données de la PCR :

Tous les blocs de paraffine des 90 patients inclus dans notre travail ont été retrouvés dans nos archives. Leur nombre était de 96, et ils ont été tous adressés à l'unité de recherche en bio-pathologie de l'Institut Curie de Paris pour recherche du HPV par PCR. Comme déjà mentionné, la technique PCR n'a été contributive que pour 55 blocs correspondant à 54 patients (1 bloc pour chaque patient

dans 53 cas, et 1 patient dont les prélèvements ont été inclus dans 2 blocs différents). Pour les 41 blocs restants (correspondant aux prélèvements de 36 patients), la PCR a été non contributive (42,71 %). Le taux de réussite de la PCR était donc de 57,29 % (55 blocs sur 96).

Le statut HPV des fragments tumoraux envoyés n'a été donc bien spécifié que pour 55 blocs seulement : il a été positif pour 7 blocs (correspondant à 7 patients), et négatif pour les 48 blocs restants (correspondant à 47 patients) (figure 22).



**Figure 22 : Données de la PCR pour la recherche du HPV.**

Notons enfin, que parmi les 41 blocs de paraffine n'ayant pas permis une PCR contributive, le gène de ménage " GAPDH " n'a pas pu être amplifié dans 26 blocs (63,41 %). Pour les 15 blocs restants (36,59 %), le gène de ménage " GAPDH " a pu être amplifié difficilement mais la recherche de HPV s'est avérée non contributive.

# Discussion

# Les données épidémiologiques & anatomo-pathologiques

## **I. Données épidémiologiques descriptives :**

### **I. 1. La prévalence :**

Dans notre étude, la présence des HPV dans les carcinomes épidermoïdes des VADS a été retrouvée dans 12,96 % des cas (7 cas sur 54). Kreimer *et al.*, dans une première méta-analyse ayant inclus 60 études issues de 26 pays différents et ayant porté sur un total de 5046 cas, ont trouvé que la prévalence globale des HPV dans les carcinomes épidermoïdes des VADS était de 25,9 % [12]. Ragin *et al.* [13], Dayyani *et al.* [14], et Ndiaye *et al.* [15], dans 3 autres méta-analyses plus récentes parues respectivement en 2007, 2010, et 2014 ; ont trouvé des valeurs de 27,7 %, de 21,95 %, et de 29,5 %.

Les prévalences calculées dans ces 4 méta-analyses sont donc assez comparables. Cependant, les fréquences de la présence des HPV dans les carcinomes épidermoïdes des VADS telles que rapportées dans les différentes études incluses dans ces méta-analyses, étaient parfois très disparates. C'est ainsi que ces fréquences variaient de 9 % à 74 % dans la méta-analyse de Ragin *et al.* [13], et de 3,35 % à 84 % dans celle menée par Dayyani *et al* [14].

L'importante variabilité des valeurs de la prévalence des carcinomes HPV (+) qui a été retrouvée dans ces travaux, trouve son explication dans la différence de la méthodologie employée. En effet certaines de ces études ont procédé à la recherche de HPV à partir de prélèvements tissulaires fixés par congélation, alors que d'autres l'ont recherché à partir de biopsies fixées au formol et incluses en paraffine. Aussi, les techniques d'identification des HPV étaient variables et n'avaient pas les mêmes sensibilité et spécificité (Hybridation in-situ, Southern Blot, PCR ...). Même les études ayant utilisé la PCR comme technique de recherche, n'ont pas toujours employé les mêmes amores. Enfin, certains de ces travaux ont évalué la prévalence des HPV dans les carcinomes épidermoïdes d'un site particulier des VADS et non au niveau de toutes les VADS.

Nous avons donc recherché des travaux qui ont évalué la prévalence des carcinomes épidermoïdes HPV (+) dans toutes les VADS en adoptant une méthodologie semblable à la nôtre, à savoir :

- recherche de HPV à partir de biopsies fixées au formol et incluses en paraffine,
- recherche de HPV par la technique " PCR consensus ",
- l'utilisation d'amorces spécifiques de type GP5+/GP6+.

Dans les limites de notre recherche bibliographique, nous avons trouvé 4 études qui remplissaient ces critères [138, 139, 161, 162]. Les prévalences des carcinomes épidermoïdes HPV (+) retrouvées dans ces études sont présentées dans le tableau suivant (tableau X).

**Tableau X : Prévalence des carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS dans les études ayant adopté une méthodologie similaire à la nôtre.**

Auteurs de l'étude	Pays	Nombre total de cas testés pour le HPV par PCR	Prévalence des carcinomes HPV (+)
Quintero <i>et al.</i> [138]	Colombie	175 cas	18,9 %
Smith <i>et al.</i> [139]	Etats Unis	237 cas	27,8 %
Snijders <i>et al.</i> [161]	Angleterre	63 cas	20,6 %
Heath <i>et al.</i> [162]	Angleterre	60 cas	30 %
Notre étude	Sénégal	54 cas	12,96 %

La prévalence des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV qu'on a retrouvée dans notre série (12,96 %) était donc inférieure à ces résultats. Toutefois, il est à noter qu'aucun de ces travaux ne s'est intéressé à cette prévalence dans la race noire. De même, les études africaines enrôlées dans les 4 grandes méta-analyses qu'on vient de rapporter [12-15] ; étaient très limitées en nombre, voire absentes.

Effectivement, sous l'angle de la disparité ethnique, notre résultat devient concordant avec les données de la littérature ; puisque c'est dans la race noire que les plus faibles taux de cette prévalence ont été notés [15].

Ndiaye *et al.* [163], dans une publication parue en 2013, ont mené le premier travail au Sénégal et dans toute l’Afrique de l’ouest qui s’est intéressé à la prévalence des cancers associés aux HPV parmi l’ensemble des cancers des VADS. Ils ont trouvé que sur 112 carcinomes épidermoïdes, 4 seulement étaient HPV (+), soit une prévalence de 3,6 %.

Des faibles taux de prévalence ont été également objectivés dans la communauté Afro-Américaine qui partage des origines ancestrales communes avec les populations de l’Afrique subsaharienne.

Ainsi, Settle *et al.* [135], ont montré que la prévalence des carcinomes épidermoïdes HPV (+) parmi l’ensemble des carcinomes des VADS chez les Afro-Américains était de 3,6%.

Wang XI *et al.* [164], ont trouvé des résultats très proches des nôtres : entre l’an 2000 et l’an 2004, la prévalence des carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS était de 10,9 % (6 patients sur 55).

Il en était de même pour Salazar CR *et al.* [165] qui ont estimé cette prévalence à 15,8 % (9 patients sur 57).

Le tableau XI récapitule les différentes prévalences des carcinomes HPV (+) des VADS rapportées dans la race noire.

**Tableau XI : Prévalence des carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS dans la race noire.**

Auteurs de l'étude	Pays	Nombre total des carcinomes épidermoïdes des VADS	Prévalence des carcinomes HPV (+)
Settle <i>et al.</i> [135]	Etats Unis	28 cas	3,6 %
Ndiaye <i>et al.</i> [163]	Sénégal	112 cas	3,6 %
Wang <i>et al.</i> [164]	Etats Unis	55 cas	10,9 %
Salazar <i>et al.</i> [165]	Etats Unis	57 cas	15,8 %
Notre étude	Sénégal	54 cas	12,96 %

## I. 2. L'âge :

Il est bien prouvé actuellement que les carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV sont diagnostiqués à un âge significativement inférieur à celui des patients au statut HPV négatif [24, 129-132, 138, 166, 167].

Dans notre étude, la moyenne d'âge des patients qui avaient un carcinome épidermoïde des VADS associé au HPV était de  $47,43 \text{ ans} \pm 12,38$ . Celle des malades dont le carcinome n'était pas associé au HPV était de  $47,89 \text{ ans} \pm 16,13$ . Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre la moyenne d'âge de ces 2 groupes. La comparaison du statut HPV de nos patients en fonction des différentes tranches d'âge, n'a également objectivé aucune différence statistiquement significative (cf. chapitre " Résultats ").

Nous n'avons pas trouvé une hypothèse plausible qui permet d'expliquer cette absence de différence d'âge entre les deux groupes de notre étude, excepté la taille réduite de notre échantillon. Quelques rares travaux ont également démontré qu'il n'y avait pas de différence d'âge significative entre les malades atteints d'un carcinome HPV (+) et ceux porteurs d'un carcinome HPV (-) [136, 141, 168]. Aucune explication à ce constat n'a été avancée par les auteurs de ces études. Notons

toutefois que tous ces travaux ont aussi porté sur des échantillons réduits avec un nombre de cas variant de 48 à 108 [136, 141, 168].

### **I. 3. Le sexe :**

Les carcinomes épidermoïdes des VADS sont plus fréquents chez l'homme que chez la femme [3]. Selon les données de l'OMS publiées en 2005, le sexe-ratio pour ces tumeurs varie de 1,5 pour celles qui sont situées au niveau du tractus sino-nasal, à 3 pour celles siégeant au niveau du cavum et du larynx [3]. Cette prédominance masculine demeure valable pour le groupe des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV. Plusieurs travaux ont démontré que dans ce groupe, le sexe-ratio variait de 2,5 à 5,4 [129, 132, 138-142].

Dans notre étude, le sexe-ratio des patients au statut HPV (-) était de 1,14 (25 hommes *vs* 22 femmes) et celui des patients HPV (+) était de 2,5 (5 hommes *vs* 2 femmes). Nos résultats sont donc conformes aux données de la littérature. Cependant, dans leur étude menée à Dakar, Ndiaye *et al.* ont trouvé que sur 4 patients présentant un carcinome épidermoïde HPV (+) des VADS, 3 étaient de sexe féminin [163]. Dans cette étude, c'est plutôt une prédominance féminine qui a été donc notée avec un sexe-ratio de 0,33. Nous n'avons pas trouvé de publications qui ont objectivé des résultats similaires. Devant le peu de données épidémiologiques disponibles au Sénégal, de futurs travaux portant sur des échantillons plus larges seront donc nécessaires pour bien pouvoir statuer sur le sexe-ratio dans ce groupe de cancers.

## **II. Données épidémiologiques analytiques :**

### **II. 1. Les habitudes alcooloo-tabagiques :**

Nous avons procédé à évaluer la relation entre les habitudes alcooloo-tabagiques de nos patients et le statut HPV de leurs tumeurs.

Le fait de considérer la consommation alcoolique et les habitudes tabagiques comme étant un seul facteur de risque, nous a été dicté par les contraintes suivantes :

- la faible prévalence des fumeurs [169], et la faible consommation alcoolique au Sénégal [163],
- la taille réduite de notre échantillon.

De plus, tabac et alcool sont souvent associés [126] ; et certains travaux dont nous disposons ont adopté la même méthodologie que la nôtre [170-173].

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé d'association statistiquement significative entre la consommation alcoolo-tabagique et la positivité du statut HPV dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.

Néanmoins, lorsque les habitudes alcoolo-tabagiques des patients étaient précisées, il nous a semblé intéressant de mentionner que 50 % de ceux qui ont eu un carcinome HPV (+) étaient fumeurs et/ou buveurs (3 patients parmi 6) *versus* 15 % seulement chez les patients au statut HPV (-) (6 patients parmi 40).

En fait, les données de la littérature traitant de l'association entre la consommation alcoolo-tabagique et les carcinomes HPV (+) des VADS demeurent assez controversés.

En effet, la plupart des études ont conclu que les carcinomes HPV (+) des VADS ne sont généralement pas associés à une histoire de consommation alcoolo-tabagique [12, 24, 51, 130, 132]. Applebaum *et al.* ont expliqué ce constat par le fait que même si le tabac, l'alcool et les oncoprotéines des HPV attaquent la même cible nucléaire (la protéine p53) ; les mécanismes empruntés pour altérer son fonctionnement sont différents [174].

D'un autre côté ; les travaux de Smith *et al.* [139] et de Gudleviciene *et al.* [168], ont démontré qu'il y avait une association statistiquement significative entre la consommation alcoolo-tabagique et la positivité du statut HPV au niveau des carcinomes épidermoïdes des VADS.

Quatre études ont tenté d'expliquer cette association.

Celles de Herrero *et al.* [144] et de Schwartz *et al.* [173], ont conclu que la consommation tabagique et/ou alcoolique augmentait le risque de survenue de carcinomes HPV (+) en agissant comme un cofacteur de ces virus.

Celles de Schwartz *et al.* [172] et de Smith *et al.* [175], ont expliqué cette association comme étant la conséquence d'une action synergique entre la consommation alcoololo-tabagique et l'infection à HPV des VADS. La résultante de cette synergie étant une augmentation du risque de survenue de carcinome à ce niveau [172, 175].

Au vu de ces divergences, et comme l'ont précisé Gillison *et al.* [176], on ne peut que se contenter d'affirmer que l'infection des VADS par le HPV peut y provoquer un cancer indépendamment du statut alcoololo-tabagique du patient.

## **II. 2. La notion de sexe oral :**

Plusieurs études ont démontré que certaines habitudes sexuelles sont bien corrélées au risque d'infection des VADS par le HPV. Ces habitudes sexuelles ont été considérées aussi comme étant un facteur de risque majeur pour la survenue de carcinomes épidermoïdes associés aux HPV au niveau des VADS [71, 72, 145, 147, 149]. Ces conduites sexuelles majorant le risque relatif de survenue de tels cancers peuvent être résumées comme suit [63, 71, 72, 147-149] :

Le risque d'avoir un carcinome épidermoïde HPV (+) au niveau des VADS est d'autant plus important que :

- si l'activité sexuelle a débuté à un âge plus jeune,
- si le nombre de partenaires sexuels est important,
- si le sujet s'adonne à la pratique du " sexe oral ".

Nous ne pouvons évaluer l'impact de telles habitudes sur la prévalence des HPV dans les carcinomes épidermoïdes des VADS de notre étude. En effet, aucune donnée concernant le comportement sexuel de nos patients n'a été mentionnée dans leurs dossiers. Ceci peut être expliqué par le fait que les habitudes sexuelles des patients sont souvent exclues de la réflexion clinique des médecins. De plus, pour plusieurs raisons socio-culturelles et religieuses, les malades parlent peu de leurs pratiques sexuelles souvent perçues comme étant un tabou. Pour pouvoir évaluer la relation entre les cancers HPV (+) des VADS et les conduites sexuelles des patients qui en sont atteints ; l'idéal serait de procéder à une étude prospective où de tels éléments seront activement recherchés par des cliniciens sensibilisés à cette étude.

## **II. 3. Le type du HPV :**

Dans notre étude, 7 cas de carcinomes associés aux HPV ont été retrouvés. Le génotypage précis des HPV n'a été possible que dans 6 cas. Dans 5 cas, il s'agissait d'un HPV de type 16, et dans l'autre cas, d'un HPV de type 33. La PCR spécifique de type employée dans notre étude ayant utilisé des amorces pouvant identifier les génotypes 6, 11, 16, 18, 33, et 45 ; le HPV non typé ne pouvait donc appartenir à l'un de ces génotypes. Les 5 HPV de type 16 représentaient donc 71,43% de l'ensemble des HPV retrouvés dans notre série. Ils étaient tous localisés au niveau de l'hypopharynx, et il y avait une association statistiquement significative entre le type 16 et la localisation hypopharyngée ( $p = 0,048$ ). Les 2 autres HPV étaient localisés au niveau de la cavité orale sans association statistiquement significative entre leur type et leur siège ( $p > 0,05$ ). Aucun de ces 2 HPV n'était de type 16.

Nos résultats sont donc en corrélation avec les données de la littérature.

En effet, selon la méta-analyse de Ndiaye *et al.* publiée en 2014 [15], sur 12 163 cas de cancers des VADS inclus de leur étude, la prévalence du HPV de type 16 parmi ceux qui étaient associés aux HPV était la plus élevée avec un pourcentage de 21,1%. De même, au niveau des cancers HPV (+) de l'hypopharynx, le HPV de type 16 était également le plus prévalent avec un pourcentage de l'ordre de 50 % [15].

Dans notre étude, aucun des 2 HPV retrouvés au niveau de la cavité orale n'était de type 16. Là aussi, Ndiaye *et al.* ont démontré que c'est seulement en Afrique que le HPV de type 16 n'était pas le plus prévalent au niveau de la cavité orale [15].

## **III. Données anatomo-pathologiques :**

### **III. 1. Le siège des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :**

Dans notre étude, 5 cas de carcinomes épidermoïdes HPV (+) parmi les 7 retrouvés étaient de localisation hypopharyngée (71,43 %). Les 2 autres cas (28,57 %) étaient localisés au niveau de la cavité orale : l'un au niveau du versant muqueux de la lèvre inférieure, et l'autre au niveau de la face

interne de la joue gauche. Nous n'avons pas trouvé de relation statistiquement significative entre la positivité du statut HPV de la tumeur et son siège précis au sein des VADS. Toutefois, cette importante fréquence (71,43 %) de l'association des carcinomes HPV (+) avec la localisation hypopharyngée est discordante avec les données de la littérature. En effet, les carcinomes épidermoïdes associés aux HPV sont réputés être localisés préférentiellement au niveau de l'oropharynx, et plus précisément au niveau des amygdales palatines et linguales [9, 12-15, 22].

C'est ainsi que dans 4 études [139, 167, 177, 178], parmi tous les carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS recensés, le pourcentage de ceux qui étaient de localisation oropharyngée variait de 65 à 83 %. En revanche, le pourcentage de ceux qui étaient localisés au niveau de l'hypopharynx variait de 4 à 8 %.

La discordance de notre résultat avec ceux objectivés dans ces études peut être aisément expliquée par la composition même de notre échantillon. Effectivement, sur l'ensemble des 54 cas inclus dans notre étude, 26 (48 %) étaient situés au niveau de l'hypopharynx alors que 2 seulement (4 %) étaient de siège oropharyngé. Inversement, dans les 4 études que nous venons de rapporter [139, 167, 177, 178], la proportion des carcinomes hypopharyngés était de 8 % dans le meilleur des cas, alors que celle des carcinomes oropharyngés était au minimum de 29 %.

Or, il est bien démontré que le plus haut taux d'association des HPV avec les carcinomes épidermoïdes s'observe au niveau de l'oropharynx (57 % à 82 %) comparativement aux autres sites anatomiques des VADS (0,8 % à 9 %) [179].

Le faible nombre de tumeurs oropharyngées incluses dans notre étude aurait donc amplifié le pourcentage des carcinomes HPV (+) de localisation hypopharyngée.

Un autre argument vient consolider cette hypothèse. Si on ne s'intéresse qu'aux cas des tumeurs hypopharyngées de notre étude, la prévalence de celles qui étaient HPV (+) était de 19,23 % (5 sur 26). Ndiaye *et al.* [15], dans une méta-analyse récente parue en 2014 et ayant revu 148 études, ont bien détaillé les prévalences des carcinomes HPV (+) en fonction des différents sites des VADS. Ils ont conclu que la prévalence de ces tumeurs parmi l'ensemble des carcinomes diagnostiqués au niveau de l'hypopharynx était de 21,9 %. Ce constat concorde avec notre résultat. Il en ressort donc que c'était le fait d'avoir inclus un nombre de carcinomes hypopharyngés 13 fois supérieur à celui

des tumeurs oropharyngées qui aurait amplifié la proportion des carcinomes HPV (+) situés dans l'hypopharynx.

### **III. 2. Données histopathologiques :**

#### *III. 2. 1. Forme histologique des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :*

Tous les carcinomes épidermoïdes des VADS inclus dans notre étude étaient de forme conventionnelle, et ce, quel que soit leur statut HPV. Aucune variante particulière n'a été donc diagnostiquée pour les 7 cas associés aux HPV qu'on a trouvés.

Les données récentes de la littérature affirment qu'en plus de la forme conventionnelle, certaines variantes du carcinome épidermoïde des VADS étaient associées aux HPV. Il s'agit notamment des variantes papillaire, verrueuse, basaloïde, adénosquameuse, et sarcomatoïde [7, 23, 25, 154, 180]. Néanmoins, la prévalence des HPV dans ces formes demeure très faible [25, 180].

En fait, il est bien établi actuellement que les carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS s'associent dans 50 à 80 % des cas à une " variante " histologique particulière, non encore reconnue par l'OMS comme entité à part entière [23, 156]. Les aspects microscopiques de cette forme particulière ont été déjà relatées dans le chapitre " Rappels et revue de la littérature ". De façon sommaire, ces aspects se résument à la présence d'une mauvaise différenciation ou d'un aspect basaloïde, et d'une kératinisation faible ou absente [9, 23-25, 109, 156].

Etant donné que ces données ne se sont bien confirmées qu'après la parution de la dernière classification OMS des tumeurs de la tête et du cou, cette variante fréquemment associée aux HPV demeure difficile à classer [24, 154].

En effet, malgré que son " aspect basaloïde " pourrait la faire confondre avec la variante basaloïde, elle en demeure différente et surtout de meilleur pronostic [23-25, 156]. Parallèlement, de par ses particularités microscopiques, elle ne peut être considérée comme un authentique carcinome épidermoïde de forme conventionnelle [23-25, 154].

Au vu de ces éléments, il aurait pu être possible que cet aspect histologique évocateur des carcinomes HPV (+) ait été présent dans nos cas ; mais que notre adoption de la classification OMS en vigueur nous a porté à les considérer comme étant des carcinomes épidermoïdes conventionnels.

Pour pouvoir bien discuter l'aspect microscopique des carcinomes inclus de notre étude conformément à ces nouvelles données, l'idéal aurait été de relire les lames de notre échantillon. Malheureusement, plusieurs de ces lames n'ont pas été retrouvées. De plus, la recoupe des blocs de paraffine était impossible vu qu'ils étaient épuisés par la technique PCR.

Or, comme nous venons de le mentionner, les carcinomes épidermoïdes HPV (+) des VADS sont souvent peu différenciés et peu ou pas matures. Nous avons donc relevés et analysés ces éléments à partir de nos comptes rendus, afin de les discuter dans les 2 chapitres à venir.

### *III. 2. 2. Degré de différenciation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :*

On n'avait pas objectivé d'association statistiquement significative entre le degré de différenciation des nos carcinomes épidermoïdes et leurs statuts HPV. Trois carcinomes seulement de notre série étaient peu différenciés, et aucun d'eux n'était associé aux HPV. En effet, sur nos 7 cas de carcinomes HPV (+), 6 étaient bien différenciés (85,71 %) et 1 était moyennement différencié (14,29 %).

En se basant sur le classique *grading* de l'OMS des carcinomes épidermoïdes des VADS, la majorité des carcinomes HPV (+) auraient été gradés comme étant peu différencié [23, 25].

Or, dans notre série, aucun carcinome associé aux HPV n'a été diagnostiqué comme peu différencié. D'autres travaux ont trouvé que le pourcentage des carcinomes peu différenciés par rapport à l'ensemble des carcinomes HPV (+) des VADS était au mieux de 31 % seulement [141, 142, 161].

Inversement, Badaracco *et al.* [140] et Gillison *et al.* [9] ont trouvé que les carcinomes HPV (+) des VADS étaient fréquemment peu différenciés. Badaracco *et al.* ont même objectivé que cette mauvaise différenciation était liée de façon statistiquement significative à la présence des HPV [140].

La différence entre ces résultats réside dans la différence des méthodologies adoptées par les auteurs de ces travaux. En effet, comme dans notre étude, ceux qui ont trouvé que les carcinomes HPV (+) des VADS étaient plutôt moyennement à bien différenciés ; ont juste objectivé la présence de l'ADN viral. Par contre, ceux qui ont démontré que les carcinomes HPV (+) des VADS étaient peu différenciés ont adopté dans leurs recherches des techniques qui ont permis de prouver que les HPV étaient non seulement présents, mais aussi biologiquement actifs [9, 140]. En d'autres termes, les carcinomes HPV (+) peu différenciés des VADS étaient en fait HPV-induits, et cette mauvaise différenciation était due à l'activité biologique des oncoprotéines virales [9, 140].

Effectivement, même si les mécanismes biomoléculaires de cette mauvaise différenciation demeurent mal élucidés, il est bien démontré que cette dernière n'est que la traduction d'une oncogenèse viro-induite via l'expression des oncoprotéines E6 et E7 des HPV [9, 25, 140, 156].

Les carcinomes HPV (+) et bien différenciés retrouvés dans notre étude ne semblent donc pas être surprenants, si on considère l'éventualité que les HPV auraient pu simplement exister dans la tumeur sans manifester leur pouvoir oncogène. Considérant que tous nos cas de carcinomes HPV (+) étaient localisés au niveau de l'hypopharynx et de la cavité orale, cette hypothèse devient d'autant plus plausible que si l'on se rappelle que :

- l'activité oncogénique des HPV dans ces sites anatomiques est de l'ordre de 3% [181],
- le caractère peu différencié des carcinomes HPV-induits est surtout retrouvé au niveau de l'oropharynx [25, 181].

### *III. 2. 3. Degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes diagnostiqués :*

Dans notre série, on n'avait pas trouvé d'association statistiquement significative entre le degré de kératinisation des carcinomes épidermoïdes des VADS et leurs statuts HPV. Parmi les 7 cas de carcinomes HPV (+), 2 seulement étaient peu ou pas kératinisants (28, 57 %) *versus* 5 qui étaient moyennement ou franchement kératinisants (71,43 %).

De même que pour la mauvaise différenciation, la kératinisation faible ou carrément absente est plutôt observée dans les carcinomes contenant des HPV biologiquement actifs (c.à.d. des HPV qui ont exprimé leur pouvoir oncogène) [25, 109, 156, 182].

La faible fréquence des carcinomes HPV (+) et peu ou pas kératinisants observée dans notre étude, corrobore encore plus l'hypothèse que ces virus n'ont pas exprimé leur potentiel cancérogène.

En fait, la recherche du HPV dans les carcinomes épidermoïdes des VADS, prend tout son intérêt lorsqu'elle permet non seulement d'objectiver la présence du virus, mais aussi de prouver son action oncogénique [9, 23, 25, 140, 156]. Cet intérêt est justifié par le fait que seuls les carcinomes réellement HPV-induits sont de meilleur pronostic que ceux abritant des HPV biologiquement inactifs [9, 12-14, 22].

Dans nos futurs travaux, l'idéal serait donc non seulement de rechercher la simple présence des HPV, mais aussi de déterminer s'ils ont exprimé leur pouvoir oncogène.

# Les données de la PCR

Dans cette deuxième partie de la discussion, nous avons essayé d'identifier les différents paramètres ayant rendu la technique PCR non contributive pour 41 blocs parmi les 96 initialement inclus dans notre travail.

Comme il a été bien précisé dans le rapport que nous a communiqué l'unité de recherche en bio-pathologie de l'Institut Curie de Paris où l'étude PCR a été faite ; ces cas non contributifs se répartissaient en 2 catégories :

- La première catégorie (**Groupe A / 15 blocs**) englobait les échantillons où le gène témoin GAPDH a pu être amplifié, mais très difficilement et faiblement. Ce gène témoin GADPH (appelé encore gène de " ménage ") est un gène observé dans tous les tissus humains, et dont l'amplification est le témoin d'une assez bonne qualité de l'ADN à tester. De plus, dans ces échantillons, il n'a pas été détecté d'ADN de HPV. Le laboratoire a préféré considérer ces cas comme étant non contributifs pour ne pas rendre les résultats potentiellement négatifs. Par contre, il n'a pas pu trancher s'il n'y avait réellement pas d'ADN de HPV, ou si l'ADN était trop dégradé, ou encore s'il était présent mais en très faible quantité pour pouvoir être amplifié.
- La deuxième catégorie (**Groupe B / 26 blocs**) était représentée par l'ensemble des échantillons pour qui il n'a jamais été possible d'amplifier le gène de " ménage " GAPDH. Cette impossibilité d'amplifier la GADPH étant le témoin d'un ADN trop fragmenté ou de structure profondément altérée.

## I. Paramètres ayant rendu la PCR non contributive dans le groupe A :

Dans ce groupe, quoique difficilement et faiblement, le gène GAPDH a pu être amplifié. La PCR a donc plutôt fourni des résultats difficilement interprétables qu'elle n'a été vraiment non contributive. Le laboratoire a émis 3 hypothèses concernant l'ADN extrait et exploité par PCR dans cette catégorie :

- soit qu'il n'y avait pas d'ADN de HPV,
- soit qu'il y en avait mais était en très faible quantité,
- soit qu'il y en avait mais les conditions de conservation l'ont trop dégradé.

Si on ne peut se prononcer quant aux 2 premières hypothèses, il nous semble néanmoins que la troisième est peu plausible.

En effet, outre le fait que le gène GAPDH a pu être amplifié (ce qui témoigne d'une assez bonne qualité de conservation du matériel génétique), la constatation suivante corrobore nos dires.

Parmi tous les patients recrutés dans notre étude, 6 seulement ont eu des fragments biopsiques inclus dans 2 blocs différents. Pour 4 patients parmi ces 6, la PCR a conclu à des résultats identiques pour leurs 2 blocs. Pour les 2 patients restants, la PCR était contributive pour un bloc, alors qu'elle a classé le deuxième bloc dans le groupe A. Chez ces 2 patients, l'ADN extrait des blocs de paraffine était donc exploitable (non dégradé) dans un bloc, alors qu'il ne l'était pas dans l'autre. Les fragments biopsiques étant prélevés de la même tumeur, par le même opérateur, conservés, fixés, et archivés dans les mêmes conditions ; il en va de soi que la qualité de l'ADN serait la même dans les deux blocs. Il en ressort donc que, pour ce groupe A, il est peu probable que la PCR ait été non contributive à cause de la mauvaise qualité de l'ADN extrait de ces blocs.

Il semblerait ainsi que les cas inclus dans le groupe A, ne contenaient réellement pas de l'ADN de HPV, ou en contenaient mais en très faible quantité. Ce dernier cas de figure serait expliqué en partie par le fait que, lors de la coupe au microtome, le bloc de paraffine était parfois relativement épuisé ne laissant ainsi qu'un faible volume tumoral d'un prélèvement biopsique déjà souvent de petite taille.

## **II. Paramètres ayant rendu la PCR non contributive dans le groupe B :**

Ce groupe englobe les échantillons tissulaires dont l'ADN était trop fragmenté ou de structure profondément altérée.

Rappelons que plusieurs paramètres interfèrent avec la qualité du matériel génétique extrait à partir des blocs de paraffine pour étude en PCR.

Ces paramètres peuvent être résumés de la façon suivante [183-188] :

- des paramètres inhérents au geste chirurgical ou à l'acte biopsique (*prefixation parameters*),
- la durée de préfixation (*prefixation time*),
- des paramètres de la fixation elle-même (*intrafixation parameters*),
- la durée et les conditions d'archivage des blocs de paraffine,
- des paramètres relatifs à la technique d'extraction de l'ADN à partir des blocs de paraffine.

### **II. 1. Les paramètres inhérents au geste chirurgical ou à l'acte biopsique (*prefixation parameters*) :**

Ces paramètres englobent plusieurs éléments dont les principaux sont le degré d'anoxie tissulaire, la valeur du pH local, le type d'anesthésique utilisé, et la durée de l'anesthésie [183].

Comme l'ont bien précisé Srinivasan *et al.* [183] et Hofman *et al.* [187], le pathologiste ne peut réellement intervenir ou émettre des recommandations sur ces paramètres qui dépendent essentiellement de l'équipe soignante, et varient largement selon l'acte biopsique ou le geste chirurgical à pratiquer.

Néanmoins, dans notre étude, il semble que ces éléments n'ont pas eu d'impact significatif sur la qualité du matériel génétique extrait à partir de nos blocs de paraffine. En effet, toujours selon Srinivasan *et al.* [183], non seulement ces éléments interfèrent peu avec la qualité de l'ADN

comparativement aux autres paramètres (essentiellement les paramètres de fixation elle-même) ; mais aussi ils intéresseraient beaucoup plus les interventions chirurgicales que les actes biopsiques.

Effectivement, c'est au cours des interventions chirurgicales que la mise de clamps à visée hémostatique peut engendrer une véritable anoxie tissulaire et faire varier le pH, et interférer ainsi avec la structure de l'ADN [183, 189]. Or, dans notre travail, nous n'avons que des prélèvements biopsiques obtenus généralement sans mise de clamps à visée hémostatique, rendant les paramètres sus-cités peu intervenants dans l'altération de la qualité de l'ADN.

## **II. 2. La durée de préfixation (*prefixation time*) :**

Par définition, la durée de préfixation est l'intervalle de temps séparant l'instant précis de l'excision d'un fragment tissulaire du moment de sa fixation [96, 183].

Dix minutes seulement après le geste d'excision sont suffisantes pour l'apparition d'altérations biochimiques significatives au niveau des tissus prélevés si une fixation rapide n'a pas eu lieu [183, 190].

Ces altérations sont dues essentiellement au phénomène d'anoxie tissulaire et intéressent, entre autres, la structure de l'ADN [183, 186].

La durée de préfixation n'étant généralement pas précisée par les cliniciens, nous ne pouvons malheureusement discuter ce paramètre et évaluer son éventuel impact sur la dégradation de l'ADN dans nos échantillons.

## **II. 3. Matériel et méthodes : les paramètres de la fixation elle-même (*intrafixation parameters*) :**

Selon plusieurs auteurs, l'étape de fixation constitue l'étape la plus critique pour la préservation des acides nucléiques après inclusion en paraffine [183, 191-195]. Quatre paramètres conditionnent le bon déroulement et la réussite de cette étape [183, 191] :

- le type du fixateur,
- la température à laquelle a été faite la fixation,
- la durée de la fixation,
- le volume du fixateur.

*II. 3. 1. Le type du fixateur :*

Toutes les biopsies incluses dans notre travail ont été préalablement fixées au formol non tamponné et dilué à 10 %. Même s'il est bien admis actuellement que ce fixateur est un peu dommageable pour la structure de l'ADN, il demeure cependant le fixateur le plus utilisé dans les laboratoires d'ACP de par le monde [183, 192, 196, 197].

En effet, le formol altère la structure de l'ADN en provoquant des pontages entre les histones, en réagissant directement avec les nucléotides, et parfois en cassant la double hélice des brins de l'ADN [183, 191, 198, 199]. Néanmoins, et comparativement aux autres types de fixateurs utilisés en routine (acétone, liquide de Bouin ...), le formol permet tout de même une meilleure conservation des acides nucléiques et, quand les règles de son utilisation sont bien respectées, donne des résultats bien satisfaisants pour la PCR [196, 197, 200]. L'élément fondamental à respecter et à contrôler concernant la qualité du formol est la neutralité de son pH. Plusieurs travaux ont conclu que la structure de l'ADN est de loin et plus profondément altérée quand le formol employé pour la fixation est à pH acide non tamponné [183, 191, 201, 202].

Effectivement, la plupart des travaux qui avaient réussi leur PCR avec un taux avoisinant les 100 %, ont procédé à l'analyse de prélèvements tissulaires fixés dans du formol au pH neutre et tamponné [184, 192, 193, 195, 196, 199, 200]. Or, dans notre laboratoire, le formol utilisé était non tamponné, et la neutralité de son pH n'était pas contrôlée.

On peut ainsi conclure que, pour notre étude, le fixateur qu'on a utilisé et ses caractéristiques expliqueraient en partie la profonde altération de l'ADN de nos échantillons.

*II. 3. 2. La température à laquelle a été faite la fixation :*

La fixation des différentes biopsies sur lesquelles a porté notre étude s'est faite à température ambiante. Il en a été de même pour la plupart des travaux qui ont réussi leur technique PCR dans

presque 100% des cas [184, 192, 193, 195, 196, 199, 200]. Il semble donc que ce paramètre n'a pas vraiment intervenu dans la dégradation des acides nucléiques des prélèvements biopsiques inclus dans notre étude.

Notons toutefois que certaines études ont démontré que lorsque la fixation s'est faite et s'est maintenue à une température de 4°C, aussi bien la quantité que la qualité de l'ADN extrait étaient meilleures que celles des prélèvements fixés à température ambiante [203-205]. Il serait ainsi souhaitable que la fixation des prélèvements tissulaires susceptibles de subir une amplification génique par PCR se fasse dorénavant à une température de 4°C.

## *II. 3. 3. La durée de la fixation :*

Il est actuellement bien prouvé que plus la durée de fixation dans le formol a été longue, plus la fragmentation et la dégradation de l'ADN a été importante [183, 195, 196]. Malheureusement, dans notre étude, les archives de notre service ne nous ont pas permis de préciser la durée de fixation de nos prélèvements biopsiques datant de 6 à 7 ans.

Les habitudes de notre service étant toujours les mêmes, et pour avoir une idée approximative, nous avons déterminé la durée moyenne de fixation dans le formol de 200 prélèvements biopsiques choisis au hasard sur une période de 4 mois (Juin – Septembre 2014). Elle était de 4,5 jours (108 heures) avec parfois des durées atteignant les 21 jours.

Funabashi *et al.* ont comparé les résultats de la PCR pour des tissus fixés dans le formol pour des durées respectives de 24 heures et de 7 jours. Ils ont démontré que le signal lumineux émis par les produits d'amplification de la PCR diminuait considérablement pour devenir parfois absent entre le premier groupe (24h de fixation) et le deuxième groupe (7 jours de fixation) [195]. Ce résultat a été retrouvé dans d'autres études [202, 206, 207].

Or, la durée moyenne de fixation de 4,5 jours qu'on a calculée ne reflète que la période durant laquelle les biopsies ont été maintenues dans le formol dans notre laboratoire.

Si on y ajoute l'intervalle de temps écoulé entre la date du prélèvement et la date de sa réception dans notre laboratoire, la moyenne de la durée totale de fixation devient de 7,9 jours, avec une extrême allant jusqu'à 48 jours. Cette longue durée de fixation qui dépasse largement la période

de 24 à 48 heures recommandée par les sociétés savantes, semblerait donc constituer l'élément majeur ayant dégradé les acides nucléiques de nos prélèvements.

*II. 3. 4. Le volume du fixateur :*

Le volume du fixateur doit être au moins égal à 20 fois le volume de la pièce à fixer [183]. Tous les prélèvements tissulaires inclus dans notre étude consistaient en des petits fragments biopsiques, généralement reçus dans des flacons remplis d'un volume de formol dépassant 20 fois leurs volumes. Ce paramètre a été donc bien respecté et ne semble pas ayant intervenu dans la dégradation des acides nucléiques de nos échantillons.

**II. 4. Matériel et méthodes : la durée et les conditions d'archivage des blocs de paraffine :**

*II. 4. 1. La durée de conservation des blocs de paraffine :*

Dans notre cas, les blocs de paraffine envoyés pour recherche de HPV par PCR étaient préalablement archivés pour une période allant de 5 à 6 ans. Cet archivage a eu lieu dans de petites armoires en bois, et les blocs de paraffine étaient conservés à la température ambiante des locaux de notre laboratoire.

Pour certains auteurs, l'intégrité de l'ADN extrait de blocs de paraffine archivés diminue progressivement au fil des années [187, 188, 195]. Une étude américaine a même estimé que la quantité d'acides nucléiques contenue initialement dans un bloc de paraffine, diminue de 5 à 50% au bout de chaque décennie [208].

Funabashi *et al.* ont procédé à une évaluation du taux de réussite de l'amplification par PCR du gène de la  $\beta$ -actine à partir de 30 blocs de paraffine archivés depuis 5 ans [195]. Comme dans notre cas, les prélèvements tissulaires contenus dans ces blocs ont été préalablement fixés dans du formol, et la technique d'extraction de l'ADN s'est faite en utilisant un Kit commercial. Ils ont trouvé que, selon l'origine tissulaire du prélèvement (foie, rate ...), le taux de réussite de la PCR variait de 40 à 60 % ; ce qui est comparable à notre résultat qui était de 57,29 %.

Cependant, une extraction d'un ADN "d'assez bonne qualité" et en quantité suffisante pour permettre son exploitation par PCR, a été possible à partir de blocs de paraffine archivés pour des périodes atteignant parfois les 5 décades [183, 188, 191, 196, 209].

Il serait donc difficile d'identifier l'effet réel et exact de la durée de conservation sur le maintien de la structure de l'ADN. En effet, comme l'ont bien souligné Hewitt *et al.* [188], il est quasiment impossible d'imputer de façon formelle l'altération de l'ADN contenu dans des blocs de paraffine archivés pour de longues périodes à la durée d'archivage elle-même, ou bien encore à une procédure de fixation défaillante dont la conséquence sur la qualité des acides nucléiques ne s'est manifestée qu'au moment de leur exploitation par PCR.

#### *II. 4. 2. Les conditions d'archivage des blocs de paraffine :*

Dans la limite de notre revue des données de la littérature, nous n'avons pas trouvé de travaux ayant tenté d'évaluer l'impact des conditions de conservation des blocs de paraffine sur la qualité des acides nucléiques qui y sont contenus. Le peu de données dont nous disposons se limitait plutôt à quelques recommandations émises par certains auteurs concernant l'archivage de ces blocs. Ces recommandations semblent garantir une assez bonne conservation de la structure des acides nucléiques en vue de leur exploitation pour des examens ultérieurs, notamment la PCR.

C'est ainsi que Hofman *et al.* [187], et Hewitt *et al.* [188], conseillent de conserver les tissus inclus en paraffine dans des pièces climatisées ne subissant pas de variations de température, et si possible à une température inférieure à 20°C. Ils recommandent aussi un contrôle régulier du taux d'humidité de ces pièces (sans en préciser les modalités) qui doivent être à l'abri des rongeurs et des insectes, parfois potentiellement nuisibles pour les blocs de paraffine.

Quant à l'institut fédéral américain du cancer, les recommandations qu'il a émises sont encore plus minimalistes, se résumant à archiver les blocs paraffinés dans des locaux non humides dont la température ne dépasse pas les 27°C (température ambiante) [210]. En se référant à cette dernière recommandation, on est en mesure d'affirmer que les conditions d'archivage des blocs dans notre service ont été donc respectées.

## **II. 5. Matériel et méthodes : les paramètres relatifs à la technique d'extraction de l'ADN à partir des blocs de paraffine :**

La technique PCR ne peut se dérouler qu'une fois le matériel génétique des échantillons tissulaires contenus dans les blocs de paraffine ait été préalablement extrait. Les techniques d'extraction de l'ADN peuvent causer sa fragmentation et, en conséquence, altérer sa qualité [184, 185].

Dans un travail très récent publié en 2015 [184], Alvarez *et al.* ont comparé l'impact de 5 techniques différentes d'extraction d'ADN à partir de blocs de paraffine sur la sensibilité de la PCR dans la détection des HPV dans des biopsies du col utérin. Ils ont conclu à la présence d'une différence parfois statistiquement significative dans la détection des HPV selon la technique d'extraction d'ADN employée. Cette conclusion semble séduisante pour avancer encore plus d'arguments expliquant l'altération profonde du matériel génétique de nos échantillons du groupe B.

Néanmoins, et comme l'ont bien précisé Alvarez *et al.* [184], même si ces différentes techniques d'extraction de l'ADN se sont traduites par une sensibilité différente dans la détection de HPV ; elles ont toutes permis d'avoir une amplification satisfaisante du gène de ménage (ici le gène de la globine  $\beta$ ). Aucune différence statistiquement significative n'a été donc objectivée pour l'amplification du gène de ménage selon la méthode d'extraction du matériel génétique [184].

Alvarez *et al.* ont conclu donc que même si la technique d'extraction de l'ADN peut fragmenter et engendrer une différence dans la sensibilité de la PCR dans la détection des HPV, cette fragmentation n'est généralement pas si importante au point de rendre l'amplification du gène de ménage impossible [184].

Or, dans tous nos échantillons du groupe B, cette amplification du gène de ménage n'a jamais été possible. Ceci témoigne d'une altération profonde de l'ADN de nos échantillons qui serait beaucoup plus inhérente aux paramètres de fixation et d'inclusion en paraffine qu'à la technique d'extraction de l'ADN elle-même. (Ces paramètres de fixation et d'inclusion en paraffine ayant été déjà discutés dans le chapitre II.3.)

Pour conclure ce chapitre, il nous semble évident d'affirmer que la discussion des différents paramètres énumérés ci-dessus, nous a permis de dégager de nombreuses défaillances. Ces dernières

ont concerné aussi bien la manière de traiter les prélèvements biopsiques qui nous ont été adressés, que les conditions de leur conservation. Des recommandations visant à remédier à ces défaillances seront présentées à la fin de ce travail dans le chapitre " Conclusion & Recommandations ".

# Conclusion

&

# Recommendations

Du fait de leurs particularités épidémiologiques, morphologiques, et pronostiques ; les carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV ne cessent de susciter l'intérêt des cliniciens et des pathologistes. L'abondance des données de la littérature traitant de cette entité et publiées au cours de la dernière décennie, témoigne de cet intérêt et en fait un sujet d'actualité.

Cependant, peu d'études africaines se sont intéressées à ce sujet. Les rares données rapportant les particularités épidémiologiques et pathologiques de ces carcinomes HPV (+) des VADS chez la race noire, sont surtout issues de travaux menés chez les Afro-Américains.

Notre étude constitue la deuxième étude menée au Sénégal qui s'est penchée sur les particularités épidémiologiques et histologiques des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV. Par ailleurs, elle est la première étude au Sénégal ayant tenté d'identifier les différentes causes ayant pu altérer la qualité de l'ADN des prélèvements tissulaires, et ayant affecté en conséquences la rentabilité de la PCR. C'était une étude rétrospective, descriptive, et analytique ; qui a eu lieu dans le laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (A.C.P.) de l'Hôpital Aristide le Dantec (HALD) de Dakar. Elle a porté sur 90 patients atteints d'un carcinome épidermoïde invasif siégeant au niveau des VADS, recrutés durant la période allant du 1<sup>er</sup> janvier 2008 au 30 Juin 2009.

Parmi les 90 patients initialement inclus dans notre travail, la PCR n'a été concluante que chez 54 patients seulement (60%). Sur ces 54 patients, 7 uniquement avaient un carcinome associé aux HPV ; soit une prévalence de 12,96 %. La moyenne d'âge des patients atteints d'un carcinome HPV (+) était de 47,43 ans  $\pm$  12,38 *versus* 47,89 ans  $\pm$  16,13 chez les malades au statut HPV (-). Aussi bien chez les patients ayant un carcinome épidermoïde associé aux HPV que chez ceux n'en ayant pas, une prédominance masculine a été toujours notée avec des sexe-ratios respectifs de 1,14 et de 2,5.

Pour les données épidémiologiques analytiques, chez les 54 patients dont la PCR était contributive, les habitudes alcoololo-tabagiques n'ont été mentionnées que chez 46 patients (85,15%). Contrairement à ce qui est rapporté dans les données de la littérature, nous avons noté une fréquence de consommation alcoolique et/ou tabagique plus importante chez les patients au statut HPV(+) que chez les patients au statut HPV (-). Elle était de 50 % dans le premier groupe (3 patients sur 6) contre 15 % seulement dans le deuxième groupe (6 patients sur 40). Cependant, cette différence n'était pas statistiquement significative. La notion de sexe oral, n'ayant pas encore intégré les réflexes des cliniciens lors de l'interrogatoire, n'a jamais été mentionnée dans les dossiers de nos patients. Quant

aux types des HPV isolés, sur les 7 cas identifiés, 5 étaient de type 16 (71,43%), 1 était de type 33 (14,28%), et un autre n'a pas pu être génotypé (14,28%).

Concernant les données anatomo-cliniques, pour les 54 cas de carcinomes dont on a pu déterminer le statut HPV, leur répartition au sein des VADS n'était pas " homogène ". Ainsi, 26 cas (48,15%) étaient de siège hypopharyngé, 23 cas (42,6 %) étaient localisés au niveau de la cavité orale ; alors qu'on n'avait que 5 cas seulement (9,25 %) localisés au niveau du reste des VADS. Il est à noter que 5 cas de carcinomes épidermoïdes parmi les 7 associé aux HPV étaient de siège hypopharyngé (71,43%). La plus forte prévalence des carcinomes HPV (+) observée dans notre série était donc au niveau de l'hypopharynx (5 cas parmi 26, soit une prévalence de 19,23 %). Important à noter aussi que ces 5 cas étaient tous associés à un HPV de type 16, et ce, de façon statistiquement significative ( $p = 0,048$ ).

Pour les données histologiques, tous les comptes rendus anatomopathologiques finaux de nos patients ont conclu à un carcinome épidermoïde conventionnel. Aucune variante " basaloid-like " n'a été donc mentionnée pour les carcinomes s'étant avérés associés aux HPV. Nous n'avons pas objectivé de relation statistiquement significative entre le degré de différenciation de nos carcinomes épidermoïdes et leur statut HPV. Notons toutefois que la forme bien différenciée était la forme la plus retrouvée aussi bien dans les carcinomes HPV (+) que dans les carcinomes HPV (-) avec des fréquences respectives de 85,71 % et de 55,32%. Il en était de même pour la kératinisation, qui était franche ou modérée dans 71,43 % des cas au statut HPV positif, et dans 78,72 % des carcinomes HPV (-).

Les fragments biopsiques des 90 patients de notre série étaient inclus dans 96 blocs de paraffine. La PCR était non concluante pour 41 blocs parmi ces 96 (42,7 %). Sur ces 41 cas, la PCR a pu amplifier le gène de ménage " GAPDH " dans 15 cas (36,58 %), mais de façon très difficile et faible. On n'a pu trancher si c'est la mauvaise qualité de l'ADN qui a rendu la PCR non contributive pour ces 15 cas, ou bien le faible volume tumoral résiduel contenu dans ces blocs. Par contre, pour les 26 cas restants (63,42 %), le gène de ménage " GAPDH " n'a jamais pu être amplifié. Ceci est dû vraisemblablement à une structure d'ADN profondément altérée.

Deux paramètres semblent avoir été déterminants dans l'altération du matériel génétique de nos échantillons tissulaires : la durée de fixation et la qualité du fixateur employé. En effet, dans notre étude, l'intervalle de temps écoulé entre la date du prélèvement biopsique et le moment de sa

prise en charge dans notre laboratoire était estimé 7,9 jours. Cette durée a dépassé largement celle de 24 à 48 heures recommandée par les sociétés savantes. De plus, non seulement la qualité du fixateur utilisé par les cliniciens n'a pas été contrôlée, mais aussi le formol qu'on a employé dans notre service était non tamponné. L'acidité du pH de ce dernier reconnu être dommageable pour la structure de l'ADN, aurait donc participé aussi à la détérioration de la qualité des acides nucléiques de nos biopsies.

Au terme de cette étude, les difficultés rencontrées nous ont suggéré un bon nombre de recommandations.

Des recommandations destinées aux cliniciens, et qui consistent à :

- Fixer immédiatement les biopsies prélevées dans un fixateur conforme aux normes de qualité.
- Sensibiliser les patients sur la nécessité et l'intérêt d'acheminer leurs prélèvements biopsiques au laboratoire d'ACP dans les plus brefs délais.
- S'enquérir des habitudes sexuelles des patients présentant une tumeur des VADS suspecte de malignité, à fortiori s'ils sont jeunes, de sexe masculin, et sans notion d'alcoololo-tabagisme.

Des recommandations adressées aux anatomopathologistes qui doivent :

- Prendre en charge les prélèvements biopsiques qu'ils reçoivent dans un délai ne dépassant pas les 48 heures.
- Employer du formol tamponné et contrôler son pH, surtout pour les prélèvements tissulaires susceptibles de faire l'objet d'études de biologie moléculaire.
- Archiver les blocs de paraffine dans des locaux non humides, et dont la température doit être contrôlée à moins de 20°C.
- Attirer l'attention du clinicien sur la possible association de la tumeur diagnostiquée avec le HPV si l'aspect histologique en est évocateur.
- Instaurer des réunions de concertations multidisciplinaires pour une meilleure communication et une prise en charge optimale des patients.

# Références

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
- [2] Gnepp DR. Diagnostic surgical pathology of the head and neck. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009.
- [3] World Health Organization. Pathology & Genetics: Head and neck tumours. 1st ed. Lyon: IARC Press; 2005.
- [4] Dufour X, Beby-Defaux A, Agius G, Lacau St Guily J. HPV and head and neck cancer. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head neck Dis*. 2012;129(1):26-31.
- [5] Hans S, Bouccara D, Brasnu D. Évolution des facteurs de risque des cancers des voies aérodigestives: analyse des données récentes de la littérature. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*. 2009;126(1):29-34.
- [6] Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983;12(6):418-24.
- [7] Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S59-66.
- [8] Muñoz N, Castellsagué X, De González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S1-10.
- [9] Gillison ML, Koch WM, Capone RB, 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):709-20.
- [10] Franceschi S, Muñoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5(7):567-75.

- [11] Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35.
- [12] Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):467-75.
- [13] Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007;121(8):1813-20.
- [14] Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010;2:15.
- [15] Ndiaye C, Mena M, Alemany L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):1319-31.
- [16] Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol*. 2006;24(17):2606-11.
- [17] Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006;24(5):736-47.
- [18] Schlecht NF. Prognostic value of human papillomavirus in the survival of head and neck cancer patients: an overview of the evidence. *Oncol Rep*. 2005;14(5):1239-47.
- [19] Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;125(1):1-9.
- [20] Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*. 2003;104(3):336-44.

- [21] Gillison ML. Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J Clin Oncol.* 2006;24(36):5623-5.
- [22] O'Rourke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2012;48(12):1191-201.
- [23] Bishop JA. Histopathology of human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma: a review of classic and variant forms. *Diagn Histopathol.* 2015;21(2):70-6.
- [24] Bishop JA, Sciubba JJ, Westra WH. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Surg Pathol Clin.* 2011;4(4):1127-51.
- [25] El-Mofty SK. Human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma variants. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(1):23-31.
- [26] Allen CT, Lewis JS, El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *Laryngoscope.* 2010;120(9):1756-72.
- [27] Lonardo F, Sakr W. Preneoplastic lesions of the upper aerodigestive tract. In: Ensley JF, Gutkind S, Jacobs JA, Lippman S. Head and neck cancer: Emerging perspectives. California: Academic Press; 2003. p. 35-53.
- [28] Beby-Defaux A, Dufourc X, Agiusa G. Infections à papillomavirus humains (HPV) des voies aéro-digestives supérieures (VADS). *Revue Francophone des Laboratoires.* 2011;434:65-75.
- [29] Netter FH. *Atlas of human anatomy.* 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
- [30] Seeley RR, Stephens TD, Tate P. *Anatomy and physiology.* 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2008.
- [31] Rouvière H, Delmas A. *Anatomie humaine descriptive topographique et fonctionnelle, tome 1: Tête et cou.* 15th ed. Paris: Masson; 2002.

- [32] Fakhry N, Rossi ME, Reyre A. Anatomie descriptive, radiologique et endoscopique du pharynx. Encycl Méd Chir (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-491-A-10, 2014, 13p.
- [33] Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. Immunol Today. 1998;19(9):414-21.
- [34] Lefebvre JL, Chevalier D. Cancer de l'hypopharynx. Encycl Méd Chir (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-605-A-30, 2004, 10p.
- [35] Marandas P, Julieron M, Sigal R, Wibault P. Cancers du sinus piriforme. Encycl Méd Chir (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-605-A-10, 1996, 9p.
- [36] Chevalier D, Dubrulle F, Vilette B. Anatomie descriptive, endoscopique et radiologique du larynx. Encyc Méd Chir (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-630-A-10, 2001, 13p.
- [37] Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. WHEATER'S functional histology: A text and colour atlas. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006.
- [38] Mills SE. Histology for pathologists. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
- [39] Zak FG, Lawson W. The presence of melanocytes in the nasal cavity. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1974;83(4):515-9.
- [40] Graeme-Cook F, Bhan AK, Harris NL. Immunohistochemical characterization of intraepithelial and subepithelial mononuclear cells of the upper airways. Am J Pathol. 1993;143(5):1416-22.
- [41] World Health Organization – International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Volume 90: Human papillomaviruses. Lyon, France: WHO Press; 2007.
- [42] Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. Proc Assoc Am Physicians. 1999;111(6):581-7.
- [43] Who should be vaccinated against human papillomavirus? Lancet Infect Dis. 2006;6(1):1.

- [44] Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol.* 2004;57(5):449-55.
- [45] De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
- [46] Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia – I. Classification, virology, pathology, and epidemiology. *J Clin Pathol.* 1994;47(12):1066-72.
- [47] Darnell GA, Antalis TM, Rose BR, Suhrbier A. Silencing of integrated human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cells expressing SerpinB2. *J Virol.* 2005;79(7):4246-56.
- [48] Hindmarsh PL, Laimins LA. Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virol J.* 2007;4:19.
- [49] Segondya M. Classification des papillomavirus (HPV). *Revue Francophone des Laboratoires.* 2008;405:23-5.
- [50] Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
- [51] McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck.* 1998;20(3):250-65.
- [52] Herdman MT, Pett MR, Roberts I, et al. Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis.* 2006;27(11):2341-53.
- [53] Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
- [54] Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):2006-11.
- [55] Hoffmann M, Lohrey C, Hunziker A, Kahn T, Schwarz E. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. *Oral Oncol.* 2004;40(5):520-4.

- [56] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-60.
- [57] Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4350-4.
- [58] Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*. 2009;34(1):113-23.
- [59] Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(10):1700-17.
- [60] Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75(3):495-505.
- [61] Chen R, Aaltonen LM, Vaheri A. Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Rev Med Virol*. 2005;15(6):351-63.
- [62] Fakhry C, Westra WH, Li S, 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):261-9.
- [63] D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(19):1944-56.
- [64] Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):362-72.
- [65] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(5):525-41.

- [66] Monographs.iarc.fr [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer (World health Organization). [updated 2015 Mar 23; cited 2015 May 20]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>
- [67] Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007;370(9590):890-907.
- [68] Hallmo P, Naess O. Laryngeal papillomatosis with human papillomavirus DNA contracted by a laser surgeon. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1991;248(7):425-7.
- [69] Kashima HK, Kessis T, Mounts P, Shah K. Polymerase chain reaction identification of human papillomavirus DNA in CO<sub>2</sub> laser plume from recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;104(2):191-5.
- [70] Abramson AL, DiLorenzo TP, Steinberg BM. Is papillomavirus detectable in the plume of laser-treated laryngeal papilloma? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990;116(5):604-7.
- [71] D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1263-9.
- [72] Dahlstrom KR, Li G, Tortolero-Luna G, Wei Q, Sturgis EM. Differences in history of sexual behavior between patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and patients with squamous cell carcinoma at other head and neck sites. *Head Neck.* 2011;33(6):847-55.
- [73] Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.* 2012;307(7):693-703.
- [74] Rintala M, Grénman S, Puranen M, Syrjänen S. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective Finnish HPV Family Study. *J Clin Virol.* 2006;35(1):89-94.
- [75] D'Souza G, Fakhry C, Sugar EA, et al. Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer.* 2007;121(1):143-50.

- [76] Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(9):836-40.
- [77] Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(1):172-82.
- [78] Beachler DC, D'Souza G, Sugar EA, Gillison ML. Differences in oral and anal HPV natural history among HIV-infected individuals; 28th International Papillomavirus Conference. Puerto Rico, 2012; p. 213.
- [79] Kashima HK, Shah F, Lyles A, et al. A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope.* 1992 Jan;102(1):9-13.
- [80] Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000318.
- [81] Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer.* 1997;75(10):1410-6.
- [82] Von Knebel Doeberitz M. New molecular tools for efficient screening of cervical cancer. *Dis Markers.* 2001;17(3):123-8.
- [83] Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer.* 2002;38(17):2229-42.
- [84] Pannone G, Rodolico V, Santoro A, et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer.* 2012;7:4.
- [85] Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78(21):11451-60.

- [86] Ollier L, Giordanengo V. Méthodes de détection et d'identification des HPV. Revue Francophone des Laboratoires. 2008;405:51-5.
- [87] Nindl I, Lotz B, Kühne-Heid R, Endisch U, Schneider A. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. J Clin Pathol. 1999;52(1):17-22.
- [88] Clavel C, Rihet S, Masure M, et al. DNA-EIA to detect high and low risk HPV genotypes in cervical lesions with E6/E7 primer mediated multiplex PCR. J Clin Pathol. 1998;51(1):38-43.
- [89] Coste-Burel M, Aubineau-Ferré V, Imbert-Marcille BM, Bompoil T, Besse B, Billaudel S. Typage des papillomavirus humains génitaux: détection du génome par amplification génique « consensus » et typage par hybridation en milieu liquide sur microplaques. Immunoanal Biol Spéc. 1995;10:307-11.
- [90] Pépin D, Le Bihan-Le Beyec J, Hugol D, et al. Stratégie de dépistage par PCR des infections à papillomavirus humains (HPV) sur les prélèvements cervico-vaginaux. Revue Française des Laboratoires. 1999;318:23-8.
- [91] Coutlée F, Rouleau D, Petignat P, et al. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMY primers and the Linear array HPV genotyping test. J Clin Microbiol. 2006;44(6):1998-2006.
- [92] Eklund C, Zhou T, Dillner J. Global Proficiency Study of Human Papillomavirus Genotyping. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4147-55.
- [93] Debaquea H, Eideb ML. Méthodes de détection des HPVs et techniques de génotypage dans le dépistage du cancer du col utérin. Ann Pathol. 2012;32(6):401-9.
- [94] Hantz S, Alain S, Denis F. Diagnostic des infections à papillomavirus: état des lieux et perspectives. Mt Pédiatrie. 2010;13(1):20-32.

- [95] Specht K, Richter T, Müller U, Walch A, Werner M, Höfler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. Am J Pathol. 2001;158(2):419-29.
- [96] Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, et al. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. J Mol Diagn. 2000;2(2):84-91.
- [97] Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJM, 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):2465-72.
- [98] Termine N, Panzarella V, Falaschini S, 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):1681-90.
- [99] Kay P, Meehan K, Williamson AL. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. J Virol Methods. 2002;105(1):159-70.
- [100] Jin L, Lloyd RV. In situ hybridization: methods and applications. J Clin Lab Anal. 1997;11(1):2-9.
- [101] Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. Int J Cancer. 2003;107(3):401-6.
- [102] Lizard G, Démaries-Poulet MJ, Roignot P, Gambert P. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint. Diagn Cytopathol. 2001;24(2):112-6.
- [103] Shi W, Kato H, Perez-Ordonez B, et al. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. J Clin Oncol. 2009;27(36):6213-21.

- [104] Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98(3):503-17.
- [105] Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol.* 2009;1:22.
- [106] Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene.* 2002;21(10):1510-7.
- [107] Snijders PJ, Van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol.* 2003;201(1):1-6.
- [108] Lindquist D, Romanian M, Hammarstedt L, 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):350-5.
- [109] Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 1998;152(1):145-56.
- [110] Sartor M, Steingrimsdottir H, Elamin F, et al. Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer.* 1999;80(1-2):79-86.
- [111] Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2007;120(8):1731-8.
- [112] Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol.* 2003;162(3):747-53.

- [113] Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, 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):394-400.
- [114] Kumar B, Cordell KG, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3128-37.
- [115] Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5630-6.
- [116] Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer*. 2008;122(12):2656-64.
- [117] Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus *in situ* hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*. 2010;116(9):2166-73.
- [118] Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, et al. p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology*. 2010;56(7):957-67.
- [119] Cantley RL, Gabrielli E, Montebelli F, Cimbaluk D, Gattuso P, Petruzzelli G. Ancillary Studies in Determining Human Papillomavirus Status of Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx: A Review. *Patholog Res Int*. 2011;2011:138469.
- [120] Lewis JS Jr, Thorstad WL, Chernock RD, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma:an entity with a favorable prognosis regardless of tumorHPV status. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1088-96.
- [121] Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*. 2011;64(4):308-12.

- [122] Albrecht V, Chevallier A, Magnone V, et al. Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA microarrays. *J Virol Methods*. 2006;137(2):236-44.
- [123] Hans S, Brasnu D. Cancers ORL: conduit à tenir et traitement. *Encycl Méd Chir* (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 6-0470, 2010, 8p.
- [124] Boussen H, Bouaouina N, Gamoudi A, Mokni N, Benna F, Boussen I, Ladgham A. cancers du nasopharynx. *Encycl Méd Chir* (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-590-A-10, 2007, 23p.
- [125] Lefebvre JL, Chevalier D. Cancers du larynx. *Encycl Méd Chir* (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-710-A-10, 2005, 17p.
- [126] Lefebvre JL, Chevalier D. Épidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures. *Encycl Méd Chir* (Elsevier Masson, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-947-A-10, 2012, 11p.
- [127] Aupérin A, Hill C. Épidémiologie des carcinomes des voies aérodigestives supérieures. *Cancer Radiother*. 2005;9(1):1-7.
- [128] Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chronic Dis*. 1972;25(12):711-6.
- [129] Licitra L, Zigon G, Gatta G, Sánchez MJ, Berrino F. Human papillomavirus in HNSCC: a European epidemiologic perspective. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008;22(6):1143-53.
- [130] Joseph AW, D'Souza G. Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2012;45(4):739-64.
- [131] Hocking JS, Stein A, Conway EL, et al. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer*. 2011;104(5):886-91.

- [132] Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):612-9.
- [133] Auluck A, Hislop G, Bajdik C, Poh C, Zhang L, Rosin M. Trends in oropharyngeal and oral cavity cancer incidence of human papillomavirus (HPV)-related and HPV-unrelated sites
- [134] Barry B, Ortholan C. Papillomavirus humain et cancer ORL. *Cancer Radiother*. 2014;18(5-6):430-3.
- [135] Settle K, Posner MR, Schumaker LM, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(9):776-81.
- [136] Na II, Kang HJ, Cho SY, et al. EGFR mutations and human papillomavirus in squamous cell carcinoma of tongue and tonsil. *Eur J Cancer*. 2007;43(3):520-6.
- [137] Shindoh M, Chiba I, Yasuda M, et al. Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Cancer*. 1995;76(9):1513-21.
- [138] Quintero K, Giraldo GA, Uribe ML, et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(3):375-81.
- [139] Smith EM, Rubenstein LM, Hoffman H, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infect Agent Cancer*. 2010;5:4.
- [140] Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, et al. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep*. 2007;17(4):931-9.
- [141] Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer*. 1999;85(9):1903-9.

- [142] Deng Z, Hasegawa M, Matayoshi S, et al. Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(11):1625-31.
- [143] Zaravinos A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget.* 2014;5(12):3956-69.
- [144] Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772-83.
- [145] Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 2004;108(5):766-72.
- [146] Miller CS, Zeuss MS, White DK. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;77(5):480-6.
- [147] Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004;189(4):686-98.
- [148] Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, Göran Hansson B, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(12):1327-36.
- [149] Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):166-81.
- [150] Beachler DC, D'Souza G. Nuances in the changing epidemiology of head and neck cancer. *Oncology (Williston Park).* 2010;24(10):924-6.

- [151] Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, et al. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol.* 2014;50(3):168-77
- [152] Koch WM. Clinical features of HPV-related head and neck squamous cell carcinoma: presentation and work-up. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012;45(4):779-93.
- [153] Goldenberg D, Begum S, Westra WH, et al. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. *Head Neck.* 2008;30(7):898-903.
- [154] Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPVstatus. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(7):1044-50.
- [155] Westra WH. Detection of human papillomavirus in clinical samples. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012;45(4):765-77.
- [156] Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS Jr. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol.* 2009;3(3):186-94.
- [157] El-Mofty SK, Patil S. Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization of a distinct phenotype. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):339-45.
- [158] Van Houten VM, Snijders PJ, Van Den Brekel MW, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 200115;93(2):232-5.
- [159] Chernock RD, Lewis JS Jr, Zhang Q, El-Mofty SK. Human papillomavirus-positive basaloid squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a distinct clinicopathologic and molecular subtype of basaloid squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41(7):1016-23.
- [160] Thariat J, Badoual C, Faure C, Butori C, Marcy PY, Righini CA. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: role of HPV and implication in treatment and prognosis. *J Clin Pathol.* 2010;63(10):857-66.

- [161] Snijders PJ, Scholes AG, Hart CA, et al. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer*. 1996;66(4):464-9.
- [162] Heath S, Willis V, Allan K, et al. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24(1):e18-23.
- [163] Ndiaye C, Alemany L, Diop Y, et al. The role of human papillomavirus in head and neck cancer in Senegal. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):14.
- [164] Wang XI, Thomas J, Zhang S. Changing trends in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2012;16(1):7-12.
- [165] Salazar CR, Smith RV, Garg MK, et al. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma survival: a comparison by tumor site and initial treatment. *Head Neck Pathol*. 2014;8(1):77-87.
- [166] Anderson CE, McLaren KM, Rae F, Sanderson RJ, Cuschieri KS. Human papilloma virus in squamous carcinoma of the head and neck: a study of cases in south east Scotland. *J Clin Pathol*. 2007;60(4):439–41.
- [167] Thibaudeau E, Fortin B, Coutlée F, et al. HPV Prevalence and Prognostic Value in a Prospective Cohort of 255 Patients with Locally Advanced HNSCC: A Single-Centre Experience. *Int J Otolaryngol*. 2013;2013:437815.
- [168] Gudleviciene Z, Smilyte G, Mickunas A, Pikelis A. Prevalence of human papillomavirus and other risk factors in Lithuanian patients with head and neck cancer. *Oncology*. 2009;76(3):205-8.
- [169] World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2013. Country profile Senegal. [cited 2015 May 07]. Available from: [http://www.who.int/tobacco/surveillance/policy/country\\_profile/sen.pdf](http://www.who.int/tobacco/surveillance/policy/country_profile/sen.pdf)
- [170] Farshadpour F, Konings S, Speel EJM, et al. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Case-Control Study regarding Tobacco and Alcohol Consumption. *Patholog Res Int*. 2011; 2011:806345.

- [171] Gillison ML, D'Souza G, Westra W, 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):407-20
- [172] Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(21):1626-36.
- [173] Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, Ricks S, Porter PL, Chen C. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(11):1137-44.
- [174] Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(23):1801-10.
- [175] Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control.* 2010;21(9):1369-78.
- [176] Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:S34-54.
- [177] Glombitza F, Guntinas-Lichius O, Petersen I. HPV status in head and neck tumors. *Pathol Res Pract.* 2010;206(4):229-34.
- [178] Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res.* 1996;2(4):755-62.
- [179] Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol.* 2010;17(6):394-403.
- [180] Cai C, Chernock RD, Pittman ME, El-Mofty SK, Thorstad WL, Lewis JS Jr. Keratinizing-type squamous cell carcinoma of the oropharynx: p16 overexpression is associated with positive high-risk HPV status and improved survival. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(6):809-15.

- [181] Lewis JS Jr, Ukpo OC, Ma XJ, et al. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas--a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology*. 2012;60(6):982-91.
- [182] El-Mofty SK, Zhang MQ, Davila RM. Histologic Identification of Human Papillomavirus (HPV)-Related Squamous Cell Carcinoma in Cervical Lymph Nodes: A Reliable Predictor of the Site of an Occult Head and Neck Primary Carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2008;2(3):163-8.
- [183] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002;161(6):1961-71.
- [184] Alvarez-Aldana A, Martínez JW, Sepúlveda-Arias JC. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. *Pathol Res Pract*. 2015;211(2):150-5.
- [185] Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev*. 2003;27(5):397-404.
- [186] Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp*. 2011;49:1-3.
- [187] Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, et al. Rôle du laboratoire d'anatomie pathologique dans l'approche pré-analytique des examens de biologie moléculaire réalisés en pathologie tumorale. *Ann Pathol*. 2010;30(2):85-93.
- [188] Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(12):1929-35.
- [189] Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM, Gutman P. Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagn Mol Pathol*. 1994;3(3):148-55.

- [190] Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(3):327-34.
- [191] Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One*. 2007;2(6):e537.
- [192] Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl*. 1991;1(1):46-50.
- [193] Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yildirim S, Baloglu H. The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(5):485-92.
- [194] Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Pathol*. 2003;56(3):184-6.
- [195] Funabashi KS, Barcelos D, Visoná I, et al. DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: the effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Pathol Res Pract*. 2012;208(10):584-91.
- [196] Turashvili G, Yang W, McKinney S, et al. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(1):33-43.
- [197] Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular diagnostics for the clinical laboratorian. 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2006.
- [198] Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 2014;70(1):12-9.
- [199] Williams C, Pontén F, Moberg C, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol*. 1999;155(5):1467-71.

- [200] Zsikla V, Baumann M, Cathomas G. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):654-6.
- [201] Brutlag D, Schlehuber C, Bonner J. Properties of formaldehyde-treated nucleohistone. *Biochemistry*. 1969;8(8):3214-8.
- [202] Douglas MP, Rogers SO. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res*. 1998;401(1-2):77-88.
- [203] Yagi N, Satonaka K, Horio M, Shimogaki H, Tokuda Y, Maeda S. The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. *Biotech Histochem*. 1996;71(3):123-9.
- [204] Noguchi M, Furuya S, Takeuchi T, Hirohashi S. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int*. 1997;47(10):685-91.
- [205] Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, et al. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol*. 1990;43(9):748-51.
- [206] Casale V, Oneda R, Lavezzi AM, Matturri L. Optimisation of postmortem tissue preservation and alternative protocol for serotonin transporter gene polymorphisms amplification in SIDS and SIUD cases. *Exp Mol Pathol*. 2010;88(1):202-5.
- [207] Bramwell NH, Burns BF. The effects of fixative type and fixation time on the quantity and quality of extractable DNA for hybridization studies on lymphoid tissue. *Exp Hematol*. 1988;16(8):730-2.
- [208] Cronin M, Pho M, Dutta D, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol*. 2004;164(1):35-42.
- [209] Santos MC, Saito CP, Line SR. Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. *Pathol Res Pract*. 2008;204(9):633-6.

[210] Office of Biorepositories and Biospecimen Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. NCI Best Practices for Biospecimen Resources [Internet]. [cited 2015 May 07]. Available from: <http://biospecimens.cancer.gov/bestpractices/2011-NCIBestPractices.pdf>.

# Annexes

## Annexe n°1 :

## Fiche d'enquête standardisée

## *Identification du patient*



## *Données épidémio-cliniques*

- Âge :
  - Sexe :
  - \* Tabac :  Oui :  Type :  Quantité :  
 Non
  - Facteurs de risque : 
    - \* Alcool :  Oui :  Type :  Quantité :  
 Non
    - \* Notion de sexe oral :  Oui  Non
  - Siège exact de la tumeur :

## ***Données Anatomo-pathologiques***

- Nature du prélèvement reçu :  Biopsie : Nombre de fragments :  
 Pièce opératoire : Description de la pièce :
  - Eléments du compte rendu histopathologique :
    - Type histologique du carcinome épidermoïde :  Conventionnel  
 Autre variante (préciser) :
    - Différenciation (si forme conventionnelle) :  Indifférencié  
 Peu différencié  
 Moyennement différencié  
 Bien différencié
    - Kéatinisation :  Absente  
 Discrète ou focale  
 Moyennement kératinisant  
 Franchement kératinisant

**Annexe n°1 (suite) : Fiche d'enquête standardisée**

**Recherche de HPV dans le tissu tumoral**

- PCR :
  - Contributive       HPV présent      Type du HPV :
  - Non concluante       HPV absent

## Résumé

**Introduction :** Les carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV constituent une entité clinique à part entière de mieux en mieux individualisée au cours de la dernière décennie. Peu d'études africaines se sont intéressées à ce sujet. Les données épidémiologiques et anatomo-pathologiques de cette entité chez la race noire demeurent donc assez rares.

**But :** le but de notre travail était de décrire le profil épidémiologique et les caractéristiques anatomo-pathologiques des carcinomes des VADS associés aux HPV à Dakar. Aussi, nous avons tenté d'évaluer la technique PCR pour la recherche des HPV dans les blocs de paraffine de nos patients.

**Méthodes :** Une étude rétrospective, descriptive et analytique a été menée auprès de 90 patients atteints d'un carcinome épidermoïde invasif des VADS. Le diagnostic pathologique de ces tumeurs était confirmé dans le service d'ACP de l'HALD durant la période allant du 1<sup>er</sup> janvier 2008 au 30 Juin 2009. La recherche des HPV par PCR a été faite à l'Institut Curie de Paris.

**Résultats :** Sur les 90 patients inclus dans notre étude, la recherche de HPV par PCR n'a été contributive que pour 54 patients (60%). Sur ces 54 patients, 7 avaient un carcinome épidermoïde associé aux HPV, soit une prévalence de 12,96%. L'âge moyen de ces 7 patients était de 47,43 ans, et le sexe ratio était de 2,5. Quand elles étaient notées, les habitudes alcoololo-tabagiques étaient rapportées chez 50% de ces patients. La notion de sexe oral n'a jamais été recherchée. La localisation préférentielle de ces carcinomes HPV (+) était hypopharyngée (71,43%). Le HPV 16 était le génotype le plus retrouvé (71,43%), et était toujours localisé au niveau de l'hypopharynx. Les 7 cas de carcinomes épidermoïdes associés aux HPV étaient tous de forme conventionnelle. Ils étaient bien différenciés dans 85,71% des cas, et franchement ou moyennement kératinisants dans 71,43% des cas. Aucune variante " basaloïd-like " n'a été diagnostiquée.

**Conclusion :** La prévalence des carcinomes épidermoïdes des VADS associés aux HPV qu'on a trouvée était concordante avec celle observée chez la race noire. La longue durée de fixation des biopsies et la qualité non contrôlée du formol utilisé, semblent avoir été les 2 principaux facteurs ayant affecté la rentabilité de la PCR pour la recherche des HPV.

**Mots clés :** Carcinome épidermoïde ; Voies aéro-digestives supérieures ; HPV ; PCR

