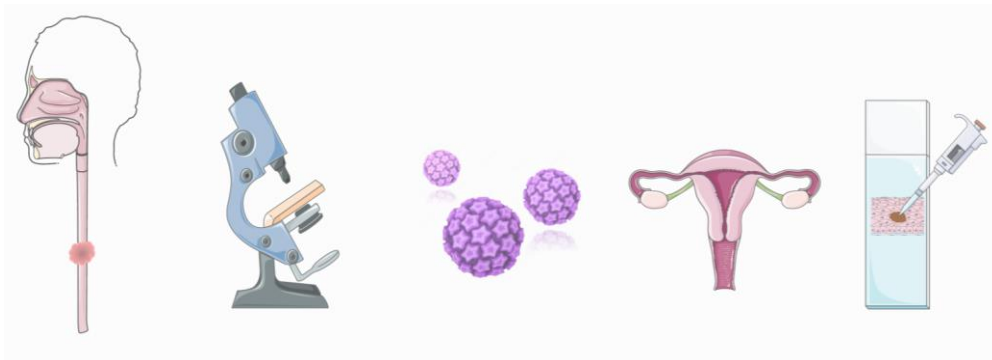


Université de Liège
Laboratoire de Pathologie Expérimentale
GIGA-Cancer

Implication des infections à papillomavirus humains dans la carcinogénèse œsophagienne et endocervicale

Célia Reynders



Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Doctorat en Sciences biomédicales et pharmaceutiques

Promoteurs : Dr. Pascale Hubert et Dr. Michaël Herfs

Année académique **2023-2024**

MEMBRES DU JURY ET PROMOTEURS

Membres du comité de thèse

Dr. Christine GILLES (Présidente, ULiège)

Dr. Chantal HUMBLET (Secrétaire, ULiège)

Dr. Joan SOMJA (ULiège, CHU de Liège)

Evaluateurs externes

Pr. Nicolas GILLET (UNamur)

Dr. Thibault KERVARREC (Université de Tours)

Promoteurs

Dr. Michaël HERFS (ULiège)

Dr. Pascale HUBERT (ULiège)

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

Résumé	11
Abstract	12
Introduction	13
1. Le papillomavirus humain (HPV)	14
1.1 Généralités.....	14
1.2 Classification des HPVs	14
1.3 Structure d'HPV	15
1.3.1 Région non codante	16
1.3.2 Protéines de capsid	17
1.3.2.1 L1.....	17
1.3.2.2 L2.....	17
1.3.3 Protéines de réplication et d'amplification	17
1.3.3.1 E1.....	17
1.3.3.2 E2.....	18
1.3.4 Protéines de fusion	18
1.3.4.1 E4.....	18
1.3.4.2 E8.....	19
1.3.5 Oncoprotéines.....	19
1.3.5.1 E5.....	19
1.3.5.2 E6.....	21
1.3.5.3 E7.....	23
1.4 Cycle viral.....	25
1.4.1 Entrée du virus	26
1.4.2 Phases de réplication et d'amplification du virus.....	27
1.4.2.1 Phase d'amplification initiale.....	28
1.4.2.2 Phase de maintenance.....	28
1.4.2.3 Phase d'amplification finale.....	28
1.4.3 Formation et relargage du virus	29
1.4.4 Intégration du virus.....	29
2. HPV et cancers.....	30
2.1 Généralités.....	30
2.1.1 De l'infection par HPV au cancer	30

2.1.2	Facteurs de risques associés à HPV	30
2.1.3	Épidémiologie	31
2.2	Cancers du col de l'utérus	32
2.2.1	Le carcinome épidermoïde	34
2.2.1.1	Lésions précancéreuses	34
2.2.1.2	Classification des carcinomes épidermoïdes	36
2.2.2	L'adénocarcinome.....	37
2.2.2.1	Lésions précancéreuses	37
2.2.2.2	Sous-types d'adénocarcinome.....	38
2.2.2.3	Classification des adénocarcinomes et implication d'HPV	40
2.2.3	Dépistage et traitement des cancers du col utérin	41
2.3	Autres cancers HPV induits.....	42
2.3.1	Cancers du canal anal	42
2.3.2	Cancers du pénis	43
2.3.3	Cancers de la vulve et du vagin.....	43
2.3.3.1	Cancers du vagin	43
2.3.3.2	Cancers de la vulve.....	43
2.3.4	Cancers de la tête et du cou	44
2.4	Vaccins HPV et prévention	45
3.	L'œsophage et sa cancérisation	47
3.1	Anatomie et histologie	47
3.2	Cancers de l'œsophage.....	47
3.2.1	Épidémiologie	47
3.2.2	Le carcinome épidermoïde de l'œsophage	49
3.2.2.1	Facteurs de risque.....	49
3.2.2.2	Lésions précancéreuses et carcinogenèse.....	49
3.2.2.3	Sous-types et différenciations des carcinomes épidermoïdes.....	50
3.2.3	L'adénocarcinome de l'œsophage.....	51
3.2.3.1	Facteurs de risque.....	51
3.2.3.2	Œsophage de Barrett	51
3.2.3.3	Lésions précancéreuses et carcinogenèse.....	54
3.2.3.4	Sous-types et différenciations des adénocarcinomes	55
3.2.4	Diagnostic et évaluation du stade tumoral des cancers de l'œsophage.....	55
3.2.5	Traitement des cancers de l'œsophage.....	57

3.3	HPV et cancers de l'œsophage	58
	But du projet.....	60
	Matériel et méthodes.....	62
1.	Récolte des échantillons et données cliniques	63
2.	Détermination du statut HPV	63
2.1	Génotypage	63
2.1.1	Extraction ADN	63
2.1.2	Luminex HPV Assay, Real Time High Risk HPV Assay (Abbott) et Cobas 6800 HPV Assay (Roche)	64
2.2	Hybridation <i>in situ</i>	65
2.3	RT-qPCR	65
2.3.1	Extraction d'ARN	65
2.3.2	Synthèse d'ADN complémentaire.....	65
2.3.3	Quantitative PCR.....	65
2.4	RNAscope.....	66
2.4.1	Le prétraitement	66
2.4.2	Le traitement	67
3.	Comparaison des catégories	67
3.1	Immunohistochimie.....	67
3.2	Attribution de score.....	68
3.2.1	Visuellement	68
3.2.2	QuPath-0.3.0.....	69
4.	Analyse des données clinico-pathologiques	70
5.	Analyses statistiques	70
	Résultats.....	71
	Partie 1: Implication des infections par HPV de haut risque dans la carcinogenèse œsophagienne.....	72
1.	Caractérisation clinico-pathologique des carcinomes épidermoïdes œsophagiens et analyse de la potentielle implication d'HPV dans ces cancers	72
1.1	Description de la population étudiée	72
1.1.1	Caractéristiques cliniques et démographiques.....	72
1.1.2	Caractérisation clinico-pathologique.....	73
1.1.2.1	Statut HPV des carcinomes épidermoïdes.....	76
1.2	Comparaison des caractéristiques clinico-pathologiques des patients en fonction de leur statut HPV	77

1.3	Analyse des facteurs pronostiques associés à la survie des patients	79
1.3.1	Facteurs de risque prédictifs de la récurrence/ progression de la maladie	80
1.3.2	Facteurs pronostiques de la survie globale des patients.....	83
2.	Caractérisation clinico-pathologique des adénocarcinomes œsophagiens et analyse de la potentielle implication d'HPV dans ces cancers	86
2.1	Description de la population étudiée	86
2.1.1	Caractéristiques cliniques et démographiques.....	86
2.1.2	Caractérisation clinico-pathologique	87
2.1.2.1	Statut HPV des adénocarcinomes.....	90
2.2	Comparaison des caractéristiques clinico-pathologiques des patients en fonction de leur statut HPV	91
2.3	Analyse des facteurs pronostiques associés à la survie des patients	93
2.3.1	Facteurs de risque prédictifs de la récurrence/ progression de la maladie	94
2.3.2	Facteurs pronostiques de la survie globale des patients.....	97
Partie 2 : Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma (usual type and variants) : a systematic review and meta-analysis.....		100
Discussion et conclusion.....		123
Partie 1 : Caractérisation clinico-pathologique des carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes œsophagiens et analyse de la potentielle implication d'HPV dans ces cancers.....		124
Partie 2 : Revue systématique et méta-analyse : prévalence et distribution des génotypes d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin		130
Bibliographie.....		133
Annexes.....		167

TABLE DES ABRÉVIATIONS

5-FU : 5-Fluorouracil
ACG : American College of Gastroenterology
ADC : Adénocarcinome
ADN : Acide désoxyribonucléique
AE : Site précoce
AEC : Atypical endocervical cell
AIS : Adénocarcinome *in situ*
AJCC/UICC : American Joint Committee on Cancer/ Union for International Cancer Control
AKT/PKB : Protein kinase B
AL : Site tardif
APC : Antigen-presenting cell
APOBEC : Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide- like
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASC-H : Atypical squamous cell – cannot rule out HSIL
ASCUS : Atypical squamous cell of undetermined significance
ASR : Age-standardized rate
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3 related
Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax : Bcl-2–associated X
BE : Œsophage de Barrett
BFB : Breakage-fusion-bridge
BMP : Bone morphogenetic protein
BPV : Bovine papillomavirus
Brd4 : Bromodomain-containing protein 4
BSG : British Society of Gastroenterology
CD : Conserved domain
CDK : Cyclin-dependent kinase
CDKN2A : Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
Cdx : Caudal-related homeobox
cGAS-STING : Cyclic GMP–AMP synthase (cGAS)–stimulator of interferon genes (STING)
CHD6 : Chromodomain helicase DNA binding domain 6
CIN : Cervical intraepithelial neoplasia
CMH : Complexe majeur d’histocompatibilité
COPI : Coat protein complex I
CT : Computerized tomography scan
DBD : DNA binding domain
DDR : DNA damage response
DED : Death effector domain
DES : Diéthylstilbestrol
DNMT1 : DNA methyltransferase 1
E6AP : E6-associated protein
EAC : Adénocarcinome de l’œsophage
EDTA : Ethylene diamine tetra acetic acid
EGFR : Epidermal growth factor receptor

ErbB4 : Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4
ESCC : Carcinome épidermoïde de l'œsophage
ESGE : European Society of Gastrointestinal Endoscopy
ESMO : European society for medical oncology
EUS : Endoscopic ultrasound
FADD : Fas-associated death domain
FDA : Food and Drug Administration
FDG-PET : Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography
FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FLOT : 5-FU-Leucovorine-Oxaliplatine-Docetaxel
FOLFOX : Acid-5FU-Oxaliplatine
GERD : Gastroesophageal reflux disease
Globocan : Global Cancer Observatory
GPCA : Gaussia Princeps Luciferase Complementation Assay
HIS : Hybridation *in situ*
HKme : Histone lysine methylation
HLA : Human Leukocyte Antigen
HPV : Human papillomavirus
HR-HPV : High risk human papillomavirus
HRP : Horse radish peroxidase
HSIL : High-grade squamous intraepithelial lesion
HSPG : Heparan sulfate proteoglycan
HSV : Herpes Simplex Virus
hTERT : Human telomerase reverse transcriptase
IARC : International Agency for Cancer Research
IECC : International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification
IFN : Interferon
IL : Interleukin
IRF3 Interferon regulatory factor 3
ISG : IFN-stimulated genes
JAK : Janus kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
Kb : Kilobase
kDa : Kilodalton
KDM5C : Lysine Demethylase 5C
KLK8 : Kallikrein-8
LCR : Long control region
LEGH : Lobular endocervical glandular hyperplasia
LR-HPV : Low risk papillomavirus
LSIL : Low-grade squamous intraepithelial lesion
miRNA : Micro-ARN
MMC : Mitomycin C
mTOR : Mammalian target of rapamycin
MUC : Mucine
ND10 : Nuclear domain 10
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
NHERF1 : NA+/H+ Exchanger Regulatory Factor
NLR : NOD-like receptor
NOS : Not otherwise specified
ORF : Open reading frame

Ori : Origin of replication
ORL : Oto-rhino-laryngologie
OS : Overall survival
PBM : PDZ binding motif
PBS : Phosphate buffer saline
PCR : Polymerase chain reaction
PD-1 : Programmed cell death 1
PDZ : Domain PSD-95/Dlg/ZO-1 domain
PET scan : Positron emission tomography scan
PFS : Progression-free survival
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
pRb : Retinoblastoma protein
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
PTPN14 : Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 14
ROS : Reactive oxygen species
RPA : Replication protein A
RT : Radiotherapy
RT-qPCR: Reverse transcription – quantitative PCR
SCC : Squamous cell carcinoma
SMILE : Stratified mucin-producing intraepithelial lesion
SOX : SRY-box transcription factor
Sp1 : Specificity protein 1
STAT : Signal transducer and activator of transcription
TGF : Tumor growth factor
TNF : Tumor necrosis factor
TopBP1 : Topoisomerase II-binding protein 1
TP63 : Tumor protein p63
UBR : Ribosome Biogenesis Homolog
URR : Upstream regulatory region
VLP : Virus like particle
WHO/OMS : World Health Organization/ Organisation Mondiale de la Santé

RÉSUMÉ

Résumé

Les papillomavirus humains (HPVs) sont des virus à ADN double brin non enveloppés. Le groupe d'HPVs le plus largement étudié est le groupe des α -HPVs. Séparés des α -HPVs de bas risque par leur pouvoir oncogène, les α -HPVs de haut risque sont connus depuis longtemps comme agents étiologiques de certains cancers diagnostiqués dans le tractus ano-génital et la sphère oropharyngée. Alors que le lien « HPV-cancer » est bien établi dans le col de l'utérus (>90%), la vulve (\approx 40%), le vagin (\approx 70%), le pénis (\approx 50%), l'anus (\approx 85%) et les voies aérodigestives supérieures (\approx 30%), l'implication des infections à HPV dans la cancérisation œsophagienne (tant épidermoïdes que glandulaires) reste très controversée. Ce constat est également vrai pour les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin. L'objectif de cette thèse est double : d'une part, caractériser histopathologiquement les cancers œsophagiens (épidermoïde et glandulaire) et mieux comprendre le potentiel rôle des α -HPVs dans la cancérisation de ces derniers ; d'autre part, réaliser une revue systématique et méta-analyse afin d'obtenir une vue d'ensemble de la potentielle implication d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin.

Dans la première partie de cette étude, en collaboration avec des biobanques belges et européennes, une cohorte de 230 patients atteints d'un carcinome épidermoïde et 119 patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage a été collectée. Le statut HPV de chaque échantillon a été analysé par génotypage et confirmé en Hybridation *in situ*. L'activité transcriptionnelle du virus a également été vérifiée *via* RT-qPCR et RNAscope. Cette procédure a permis de classer les échantillons en 3 catégories : HPV négatif, HPV ADN+/ARN- et HPV ADN+/ARN+. Ces trois sous-groupes ont ensuite été comparés selon différents critères : le degré de différenciation des tumeurs, le statut p53, l'index de prolifération (Ki67), la positivité pour p16^{ink4a} ainsi que la densité en cellules immunitaires CD8⁺ et PD1⁺. Les données cliniques des patients ont également été récoltées et une analyse de la survie de ces patients a été réalisée. Malgré un taux de 26% d'infection par HPV (ADN+/ARN+) retrouvé dans la cohorte d'adénocarcinomes (31/119, 26%), HPV ne semble pas être impliqué dans la carcinogenèse de ces derniers au vu du faible pourcentage de cellules infectées par le virus (observé *via* la technique de RNAscope) et la survie des patients inchangée avec le statut HPV positif. Au contraire, l'étude sur les carcinomes épidermoïdes montre une implication du virus HPV dans 14% des tumeurs (32/230, 14%) et cette catégorie (HPV ADN+/ARN+) présente des caractéristiques similaires aux tumeurs HPV+ de la sphère oropharyngée prouvant l'implication de ce virus dans la carcinogenèse de ces derniers : 100% des cellules tumorales infectées par HPV (RNAscope), validation par le biomarqueur indirect d'HPV (p16^{ink4a}) dans plus de 90% des cas et survie des patients sans récurrence de la maladie significativement améliorée lors d'une infection par HPV ($p=0.0365$).

La seconde partie de ce projet s'est focalisée sur la prévalence et la distribution des génotypes d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin. Pour pallier le manque de compréhension globale de l'implication d'HPV dans ce groupe hétérogène de tumeurs, une revue systématique et méta-analyse a été réalisée. 379 études comprenant 17 129 cas d'adénocarcinome cervical ont permis de mettre en évidence une prévalence globale d'HPV de 78.4% dans ces tumeurs avec une hétérogénéité significative entre les régions géographiques (ex : 72.5% en Asie *versus* 86.8% en Océanie) et les sous-types histologiques de cancers étudiés (ex : 9.8% dans les sous-types gastriques *versus* 85% dans les « classiques »). Cette analyse met en évidence l'implication d'HPV dans l'ensemble des sous-types d'adénocarcinome mais à un degré variable. La réalisation d'un système de classification de ces tumeurs, basé sur des aspects morphologiques et viraux précis, pourrait être une évolution intéressante à la classification actuellement peu précise (OMS 2020).

Abstract

Human Papillomaviruses (HPVs) are non-enveloped double-stranded DNA viruses. The most extensively studied group of HPVs is the α -HPV group. Distinguished from low-risk α -HPVs by their oncogenic potential, high-risk α -HPVs are well-known for being the etiological agents of certain cancers diagnosed in the anogenital tract and oropharyngeal region. While the link between HPV and cancer is established in the cervix (>90%), vulva (\approx 40%), vagina (\approx 70%), penis (\approx 50%), anus (\approx 85%), and upper aerodigestive tract (\approx 30%), the involvement of HPV infections in esophageal carcinogenesis (both squamous and glandular) remains highly controversial. This observation is also true for the different subtypes of cervical adenocarcinoma. The objectives of this thesis are : 1) to histopathologically characterize esophageal cancers (squamous and glandular) and gain a better understanding of the potential involvement of α -HPVs in their initiation/progression ; 2) to conduct a systematic review and meta-analysis in order to comprehensively assess HPV positivity in various subtypes of cervical adenocarcinoma.

In the first part of this study, in collaboration with Belgian and European biobanks, a cohort of 230 patients with squamous carcinoma and 119 patients diagnosed with esophageal adenocarcinoma was collected. The HPV status of each sample was analyzed through genotyping and confirmed using *In Situ* Hybridization. Viral transcriptional activity was also verified using both RT-qPCR and RNAscope. This process allowed us to classify the samples into three categories: HPV-negative, HPV DNA+/RNA-, and HPV DNA+/RNA+. These three subgroups were then compared based on various criteria: tumor differentiation, p53 status, proliferation index (Ki67), positivity for p16^{ink4a}, as well as the density of CD8+ and PD1+ cells. Clinical data was also collected and patient survival analyses were conducted. Despite a 26% HPV infection rate (DNA+/RNA+) found in the adenocarcinoma cohort (31/119, 26%), HPV does not appear to be implicated in their carcinogenesis given the low percentage of virus-infected cells (as seen in RNAscope) and the unchanged patient survival with a positive HPV status. Conversely, the study focusing on squamous carcinomas shows HPV involvement in 14% of tumors (32/230, 14%), and this HPV DNA+/RNA+ category presents close characteristics with HPV+ tumors located in the oropharyngeal region. Furthermore, several features support the causal role of HPV in this subset of tumor: 100% of tumor cells are infected (RNAscope), validation of these latter results using the indirect HPV biomarker (p16^{ink4a}), and the significantly improvement of patient disease-free survival in case of HPV positivity (p=0.0365).

The second part of this project focused on the prevalence and distribution of HPV genotypes in different subtypes of cervical adenocarcinoma. To address the lack of a comprehensive understanding of HPV involvement in this heterogeneous tumor group, a systematic review and meta-analysis was conducted. A total of 379 studies comprising 17 129 cases of cervical adenocarcinoma were collected. An HPV prevalence of 78.4% in these tumors was highlighted, with significant heterogeneity between geographical regions (72.5% in Asia *versus* 86.8% in Oceania) and studied histological subtypes of cancer (9.8% in the gastric subtype *versus* 85% in the classic/usual subtype). This analysis demonstrates the presence of HPV across all subtypes of adenocarcinoma but to a varying degree. Developing a classification system for these tumors based on precise morphological and viral features could be an interesting evolution of the current "mutually exclusive" WHO 2020 classification.

INTRODUCTION

1. Le papillomavirus humain (HPV)

1.1 Généralités

Les papillomavirus humains (HPVs) sont des petits virus à ADN double brin circulaire d'une longueur d'environ 8 kb. Ces virus sont non enveloppés mais possèdent une capside icosaédrique composée de 72 pentamères (H. P. Nguyen, Ramirez-Fort, and Rady 2014).

Dans un premier temps, les papillomavirus humains (HPVs) ont été regroupés avec les polyomavirus dans la famille des *Papovaviridae*. La découverte des mécanismes de transcription distincts entre les deux groupes de virus a permis de les séparer en deux familles. Les HPVs font maintenant partie de la famille des *Papillomaviridae* (Bernard et al. 2010).

1.2 Classification des HPVs

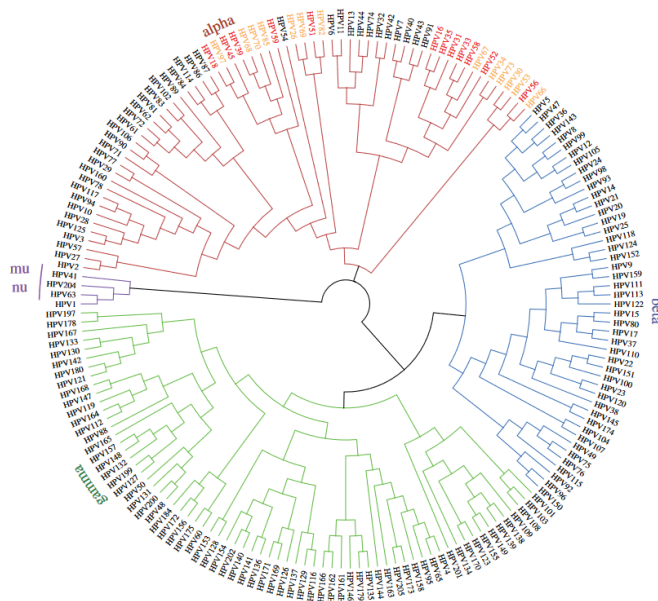


Figure 1 : Arbre phylogénétique des différents HPVs. La classification est basée sur la séquence nucléotidique de L1. Les α -HPVs sont représentés en rouge, les Beta en bleu, les Gamma en vert et les Mu et Nu en mauve (McBride 2017b).

La classification des HPVs est basée sur la séquence de leur génome et permet de catégoriser les HPVs en fonction de leur genre, espèce, type, variant et sous variant. L'attribution du type est réalisée sur base d'une différence de plus de 10% dans la séquence du gène L1. Tandis qu'une différence entre 2 à 10% dans cette séquence définira un sous-type d'HPV (de Villiers et al. 2004). La classification des variants est réalisée en comparant les séquences des paires nucléotidiques (génome entier) d'un même type d'HPV. Par exemple, le génotype HPV16 peut être séparé en quatre variants (A, B, C et D) eux-mêmes divisés en sous-variants (A1-4, B1-4, C1-4 et D1-4) (Z. Chen et al. 2018; Clifford et al. 2019).

Plus de 400 types d'HPVs ont été identifiés à ce jour et ces HPVs sont assignés à cinq genres différents : les Alpha, Beta, Gamma, Mu et Nu- papillomavirus (Source : Papillomavirus Epistème) (Figure 1). Ces cinq genres peuvent être classés en fonction de leur tropisme et des maladies associées. En effet, les Beta, Gamma, Mu et Nu-HPVs ont un tropisme plutôt cutané tandis que les α -HPVs ont un tropisme à la fois cutané et muqueux (Doorbar et al. 2012). Les catégories contenant le plus grand nombre d'HPV sont les Beta et Gamma-HPV. Considérés

comme « inoffensifs », il s'avère que chez certains patients immunodéprimés, ces HPV peuvent intervenir dans l'initiation des lésions précancéreuses de la peau UV-dépendantes (Lambert et al. 2020).

Les α -HPVs restent, à ce jour, les plus largement étudiés. Les HPV au tropisme muqueux sont séparés en deux types : les HPV dits de bas risque (LR-HPVs) ou non oncogéniques tels que HPV6 et HPV11 et les HPV dits de haut risque (HR-HPVs) ou oncogéniques comme HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 et 59. Les LR-HPVs sont associés à des lésions bénignes (tels que des verrues génitales) tandis que les HR-HPVs peuvent induire des lésions pouvant progresser vers un cancer invasif (Chow, Broker, and Steinberg 2010). Quelques différences majeures (entre les HR et LR-HPVs) existent au niveau de la fonction des protéines E6 et E7. En effet, dans les HR-HPVs, ces protéines mènent à une dégradation de leur cible tandis que chez les LR-HPVs, elles ne jouent qu'un rôle de « séquestration ». Les HR-HPVs induisent la transformation et l'immortalisation des cellules, ce qui n'est pas le cas pour les LR-HPVs (Doorbar et al. 2012).

Au cours de cette thèse, nous allons nous focaliser sur les α -HPVs de haut risque.

1.3 Structure d'HPV

Le génome d'HPV comprend trois régions fonctionnelles. Une région dite précoce codant pour 6 protéines impliquées notamment dans la transcription et la réplication du virus, une région tardive codant pour les protéines de la capside (L1 et L2) ainsi qu'une région intermédiaire comprenant l'origine de réplication ainsi que les sites de liaison des facteurs de transcription. Ces trois régions sont séparées par des sites de polyadénylation, le site précoce (A_E) et le site tardif (A_L) (Van Doorslaer et al. 2018) (Figure 2).

Le génome d'HPV contient deux promoteurs majeurs responsables de l'expression des gènes précoces (p97 pour HPV16 et p105 pour HPV18) et des gènes tardifs (p670 pour HPV16 et p811 pour HPV18) (Scarth et al. 2021).

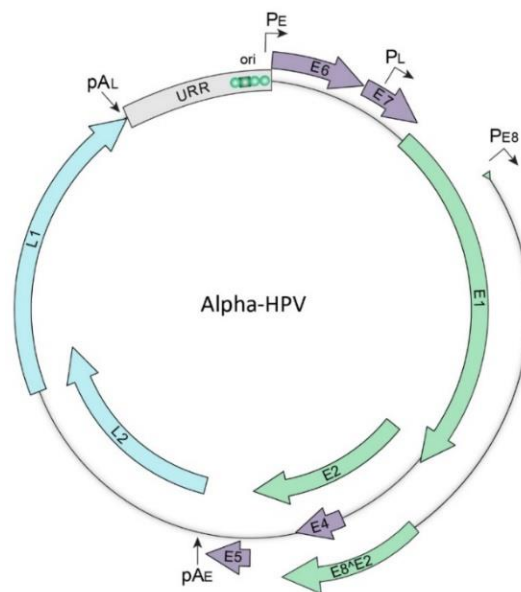


Figure 2 : Représentation de la structure du génome des α -HPVs. Les gènes précoces sont représentés en mauve et vert. Les gènes tardifs en bleu et la partie non codante en gris (Della Fera et al. 2021).

La transcription des gènes viraux est unidirectionnelle et est produite à partir d'un seul des deux brins du génome. L'ensemble des ORF (*Open Reading Frame*) se trouve sur un unique brin. Les HPVs ne codent pas pour leur propre ARN polymérase, ils sont dépendants de leur hôte. Les ARNm des HR-HPVs sont polycistroniques et ils subissent un ensemble de mécanismes tels que l'épissage alternatif et la polyadénylation alternative afin d'exprimer l'ensemble des protéines du virus à partir des promoteurs. La polyadénylation est réalisée au niveau du site précoce (A_E) ou du site tardif (A_L) à l'aide de la machinerie de polyadénylation de l'hôte (Figure 3) (Schwartz 2013; Bergvall, Melendy, and Archambault 2013; L. Yu, Majerciak, and Zheng 2022).

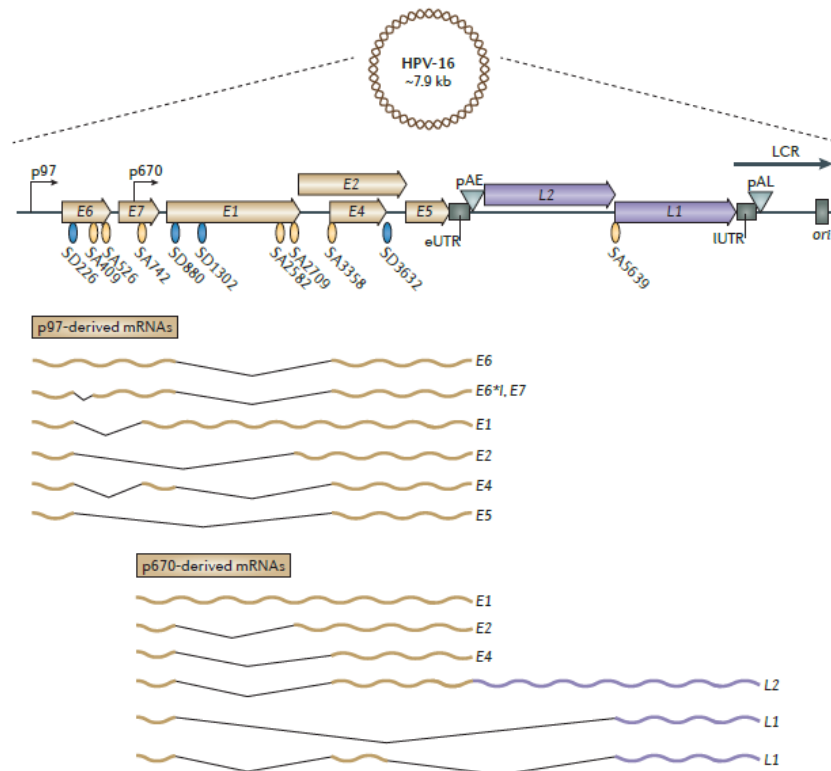


Figure 3 : Représentation du génome viral d'HPV16 de façon linéaire et des ARNm produits. Au-dessus : les gènes précoces (E6, E7, E1, E2, E4 et E5) sont en beige et les gènes tardifs (L2 et L1) en mauve. Les deux promoteurs (p97 et p670) ainsi que l'Ori et la partie LCR sont également représentés. Les deux sites de polyadénylation (pAE et pAL) sont présents ainsi que plusieurs sites d'épissage (SD et SA). En dessous : les ARNm dérivés des deux promoteurs sont illustrés. Image provenant de l'article (Johansson and Schwartz 2013).

1.3.1 Région non codante

La région non codante appelée LCR (*long control region*) ou URR (*non-coding upstream regulatory region*) est une région du génome viral qui ne code pour aucune protéine. Elle est située entre L1 et l'ORF de E6. Cette région contient les sites de liaison pour les protéines E1 et E2, impliquées dans la régulation de la réplication virale, ainsi qu'une origine de réplication (Ori). Elle contient également le promoteur précoce qui est responsable de la transcription des gènes E6 et E7 impliqués dans la transformation cellulaire. De plus, la région URR contient des sites de liaison pour certains facteurs de transcription cellulaire comme NF1, Oct1, TEF-2, AP-1 et SP1. Ces facteurs régulent (en stimulant ou inhibant) l'activité du promoteur précoce et par conséquent l'expression des gènes viraux (Chong et al. 1991; Rho et al. 1997; Lacey et al. 2009; Van Doorslaer et al. 2017; R. C. O. Silva et al. 2020).

1.3.2 Protéines de capsid

La capsid virale est composée de deux protéines bien conservées : la protéine de capsid majeure (L1) et la protéine mineure (L2). Ces deux protéines sont synthétisées tardivement (lorsque le génome a été amplifié) (Doorbar 2007).

1.3.2.1 L1

La protéine L1 (55KDa) est la protéine majeure de la capsid virale. Il faut 360 protéines L1 organisées en pentamères pour pouvoir former la structure icosaédrique de la capsid. Cette protéine joue un rôle essentiel dans l'infection virale. En effet, elle permet l'ancrage de la capsid virale aux récepteurs (protéoglycanes héparine sulfate) qui se trouvent au niveau de la membrane cellulaire. Ce processus conduit à l'entrée du virus dans sa cellule hôte (Knappe et al. 2007).

L'assemblage de ces protéines L1 (sans le génome viral) forme ce qu'on appelle une VLP (*virus-like particle*) (Buck, Day, and Trus 2013). Les VLPs n'ont pas de pouvoir infectieux mais sont très immunogènes et sont utilisées depuis longtemps comme élément clé des vaccins anti-HPV (Gardasil® et Cervarix®) (J. W. Wang and Roden 2013).

1.3.2.2 L2

La protéine L2 est une protéine mineure de la capsid car il ne faut que 12 à 72 protéines L2 par capsid. En plus de son rôle dans la formation de la capsid, d'autres rôles sont attribués à cette protéine comme sa capacité à emballer l'ADN viral et à « conduire » le génome du virus à l'intérieur du noyau cellulaire. C'est plus précisément la partie N-terminale de la protéine L2 qui se lie à l'ADN. Le complexe L2/ADN serait stabilisé par quelques protéines L1 (J. Zhou et al. 1994; Buck et al. 2008; DiGiuseppe et al. 2017). La protéine L2 est également impliquée dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte (Morante et al. 2022).

1.3.3 Protéines de réplication et d'amplification

Les protéines E1 et E2 sont impliquées dans la réplication de l'ADN ainsi que dans la régulation de la transcription. Afin de se répliquer, le virus a besoin d'interagir avec la machinerie cellulaire de sa cellule hôte (L. Yu, Majerciak, and Zheng 2022).

1.3.3.1 E1

La séquence du gène E1 est une séquence bien conservée et code pour une protéine enzymatique (la seule du virus). Afin d'être enzymatiquement active, la protéine doit se trouver sous forme de doubles hexamères. La protéine E1 est composée de trois domaines fonctionnels (Deng et al. 2004; Fradet-Turcotte et al. 2010; Bergvall, Melendy, and Archambault 2013; Schuck and Stenlund 2015) :

- 1) la région régulatrice N-terminale contient un motif de liaison aux cyclines qui interagit avec la cycline A/E en complexe avec Cdk2 (*Cyclin-dependent kinase 2*). Cette région contient également un site de phosphorylation pour Cdk2.
- 2) la partie centrale ou domaine de liaison à l'ADN (DBD) permet la formation du complexe E1-E2 qui se lie à l'origine de réplication virale (*ori*) présente dans la partie LCR. Elle induit le recrutement de protéines impliquées dans la réplication comme la topoisomérase I, l'ADN polymérase α et la RPA (*Replication Protein A*).
- 3) la partie C-terminale joue le rôle d'hélicase ATP-dépendante lorsque celle-ci est sous forme dimérique. Elle permet la séparation des brins d'ADN.

La protéine E1 n'a pas seulement un rôle dans la réplication de l'ADN viral. En effet, bien que le mécanisme sous-jacent ne soit pas élucidé, Castro-Munoz *et al.* ont montré (par des analyses d'RNA-seq) que la protéine E1 peut aussi réduire l'expression de l'IFN β 1 et l'IFN λ 1 et ainsi contribuer à l'inhibition de la réponse immunitaire antivirale (Castro-Muñoz et al. 2019).

1.3.3.2 E2

La protéine E2 est une protéine modulatrice composée d'un domaine C-terminal (domaine de liaison à l'ADN) et N-terminal (domaine de transactivation) impliqué dans la régulation (positive et négative) de la production d'ARN_m viral et de la réplication virale. Cette protéine supporte le rôle de E1 dans l'initiation de la réplication et permet la formation des foyers de réplifications nucléaires (Sakakibara, Mitra, and McBride 2011). De plus, E2 peut lier des protéines essentielles pour l'initiation de la réplication comme TopBP1 (*Topoisomerase II-binding protein 1*), une protéine de l'hôte impliquée dans la réplication de l'ADN cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN. De même, E2 peut interagir avec BrD4 (*bromodomain-containing protein 4*), une protéine qui possède une activité histone acétyltransférase permettant de réaliser le lien entre le génome viral et les chromosomes de l'hôte (Kanginakudru et al. 2015; McKinney et al. 2016). Parmi les nombreuses interactions possibles de cette protéine virale, E2 a la capacité d'induire l'apoptose par liaison directe au domaine DED (*Death effector domain*) de la caspase 8 (Thierry and Demeret 2008).

Enfin, E2 est une protéine régulatrice de la transcription de E6 et E7. E2 réprime le promoteur des oncogènes ce qui induit une diminution de l'expression de E6 et E7. Lorsque le génome d'HPV s'intègre dans le génome de l'hôte, la cassure se réalise généralement au niveau du gène E2 ce qui conduit à une augmentation de la transcription de E6 et E7 contribuant à la progression vers un cancer (Nishimura et al. 2000; Wallace and Galloway 2014; Araldi et al. 2017).

1.3.4 Protéines de fusion

Les protéines E4 et E8 proviennent toutes les deux de gènes fusionnés E1^{E4} et E8^{E2}. Ce sont des protéines moins essentielles pour la survie du virus, bien qu'elles participent au cycle viral (Doorbar 2013; Straub et al. 2014).

1.3.4.1 E4

La protéine E4 résulte d'un épissage alternatif d'ARN_m au départ d'une fusion entre les premiers codons du gène E1 avec le cadre de lecture ouvert (ORF) du gène E4. Cette protéine E4 est l'une des protéines virales la moins étudiée et est probablement impliquée dans le relargage des virions par cassure des filaments de kératine au niveau de la couche supérieure des kératinocytes. Elle joue également un rôle dans l'amplification du génome viral durant la différenciation des kératinocytes (Wilson, Fehrmann, and Laimins 2005). En effet, E4 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 en séquestrant le complexe CyclinB/CDK1 (Doorbar 2013).

La protéine E4 a tendance à se déposer sous forme de « fibres amyloïdes » ce qui permet d'utiliser cette protéine (en combinaison ou non avec le biomarqueur p16^{ink4a}) comme biomarqueur d'une infection virale active (Damgaard et al. 2022).

1.3.4.2 E8

La protéine E8 est également une protéine de fusion provenant d'une fusion entre le gène E2 et des résidus du gène E8. La protéine E8^{E2} a la capacité de réprimer la transcription et la réplication virale afin de maintenir une infection latente. Cette répression est réalisée en agissant sur les oncoprotéines E6 et E7 ainsi que les protéines de répliquons E1 et E2. La protéine E8^{E2} a également la capacité d'interagir avec des facteurs de répression de la transcription cellulaire comme CHD6 (*chromodomain helicase DNA binding domain 6*) afin de renforcer son rôle d'inhibiteur viral. Cette répression de la réplication se fait aussi bien dans les kératinocytes indifférenciés que dans les cellules en différenciation démontrant que la protéine E8 joue un rôle tout le long du cycle viral (Fertey et al. 2010; Straub et al. 2014; 2015; Dreer, Van De Poel, and Stubenrauch 2017).

1.3.5 Oncoprotéines

Il existe 3 oncoprotéines différentes : E5, E6 et E7. Chacune de ces protéines joue un rôle bien particulier, seule ou en collaboration avec les autres. L'ensemble des mécanismes induits par ces protéines oncogènes conduit à l'immortalisation cellulaire et à la progression vers un cancer (Figure 4).

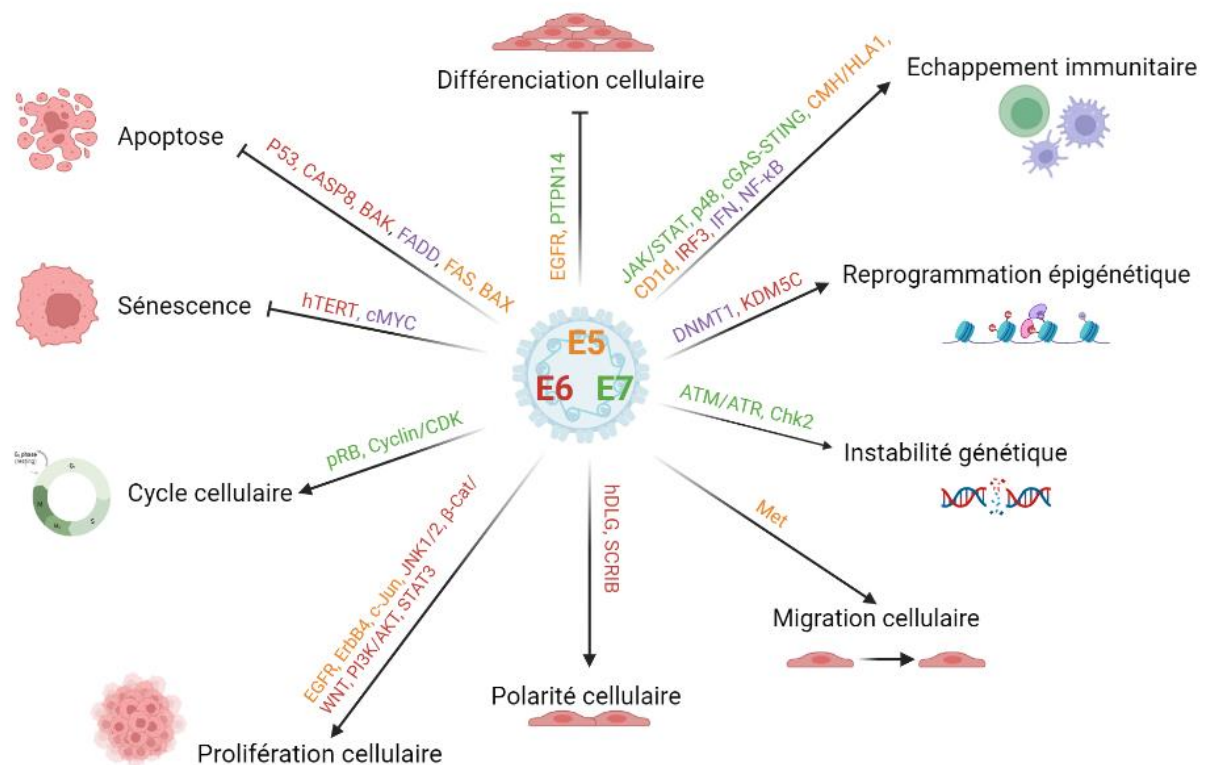


Figure 4 : Représentation des interactions entre les oncoprotéines des HR-α-HPVs et les voies de signalisation ou protéines de l'hôte. En orange : cibles de E5, en rouge : cibles de E6, en vert : cibles de E7, en mauve : cibles de plusieurs oncoprotéines. L'ensemble de ces interactions conduit à l'immortalisation des cellules. Figure réalisée à partir de BioRender.

1.3.5.1 E5

La protéine E5 est l'oncoprotéine la moins étudiée, elle ne joue qu'un rôle mineur dans l'immortalisation et la transformation cellulaire. Cette protéine est exprimée chez les α-HPVs mais pas chez les β-HPVs. Bien que la fonction de la protéine E5 dans la carcinogénèse n'est

pas totalement définie, certaines études montrent des interactions de cette dernière avec des protéines de l'hôte (L. Yu, Majerciak, and Zheng 2022).

HPV E5 joue son rôle d'oncoprotéine seule ou en soutien avec E6 et E7. Cet effet est même plus important lors d'une synergie de ces trois oncoprotéines (Maufort et al. 2007; 2010). Cette protéine contient trois domaines transmembranaires et elle est localisée principalement dans la membrane intracellulaire du réticulum endoplasmique et au niveau de l'appareil de Golgi. HPV E5 contribue à la transformation de la cellule hôte en agissant sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'échappement immunitaire (Fehrmann, Klumpp, and Laimins 2003; Wasson et al. 2017).

Une prolifération cellulaire accrue est l'une des caractéristiques les plus importantes lors du développement d'un cancer. Il s'avère que E5 a la capacité de lier des protéines de l'hôte jouant un rôle dans la prolifération et la transformation cellulaire conduisant à un dérèglement cellulaire. Une des premières observations a été celle de l'interaction entre la protéine E5 du BPV-1 (*bovine papillomavirus-1*) et EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Bien que le BPV et HPV n'aient pas une analogie complète, une interaction similaire a été observée entre HPV16 E5 et EGFR. Le mécanisme résultant de cette activation n'est pas clair mais une des hypothèses est que E5 pourrait interférer dans l'interaction entre c-Cbl (une E3 ubiquitine ligase) et EGFR, ce qui préviendrait l'ubiquitination et la dégradation de cette dernière protéine. Cette interaction E5-EGFR a comme conséquence de stimuler la prolifération cellulaire et ainsi de contribuer à un environnement adéquat pour le cycle du virus (Straight et al. 1993; Benyue Zhang et al. 2005; Wechsler et al. 2018). De plus, E5 peut interagir avec des protéines d'autres voies de signalisation et notamment avec le récepteur tyrosine kinase Met. Met est impliqué dans la survie et la migration des cellules épithéliales. Une interaction entre E5 et Met conduit à une augmentation de la motilité cellulaire et donc au développement cancéreux (Scott et al. 2018). D'autres interactions ont été identifiées pouvant moduler la prolifération cellulaire comme la liaison de E5 avec ErbB4 (récepteur tyrosine-kinase) ou directement avec le facteur de transcription oncogénique c-Jun (S. -L. Chen et al. 1996; S-L Chen et al. 2007).

En ce qui concerne la mort cellulaire, les virus induisent un stress au niveau des cellules infectées, ce qui conduit à un dérèglement du cycle cellulaire et donc à l'apoptose. Cependant, HPV via ses oncoprotéines, a développé des mécanismes afin de contourner cette mort cellulaire. Un des mécanismes d'inhibition de l'apoptose utilisés par HPV est la stimulation E5-dépendante de la dégradation de la protéine BAX (protéine pro-apoptotique) par le protéasome (Oh et al. 2010). E5 peut également prévenir l'apoptose en diminuant l'expression du récepteur Fas et inhiber le recrutement de FADD (*Fas-associated protein with death domain*) (Kabsch et al. 2004).

En plus de jouer un rôle sur la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose, l'oncoprotéine E5 peut médier l'échappement immunitaire. Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, elle présente à sa surface des épitopes de protéines étrangères. Le rôle de l'immunité adaptative est de reconnaître ces épitopes. Un des mécanismes utilisés par E5 est d'inhiber l'expression des récepteurs CMH/HLA-I empêchant la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T (Gruener et al. 2007; Campo et al. 2010). La dérégulation de CD1d (une protéine ayant un rôle similaire à celui du CMH-1) par E5 permet également l'échappement immunitaire des cellules infectées (Miura et al. 2010). Enfin, il s'avère que E5

est aussi capable d'altérer la voie de signalisation de l'IFN (composant clé de la réponse immunitaire innée antivirale), précisément IFN κ (IFN spécifique des kératinocytes), en abrogeant l'expression des ISG (*IFN-stimulated genes*) (Scott et al. 2020) (Figure 4).

1.3.5.2 E6

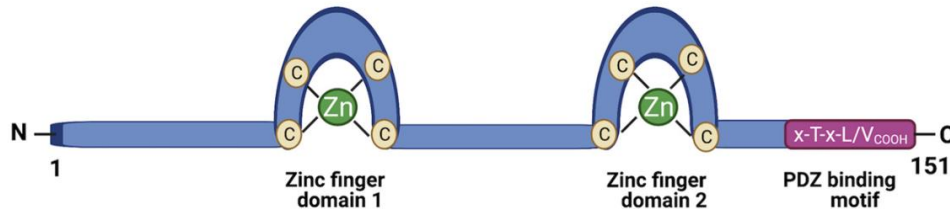


Figure 5: Représentation schématique de la structure de l'oncoprotéine E6 (HR-HPV). Les deux domaines en doigt de zinc ainsi que le motif PBM dans la partie C-terminale sont représentés. Image modifiée et provenant de l'article (Chitsike and Duerksen-Hughes 2021).

Chez les HR-HPVs, l'oncoprotéine E6 est depuis longtemps considérée comme possédant un pouvoir intrinsèque de transformation. Ceci n'est pas le cas pour les LR-HPVs. Une collaboration entre E6 et E7 conduit à la formation de (pré)cancers (S. Song et al. 2000). Cette protéine E6 est composée d'environ 150 acides aminés et contient deux domaines de liaison en doigt de zinc avec chacun deux motifs C-X-X-C. Contrairement aux LR-HPVs, les HR-HPVs possèdent un motif PBM (motif de liaison PDZ) dans leur partie C-terminale (Figure 5). Ce motif est important par son interaction avec un grand nombre de protéines possédant un domaine PDZ. Les deux protéines les plus étudiées contenant un domaine PDZ et ciblées par E6 sont l'homologue humain de DLG et SCRIB, deux protéines suppresseur de tumeur impliquées dans la polarité cellulaire. L'interaction de ces protéines avec E6 a pour conséquence leur dégradation par le protéasome (Ganti et al. 2015). Une étude récente a également montré que E6 (dépendant de son motif PBM) est responsable de la phosphorylation de JNK1/2 (*c-Jun N-terminal kinase 1/2*) conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire. Ce mécanisme n'est pas clair mais la phosphorylation de JNK1/2 serait une conséquence secondaire à la dégradation de SCRIB et DLG (après liaison au motif PBM de E6) (E. L. Morgan et al. 2021).

HPV E6 est capable de lier une multitude de protéines de l'hôte impliquées dans la prolifération, l'apoptose et l'immunité (Y. Liu et al. 2009).

La principale fonction de E6, mais aussi la fonction la plus étudiée, est la dégradation de p53 (protéine suppresseur de tumeur). p53 permet la régulation d'une série de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et l'apoptose cellulaire. Dans plus de 50% des cancers, p53 est inactivée ce qui démontre le rôle essentiel de cette protéine dans le fonctionnement cellulaire. Dans le contexte du virus HPV, la première étape consiste en la liaison de la protéine E6 au motif LxxLL de E6AP (*E6 association protein*). E6AP est une ubiquitine ligase E3 indispensable à la dégradation de p53. Un hétérotrimère E6/E6AP/p53 peut alors se former et s'en suit la dégradation de p53 par le protéasome via son ubiquitination (Martinez-Zapien et al. 2016; L. Li et al. 2022). Hormis la dégradation de p53, E6 peut interagir avec d'autres protéines impliquées dans la voie de l'apoptose. C'est le cas pour les protéines BAK (protéines pro-apoptotiques), FADD et procaspase-8. Ces protéines

sont alors dégradées à la suite de leur liaison au complexe E6/E6AP (Thomas and Banks 1998; Garnett, Filippova, and Duerksen-Hughes 2006; Filippova et al. 2007).

HPV E6 peut également prévenir la sénescence, un processus au cours duquel les cellules somatiques normales entrent en mort cellulaire en raison du raccourcissement des télomères à la suite de nombreux cycles de réplication. En effet, E6 promeut l'immortalisation cellulaire par l'activation du complexe télomérase (enzyme de type transcriptase inverse qui synthétise des séquences d'ADN à l'extrémité des télomères). Ce complexe enzymatique est composé d'une sous-unité catalytique hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) et d'un composant ARN (hTERC). Il a été mis en évidence que E6 induit la transcription du gène *hTERT*. Cependant, le mécanisme découlant de cette activation demeure complexe. L'action de E6 dépend de l'activité de Myc, un proto-oncogène impliqué dans l'activité télomérase. Le complexe E6/Myc se lie au promoteur du gène *hTERT* et ainsi induit sa transcription. Notons que ce mécanisme n'est pas présent chez les LR-HPVs. (Veldman et al. 2003; Y. Zhang et al. 2017).

De nombreuses voies de signalisation peuvent être impactées par l'oncoprotéine E6. C'est le cas des voies Wnt, PI3K/AKT/mTOR et JAK/STAT.

1) La voie de signalisation Wnt

La voie Wnt est une voie de signalisation impliquée dans l'homéostasie tissulaire et le développement. L'effecteur principal de cette voie est la β -caténine. Il a été montré que le complexe E6/E6AP peut stabiliser la β -caténine évitant sa dégradation par le protéasome et conduisant à une prolifération accrue et une différenciation cellulaire. Le mécanisme par lequel la stabilisation est effectuée n'est pas clair mais le complexe E6/E6AP pourrait participer à la séquestration d'un régulateur négatif de la voie Wnt : NHERF1 (*NA⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor*). Ce régulateur possède un domaine PDZ. (Sominsky et al. 2014; Muñoz Bello et al. 2015).

2) La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

Cette voie de signalisation est impliquée dans la régulation de la prolifération et du métabolisme et est altérée dans certains cancers. Certaines études ont montré que E6 peut induire l'augmentation de la phosphorylation de PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) et AKT (*Serine/threonine kinase/Protein kinase B*). Plusieurs hypothèses sont présentes à ce sujet. En plus de jouer un rôle dans la régulation de la voie Wnt, NHERF1 peut aussi inhiber le signal de PI3K en recrutant PTEN (inhibiteur de la voie PI3K/AKT). Par la séquestration de NHERF1, E6 contribuerait à la dérégulation de cette voie de signalisation. Une autre hypothèse est que E6 lie le domaine PDZ de hDLG qui est connue pour réguler PTEN (Contreras-Paredes et al. 2009; Accardi et al. 2011).

3) La voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT est une voie impliquée dans la régulation de la réponse de l'immunité innée mais aussi dans la différenciation et prolifération cellulaire ainsi que dans la migration et apoptose. Dans le contexte d'HPV, une étude a montré que l'oncoprotéine E6 peut augmenter la phosphorylation de STAT3 et ainsi déréguler la voie de signalisation JAK/STAT. Cette activation est réalisée par l'intermédiaire d'un axe Rac1-NF κ B-IL-6. Les membres de la famille de cytokines IL-6 sont connues pour induire la phosphorylation de STAT3. La production d'IL6 est

contrôlée par l'activation (RAC1 GTPase dépendante) de la voie NFκB. Cependant, le mécanisme par lequel l'oncoprotéine E6 active cette voie Rac1-NFκB-IL6-STAT3 n'est pas encore élucidé (E. L. Morgan et al. 2018; E. L. Morgan and Macdonald 2019).

L'oncoprotéine E6 participe également à l'échappement immunitaire. Physiologiquement, la voie de signalisation de l'IFN produit des cytokines capables de jouer un rôle antiviral. Cependant, lors d'une infection par HPV, le rôle des acteurs de la réponse antivirale peut être modifié par le virus pour lui permettre de compléter son cycle viral ou encore produire une infection importante. E6 affecte la réponse immunitaire en dérégulant des protéines impliquées dans la voie de l'IFN. C'est le cas pour IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*). E6 de HPV16 est capable d'interagir avec IRF3 par un lien direct à son motif LxxLL. Au contraire, E6 de HPV18 n'est pas capable de lier cette protéine. Cette interaction spécifique pourrait expliquer, en partie, la haute prévalence d'HPV16 dans les cancers HPV-induits (Nees et al. 2001; Poirson et al. 2022).

Enfin, E6 a le pouvoir d'induire des altérations épigénétiques comme des méthylations de l'ADN et des histones. En effet, E6 peut augmenter l'expression de la méthyltransférase DNMT1 par le biais de la dégradation de p53. Cette dernière protéine en liaison avec Sp1, régule négativement le promoteur de DNMT1 mais lorsque p53 est dégradé, Sp1 agit comme activateur de DNMT1. Ce qui conduit à une hyperméthylation de l'ADN. Pour ce qui est des modifications au niveau des histones, une étude a montré que la partie C-terminale de E6 (d'HPV16) interagit avec l'histone déméthylase KDM5C, qui, en présence de E6AP, est dégradée par le protéasome après ubiquitination. Le résultat de cette dégradation augmente l'activation de EGFR et Met conduisant, *in fine*, à la transformation cellulaire (X. Chen et al. 2018; Sen, Ganguly, and Ganguly 2018).

Ces observations montrent la capacité d'HPV E6 à interagir avec certains acteurs clés de la vie cellulaire et à induire un dérèglement conduisant à l'immortalisation des cellules (Figure 4).

1.3.5.3 E7

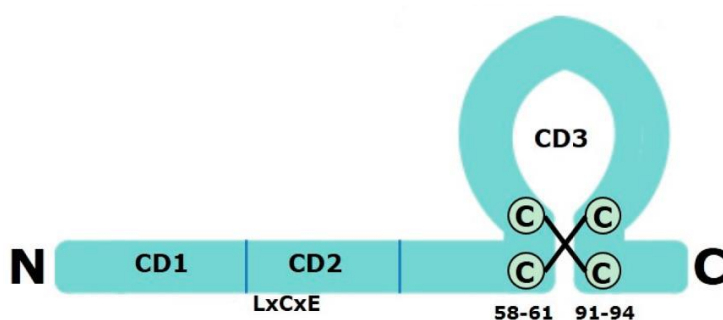


Figure 6: Représentation schématique de E7 des HR-HPVs (Tomaić 2016).

La 3^e oncoprotéine du virus HPV est E7. Cette oncoprotéine est composée de plus ou moins 100 acides aminés avec 3 régions conservées CD1, CD2 et CD3. La région CD2 contient un motif LxCxE et la partie CD3 possède une configuration en doigt de zinc (McLaughlin-Drubin and Münger 2009) (Figure 6).

La cible principale de E7 est la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (pRB). pRB est une protéine importante impliquée dans le cycle cellulaire et la prolifération et plus précisément dans la régulation de la transition de la phase G1 à la phase S. Dans une cellule

normale, pRB se lie au facteur de transcription E2F et le régule. En effet, lors de la phase G1 du cycle cellulaire, les kinases dépendantes des cyclines (complexe Cyclines D-CDK4/CDK6) inhibent pRB par phosphorylation ce qui dissocie la protéine de E2F. E2F peut alors induire l'expression de gènes impliqués dans la progression en phase S du cycle cellulaire. Le rétrocontrôle négatif de cette activation du cycle cellulaire est exercé par la protéine p16^{ink4a} (protéine suppresseur de tumeur). p16^{ink4a} peut inhiber l'activité des kinases et ainsi empêcher la dégradation de pRB, ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire (Giacinti and Giordano 2006). Lors d'une infection par HPV, E7 s'associe à la protéine pRB grâce à son motif LXCXE présent au niveau de sa région CR2. Cette association entraîne la dégradation par le protéasome de pRB et ainsi la libération de E2F qui peut alors jouer son rôle d'activateur du cycle cellulaire. À terme, ce mécanisme entraîne une prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation exacerbée de p16^{ink4a} (utilisée comme biomarqueur indirect des infections par HPV) (Dyson and Howley 1989; Boyer, Wazer, and Band 1996; McLaughlin-Drubin and Münger 2009). Outre le rôle joué sur pRB, l'oncoprotéine E7 peut également affecter le cycle cellulaire en se liant directement aux complexes cyclines A/CDK2 et cyclines E/CDK2, complexes impliqués dans l'entrée et la progression de la phase S (C. L. Nguyen and Münger 2008).

En plus de l'impact sur le cycle cellulaire, E7 peut affecter la différenciation et transformation cellulaire. En effet, HPV E7 peut se lier à PTPN14 (protéine tyrosine phosphatase non-réceptrice mutée dans certains cancers) et induire sa dégradation par le protéasome sous l'effet de l'ubiquitine ligase UBR4. Les régions CR1 et C-terminale sont indispensables pour la formation du complexe E7/PTPN14/UBR4 (White, Münger, and Howley 2016).

En outre, HPV E7, tout comme les deux autres oncoprotéines, joue un rôle sur l'échappement immunitaire en ciblant plusieurs réponses antivirales. Les acteurs principaux de la réponse antivirale sont les IFN (Interférons) et la voie JAK/STAT qui en découle. Malgré la capacité des cellules à contrôler les infections virales, le virus HPV peut déréguler certains composants de la voie de l'IFN afin de compléter son cycle viral et de permettre une infection persistante. En effet, E7 peut inhiber la translocation du facteur de transcription p48, qui en synergie avec d'autres protéines (comme STAT1 et STAT2) permet la production d'IFN- α (Barnard and McMillan 1999). Un autre composant important de la réponse immunitaire innée antivirale est la voie cGAS-STING (*cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) pathway*) qui permet la transcription de l'IFN-I. E7 d'HPV16 et d'HPV18 interagissent avec cette voie mais de façon différente. En effet, E7 d'HPV16 ne lie pas directement STING. Elle augmente la dégradation (par autophagie) de STING via NLRX1, membre de la famille des NLR (*NOD-like receptor*). Ce mécanisme d'inhibition de la production de l'IFN-I est également connu chez le virus HIV-1 et HSV-1 (*Herpes Simplex Virus*). Contrairement à E7 d'HPV16, E7 d'HPV18 interagit directement avec STING par son motif LXCXE (interaction similaire retrouvée pour la protéine E1A de l'adénovirus) (Lau et al. 2015; Guo et al. 2016; Luo et al. 2020). Parallèlement aux voies cGAS-STING et de l'IFN, E7 peut également diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires en altérant la voie NF κ B. En effet, E7 interfère avec des composants cruciaux de cette voie comme TRAF3, TRAF6 et NEMO, ce qui a comme conséquence d'inhiber la translocation nucléaire de p65, altérant, *in fine*, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL6) (Karim et al. 2011; Vandermark et al. 2012; K. H. Richards et al. 2015).

De la même façon que E6, E7 a la capacité d'induire des altérations épigénétiques. A titre d'exemple, E7 régule la même cible que E6, l'ADN méthyltransférase : DNMT1. L'interaction se fait de façon directe par le domaine en doigt de zinc (CR3) de E7 (Burgers et al. 2007).

Finalement, HPV E7 peut causer un stress réplicatif ainsi qu'une instabilité génomique dans la cellule. Effectivement, l'oncoprotéine E7 a la capacité d'activer les voies ATM et ATR-DDR (*DNA Damage Response*), voies de réparation à l'ADN. Lorsque E7 interagit avec pRB, le facteur E2F relâché peut augmenter l'expression de protéines de la voie DDR (ATM, Chk2). E7 d'HPV31 est également connu pour interagir directement avec les protéines de la voie DDR (ATM, Chk2, Chk1, Rad50, BRCA1) grâce au même domaine de liaison utilisé pour pRB (C. A. Moody and Laimins 2009; Johnson, Aloor, and Moody 2017; Mehta and Laimins 2018). Au sein de notre laboratoire, une étude récente a montré des interactions importantes entre l'oncoprotéine E7 d'HPV16 (mais aussi d'HPV18, 33 et 39) et 11 protéines impliquées dans les mécanismes de dommage et réparation de l'ADN. Grâce à l'utilisation de la technique de GPCA (*Gaussia Princeps Luciferase Complementation Assay*) et une confirmation par la technique de co-immunoprécipitation, les protéines suivantes ont pu être mises en évidence : ALKBH2, CHEK2, DNA2, DUT, ENDOV, ERCC3, PARP3, PMS1, PNKP, POLDIP2 et RBBP8. Des interactions similaires avec d'autres protéines sont également mentionnées pour l'oncoprotéine E6 (Bruyere et al. 2023). Le virus n'utilise pas les protéines impliquées dans les voies de réparation à l'ADN uniquement pour induire une instabilité génétique dans la cellule, il les recrute aussi pour son propre cycle viral. L'amplification du génome et la réplication virale d'HPV requièrent, bien évidemment, l'utilisation de protéines de l'hôte (Nilsson, Wu, and Schwartz 2018) (Figure 4).

Toutes ces observations prouvent que ces 3 oncoprotéines (E5, E6 et E7) jouent un rôle multifonctionnel à la fois dans le cycle viral mais aussi dans la transformation des cellules hôtes ainsi que l'échappement immunitaire. Les cellules infectées par HPV deviennent alors immortelles (Figure 4).

1.4 Cycle viral

Comme discuté précédemment, les HPVs peuvent avoir un tropisme cutané et muqueux. Les virus ont donc des cellules hôtes de prédilection comme les kératinocytes de la couche basale de l'épithélium. Afin que le virus puisse atteindre ces cellules hôtes, une microlésion ou un dommage plus important à l'épithélium est nécessaire. Le virus peut alors entamer sa réplication. Par la suite, il bénéficie de la capacité de division et de différenciation de sa cellule hôte pour se multiplier à son tour et finir par être relargué (Doorbar 2007; Kines et al. 2009) (Figure 7). Bien que le kératinocyte ait été décrit pendant longtemps comme l'unique cellule hôte d'HPV, d'autres cellules peuvent aussi être infectées. Au niveau du col, une population de cellules de jonction au phénotype glandulaire ainsi que les cellules glandulaires endocervicales sembleraient pouvoir jouer le rôle d'hôte pour le virus HPV (Herfs et al. 2012; Egawa et al. 2015).

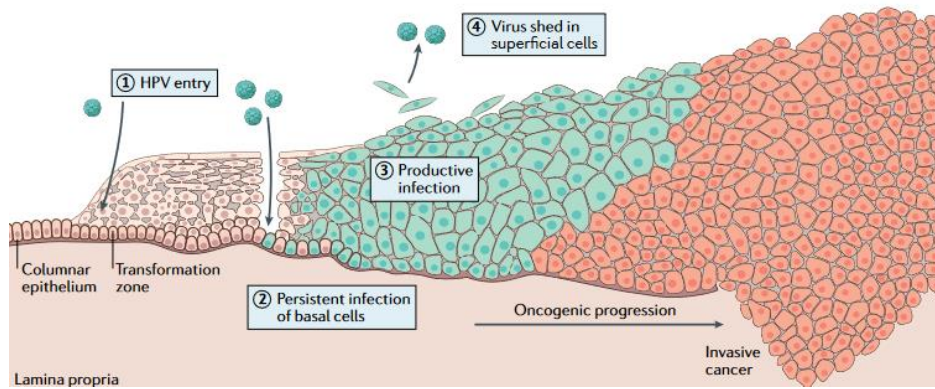


Figure 7: Représentation du cycle d'infection d'HPV au niveau de l'épithélium épidermoïde du col. 1) Entrée du virus dans les cellules de la couche basale. 2) Amplification du génome viral et maintien d'un nombre de copies contrôlé dans les kératinocytes de la couche basale. 3) Phase d'amplification accrue du génome d'HPV et répartition dans les kératinocytes des couches supérieures. 4) Formation et relargage des virus (McBride 2022).

1.4.1 Entrée du virus

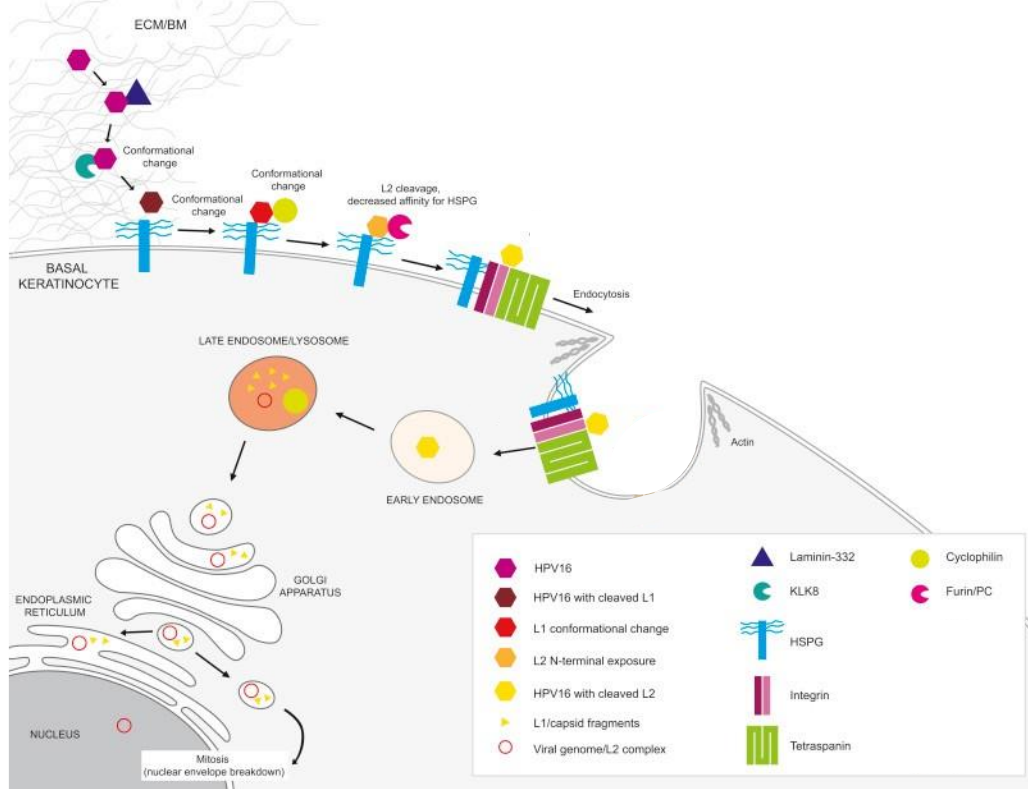


Figure 8: Représentation de l'entrée du virus HPV dans un kératinocyte de la couche basale d'un épithélium. Après avoir subi des transformations au niveau de la capside virale (changement de conformation de L1 et clivage par de la furine pour L2), HPV se lie à des récepteurs membranaires comme les protéoglycanes héparines sulfates (HSPG) puis à l'intégrine et tetraspanine. Le virus est alors internalisé par endocytose et lorsque l'endosome est devenu mature et tardif, les protéines L1 se détachent du complexe génome viral/L2. Ce complexe poursuit son chemin dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique avant de rejoindre le noyau cellulaire. Adapté à partir de (Aksoy, Gottschalk, and Meneses 2017).

Pour qu'un cycle viral complet et productif ait lieu, il est essentiel que la cellule hôte et le microenvironnement offrent les conditions adéquates (Doorbar et al. 2012). Avant même que les virions n'entrent en interaction directe avec les kératinocytes de la couche basale, il se pourrait que les virions établissent un contact préliminaire avec la membrane basale. La

laminine 5, composante de la matrice extracellulaire sécrétée par les kératinocytes, peut jouer un rôle de « transrécepteur extracellulaire » liant la capsid virale de façon transitoire (Culp et al. 2006; Kines et al. 2009). L'entrée du virus dans sa cellule hôte nécessite plusieurs étapes.

Tout d'abord, le virion se dirige vers les kératinocytes de la couche basale, où la protéine L1 établit une liaison avec des récepteurs présents à la surface de la membrane cellulaire, connus sous le nom de protéoglycanes héparine sulfate (Giroglou et al. 2001). Cette interaction initiale induit une modification de la conformation de la capsid virale, facilitée par le clivage de la protéine L2 par une enzyme appelée furine (proprotéine convertase). Une étude a d'ailleurs montré que L2 est plus facilement accessible grâce au clivage des protéines L1 par la sérine protéase Kallikreine-8 (KLK8) (Cerqueira et al. 2015). Ce changement conformationnel prépare la capsid pour son attachement à un deuxième récepteur, une étape cruciale pour l'internalisation du virion (R. M. Richards et al. 2006; Aksoy, Gottschalk, and Meneses 2017). Bien que le deuxième récepteur demeure à ce jour inconnu, beaucoup d'études ont mis en évidence le rôle probable de l' α -intégrine et de la tétraspanine en tant que seconds récepteurs impliqués dans l'internalisation du virus (Mikuličić and Florin 2019).

Ensuite, le processus d'entrée du virus dans la cellule se fait par endocytose. La littérature décrit plusieurs voies d'endocytoses selon les différents HPVs mais les plus étudiées sont celles médiées par les protéines de structure clathrine et cavéoline. Par exemple, l'endocytose d'HPV16 semble dépendre de la clathrine, tandis que le transport d'HPV31 serait réalisé par la cavéoline (Day, Lowy, and Schiller 2003; Smith et al. 2008).

Enfin, dans l'endosome mature tardif, la capsid se désassemble afin d'exposer le génome viral. Ce processus de désassemblage est favorisé par une diminution du pH ainsi que par des protéines de l'hôte telles que la cyclophiline (protéine chaperonne) (Bienkowska-Haba et al. 2012). Le complexe génome viral/L2 est transporté dans l'appareil de Golgi puis le réticulum endoplasmique avant de rejoindre le noyau cellulaire. Afin de transiter plus facilement par l'appareil de Golgi, L2 se lie à COPI (*coat protein complex I*), une protéine impliquée dans le transport cellulaire (Harwood et al. 2023). Ce transit est également médié par des protéines comme la γ -sécrétase (W. Zhang et al. 2014) (Figure 8).

1.4.2 Phases de réplication et d'amplification du virus

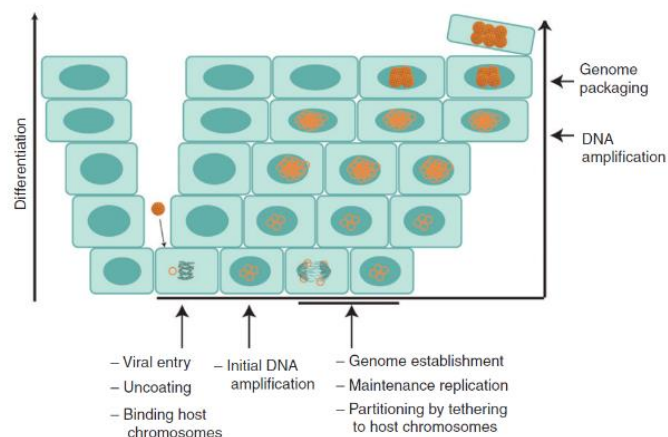


Figure 9: Représentation des phases de réplication et d'amplification du virus. Après l'entrée du virus, une première phase permet l'amplification contrôlée du génome. La deuxième phase a pour but de maintenir un certain nombre de copies virales et permet la liaison du génome viral à l'ADN chromosomique, afin de profiter de la division cellulaire pour se répartir dans les cellules filles. La dernière phase permet l'amplification finale avant l'empaquetage du génome (McBride 2017a).

Lorsque le génome viral (sous forme épisomale) est entré dans le noyau cellulaire des kératinocytes de la couche basale, il s'ensuit l'établissement d'une longue et persistante infection de ces cellules. Le génome viral peut alors se répliquer et être amplifié. Il y a trois phases de réplication dans le cycle viral : une phase d'amplification limitée de l'ADN, une phase de maintenance de la réplication et une phase d'amplification importante dépendant de la différenciation cellulaire (McBride 2017b) (Figure 9).

1.4.2.1 Phase d'amplification initiale

Le début de la phase d'amplification est initié par la liaison du complexe L2/génome viral aux chromosomes cellulaires, ce qui permet de maintenir l'ADN viral dans le noyau. Un endroit clé pour débiter la réplication est ND10 (*nuclear domain 10 bodies*). Les ND10 sont des corps nucléaires qui recrutent des protéines impliquées dans la défense antivirale, l'apoptose, la réparation de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes. Toutefois, dans ce contexte-ci, ils servent de sites exploités par le complexe L2/génome viral pour favoriser la réplication et la transcription virale, contrecarrant la défense antivirale (Florin et al. 2002; Kieback and Müller 2006).

Comme discuté précédemment, les principaux acteurs de la réplication virale sont les protéines E1 et E2 qui recrutent notamment la polymérase. Lorsque celles-ci se lient à l'origine de réplication, tout le processus d'amplification est lancé mais un faible nombre de copies d'ADN (environ 20 copies par cellules) est d'abord maintenu dans les kératinocytes basaux. Ce contrôle est réalisé par la protéine E8^{E2} (Zwolinska et al. 2023).

1.4.2.2 Phase de maintenance

Afin d'induire une infection dite persistante et de maintenir une réplication, l'ADN viral doit être localisé dans une région du noyau qui lui sera bénéfique par la suite. C'est-à-dire accroché aux chromosomes de la cellule pour pouvoir être transféré aux cellules filles lors de la mitose. Cette liaison est stabilisée grâce à l'interaction de E2 avec BrD4 (McKinney et al. 2016). Le virus va échapper aux mécanismes antiviraux en recrutant, par exemple, les protéines TOPBP1 impliquées dans la réparation de l'ADN (Kanginakudru et al. 2015).

Les oncoprotéines E5, E6 et E7 jouent leur rôle en recrutant un ensemble de protéines de l'hôte impliquées dans la différenciation, prolifération cellulaire mais aussi dans l'immunité. L'ensemble de ces interactions crée un environnement propice au développement du virus et à l'échappement immunitaire (Scarth et al. 2021).

1.4.2.3 Phase d'amplification finale

Au cours de leur cycle cellulaire, les kératinocytes se différencient et deviennent matures. Les copies de génome viral suivent cette différenciation et sont transmises dans les kératinocytes de la couche supérieure de l'épithélium. À ce moment-là, une dernière amplification virale importante a lieu. Cette amplification est concomitante avec une augmentation des protéines E1 et E2 ainsi que l'expression du promoteur tardif afin de produire les protéines L1, L2 pour l'encapsidation du génome mais aussi E4 impliquée dans le relargage des virions et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Doorbar 2013; McBride 2017a).

Les oncoprotéines sont également produites de façon accrue dans cette dernière phase d'amplification et peuvent recruter des protéines de l'hôte impliquées dans les voies de réparation à l'ADN afin d'améliorer la réplication virale (Sakakibara, Chen, and McBride 2013).

Une des voies les plus utilisées par HPV est la voie DDR médiée par ATM ou ATR (C. A. Moody and Laimins 2009; Gillespie et al. 2012).

1.4.3 Formation et relargage du virus

La dernière étape du cycle viral d'HPV est l'encapsidation du génome viral et le relargage des particules. Les protéines impliquées dans cette encapsidation sont les protéines L1 et L2 provenant de l'activation du promoteur tardif. L'association des 360 protéines L1 arrangées en 72 capsomères pentamériques et quelques protéines L2 formeront une capsidie dans le noyau de la cellule. La stabilisation de la capsidie est réalisée par des ponts disulfures entre les protéines L1 (Buck et al. 2005).

La maturation du virus est réalisée dans les kératinocytes de la couche supérieure parfois en desquamation et est favorisée par un gradient d'oxydoréduction présent dans le tissu (Conway et al. 2009). Lorsque les particules virales sont formées, la protéine E4 peut désassembler la structure de kératine et interagir avec l'enveloppe cornée cellulaire pour permettre le relargage de ces dernières (Brown et al. 2006). Les virus ainsi libérés peuvent infecter d'autres cellules.

1.4.4 Intégration du virus

L'intégration virale est considérée depuis longtemps comme une étape importante pour la cancérisation viro-induite bien que cette étape soit un événement déclenché par inadvertance lors de la réplication. Les sites d'intégration du virus peuvent être aléatoires même si certaines régions restent préférentielles comme les régions actives transcriptionnellement et les sites fragiles soumis à des stress réplicatifs (Christiansen et al. 2015). Lors de l'intégration du génome viral, le plus souvent, une cassure du gène E2 (répresseur des oncogènes E6 et E7) survient, ce qui entraîne une dérégulation de l'expression des oncogènes conduisant à un dérèglement du cycle cellulaire (Jeon, Allen-Hoffmann, and Lambert 1995). La linéarisation du génome viral ne se fait pas exclusivement au niveau du gène E2. En effet, d'autres endroits comme le gène E1 peuvent être rompus et permettre d'intégrer le génome cellulaire (Sakakibara, Mitra, and McBride 2011).

Cependant, tous les cancers HPV-dépendant ne contiennent pas de l'ADN viral intégré. En effet, le génome viral peut se retrouver sous forme intégrée mais aussi sous forme épisomale ou mixte (à la fois intégrée et épisomale). La dérégulation des oncogènes E6 et E7 ne se fait pas uniquement lorsque l'ADN viral est intégré. Le génome viral épisomale peut acquérir des changements génétiques et épigénétiques (comme une méthylation dans les sites de liaison de E2) induisant une dérégulation de ces gènes et conférant ainsi l'immortalité à la cellule (Chaiwongkot et al. 2013; Olthof et al. 2014). Ceci est vrai notamment pour les cancers de la sphère ORL où l'intégration du génome viral est moins fréquente (environ 40%) par rapport aux cancers du col de l'utérus où HPV est intégré dans environ 70-80% des cas (Vojtechova et al. 2015).

2. HPV et cancers

2.1 Généralités

2.1.1 De l'infection par HPV au cancer

Les virus sont des parasites obligatoires, ce qui signifie qu'ils dépendent entièrement de leur hôte pour accomplir leur cycle viral complet (Mesri, Feitelson, and Munger 2014). Prenons le cas du virus HPV : il produit seulement 6 protéines précoces et 2 protéines tardives. A elles seules, ces protéines virales ne sont pas suffisantes pour accomplir le cycle viral. Pour y arriver, le virus doit interagir et détourner à son avantage des protéines spécifiques de l'hôte, essentielles à sa survie. Dès lors, le virus parvient à exploiter les mécanismes de la cellule hôte pour créer un environnement favorable à sa propre réplication. Il met en œuvre divers processus, tels que l'arrêt de l'apoptose et la stimulation de la prolifération cellulaire afin de favoriser la réplication de son propre matériel génétique. De plus, il détourne les mécanismes de réparation de l'ADN pour garantir la stabilité de son propre génome, tout en évitant d'être reconnu et éliminé par le système immunitaire via l'altération de certaines voies de signalisation immunitaire (ex : IFN, NFκB,...) (Mesri, Feitelson, and Munger 2014; Doorbar et al. 2015; Della Fera et al. 2021).

La plupart des infections par HPV sont transitoires et régressent au bout de quelques mois grâce à l'intervention du système immunitaire (Schiffman et al. 2016). Cependant, lorsque l'infection persiste et que les détournements des mécanismes cellulaires deviennent chroniques (ce qui se produit dans environ 5-10% des infections), cela peut causer des « problèmes » pour la cellule hôte. L'accumulation d'altérations génétiques de plus en plus nombreuses favorise la progression d'un pré-cancer vers un cancer. Ce processus de cancérisation est long et se manifeste plusieurs années (>5 ans) après l'infection initiale (Gravitt 2011; McBride 2017b).

Les infections persistantes par les α-HPVs sont maintenant bien reconnues comme responsables d'un grand nombre de lésions (pré)cancéreuses se développant dans les régions ano-génitales et aéro-digestives supérieures (Bruni et al. 2023).

2.1.2 Facteurs de risques associés à HPV

Certains facteurs favorisent la persistance de l'infection par HPV et la progression vers la formation d'un cancer. Ces facteurs sont classés en trois types : les facteurs viraux, les facteurs de l'hôte et les facteurs comportementaux :

- 1) le génotype du virus influence le risque de développer un cancer. En effet, une infection par HPV16 est plus susceptible de progresser vers un cancer du col de l'utérus alors que d'autres HPVs carcinogènes sont moins liés à ce type de cancer. Une charge virale importante et des variants particuliers d'HPV (par exemple les variants D, A3 et A4 de HPV16) sont aussi des facteurs de risques plus importants. Bien que les raisons pour lesquelles certains variants viraux sont associés à un risque cancéreux plus important reste peu connus (zur Hausen 2002; Škamperle et al. 2013; Clifford et al. 2019).
- 2) la réponse immunitaire de l'hôte est un facteur de risque associé. Une personne immunodéprimée (notamment par la présence du virus HIV ou une personne greffée)

est plus susceptible de développer un cancer à la suite d'une infection par HPV qu'une personne possédant une bonne immunité (Aziz et al. 2023).

- certains facteurs comportementaux peuvent favoriser le développement de cancer HPV-induit. Le tabac et l'alcool sont les cofacteurs les plus importants (Madathil et al. 2020; Lai et al. 2022). Des études auraient également montré un lien entre le microbiote vaginal et la persistance d'une infection par HPV au niveau du col utérin (Łaniewski et al. 2018; Lebeau et al. 2022). Un nombre élevé de partenaires sexuels ainsi qu'une prise de contraception hormonale sont également des facteurs de risque (Kasamatsu et al. 2019).

2.1.3 Épidémiologie

Environ 5% des cancers humains dans le monde sont causés par une infection par HPV ce qui représente globalement 690 000 cancers par année (Mesri, Feitelson, and Munger 2014; de Martel et al. 2020). Les α -HPVs de haut risque sont impliqués dans 99.9% des carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus. Mais ces cancers ne sont pas les seuls. En effet, HPV peut causer des cancers de la vulve ($\approx 40\%$), du vagin ($\approx 70\%$), du pénis ($\approx 50\%$), de l'anus ($\approx 85\%$) et de la tête et du cou ($\approx 30\%$) (Bruni et al. 2023).

La plupart des cancers attribués à HPV se retrouvent dans les régions en voie de développement comme l'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud-Est, l'Amérique du Sud et l'Europe de l'Est (de Martel et al. 2020) (Figure 10).

Au niveau des génotypes d'HPV, HPV16 est le génotype le plus fréquemment lié au développement de cancers suivi par HPV18 et HPV45 (Kombe Kombe et al. 2021).

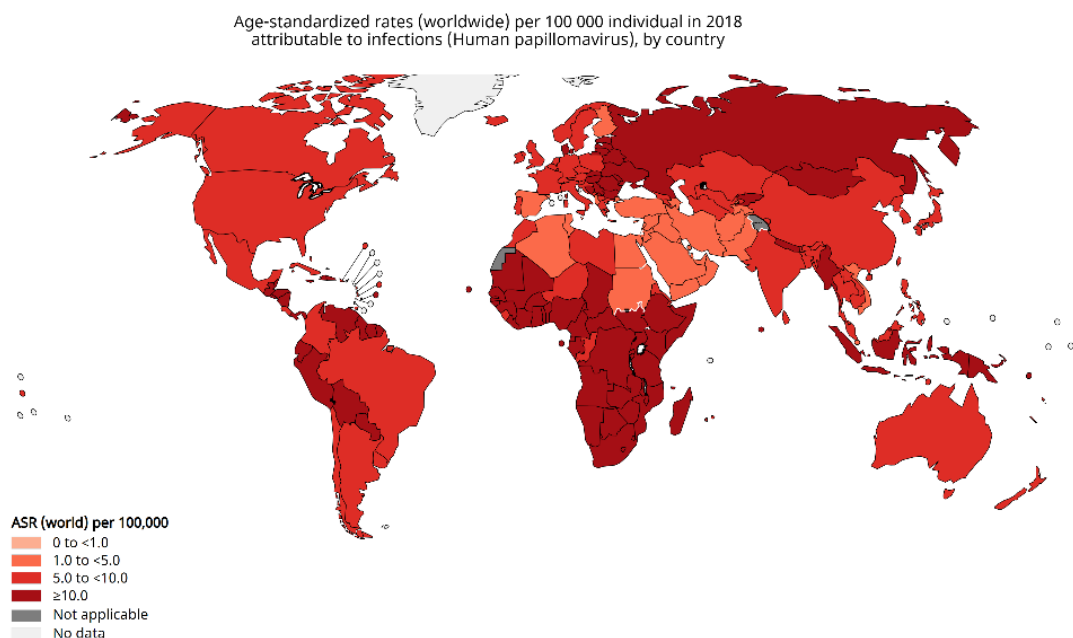


Figure 10: Représentation de l'incidence des cancers HPV-induits dans le monde pour 100 000 individus (GLOBOCAN 2018).

2.2 Cancers du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus est le 4^e cancer le plus fréquent chez la femme avec une estimation de 604 000 nouveaux cas en 2020 et plus de 342 000 cas de décès. Plus de 90% des cancers du col sont causés par HPV. Les génotypes HPV16 et HPV18 sont responsables de 70% de ces cancers. Ces cancers sont principalement présents dans le sud de l'Afrique et en Amérique latine (Sung et al. 2021) (Figure 11). Etant donné que les cancers du col de l'utérus constituent entre 80 et 85% de tous les cancers HPV-induits, il n'est pas surprenant d'observer une forte similarité entre les cartes représentant les taux de cancers du col de l'utérus (Figure 11) et celle illustrant les taux de cancers HPV-induits à travers le monde (Figure 10).

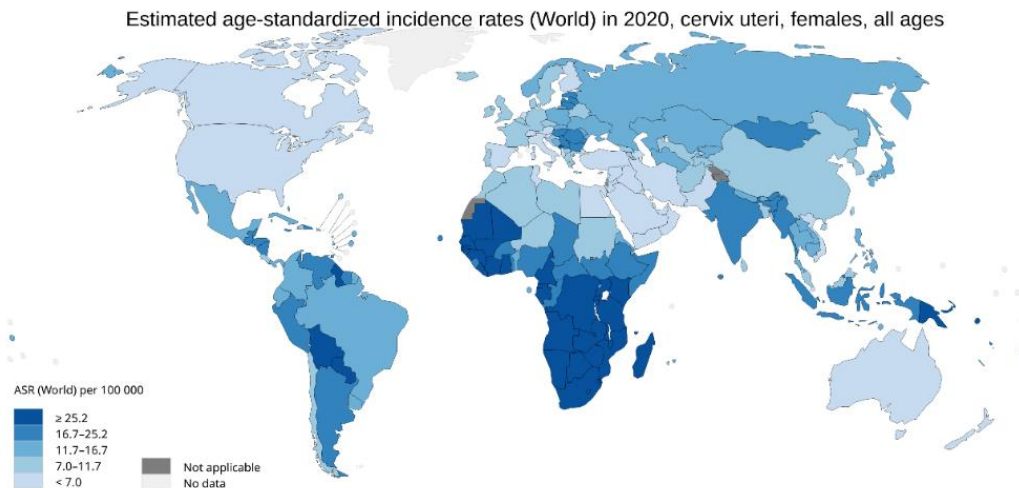


Figure 11: Représentation de l'incidence des cancers du col de l'utérus dans le monde pour 100 000 individus (GLOBOCAN 2020).

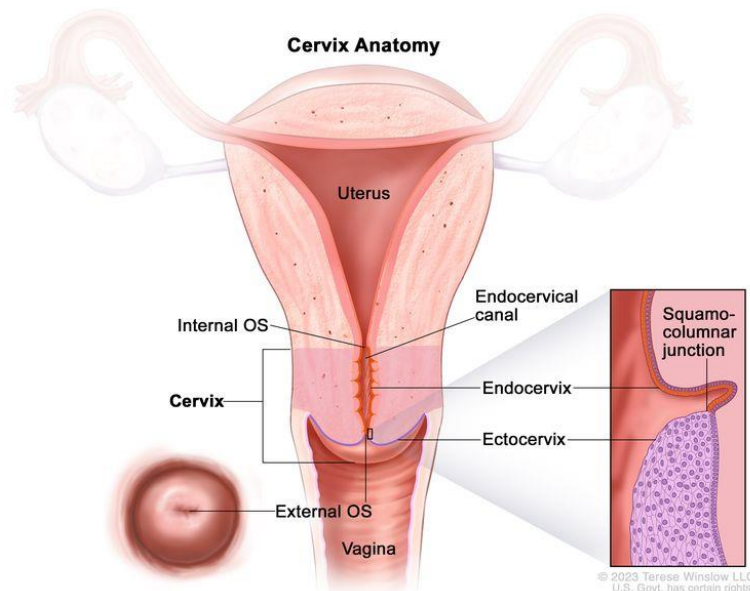


Figure 12: Représentation anatomique d'un col de l'utérus sain. Ce col est composé d'une partie endocervicale (du côté de l'utérus) et d'une partie exocervicale (du côté du vagin). Les deux parties sont séparées par la jonction pavimonto-cylindrique (Source : National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/types/cervical>).

Le terme « cancer du col de l'utérus » englobe 2 principaux types de cancers pouvant se développer au niveau du col. Le carcinome épidermoïde (SCC) (environ 85 à 90% des cancers du col) se développe au niveau de la zone de jonction et de l'exocol. Le deuxième cancer est l'adénocarcinome (ADC) (environ 10 à 15% des cancers) se développant également au niveau de la zone de jonction mais aussi au niveau de l'endocol. En effet, la zone de jonction endo-exocol aussi appelée jonction pavimento-cylindrique ou zone de transformation, est connue depuis longtemps pour présenter une forte prédisposition au développement de ces cancers. Cette zone est en réalité une zone de métaplasie dynamique où la transformation d'un épithélium en un autre se produit (Prendiville and Sankaranarayanan 2017) (Figure 12). Avant les années 2010, on considérait les kératinocytes de la couche basale comme unique cellule hôte d'HPV pouvant conduire à un carcinome épidermoïde. Pourtant, d'autres théories sur l'origine cellulaire des cancers du col de l'utérus ont aujourd'hui été proposées. En effet, la jonction pavimento-cylindrique contient des cellules cuboïdes qui expriment des marqueurs spécifiques tels que la cytokératine7 et la MMP7 retrouvés dans plus 90% des lésions (pré)cancéreuses. Ces cellules cuboïdes pourraient se différencier à la fois en cellules épidermoïdes et en cellules glandulaires. Ces cellules infectées par HPV pourraient, dès lors, être à l'origine tant des carcinomes épidermoïdes que des adénocarcinomes du col utérin (Herfs et al. 2012) (Figure 13).

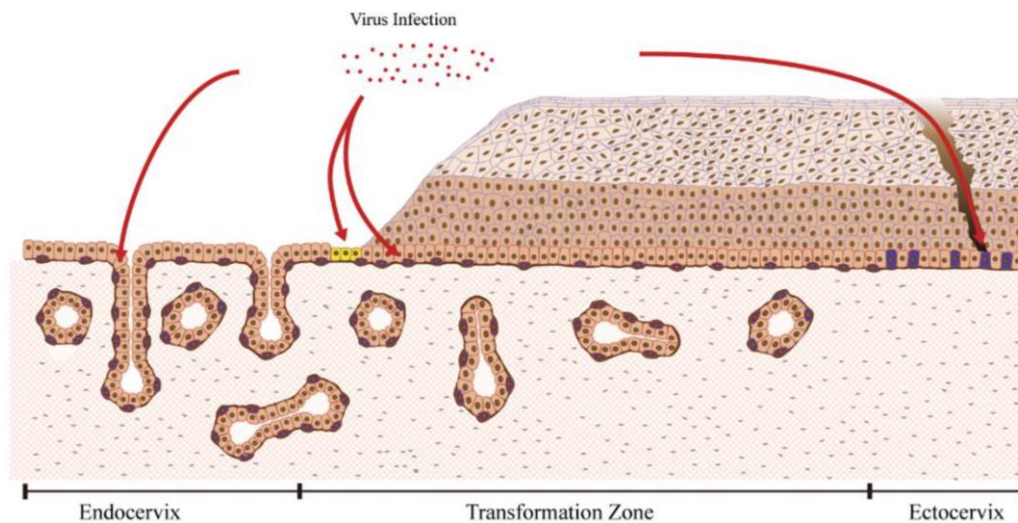


Figure 13: Représentation schématique de l'hypothèse sur les différentes cellules hôtes pouvant être infectées par HPV au niveau du col utérin. Le virus HPV pourrait infecter les kératinocytes de la couche basale de l'épithélium mais aussi les cellules cuboïdes (en jaune) de la zone de jonction ou encore directement les cellules glandulaires. Les cellules cuboïdes infectées au niveau de la zone de jonction pourraient être à l'origine des carcinomes épidermoïdes et des adénocarcinomes. Adapté à partir de (Egawa et al. 2015).

Une considération importante à faire connaissant la capacité d'HPV à induire les deux types de cancers (SCC et ADC) est qu'une infection par HPV peut progresser de façon dynamique entre deux formes : une forme productive et une forme transformante. Une infection productive ne peut pas se produire dans un épithélium glandulaire car elle est considérée comme liée à la différenciation épidermoïde. La plupart des infections productives régressent mais une partie peut devenir transformante. Tandis qu'une infection transformante peut se produire dans un épithélium glandulaire et mener à un adénocarcinome étant donné que ce type d'infection induit les lésions précancéreuses. Dans le cas de la lésion de bas grade (CIN

1), ces deux phases coexistent. En effet, l'infection est productive jusqu'à ce que le virus s'intègre et que les altérations cellulaires deviennent trop importantes pour permettre au cycle viral complet de se réaliser. C'est à ce stade que l'infection devient transformante (IARC 2022) (Figure 14).

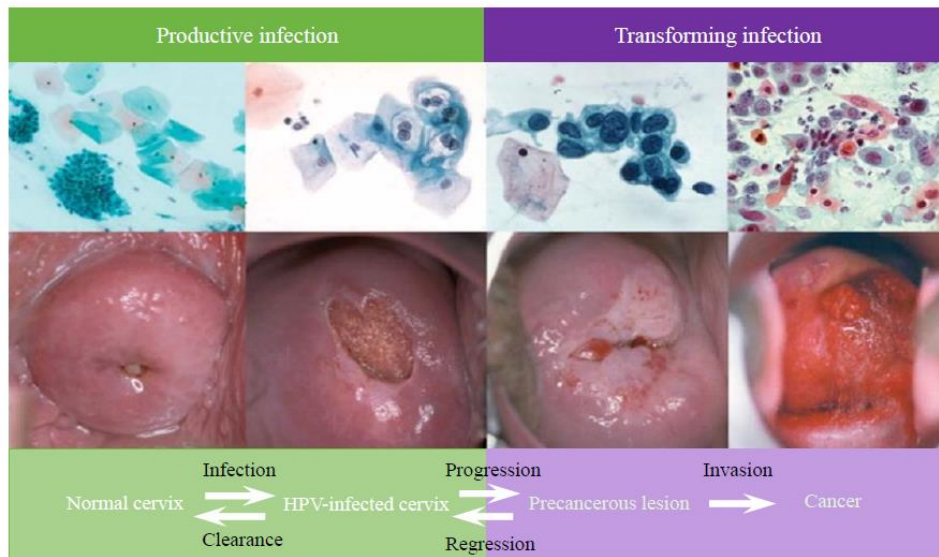


Figure 14: Représentation schématique d'une infection productive et transformante au niveau du col de l'utérus (IARC 2022).

D'autres types de cancers peuvent se développer au niveau de l'épithélium du col de l'utérus mais ceux-ci sont assez rares : le carcinome adénoquameux (comprenant des caractéristiques du carcinome épidermoïde et de l'adénocarcinome) et le carcinome à cellules vitreuses (*Glassy cell carcinoma*) considéré comme sous-catégorie du carcinome adénoquameux. Il existe également des cancers neuroendocrines. Ces cancers peuvent également être associés à une infection par HPV (Q. Wang et al. 2020; Stolnicu, Talia, and McCluggage 2020; Yordanov et al. 2021). Ceux-ci ne seront pas abordés dans la suite de ce travail.

2.2.1 Le carcinome épidermoïde

2.2.1.1 Lésions précancéreuses

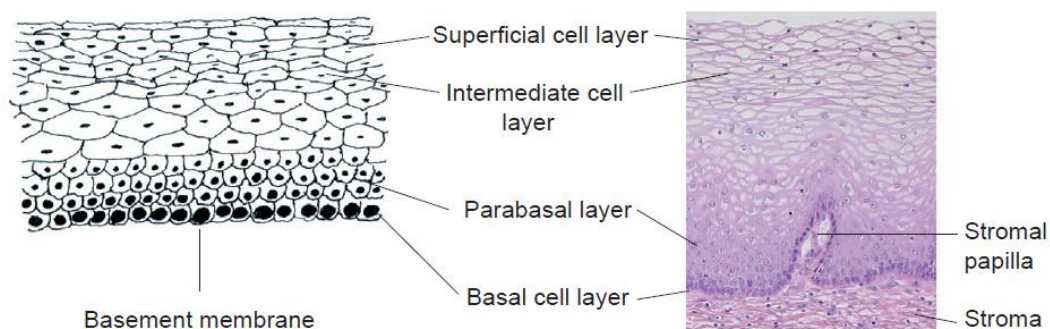


Figure 15: Représentation histologique de l'épithélium épidermoïde normal de l'exocol (Prendville and Sankaranarayanan 2017).

Le carcinome épidermoïde est un cancer présentant des caractéristiques proches de celles d'un épithélium pluristratifié (Figure 15). Avant d'arriver au stade de cancer, des lésions précancéreuses ou dysplasies (transformation architecturale du tissu) sont formées. Ces

lésions sont classées (d'un point de vue histologique) selon deux nomenclatures : le système LAST (adaptation du système de Bethesda) et le système CIN. La lésion de bas grade (LSIL : *low-grade squamous intraepithelial lesion*) ou anciennement appelée CIN1 (*cervical intraepithelial neoplasia*) correspond à la « transformation » des cellules de la base de l'épithélium. Ces lésions, causées par une infection par HPV, régressent spontanément dans 90% des cas endéans les deux ans. Cependant, dans 10% des cas, l'infection peut persister et progresser vers une dysplasie de haut grade (HSIL : *high-grade squamous intraepithelial lesion*) ou CIN2-CIN3 correspondant à la « transformation » des cellules des couches plus différenciées de l'épithélium. Si ces lésions sont non traitées, environ 50% peut progresser vers un cancer dans les années à venir (Vink et al. 2013; Pangarkar 2022; IARC 2022) (Figure 16).

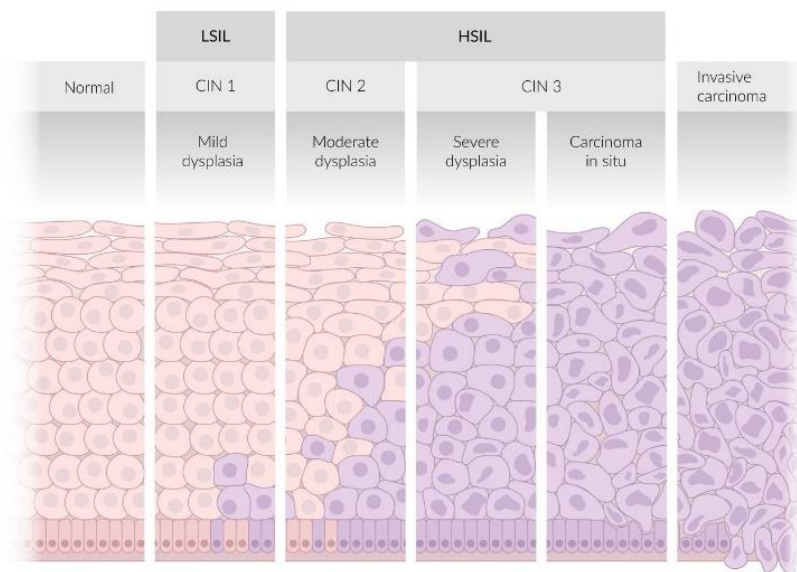


Figure 16: Représentation des lésions précancéreuses cervicales et comparaison entre la classification LAST et le système CIN (Image provenant du site : <https://www.amboss.com/us/knowledge/cervical-cancer>).

En cytologie, le système de classification des lésions (pré)cancéreuses le plus fréquemment utilisé (et maintenant recommandé) est le système de Bethesda revu en 2014. Il permet de classer les atypies cellulaires retrouvées lors de la réalisation d'un frottis cervico-vaginal (PAP test). Pour les cellules épidermoïdes, la classification établie est la suivante (Pangarkar 2022):

- ASC-US (*Atypical squamous cell - undetermined significance*)
- ASC-H (*Atypical squamous cell – cannot rule out HSIL*)
- LSIL
- HSIL
- Carcinome épidermoïde

D'un point de vue cytologique, une cellule est considérée comme anormale lorsqu'on peut y voir un élargissement du noyau, une structure de chromatine irrégulière, une variation dans la taille et la forme de la cellule. L'atypie la plus représentative d'une infection par HPV persistante est la formation de koïlocytes (cellules composées de noyaux larges et de cytoplasmes vacuolisés). La formation des koïlocytes correspondrait à la phase de relargage des virions dans les kératinocytes différenciés (Krawczyk et al. 2008) (Figure 17).

D'un point de vue histologique, les lésions sont représentées par une prolifération de cellules anormales, une maturation cellulaire anormale et des figures mitotiques persistantes. Dans les LSIL, des koïlocytes sont présents dans les couches superficielles de l'épithélium mais les cellules indifférenciées sont limitées au tiers inférieur de l'épithélium (Prendiville and Sankaranarayanan 2017) (Figure 17).

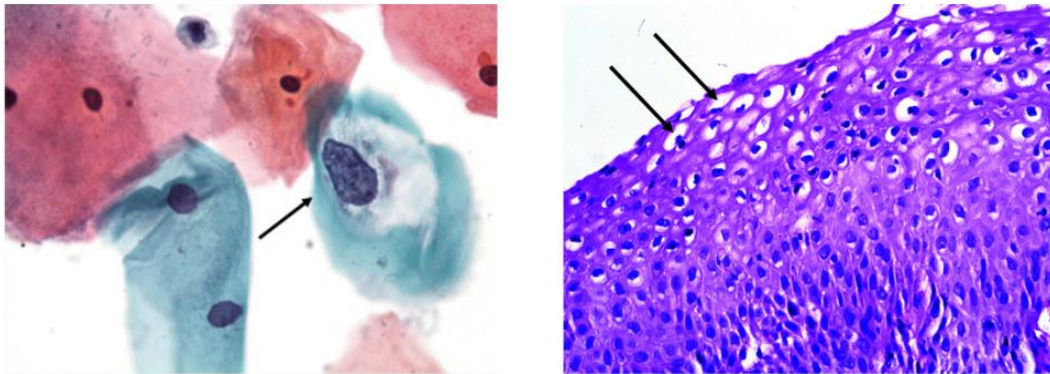


Figure 17: Représentation de koïlocytes (flèches) en cytologie (à gauche) et histologie (à droite) (coloration hématoxyline et éosine) (Fischer 2014; Prendiville and Sankaranarayanan 2017).

2.2.1.2 Classification des carcinomes épidermoïdes

Classés initialement par l'OMS (2014) comme associés à une dépendance à HPV, quelques rares cas de carcinomes épidermoïdes peuvent se révéler indépendants au virus. C'est pourquoi la nouvelle classification de l'OMS (2020) prend en compte cette deuxième catégorie. Cependant, jusqu'à présent, aucun traitement spécifique n'a été établi pour cette catégorie particulière. Une troisième catégorie de carcinome épidermoïde a été établie comme NOS (*Not otherwise specified*) lorsque les tests HPV et l'immunomarquage p16^{ink4a} ne peuvent pas être effectués (Casey et al. 2015; Höhn et al. 2021; McCluggage, Singh, and Gilks 2022).

La classification utilisée pour déterminer le stade tumoral est le stade FIGO (*Federation of Gynecology and Obstetrics*). Cette classification a été remise à jour en 2018 (Tableau 1) et permet d'adapter au mieux le traitement du patient (voir section 2.2.3) (Devine et al. 2019).

Table 1 FIGO Staging of Cancer of the Cervix Uteri (2018)

Stage	Description
I	The carcinoma is strictly confined to the cervix (extension to the uterine corpus should be disregarded)
IA	Invasive carcinoma that can be diagnosed only by microscopy, with maximum depth of invasion <5 mm*
IA1	Measured stromal invasion <3 mm in depth
IA2	Measured stromal invasion ≥3 mm and <5 mm in depth
IB	Invasive carcinoma with measured deepest invasion ≥5 mm (greater than Stage IA), lesion limited to the cervix uteri†
IB1	Invasive carcinoma ≥5 mm depth of stromal invasion, and <2 cm in greatest dimension
IB2	Invasive carcinoma ≥2 cm and <4 cm in greatest dimension
IB3	Invasive carcinoma ≥4 cm in greatest dimension
II	The carcinoma invades beyond the uterus, but has not extended onto the lower third of the vagina or to the pelvic wall
IIA	Involvement limited to the upper two-thirds of the vagina without parametrial involvement
IIA1	Invasive carcinoma <4 cm in greatest dimension
IIA2	Invasive carcinoma ≥4 cm in greatest dimension
IIB	With parametrial involvement but not up to the pelvic wall
III	The carcinoma involves the lower third of the vagina and/or extends to the pelvic wall and/or causes hydronephrosis or nonfunctioning kidney and/or involves pelvic and/or para-aortic lymph nodes‡
IIIA	The carcinoma involves the lower third of the vagina, with no extension to the pelvic wall
IIIB	Extension to the pelvic wall and/or hydronephrosis or nonfunctioning kidney (unless known to be due to another cause)
IIIC	Involvement of pelvic and/or para-aortic lymph nodes, irrespective of tumor size and extent (with r and p notations)§
IIIC1	Pelvic lymph node metastasis only
IIIC2	Para-aortic lymph node metastasis
IV	The carcinoma has extended beyond the true pelvis or has involved (biopsy proven) the mucosa of the bladder or rectum. (A bullous edema, as such, does not permit a case to be allotted to Stage IV)
IVA	Spread to adjacent pelvic organs
IVB	Spread to distant organs

When in doubt, the lower staging should be assigned.

*Imaging and pathology can be used, where available, to supplement clinical findings with respect to tumor size and extent, in all stages.

†The involvement of vascular/lymphatic spaces does not change the staging. The lateral extent of the lesion is no longer considered.

‡Adding notation of r (imaging) and p (pathology) to indicate the findings that are used to allocate the case to Stage IIIC. Example: If imaging indicates pelvic lymph node metastasis, the stage allocation would be Stage IIIC1r, and if confirmed by pathologic findings, it would be Stage IIIC1p. The type of imaging modality or pathology technique used should always be documented.

Tableau 1: Tableau expliquant les différents stades du cancer épidermoïde (Stade FIGO 2018) (Devine et al. 2019).

2.2.2 L'adénocarcinome

2.2.2.1 Lésions précancéreuses

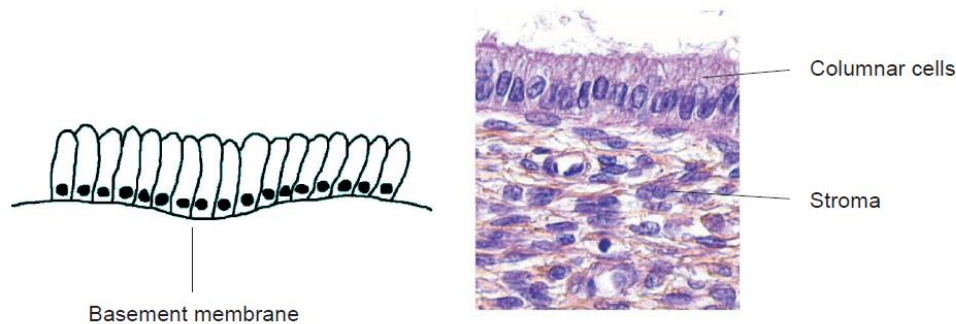


Figure 18: Représentation histologique d'un épithélium glandulaire normal au niveau de l'endocol (Prendiville and Sankaranarayanan 2017).

L'adénocarcinome est un cancer présentant des caractéristiques qui « imitent » celles d'un épithélium monostratifié glandulaire (Figure 18). Au niveau du col de l'utérus, il se forme à partir de cellules glandulaires de l'endocol ou de la zone de transformation. D'un point de vue cytologique, de la même façon que pour les atypies épidermoïdes, les atypies glandulaires sont déterminées par la classification de Bethesda (2014) comme suit (Pangarkar 2022) :

- AGC- NOS (*Atypical glandular cell- Not otherwise specified*)
- AEC-NOS (*Atypical endocervical cell- Not otherwise specified*)
- AGC en faveur d'une néoplasie

- AEC en faveur d'une néoplasie
- AIS (Adénocarcinome *in situ*)
- Adénocarcinome

L'adénocarcinome *in situ* (AIS) est le précurseur non invasif de l'adénocarcinome. Cette lésion est souvent asymptomatique et est généralement découverte lors d'une analyse par frottis cervico-vaginal ou lors d'une biopsie initialement prévue pour une lésion épidermoïde. Il existe plusieurs sous-types d'AIS mais la plupart du temps ils sont difficilement distinguables. Histologiquement, les AIS sont identifiés comme des glandes de l'endocol avec une architecture normale mais composées de cellules présentant des noyaux élargis et hyperchromatiques (Figure 19). Il est possible de retrouver une différenciation intestinale (avec la présence de cellules caliciformes) ou encore (plus rarement) une différenciation gastrique (présence d'un épithélium riche en mucine avec des cellules claires) (Pirog 2017; Stolnicu, Talia, and McCluggage 2020).

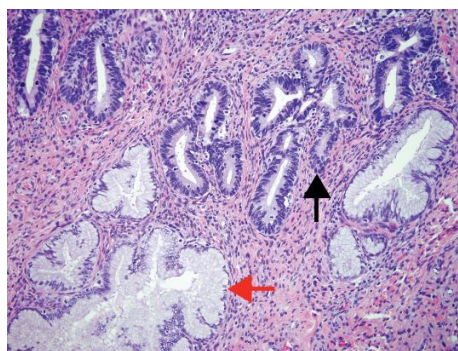


Figure 19: Coupe histologique hématoxyline-éosine (200x) représentant un adénocarcinome *in situ* (flèche noire) comparé à un épithélium endocervical normal (flèche rouge). Image provenant de (Pirog 2017).

2.2.2.2 Sous-types d'adénocarcinome

Les adénocarcinomes représentent 10 à 15% des cancers du col de l'utérus. Bien que moins nombreux que les carcinomes épidermoïdes, leur incidence a augmenté durant ces dernières décennies (S. S. Wang et al. 2004). Ils représentent un groupe hétérogène de tumeurs distinguables histologiquement (Pirog 2017) (Figure 20, tableau 2).

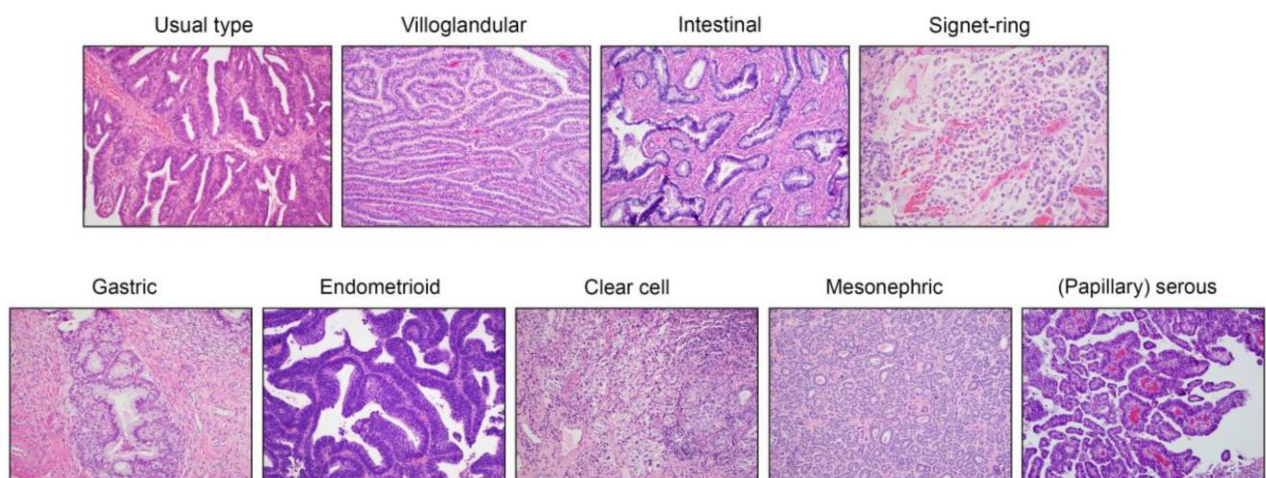


Figure 20: Représentation des différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin (Hématoxyline et éosine). Image provenant de Reynders et al. 2023 (under review).

Sous-types d'adénocarcinome	Caractéristiques
Classique (<i>Usual-type</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 75 - 80% des ADC - Morphologie : glandes cystiques, tubulaires, cribriformes irrégulières, parfois présence de mucus - IHC : p16^{ink4a} souvent positif et diffus, Ki67 supérieur à 25%, p53 rarement muté
Villoglandulaire	<ul style="list-style-type: none"> - 3-6% des ADC - Morphologie : croissances papillaires exophytiques avec des cellules cylindriques atypiques, peu de mucus - IHC : p16^{ink4a} souvent positif, p53 rarement muté
Mucineux, intestinal	<ul style="list-style-type: none"> - ≈8% des ADC - Morphologie : présence de cellules caliciformes - IHC : p16^{ink4a} souvent positif, 75% sont MUC6 positif
Mucineux, cellules en bague à chaton (<i>Signet-ring cell</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Tumeur rare - Morphologie : présence de cellules en bague à chaton - IHC : p16^{ink4a} souvent positif, MUC6 positif
Mucineux, gastrique	<ul style="list-style-type: none"> - 5-25% des ADC - Morphologie : glandes irrégulières, présence de cellules à mucus de type gastrique - Potentiel précurseur : LEGH (<i>Lobular endocervical glandular hyperplasia</i>) - IHC : p16^{ink4a} généralement négatif, MUC6 ou HIK1083 positif, 50% de mutation p53
Endométriöide	<ul style="list-style-type: none"> - Tumeur rare - Morphologie : ressemble à l'épithélium de l'endomètre, peu de mucus, glandes tubulaires - IHC : p16^{ink4a} parfois positif et diffus
À cellules claires (<i>Clear cell</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 2-7% des ADC - Morphologie : présence de caractéristiques tubulocystiques, papillaires et solides - IHC : p16^{ink4a} parfois positif diffus ou focalisé, p53 rarement muté
Mésonéphrique	<ul style="list-style-type: none"> - Tumeur rare - Morphologie : présence d'architecture tubulaire, canalaire, papillaire, solide, rétiforme, sarcomatoïde en proportion variable dans une même tumeur - IHC : p16^{ink4a} parfois « patchy »
Séreux	<ul style="list-style-type: none"> - Tumeur rare - Morphologie : structure papillaire ou glandulaire - IHC : p16^{ink4a} parfois positif, 50% de p53 muté

Tableau 2: Caractéristiques des différents sous-types d'adénocarcinome. Informations provenant des articles suivants: (Young and Clement 2002; Tekin et al. 2015; Pirog 2017; Stolnicu, Hoang, and Soslow 2019; Stolnicu et al. 2021).

2.2.2.3 Classification des adénocarcinomes et implication d'HPV

En 2014, l'OMS réalise une classification des adénocarcinomes en fonction de leur morphologie, architecture et présence en mucines intracytoplasmiques. Bien que le rôle étiologique d'HPV soit connu depuis longtemps pour un certain pourcentage d'adénocarcinomes du col de l'utérus, l'OMS n'a inclus HPV dans le système de classification qu'en 2020. La nouvelle classification de l'OMS se base alors sur la classification préétablie de l'IECC (*International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification*). Cette classification distingue les adénocarcinomes en tumeurs dépendantes ou indépendantes d'HPV. Les adénocarcinomes ne pouvant pas être classés sont assignés à la catégorie NOS (*Not otherwise specified*). Cependant, la dépendance à HPV est uniquement basée sur la morphologie cellulaire (présence ou absence de figures mitotiques et de corps apoptotiques) et non sur la réalisation d'un test HPV sensible (Stolnicu et al. 2018; Hodgson et al. 2019; Höhn et al. 2021; Stolnicu et al. 2021) (Figure 21). Bien que les éventuels faux négatifs du biomarqueur indirect d'HPV, p16^{ink4a}, soient reconnus (ex : lorsqu'une délétion ou une méthylation du promoteur se produit) (Stolnicu, Hoang, and Soslow 2019), les pathologistes continuent à utiliser ce biomarqueur pour catégoriser les adénocarcinomes en tant qu'HPV-dépendants ou indépendants. Les adénocarcinomes HPV-indépendants sont le plus souvent p16^{ink4a} négatif ou présentent une expression focalisée de cette protéine. Toutefois, il faut savoir que ces lésions peuvent également présenter un marquage anti-p16^{ink4a} diffus (rarement), ce qui complique l'utilisation de ce biomarqueur comme unique test HPV (McCluggage, Singh, and Gilks 2022).

Endocervical adenocarcinoma classifications according to the WHO 2014 and IECC 2018/WHO 2020 classification systems

WHO 2014	IECC 2018/WHO 2020
Endocervical adenocarcinoma, usual type	HPV-associated endocervical adenocarcinoma
Mucinous carcinoma NOS	Usual type
Mucinous carcinoma, gastric type	Mucinous (NOS, intestinal, signet ring cell, ISMC)
Mucinous carcinoma, intestinal type	Adenocarcinoma NOS
Mucinous carcinoma, signet-ring cell type	HPV-independent endocervical adenocarcinoma
Villoglandular carcinoma	Gastric type
Mesonephric carcinoma	Mesonephric type
Serous carcinoma	Endometrioid type
Clear cell carcinoma	Clear cell type
Endometrioid carcinoma	Adenocarcinoma NOS
Adenocarcinoma NOS	

HPV indicates human papillomavirus; IECC, International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification; ISMC, invasive stratified mucinous carcinoma; NOS, not otherwise specified; WHO, World Health Organization.

Figure 21: Comparaison entre la classification des adénocarcinomes de 2014 et la classification de 2020 de l'OMS. Les différents adénocarcinomes sont maintenant classés en fonction de leur dépendance à HPV (Stolnicu et al. 2021).

La nouvelle classification de l'OMS datant de 2020 constitue une avancée vers une meilleure compréhension de la dépendance à HPV des adénocarcinomes du col utérin. Néanmoins, cette classification demeure relativement « rigide » en ce qui concerne l'association entre un sous-type spécifique d'adénocarcinome et la présence ou non d'HPV. Pourtant, la prévalence

d'HPV dans ces cancers varie fortement en fonction de la région géographique, du sous-type d'adénocarcinome et/ou de la méthode de détection d'HPV (voir les résultats de la méta-analyse réalisée dans le cadre de cette thèse). De plus, certains adénocarcinomes dits « HPV-indépendants » (comme les adénocarcinomes à cellules claires et les endométrioïdes), pourraient parfois présenter un lien direct avec une infection par HPV (Hadisejdi and Kra 2007; Matsubara et al. 2014; Holl et al. 2015; W. Chen et al. 2016). Ces observations prouvent le côté « restrictif » de cette nouvelle classification (OMS 2020). Enfin, une étude récente a mis en évidence que le statut HPV de ces adénocarcinomes influence significativement la survie des patients (observations connues au niveau des cancers provenant de l'anus et de la sphère oropharyngée) (Cho et al. 2023). En conclusion, une classification plus nuancée qui intègre à la fois un test HPV fiable et le diagnostic histologique, pourrait ouvrir la voie à une personnalisation du traitement en fonction du sous-type de cancer.

Pour ce qui est du stade tumoral, il est établi de la même façon que pour les carcinomes épidermoïdes par la classification FIGO (2018). A noter qu'une autre classification pour les adénocarcinomes classiques (*Usual-types*) appelée « *Pattern Classification* » existe. Celle-ci se base sur l'étendue de l'invasion du stroma et des vaisseaux lymphatiques plutôt que sur la taille de la tumeur (comme la classification FIGO). Cette approche permet d'identifier plus précisément les tumeurs avec un risque métastatique (Turashvili and Park 2019).

2.2.3 Dépistage et traitement des cancers du col utérin

Le dépistage des lésions (pré)cancéreuses cervicales est essentiel dans le programme de prévention. Les tests les plus utilisés sont un test HPV (immunomarquage p16^{ink4a} et/ou test HPV direct), un co-test HPV/cytologie, un test cytologique (frottis cervico-vaginal) et une inspection visuelle. Si un frottis cellulaire est considéré comme anormal, la patiente doit subir un ensemble de nouveaux tests. Une coloscopie (examen du col à l'aide d'un microscope) ainsi qu'une biopsie de la lésion seront réalisées afin de déterminer la gravité de cette dernière (Schiffman et al. 2016). Pendant des années, le test cytologique était la méthode standard de dépistage des lésions (pré)cancéreuses se développant dans le col de l'utérus. Cependant, la sensibilité de ce test est limitée. Actuellement, l'OMS préconise aux pays d'adopter les tests HPV (tests basés sur la détection de l'ADN d'HPV) plutôt que les tests visuels ou cytologiques pour le dépistage des lésions cervicales. Selon les directives de l'OMS, ce type de dépistage devrait débuter à partir de 30 ans pour la population générale des femmes et à partir de 25 ans pour les femmes vivant avec le VIH (OMS 2021). En Belgique, il est recommandé d'effectuer un frottis cervico-vaginal entre 25 et 65 ans. Ce frottis est remboursé à raison d'une fois tous les 3 ans. Pour les femmes âgées de plus de 30 ans, le test HPV est recommandé mais celui-ci n'est pas remboursé (hpvinfo.be).

Différents types de traitement existent en fonction de la gravité des lésions (pré)cancéreuses et du stade tumoral. Pour les lésions précancéreuses, le premier traitement utilisé est la chirurgie par conisation. Cette procédure consiste en une ablation chirurgicale en forme de cône reprenant une partie de l'endocol et de l'exocol. Si les lésions sont plus importantes et avancées, une trachélectomie (suppression du col, de la partie supérieure du vagin et certains ganglions pelviens) ou une hystérectomie (suppression de l'entièreté de l'utérus ainsi que le col) seront réalisées. Les cancers plus avancés sont traités par radiothérapie (en externe ou en interne) et/ou chimiothérapie (Cisplatine, Carboplatine, Paclitaxel...). Les recommandations pour le traitement des adénocarcinomes sont actuellement les mêmes que pour les

carcinomes épidermoïdes (Marth et al. 2017; IARC 2022). Malgré les progrès réalisés dans le domaine des thérapies contre les cancers du col de l'utérus, le pronostic des patients atteints de formes avancées ou métastatiques reste insatisfaisant. C'est pourquoi, les agents immunothérapeutiques suscitent un fort intérêt. L'un des agents immunothérapeutiques les plus prometteurs est le pembrolizumab, un anticorps anti-PD1. En 2018, la FDA a accordé son approbation pour l'utilisation de ce traitement pour les patients présentant des métastases et ayant déjà reçu une chimiothérapie en première ligne. D'autres essais cliniques ont été menés dans le but d'intégrer l'immunothérapie dans la prise en charge des patients. Par exemple, une combinaison d'ipilimumab (anti-CTLA4) et du nivolumab (anti-PD1) ont été testées en phase clinique pour traiter les patients présentant des métastases et ayant déjà reçu une thérapie ultérieure (Sherer et al. 2022; Schmidt et al. 2022).

2.3 Autres cancers HPV induits

2.3.1 Cancers du canal anal

Avec une estimation de 50 865 nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2020, l'incidence du cancer du canal anal a fortement augmenté depuis les années 80 (Sung et al. 2021). Le canal anal est un organe composé d'une partie proximale recouverte d'un épithélium glandulaire, d'une jonction anorectale et d'une partie distale caractérisée par un épithélium de type épidermoïde. Deux principaux types de cancers peuvent s'y développer : le carcinome épidermoïde (le plus commun) et l'adénocarcinome (très rare) (Sundel et al. 2019).

Les facteurs de risque du carcinome épidermoïde du canal anal sont le nombre de partenaires sexuels, le virus HIV, le tabac et le virus HPV ($\approx 85\%$ des cas). De la même façon que pour le col de l'utérus, la zone de jonction est un endroit vulnérable aux infections par HPV (principalement pour HPV16 et HPV18). De même, le cycle viral et la progression tumorale se déroulent de façon similaire (Roveda and Smith 2019). Une petite proportion ($<15\%$) de carcinomes épidermoïdes sont HPV négatifs. Ces cancers présentent des mutations p53 plus fréquentes (environ 50%) que les HPV positifs (Zhu et al. 2021). Le statut HPV/p16^{ink4a} négatif ainsi que les mutations p53 sont des facteurs de mauvais pronostic pour la survie des patients atteints d'un carcinome épidermoïde du canal anal (Bruyère et al. 2021). Pour ce qui est du traitement de ces tumeurs, les stades précoces sont excisés chirurgicalement alors que la plupart des autres stades tumoraux sont traités par radio/chimiothérapie. La chimiothérapie la plus utilisée est le 5-FU (*5-Fluorouracil*) en combinaison avec un autre agent cytotoxique comme le MMC (*Mitomycin C*). Bien que les tumeurs HPV positives répondent clairement mieux aux traitements radio/chimiothérapeutiques que les tumeurs HPV négatives (Bruyère et al. 2021), le statut HPV n'influence toujours pas la prise en charge des patients (Rao et al. 2021; Turchan and Liauw 2021).

Bien moins étudiés que les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes du canal anal sont des tumeurs agressives. Le pouvoir pathogène d'HPV dans ce type de tumeur reste peu clair même si plusieurs études démontrent la présence de ce virus dans une proportion des adénocarcinomes (environ 40%) (Herfs et al. 2018; Silva Dalla Libera et al. 2019). Du fait de leur rareté, aucune recommandation pour la gestion de ces cancers n'a été définie et ces tumeurs sont généralement traitées comme les adénocarcinomes du rectum (Rao et al. 2021).

2.3.2 Cancers du pénis

Le cancer du pénis compte 35 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde. La plus grande majorité de ces cancers sont des carcinomes épidermoïdes (dans 95% des cas) et les facteurs de risque associés sont le tabac, le phimosis (rétrécissement de l'extrémité du prépuce) avec inflammation chronique ainsi que le virus HPV (dans 50% des cas) (Hakenberg et al. 2018). Depuis 2016, l'OMS a adapté la classification des carcinomes épidermoïdes du pénis en fonction de leur statut HPV (basé sur l'utilisation de p16^{ink4a} comme biomarqueur). Cette classification était auparavant uniquement basée sur la morphologie de la tumeur (Moch et al. 2022). Les cancers péniens HPV négatifs sont caractérisés par des mutations p53 et sont, au même titre que les cancers HPV négatifs de l'anus, associés à un pronostic défavorable (Kashofer et al. 2017; Hrudka et al. 2023). Au niveau des traitements utilisés, la radiothérapie, la chimiothérapie (5-FU) et l'excision restent les traitements de choix. Les techniques utilisées visent à préserver au maximum le pénis pour la qualité de vie du patient (Van Poppel et al. 2013). Parallèlement, des essais cliniques explorant l'immunothérapie en tant que traitement complémentaire pour les patients présentant des tumeurs à un stade avancé sont en cours. Ces thérapies utilisent des anti-PD1 tels que le Pembrolizumab et le nivolumab (Chahoud, Kohli, and Spiess 2021). Bien que l'OMS prenne en considération le statut HPV des tumeurs péniennes, les traitements ne sont pas adaptés en fonction de la présence ou non du virus. Cependant, il est intéressant de souligner que des études et des essais cliniques récents ont exploré le ciblage des protéines E6 ou E7 d'HPV en tant qu'approche thérapeutique potentielle (ex : la thérapie par lymphocytes T adoptifs) (Chahoud, Kohli, and Spiess 2021).

2.3.3 Cancers de la vulve et du vagin

2.3.3.1 Cancers du vagin

Les tumeurs primaires du vagin sont assez rares et constituent 1 à 2% des cancers de l'appareil génital chez la femme. Dans ces tumeurs primaires, on observe que 90% d'entre elles sont des carcinomes épidermoïdes, tandis que les 10% restants sont des adénocarcinomes (Adams, Rogers, and Cuello 2021). Les facteurs de risques associés aux carcinomes épidermoïdes du vagin sont comparables à ceux des cancers du col de l'utérus. HPV joue un rôle étiologique dans ces cancers, contribuant à environ 70% des cas (Daling et al. 2002). Pour les adénocarcinomes, certains sous-types (comme l'adénocarcinome à cellules claires) sont associés à une exposition *in utero* au DES (*Diéthylstilbestrol*) (Keller et al. 2001). Une implication du virus HPV dans les adénocarcinomes a également été décrite (Shibata et al. 2013). De manière similaire aux patients atteints d'un cancer de l'anus ou du pénis, une étiologie virale est associée à un meilleur pronostic des patients (Christina L. Rasmussen et al. 2021).

Au niveau du traitement des cancers du vagin, celui-ci dépend du stade tumoral et de l'âge de la patiente, car les fonctions sexuelles et reproductives sont impactées. La chirurgie est assez limitée, la radiothérapie et brachythérapie (radiothérapie en interne) sont préférées pour les tumeurs avancées. La radio/chimiothérapie et la chimiothérapie seule sont également utilisées pour certains cas (Adams, Rogers, and Cuello 2021; Jhingran 2022).

2.3.3.2 Cancers de la vulve

De façon similaire aux cancers du vagin, les cancers de la vulve sont rares et n'excèdent pas 4% de l'entièreté des cancers de l'appareil génital féminin. La plupart des cancers de la vulve

surviennent principalement au niveau des lèvres. Plus de 80% des cas de cancer de la vulve se manifestent sous la forme de carcinomes épidermoïdes, tandis que les autres types de cancers comprennent des mélanomes, des carcinomes basocellulaires et des carcinomes verruqueux (Olawaiye, Cuello, and Rogers 2021). Depuis 2020, l'OMS classe les carcinomes épidermoïdes de la vulve comme dépendants ou indépendants à une infection par HPV. Les lésions HPV dépendantes sont détectées chez les jeunes patientes (40% des cas). Tandis que chez les patientes ménopausées, les carcinomes épidermoïdes sont plus souvent HPV-indépendants et dans ce cas-ci, le facteur de risque le plus commun est le lichen scléreux (Ueda et al. 2011). A noter qu'en prenant le statut p53 en considération, les tumeurs HPV-indépendantes peuvent être divisées en p53 normal ou muté (Christina Louise Rasmussen et al. 2018; Carreras-Dieguez et al. 2023).

Le traitement le plus utilisé pour les carcinomes épidermoïdes vulvaires est l'excision chirurgicale. Une radio/chimiothérapie est également utilisée pour les stades avancés (Merlo 2020).

2.3.4 Cancers de la tête et du cou

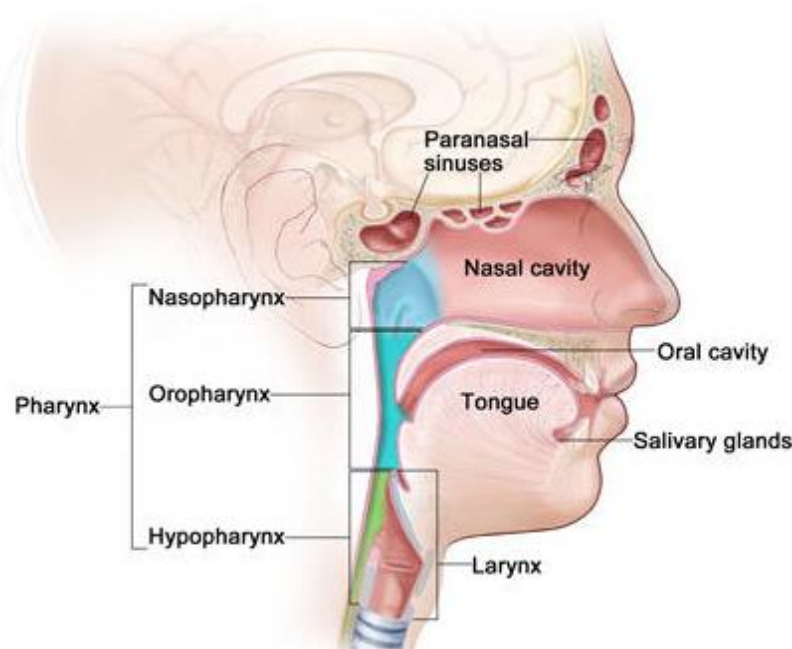


Figure 22: Anatomie de la sphère ORL. Ensemble des régions sous l'appellation tête et cou. Image provenant du site NIH : Head and Neck Cancers (<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>).

L'appellation « cancers de la tête et du cou » reprend en réalité les carcinomes épidermoïdes de la cavité orale, du pharynx, du larynx, des sinus paranasaux, de la cavité nasale et des glandes salivaires (Figure 22). Les cancers de la tête et du cou sont assez fréquents et représentent plus de 660 000 nouveaux cas et 325 000 décès annuellement dans le monde. Les principaux facteurs de risque de ces cancers sont le tabac et l'alcool. Toutefois, une tendance alarmante émerge au cours des dernières années : l'augmentation des cas liés à l'infection par HPV. Le virus est désormais identifié comme un contributeur majeur, étant impliqué dans 10 à 30% des cas de cancers de la tête et du cou et ce pourcentage peut atteindre 50% dans le cas spécifique des cancers de l'oropharynx. De façon intéressante, la diversité des génotypes d'HPV retrouvés dans les cancers de la tête et du cou est beaucoup

plus faible qu'au niveau des cancers du col. En effet, 90 à 95% des cancers HPV-induits de la sphère oropharyngée, sont causé spécifiquement par HPV16 (Fakhry et al. 2020; Gormley et al. 2022).

De façon similaire aux cancers de l'anus, les carcinomes de l'oropharynx HPV-positifs sont de meilleur pronostic par rapport aux cancers HPV-négatifs (Ang et al. 2010). Par cette observation, la 8^e édition de l'*AJCC (American Joint Committee on Cancer) Staging Manual* a été mise à jour, intégrant le statut HPV des tumeurs. Cette considération joue un rôle essentiel dans la distinction des stades tumoraux. La méthode de détection d'HPV utilisé est le biomarqueur p16^{ink4a} (Lydiatt et al. 2017; Tanaka and Alawi 2018). Comme observé pour les cancers de la vulve ou de l'anus, les cancers HPV-négatifs de l'oropharynx sont fréquemment mutés pour le gène *TP53*, ce qui est associé à un pronostic moins favorable (Shinohara et al. 2014).

En ce qui concerne les traitements de ces types de cancers (selon les recommandations ESMO), leur approche dépend étroitement de la localisation anatomique de la tumeur, des facteurs de risque associés et du stade tumoral. L'ajout du statut HPV des tumeurs dans leur classification joue un rôle clé dans l'adaptation des traitements recommandés. La plupart des stades précoces sont traités par chirurgie conservatrice ou radiothérapie. Pour les tumeurs de stades avancés, une radio et/ou chimiothérapie sont réalisées post-chirurgie. Au vu du pronostic plus favorable des tumeurs HPV-induites, il y a une tendance à réduire l'intensité des traitements administrés, ce qui se traduit par une diminution des doses de radiothérapies et chimiothérapies. En parallèle aux approches thérapeutiques conventionnelles, le pembrolizumab (anti-PD1), a reçu l'approbation de la FDA en 2016 pour son utilisation en tant que traitement, soit en monothérapie soit en association avec d'autres thérapies, chez les patients métastatiques dont la tumeur (primaire ou métastase) exprime PD-L1. Le nivolumab, un inhibiteur de PD1, a également été approuvé par la FDA pour les patients avec des métastases et initialement sous traitement au Platiniun (Hay and Nixon 2018; Machiels et al. 2020; Huang et al. 2022; Gribb, Wheelock, and Park 2023).

2.4 Vaccins HPV et prévention

Prévenir les infections par HPV par l'utilisation d'un vaccin prophylactique est la stratégie la plus efficace adoptée depuis quelques années. Les vaccins anti-HPV (approuvés par la FDA) actuels utilisent la technologie des VLPs (*Virus-like particles*), c'est-à-dire l'ensemble des protéines L1 formant une capsid virale (sans ADN) et donc sans pouvoir infectieux mais hautement immunogène. Trois vaccins HPV prophylactiques sont approuvés : le vaccin bivalent Cervarix[®] depuis 2006 (GlaxoSmithKline (GSK), London, UK), le quadrivalent Gardasil[®] (depuis 2009) qui est maintenant remplacé par le nonavalent Gardasil9[®] depuis 2014 (Merck, Kenilworth, New Jersey, USA). Ces trois vaccins sont différents dans le nombre de génotypes d'HPV qu'ils peuvent couvrir. Le Cervarix[®] couvre les souches HPV16 et HPV18, le Gardasil[®] fournissait une protection contre HPV6, HPV11, HPV16 et HPV18 et le Gardasil9[®] permet la protection de l'hôte contre les quatre souches du Gardasil[®] quadrivalent et protège également d'HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 et HPV58. Ces vaccins ont démontré leur efficacité à la fois contre les infections provoquant des verrues anogénitales mais aussi contre les infections conduisant au développement de cancers anogénitaux et autres cancers HPV-induits (comme les cancers oropharyngés) (Villa et al. 2005; Garland et al. 2007; Paavonen et al. 2007; Joura et al. 2015; Castellsagué et al. 2015; Chaturvedi et al. 2018).

Dans un premier temps, ces vaccins étaient destinés aux adolescentes entre 9 et 13 ans. Pourtant l'efficacité de ces derniers contre les infections et maladies associées chez l'homme a été largement prouvée (Giuliano et al. 2011; Castellsagué et al. 2015). Les recommandations actuelles sont destinées à toutes personnes (filles et garçons) âgées de 9 à 26 ans. La vaccination pour les adultes entre 27 et 45 ans n'est pas recommandée (non remboursée) car celle-ci est moins efficace due à une plus grande probabilité d'avoir déjà été exposé au virus (Meites et al. 2019). Des études ont également révélé une réduction de la prévalence des génotypes d'HPV inclus dans les vaccins, à la fois dans les populations vaccinées et non vaccinées, ce qui témoigne de l'émergence d'une immunité collective (Markowitz et al. 2019).

En 2022, 125 pays ont mis en place la vaccination anti-HPV pour les filles et 47 pays le font également pour les garçons (source : OMS). La couverture vaccinale à l'échelle mondiale est estimée à seulement 13%. Alors que la plupart des pays développés ont mis en place un programme de vaccination, cette initiative n'a pas encore été adoptée dans de nombreux pays en voie de développement. Cette disparité continue d'engendrer une couverture vaccinale mondiale insuffisante, une réalité qui persiste à ce jour. En Belgique, 66.8% des femmes ont une immunisation complète contre HPV en 2018. La stratégie de l'OMS pour l'élimination du cancer du col est d'adopter une couverture vaccinale de 90% pour 2030 (Spayne and Hesketh 2021).

3. L'œsophage et sa cancérisation

3.1 Anatomie et histologie

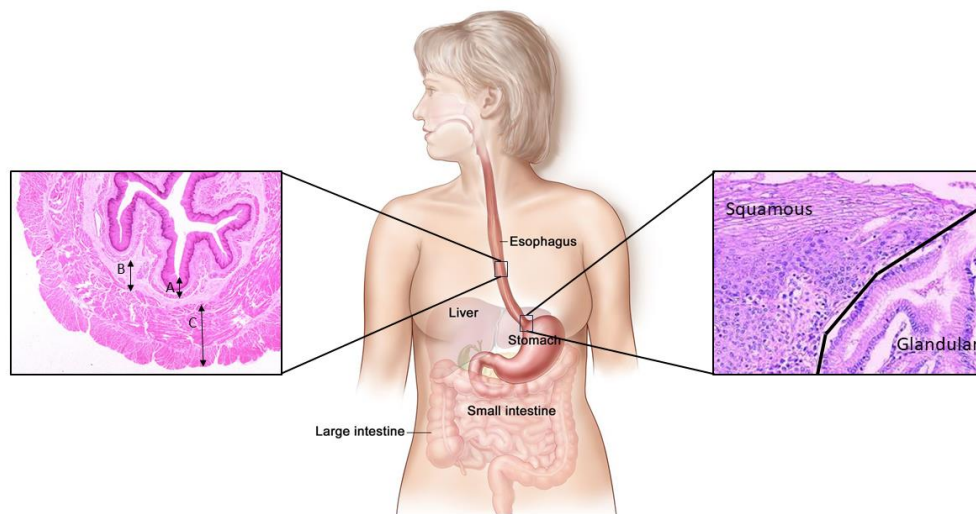


Figure 23: Représentation anatomique et histologique d'un œsophage normal. À gauche : coupe histologique transversale d'un œsophage. (A) la muqueuse (B) la sous-muqueuse et (C) la musculuse. À droite : coupe histologique au niveau de la jonction gastro-œsophagienne. Image adaptée de www.cancer.gov et medcell.org.

Appartenant au système digestif, l'œsophage est un tube musculaire d'une longueur de plus ou moins 25cm. Il contient 2 sphincters : le sphincter supérieur (situé entre le pharynx et le début du tube œsophagien) et le sphincter gastro-œsophagien (à l'embouchure de l'estomac). Le rôle de l'œsophage est de transporter les liquides et la nourriture jusqu'à l'estomac ainsi que de prévenir les reflux gastro-œsophagiens (Goyal and Chaudhury 2008).

Anatomiquement parlant, l'œsophage peut être séparé en 3 tiers : le tiers supérieur, dit œsophage cervical, le tiers médian (œsophage thoracique) et le tiers inférieur appelé œsophage abdominal. La fin de l'œsophage contient une jonction gastro-œsophagienne représentée macroscopiquement comme une ligne en zigzag (Ugalde, Pereira, and Araujo 2011; Oezcelik and DeMeester 2011).

D'un point de vue histologique, la structure de l'œsophage se compose de plusieurs couches distinctes. La muqueuse, qui englobe l'épithélium, la *lamina propria* et la *muscularis mucosae*, est suivie par la sous-muqueuse, constituée de tissu conjonctif, la musculuse (interne et externe) et de l'adventice. La muqueuse de l'œsophage contient un épithélium pluristratifié de type épidermoïde. A noter que la *muscularis mucosae* est absente dans le tiers supérieur de l'œsophage (DeNardi and Riddell 1991). La jonction gastro-œsophagienne représente la limite entre l'épithélium épidermoïde et l'épithélium gastrique (Nakanishi 2006) (Figure 23).

3.2 Cancers de l'œsophage

3.2.1 Épidémiologie

Le cancer de l'œsophage est le 7^e cancer le plus diagnostiqué dans le monde et comptait en 2020, 604 000 nouveaux cas et 544 000 décès. Les régions les plus impactées par ce cancer sont l'Asie et l'Afrique du Sud-Est (GLOBOCAN 2020) (Figure 24). Au niveau de la répartition par sexe, environ 70% des cas de cancer détectés sont retrouvés chez l'homme. Toutefois, ce pourcentage varie en fonction des régions géographiques (C.-Q. Liu et al. 2023).

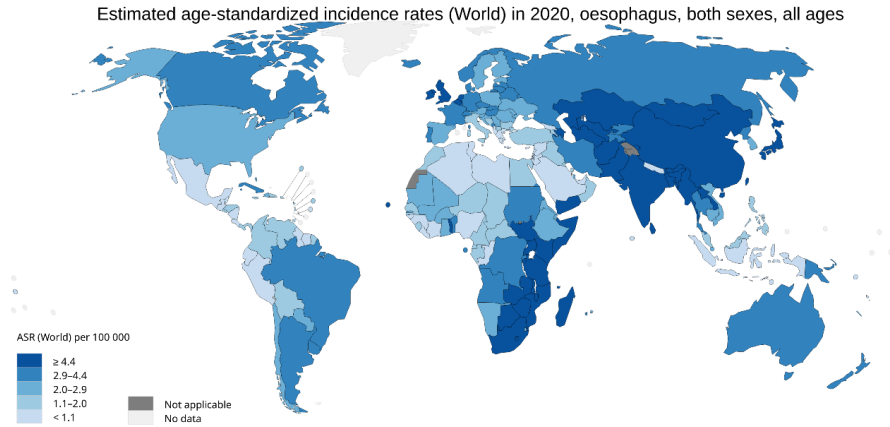


Figure 24: Représentation de l'incidence des cancers de l'œsophage dans le monde pour 100 000 individus (GLOBOCAN 2020).

Deux principaux types de cancers peuvent être observés au niveau de l'œsophage : le carcinome épidermoïde (ESCC) et l'adénocarcinome (EAC). L'ESCC est la forme de cancer la plus prédominante dans le monde notamment en Asie et dans le sud de l'Afrique. Tandis que l'EAC est moins fréquent, bien que son incidence ait fortement augmenté au cours des dernières années dans les régions développées comme les États-Unis et l'Europe (E. Morgan et al. 2022) (Figure 25). D'autres types de cancers (rares) peuvent se développer au niveau de l'œsophage comme des sarcomes, des carcinomes à petites cellules ou encore des lymphomes ou mélanomes (C.-Q. Liu et al. 2023). Ces cancers ne seront pas discutés dans la suite de ce travail.

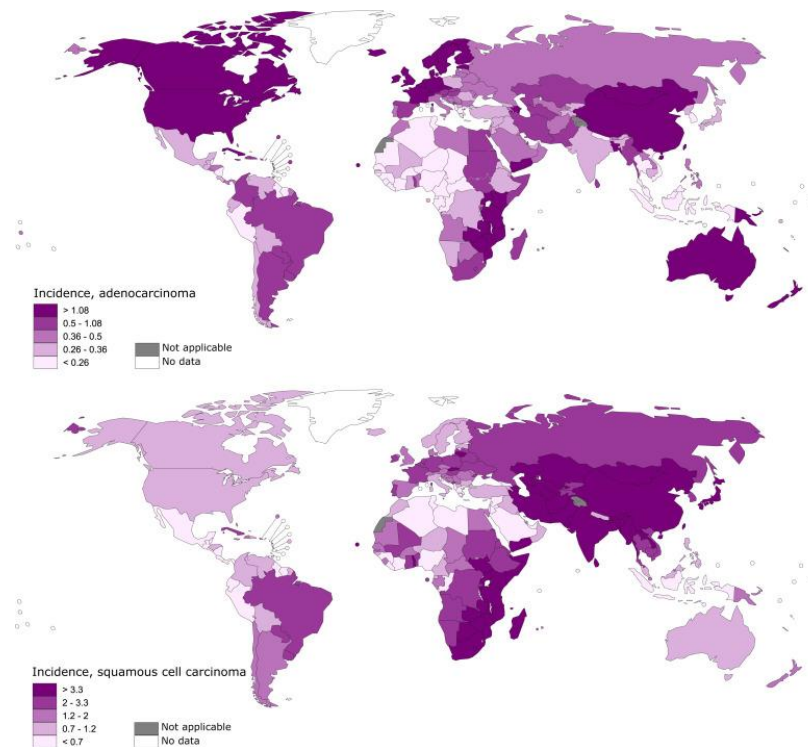


Figure 25: Représentation de l'incidence des adénocarcinomes de l'œsophage (en haut) et des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage (en bas) dans le monde pour 100 000 individus en 2020 (E. Morgan et al. 2022).

3.2.2 Le carcinome épidermoïde de l'œsophage

3.2.2.1 Facteurs de risque

Le carcinome épidermoïde est le cancer le plus fréquent (environ 80% des cas) au niveau de l'œsophage. Il se localise principalement dans les tiers supérieurs et médians de l'œsophage (Obermannová et al. 2022). Cette maladie multifactorielle a deux principaux facteurs de risques associés : l'alcool et le tabac. D'autres facteurs comme la consommation de viandes rouges, la consommation de boissons très chaudes en grande quantité, la faible consommation de fruits et légumes, la déficience en vitamines (A,B et C), le statut socioéconomique pauvre ainsi qu'une mauvaise hygiène buccale pourraient également augmenter le risque de développer un carcinome épidermoïde de l'œsophage (Qu, Ben, and Jiang 2013; C. Yu et al. 2018; Businello et al. 2020).

3.2.2.2 Lésions précancéreuses et carcinogénèse

Malgré une détection souvent tardive, les lésions précancéreuses de carcinome épidermoïde peuvent être diagnostiquées par endoscopie. De façon similaire au carcinome épidermoïde du col utérin, l'ESCC se développe à partir d'une séquence progressive : hyperplasie, dysplasie de bas grade, dysplasie de haut grade (comprenant le carcinome *in situ*) et finalement carcinome épidermoïde invasif (Alfred King-yin Lam 2021). Lors d'une dysplasie de bas grade, des atypies nucléaires (hyperchromatisme, pléomorphisme) et des atypies architecturales (maturation anormale de l'épithélium) sont présentes et limitées à la partie inférieure de l'épithélium. Pour une dysplasie de haut grade, ces atypies s'étendent dans la partie supérieure de l'épithélium (G.-Q. Wang et al. 2005)(Figure 26).

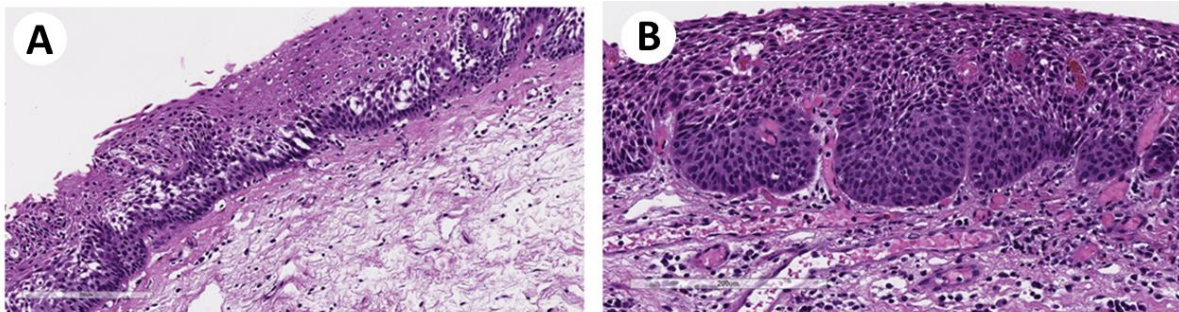


Figure 26: Coupes histologiques (Hématoxyline et éosine) d'une dysplasie de bas grade (A) et d'une dysplasie de haut grade (B) de l'œsophage. Image adaptée à partir de (Alfred King-yin Lam 2021).

La carcinogénèse de l'ESCC à partir d'un épithélium épidermoïde hyperplasique est caractérisée par des altérations génomiques, épigénétiques et post-transcriptionnelles induites par le tabac et la consommation d'alcool. Le gène *TP53* est très souvent muté dans ce type de cancer (entre 60 et 80% des cas). C'est également le cas pour d'autres gènes contrôlant le cycle cellulaire (environ 20-30% des ESCC) comme *CDKN2A* (gène codant pour la protéine p16^{ink4a}), *CDK4/CDK6*, *PIK3CA* et *PTEN*. Les gènes *NOTCH1* et *3* de la voie NOTCH contrôlant notamment la différenciation cellulaire apparaissent mutés dans 30% des ESCC. En plus des mutations, l'amplification de gènes causant l'activation de certains proto-oncogènes est un phénomène courant dans la carcinogénèse de l'ESCC. L'amplification de *EGFR*, *SOX2*, *TP63* ou encore *MYC* sont des altérations génétiques retrouvées (Taghavi et al. 2010; Y. Song et al. 2014; The Cancer Genome Atlas Research Network 2017; X. C. Li et al. 2018; Businello et al. 2020; S. Moody et al. 2021; Jin et al. 2023).

Au niveau des changements épigénétiques et post-transcriptionnels, la méthylation d'ADN, les modifications d'histones et l'altération des miRNAs (ARN non codant régulant l'expression de gènes par modifications post-transcriptionnelles) sont des mécanismes souvent retrouvés dans ce type de cancer. Les promoteurs de *CDKN2A* et d'*APC* sont hyperméthylés dans environ 50% et 30% des ESCC respectivement (Zare et al. 2009; Taghavi et al. 2010). Parallèlement, les modifications d'histones telles qu'une dérégulation de la méthylation des histones (dérégulation de H3K4me3, H3K9me3 et H4K20me3) sont associées au processus de cancérisation (M. Zhou et al. 2019). En ce qui concerne les miRNAs, leur dérégulation peut entraîner soit des surexpressions soit des sous-expressions protéiques. En fonction du type de miRNA dérégulé, les gènes qu'ils régulent seront impactés et, par conséquent, un impact sur une fonction cellulaire associée. Par exemple, le dérèglement de miR-21 impactera la prolifération cellulaire en modulant le niveau d'expression de *PTEN* (P. Li et al. 2013). L'ensemble de ces altérations génétiques, épigénétiques et post-transcriptionnelles conduisent à la formation d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage (Figure 27).

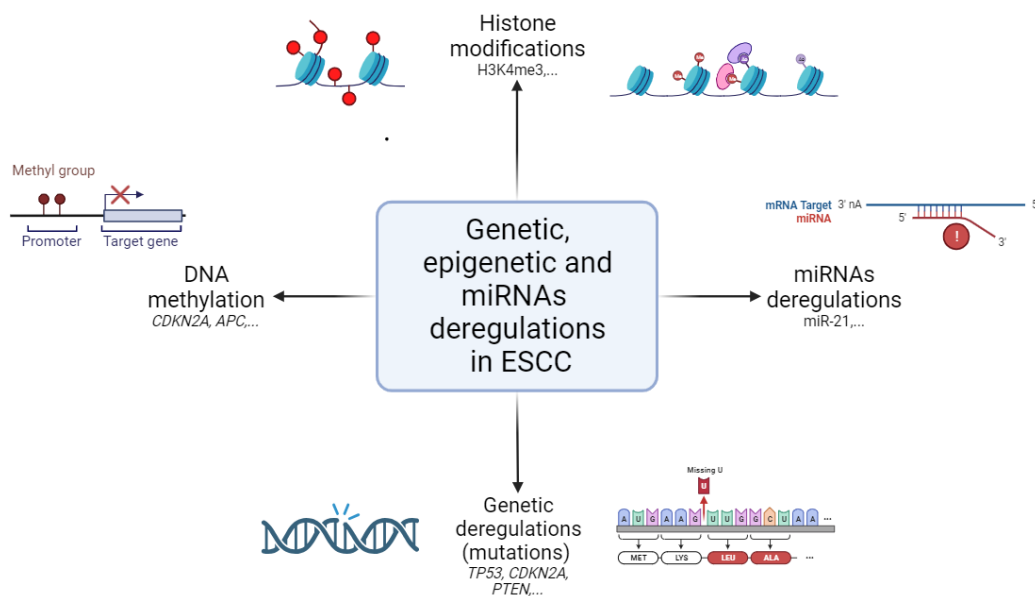


Figure 27: Représentation des dérégulations génétiques, épigénétiques et des miRNAs retrouvées lors de la carcinogenèse du carcinome épidermoïde de l'œsophage. Image réalisée à partir de BioRender.

3.2.2.3 Sous-types et différenciations des carcinomes épidermoïdes

Au niveau des carcinomes épidermoïdes, trois sous-types assez rares existent en plus du type « conventionnel » (Alfred King-yin Lam 2021):

- Le carcinome épidermoïde basaloïde représente 1 à 11% des carcinomes épidermoïdes et est considéré comme un variant d'un carcinome épidermoïde faiblement différencié. Son apparence ressemble aux cellules basales d'un épithélium épidermoïde. Ce type de cancer pourrait être associé à un mauvais pronostic (H. Song et al. 2021).
- Le carcinome épidermoïde à cellules fusiformes (*Spindle cell carcinoma*) est une tumeur rare aussi appelée carcinome sarcomatoïde ou carcinosarcome. Cette tumeur comprend des composantes épithéliales et mésenchymateuses (Baihua Zhang et al. 2016).

- Le carcinome verruqueux est défini comme un carcinome épidermoïde bien différencié avec des projections papillaires à la surface d'un bulbe. Cette tumeur est extrêmement rare (Alfred K. Lam 2020).

Ces deux derniers sous-types de tumeur ne seront pas abordés dans la suite de ce travail.

Les carcinomes épidermoïdes peuvent se trouver sous différents degrés de différenciation. Ces différenciations dépendent de caractéristiques cytologiques (atypies cellulaires, activité mitotique et étendue de la kératinisation) ainsi que de la ressemblance avec l'épithélium normal épidermoïde. La tumeur peut être définie comme bien différenciée (*well-differentiated*) lorsque la tumeur ressemble à la muqueuse épidermoïde normale et présente une forte kératinisation ainsi que peu d'activité mitotique. Elle peut être moyennement différenciée (*moderately-differentiated*) lorsque la tumeur est moins kératinisée avec des activités mitotiques plus importantes et que l'architecture normale de la muqueuse commence à se perdre. Finalement, la tumeur peut être définie comme faiblement différenciée (*poorly-differentiated*) lorsque celle-ci présente des activités mitotiques importantes, très peu de kératinisation et que l'architecture normale est complètement perdue (Alfred K. Lam 2020) (pour des illustrations, voir la partie résultat 1.1.2).

3.2.3 L'adénocarcinome de l'œsophage

3.2.3.1 Facteurs de risque

L'adénocarcinome est le deuxième cancer le plus présent au niveau de l'œsophage. Ce type de cancer se retrouve dans la partie inférieure et plus précisément au niveau de la jonction gastro-œsophagienne. L'augmentation de l'incidence de ce type de cancer dans les pays développés, tels que les États-Unis, est directement liée à des facteurs de risque associés : le reflux gastro-œsophagien chronique (*GERD : gastroesophageal reflux disease*) et à l'obésité (Schlottmann, Dreifuss, and Patti 2020). Le reflux gastro-œsophagien peut être favorisé par plusieurs facteurs tels que l'obésité, le tabac et la consommation d'aliments épicés et chauds. Ces facteurs contribuent au développement d'une hernie hiatale, à une relaxation du sphincter inférieur de l'œsophage et à une augmentation de l'acidité gastrique entraînant ainsi un reflux chronique (X.-Q. Ma et al. 2009; Katzka and Kahrilas 2020). Malgré une controverse importante, l'infection par *Helicobacter pylori* (agent pathogène causant le cancer de l'estomac) semble être associée à une diminution du risque de développement d'adénocarcinome (Xie et al. 2013; Gao et al. 2019).

Une modification du mode de vie tels qu'une réduction de la consommation alimentaire susceptible de déclencher le reflux gastrique, une perte de poids et l'utilisation de traitement antiacide peut contribuer à réduire le reflux gastro-œsophagien et diminuer le risque de développer un œsophage de Barrett pouvant progresser en cancer (Katzka and Kahrilas 2020).

3.2.3.2 Œsophage de Barrett

L'adénocarcinome trouve son origine dans la transformation d'un œsophage de Barrett (BE) lui-même provoqué par un reflux gastro-œsophagien chronique. L'œsophage de Barrett constitue une métaplasie : processus de transformation de l'épithélium épidermoïde de l'œsophage en un épithélium glandulaire. D'un point de vue macroscopique, la muqueuse de l'œsophage de Barrett contient des patchs de couleur « rose saumon » qui proviennent de la jonction gastro-œsophagienne (Figure 28). D'un point de vue histologique, le BE est composé de glandes avec des cellules mucineuses (de l'estomac) et des cellules intestinales (cellules

caliciformes, parfois des entérocytes, cellules endocrines et de Paneth). Les muqueuses peuvent être de type intestinal, cardiaque et fundique. La proportion de ces cellules et des types de muqueuses est variable mais une prédominance de la muqueuse intestinale et des cellules caliciformes est généralement présente. Cependant, le diagnostic histologique peut présenter des variations, étant tributaire de l'institut qui le détermine ainsi que du niveau de risque associé à la progression vers un cancer. L'ACG (*American College of Gastroenterology*) définit l'œsophage de Barrett comme un épithélium cylindrique métaplasique uniquement de type intestinal (avec des cellules caliciformes) qui recouvre un épithélium stratifié squameux. Il considère que la métaplasie intestinale est le seul type de métaplasie à être prédisposé à la formation d'un cancer. Alors que la BSG (*British Society of Gastroenterology*) suggère que la présence d'une métaplasie de type intestinal avec des cellules caliciformes n'est pas exclusive et que l'œsophage de Barrett représente tout remplacement de l'épithélium squameux distal normal par un épithélium cylindrique métaplasique visible par endoscopie et confirmé par biopsie. Quant à l'ESGE (*European Society of Gastrointestinal Endoscopy*), elle considère également la présence de métaplasie intestinale dans le diagnostic de l'œsophage de Barrett (Fitzgerald et al. 2014; Shaheen et al. 2016; Naini, Souza, and Odze 2016; Weusten et al. 2017; L. Zhang et al. 2021) (Figure 28).

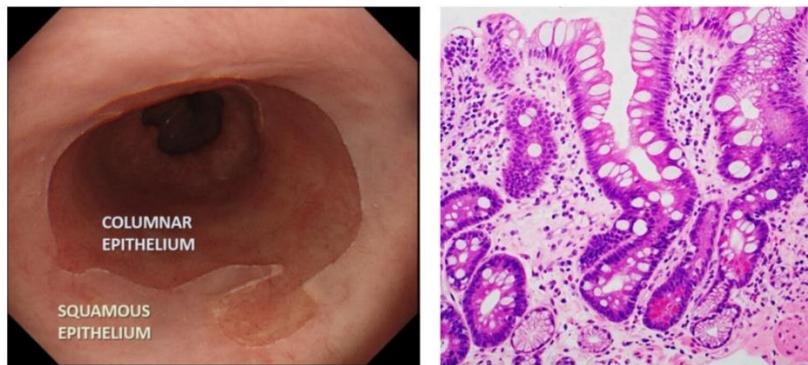


Figure 28: Représentation de l'œsophage de Barrett. (À gauche) Apparence anatomique du BE : transition entre la partie rose clair (épithélium épidermoïde) et la partie rose saumon (épithélium glandulaire). (À droite) Représentation histologique du BE (hématoxyline et éosine) : épithélium de type glandulaire composé de cellules caliciformes et d'autres cellules glandulaires. Images provenant des articles suivants : (Naini, Souza, and Odze 2016; Januszewicz and Fitzgerald 2019).

L'origine cellulaire de la formation de l'œsophage de Barrett reste un sujet controversé, malgré l'existence de nombreuses hypothèses. Par conséquent, plusieurs explications ont été avancées quant à l'origine potentielle du BE (Figure 29) :

1. une transdifférenciation directe des cellules épidermoïdes natives en cellules glandulaires. Cependant, très peu de données expérimentales expliquent ce concept (W.-Y. Yu, Slack, and Tosh 2005; Que et al. 2019).
2. une reprogrammation de cellules souches épidermoïdes de l'œsophage en cellules glandulaires. Cette reprogrammation serait médiée par Cdx1 et Cdx2 (*Caudal-related homeobox*), deux facteurs de transcription important dans le développement, la différenciation et le maintien du phénotype de l'épithélium intestinal normal. Ces facteurs ne sont pas présents dans l'épithélium œsophagien normal. Cependant, l'environnement inflammatoire causé par le reflux gastro-œsophagien activerait ces deux facteurs via la voie NFκB et permettrait la formation de métaplasie intestinale. La

protéine BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) jouerait également un rôle dans la transformation de l'épithélium épidermoïde en épithélium glandulaire (Milano et al. 2007; Souza, Krishnan, and Spechler 2008; Herfs, Hubert, and Delvenne 2009; Poehlmann et al. 2012).

3. une invasion de cellules souches pluripotentes circulantes provenant de la moelle osseuse. Ces cellules seraient recrutées dans l'œsophage et contribueraient à sa régénération et à la formation de la métaplasie (Sarosi et al. 2008). Cette théorie est toutefois très peu probable.
4. la présence de cellules souches dans les glandes sous muqueuses et canaux excréteurs capables de servir de cellules progénitrices et d'être activées lorsque l'épithélium de l'œsophage est agressé par le reflux gastrique (Lörinc and Öberg 2012).
5. la présence d'une population de cellules progénitrices embryonnaires (exprimant le marqueur glandulaire kératine 7 mais pas les marqueurs squameux kératine 14 et p63) résidant dans la jonction gastro-œsophagienne capable de migrer dans la zone soumise au reflux et d'initier la métaplasie de Barrett (X. Wang et al. 2011). D'autres cellules progénitrices de jonction appelée « cellules basales transitionnelles » exprimant à la fois les marqueurs squameux kératine 5 et p63 et le marqueur glandulaire kératine 7 ont aussi été mentionnées comme étant à l'origine de la formation de l'œsophage de Barrett (Jiang et al. 2017).
6. une migration de cellules souches provenant de l'épithélium gastrique. La métaplasie peut contenir des cellules gastriques mais cette hypothèse n'expliquerait pas la présence de cellules caliciformes (Quante et al. 2012).

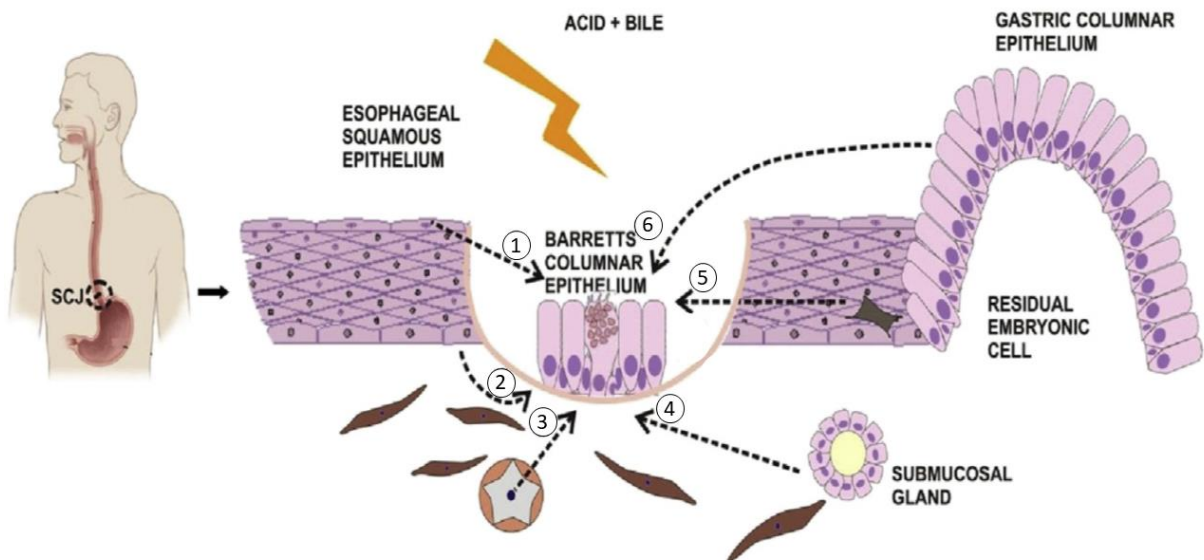


Figure 29: Représentation des différentes hypothèses sur l'origine cellulaire de l'œsophage de Barrett. (1) La transdifférenciation des cellules épidermoïdes matures en cellules glandulaires. (2) La reprogrammation des cellules souches épidermoïdes en cellules glandulaires. (3) L'invasion de cellules souches pluripotentes circulantes provenant de la moelle osseuse. (4) Les cellules souches des glandes sous muqueuse et canaux excréteurs. (5) Les cellules embryonnaires résiduelles dans la jonction gastro-œsophagienne. (6) La migration des cellules souches de l'épithélium gastrique. Image adaptée à partir de (Kapoor, Agrawal, and Mittal 2015).

3.2.3.3 Lésions précancéreuses et carcinogénèse

La métaplasie est un processus réversible pour autant que le reflux chronique s'arrête. Si celui-ci persiste, la métaplasie est un endroit préférentiel pour le développement de dysplasies et la formation d'un cancer (processus connu au niveau du col utérin). Les dysplasies comprennent des changements architecturaux comme une distorsion des glandes, des extensions papillaires dans la lumière des glandes et des changements cytologiques tels qu'une augmentation du ratio nucléo-cytoplasmique et des anomalies mitotiques. En fonction du degré des anomalies, on parlera de dysplasie de bas grade et de haut grade. Les dysplasies seront réséquées par endoscopie (Fléjou 2005; Alfred King-yin Lam 2021) (Figure 30).

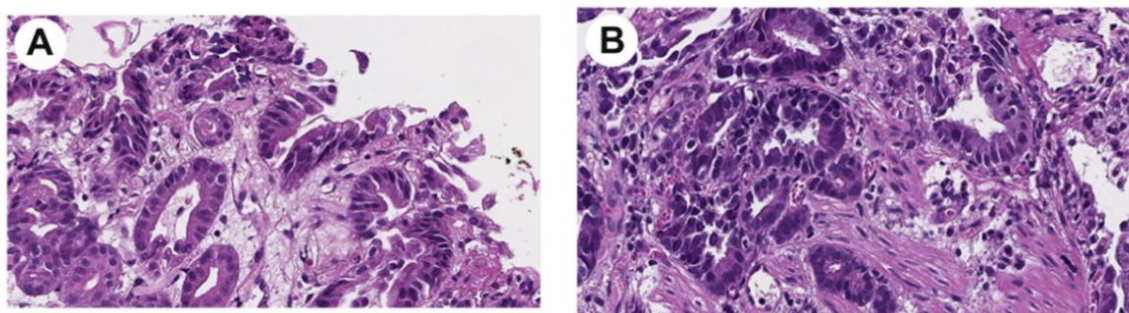


Figure 30: Coupes histologiques (Hématoxyline et éosine) d'une dysplasie de bas grade (A) et d'une dysplasie de haut grade (B) de l'œsophage. Image adaptée à partir de (Alfred King-yin Lam 2021).

L'inflammation joue un rôle important dans le processus de transformation cancéreuse de l'œsophage de Barrett en dysplasies et adénocarcinome. En effet, le reflux gastro-œsophagien et l'acide biliaire induisent une inflammation chronique par le relargage de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL1 β , IL6, IL8 mais aussi IL33. Certaines cytokines (TNF- α , IL1 β et IL8) peuvent activer la voie NF κ B, ce qui induit une dérégulation cellulaire et une altération de l'immunité, une diminution de l'apoptose, une augmentation de la prolifération épithéliale et, *in fine*, une transformation tumorale (O'Riordan et al. 2005; Dvorak et al. 2007; J. Liu et al. 2022). Cette voie NF κ B peut également être directement activée par le reflux gastro-œsophagien chronique et l'acide biliaire (Abdel-Latif et al. 2004). De plus, l'inflammation et le reflux peuvent participer à la formation de ROS ce qui induit d'importants dommages à l'ADN (Sihvo et al. 2002).

Un grand nombre d'altérations génomiques, épigénétiques et post-transcriptionnelles surviennent dans le processus de cancérisation de l'œsophage de Barrett. La mutation génétique la plus fréquente est celle du gène *TP53*. En effet, celle-ci survient dans plus de 70% des adénocarcinomes (S. M. Chung et al. 2007). Cette mutation peut entraîner un doublement du génome, une instabilité chromosomique ainsi que des phénomènes catastrophiques tels que des chromothripsis (réarrangements chromosomiques importants et simultanés causant l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur), des kataegis (modèles d'hypermuation avec des changements C>T et/ou C>G dans les dinucléotides TpC résultant d'activités des protéines APOBEC) et des cycles de BFB (*Breakage-fusion-bridge cycles*) c'est-à-dire une perte des télomères avec une fusion des bouts des chromosomes ou fusion des chromatides sœurs (Nones et al. 2014; Stachler et al. 2015; Maslyonkina et al. 2022; Maslenkina et al. 2023). D'autres gènes peuvent également être fréquemment mutés dans les adénocarcinomes œsophagiens : c'est le cas pour *SMAD4* et *CDKN2A* (Hardie et al. 2005; Gotovac et al. 2021). Les modifications épigénétiques jouent également un rôle très important

dans la carcinogénèse. L'une des modifications épigénétiques les plus retrouvées dans ces cancers est l'hyperméthylation du promoteur de *CDKN2A* dans 85% des adénocarcinomes et plus de 70% dans les œsophages de Barrett (Hardie et al. 2005). Le promoteur d'*APC* est également fréquemment hyperméthylé (dans 70% des adénocarcinomes) ce qui entraîne l'accumulation de β -caténine et l'initiation de la voie WNT (B. Wang et al. 2018). A côté des altérations épigénétiques, les miRNAs peuvent jouer un rôle dans la prolifération et différenciation cellulaire dans le contexte de ce cancer. Certains miRNAs (comme miR215 et miR192) sont dérégulés suggérant un rôle dans la progression cancéreuse du BE (Fassan et al. 2011). L'ensemble de ces événements est lié au processus de cancérisation de l'œsophage de Barrett vers un adénocarcinome (Figure 31).

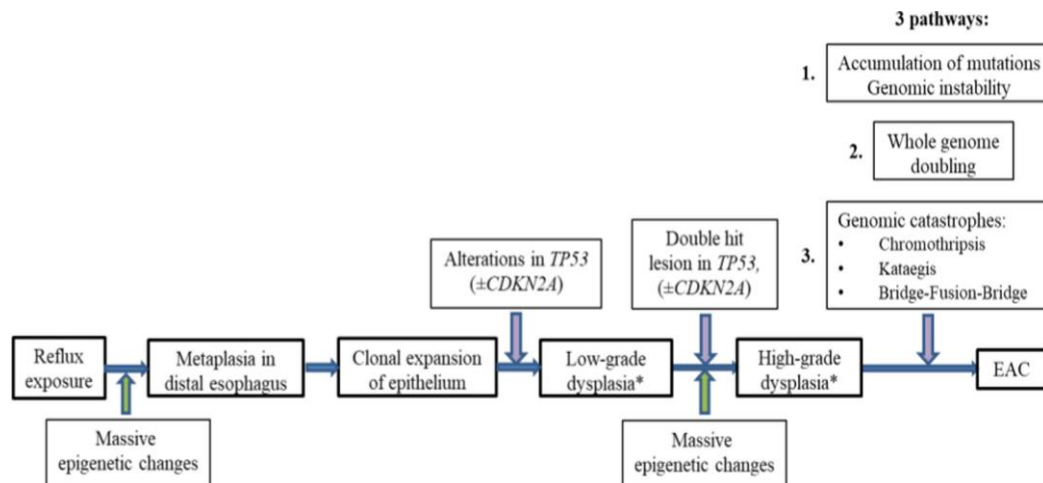


Figure 31: Représentation des événements génétiques et épigénétiques les plus fréquemment retrouvés lors du développement d'un adénocarcinome de l'œsophage. Image provenant de l'article (Maslyonkina et al. 2022).

3.2.3.4 Sous-types et différenciations des adénocarcinomes

L'adénocarcinome peut avoir des caractéristiques histologiques différentes : intestinal, mucineux et en bague à chaton. Ces deux dernières morphologies sont assez rares et plus de 75% des adénocarcinomes sont de type intestinal. A côté de l'adénocarcinome « conventionnel », d'autres rares types d'adénocarcinome peuvent être présents au niveau de l'œsophage. C'est le cas pour le carcinome kystique adénoïde, le carcinome adénosquameux et le carcinome mucoépidermoïde. De par leur forme mixte (présence d'une partie épidermoïde et une partie glandulaire), ceux-ci ne seront pas abordés dans le reste de ce travail (Chirieac et al. 2005; Alfred K. Lam 2018b).

En ce qui concerne la différenciation tumorale, l'adénocarcinome « conventionnel » peut se retrouver sous une forme bien, moyennement ou faiblement différenciée. Cela dépend de l'architecture glandulaire présente et de la facilité à l'identifier. L'adénocarcinome bien différencié contient plus de 95% de glandes correctement formées alors que l'adénocarcinome faiblement différencié a perdu cette architecture glandulaire (Alfred K. Lam 2018a) (pour des illustrations, voir la partie résultat 2.1.2).

3.2.4 Diagnostic et évaluation du stade tumoral des cancers de l'œsophage

La plupart du temps, le cancer est asymptomatique et est détecté tardivement. Bien que non spécifique, une dysphagie, un saignement gastro-intestinal, une perte de poids et une perte d'appétit doivent alerter le patient. Le diagnostic des lésions (pré)cancéreuses est réalisé

initialement par endoscopie. Si une lésion est suspectée, une biopsie ou un broyage cytologique est effectué (Short, Burgers, and Fry 2017). L'utilisation d'une échographie endoscopique (EUS, *Endoscopic ultrasound*), d'un CT (*Computed-tomography*) et/ou d'un FDG-PET (*fluorodeoxyglucose-positron emission tomography*) permet d'affiner le diagnostic et d'établir le stade de la tumeur (Rice, Patil, and Blackstone 2017; Ajani et al. 2023).

Les stades tumoraux des carcinomes épidermoïdes et des adénocarcinomes de l'œsophage sont évalués par la 8^e édition du manuel de l'AJCC/UICC (*American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control*). Ce système utilise la classification TNM afin de déterminer le stade de la tumeur. La classification TNM peut être divisée en 3 catégories : le TNM clinique (cTNM) basé sur une analyse d'images, le TNM pathologique (pTNM) basé sur une analyse de biopsies par les pathologistes et le TNM post thérapie néoadjuvante (ypTNM). En plus des données T (invasion de la tumeur) ; N (infiltration des ganglions lymphatiques) et M (présence de métastases à distance) utilisées pour le cTNM, d'autres critères (spécifiques aux deux types de tumeurs) sont ajoutés afin de déterminer le pTNM. En effet, le critère G détermine la différenciation de la tumeur (bien, moyennement ou faiblement différenciée). Le critère L permet d'identifier la localisation des carcinomes épidermoïdes (Figure 32). Le stade de la tumeur est ensuite évalué en se basant sur ces informations, ce qui permet d'orienter la prise en charge du patient vers un traitement approprié, correspondant au stade spécifique de la tumeur (Rice, Patil, and Blackstone 2017) (Figure 33).

Category	Criteria
T category	
TX	Tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	High-grade dysplasia, defined as malignant cells confined by the basement membrane
T1	Tumor invades the lamina propria, muscularis mucosae, or submucosa
T1a*	Tumor invades the lamina propria or muscularis mucosae
T1b*	Tumor invades the submucosa
T2	Tumor invades the muscularis propria
T3	Tumor invades adventitia
T4	Tumor invades adjacent structures
T4a*	Tumor invades the pleura, pericardium, azygos vein, diaphragm, or peritoneum
T4b*	Tumor invades other adjacent structures, such as aorta, vertebral body, or trachea
N category	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in 1-2 regional lymph nodes
N2	Metastasis in 3-6 regional lymph nodes
N3	Metastasis in 7 or more regional lymph nodes
M category	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
Adenocarcinoma G Category	
GX	Differentiation cannot be assessed
G1	Well differentiated. >95% of tumor is composed of well-formed glands
G2	Moderately differentiated. 50% to 95% of tumor shows gland formation
G3 [†]	Poorly differentiated. Tumors composed of nest and sheets of cells with <50% of tumor demonstrating glandular formation
Squamous cell carcinoma G category	
GX	Differentiation cannot be assessed
G1	Well-differentiated. Prominent keratinization with pearl formation and a minor component of nonkeratinizing basal-like cells. Tumor cells are arranged in sheets, and mitotic counts are low
G2	Moderately differentiated. Variable histologic features, ranging from parakeratotic to poorly keratinizing lesions. Generally, pearl formation is absent
G3 [†]	Poorly differentiated. Consists predominantly of basal-like cells forming large and small nests with frequent central necrosis. The nests consist of sheets or pavement-like arrangements of tumor cells, and occasionally are punctuated by small numbers of parakeratotic or keratinizing cells
Squamous cell carcinoma L category***	
LX	Location unknown
Upper	Cervical esophagus to lower border of azygos vein
Middle	Lower border of azygos vein to lower border of inferior pulmonary vein
Lower	Lower border of inferior pulmonary vein to stomach, including esophagogastric junction

*, subcategories: †, if further testing of "undifferentiated" cancers reveals a glandular component, categorize as adenocarcinoma G3; †, if further testing of "undifferentiated" cancers reveals a squamous cell component, or if after further testing they remain undifferentiated, categorize as squamous cell carcinoma G3; ***, location is defined by epicenter of esophageal tumor.

Figure 32: Catégories et critères associés pour l'établissement des stades des cancers de l'œsophage (TNM) (Rice, Patil, and Blackstone 2017).

cStage group	cT	cN	cM
Squamous cell carcinoma			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0-1	M0
II	T2	N0-1	M0
	T3	N0	M0
III	T3	N1	M0
	T1-3	N2	M0
IVA	T4	N0-2	M0
	T1-4	N3	M0
IVB	T1-4	N0-3	M1
Adenocarcinoma			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
IIB	T2	N0	M0
III	T2	N1	M0
	T3-4a	N0-1	M0
IVA	T1-4a	N2	M0
	T4b	N0-2	M0
	T1-4	N3	M0
IVB	T1-4	N0-3	M1

Figure 33: Ensemble des différents stades tumoraux basé sur le cTNM pour les carcinomes épidermoïdes (en haut) et les adénocarcinomes (en bas) de l'œsophage (Rice, Patil, and Blackstone 2017).

3.2.5 Traitement des cancers de l'œsophage

Le traitement des cancers est déterminé en fonction du type histologique, du stade tumoral clinique et de la localisation de la tumeur. Basé sur les recommandations de pratique clinique ESMO (*European Society for Medical Oncology*), le traitement de choix pour les tumeurs (ESCC et EAC) précoces (cT1 N0 M0) est la chirurgie par résection endoscopique. Les tumeurs avancées localement (cT2-T4 ou cN1-3 M0) seront traitées différemment en fonction du type histologique. Pour les carcinomes épidermoïdes, une radiochimiothérapie est recommandée avant une chirurgie. La chimiothérapie préconisée est la Carboplatine/Paclitaxel ou le FOLFOX (Acid-5FU-Oxaliplatine). Pour les adénocarcinomes, le traitement de choix préopératoire est la combinaison appelée FLOT (5-FU-Leucovorine-Oxaliplatine-Docetaxel) mais la radiochimiothérapie peut également être utilisée dans certains cas. Un traitement au Nivolumab (anti-PD1) peut être administré (pour les deux types histologiques) après chirurgie si des résidus de la maladie sont présents après l'évaluation du ypTNM (Figure 34). Pour les carcinomes épidermoïdes présentant des métastases ou qui ne sont pas résécables, les dérivés platinés et la fluoropyrimidine seront les traitements chimiothérapeutiques de choix. Les adénocarcinomes, eux, seront traités comme une tumeur gastrique (Platinum-fluoropyrimidine puis un anti-PD1 (nivolumab ou pembrolizumab)) (Lagergren et al. 2017; Kato et al. 2019; Obermannová et al. 2022; Lordick et al. 2022).

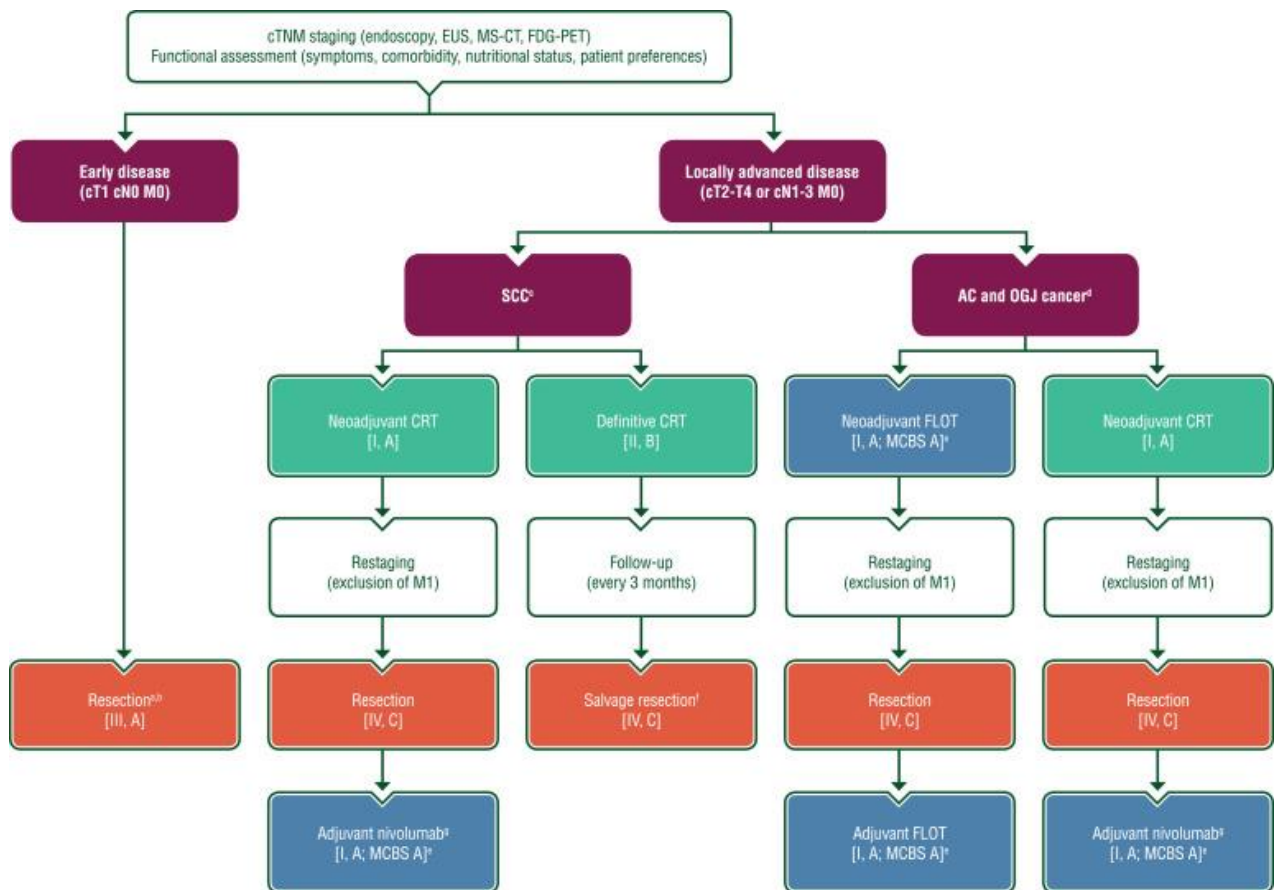


Figure 34: Recommandations ESMO des traitements pour les carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes de l'œsophage (Obermannová et al. 2022).

3.3 HPV et cancers de l'œsophage

L'implication du virus HPV dans les cancers de l'œsophage aussi bien le carcinome épidermoïde que l'adénocarcinome est une source de débat. En effet, en 2007, l'IARC déclare qu'HPV ne joue pas de rôle étiologique dans la carcinogenèse œsophagienne (IARC 2007). Pourtant, au fil des années, le nombre d'articles montrant un lien potentiel entre HPV et les cancers de l'œsophage a augmenté (Rajendra et al. 2017; Wong et al. 2018; Petrelli et al. 2021).

Connaissant le rôle étiologique d'HPV dans une partie des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, il est fort possible qu'HPV participe également à la carcinogenèse d'une fraction des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage. En effet, suggéré depuis 1982 par Syrjänen, une méta-analyse récente a rapporté qu'HPV serait détecté dans 1 cas sur 5 d'ESCC (20%) (Syrjänen et al. 1982; Petrelli et al. 2021; Gormley et al. 2022). Cependant, contrairement à ces affirmations, certaines études voisines ont contesté la présence d'HPV dans ce type de cancer (Georgantis 2015; Antonsson, Knight, and Whiteman 2016; Kanaan et al. 2020). Cette prévalence serait étroitement dépendante de la région géographique dans laquelle les cancers sont diagnostiqués. Une haute prévalence d'HPV est détectée en Asie contrairement à une faible prévalence en Australie (où la campagne de vaccination est importante) (Petrelli et al. 2021). Le marqueur p16^{ink4a} est également source de débat quant à son utilisation comme biomarqueur indirect d'HPV dans les ESCC vu le haut taux de méthylation (50%) retrouvé au niveau de son promoteur (Michaelsen, Larsen, and von Buchwald 2014; Kumar et al. 2015).

De la même façon que pour les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage, le rôle d'HPV dans le développement des adénocarcinomes est très controversé. En effet, une équipe australienne (Rajendra *et al.*) a démontré la présence d'HPV dans 68.6% des dysplasies de Barrett et 66.7% des adénocarcinomes, suggérant un rôle d'HPV dans la carcinogenèse œsophagien (Rajendra *et al.* 2013). Cependant, d'autres études montrent une prévalence plus faible (entre 10 et 35%) voire réfutent le rôle étiologique d'HPV dans l'œsophage de Barrett et l'adénocarcinome. De plus, le biomarqueur p16^{ink4a} ne semble pas être exclusivement corrélé à une infection par HPV (Iyer *et al.* 2011; El-Serag *et al.* 2013; X. Li *et al.* 2014; Antonsson, Knight, and Whiteman 2016; Kunzmann *et al.* 2017).

HPV a été clairement démontré comme un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de cancers de l'anus ou même de l'oropharynx (Ang *et al.* 2010; Jhaveri *et al.* 2017; Wu *et al.* 2021; Bruyère *et al.* 2021). Cependant, cette observation est également conflictuelle au niveau des cancers de l'œsophage. En effet, certaines études démontrent que les cancers de l'œsophage (ESCC et EAC) HPV positifs présentent un pronostic amélioré et manifestent une réponse plus favorable aux traitements par rapport aux cancers HPV négatifs (W.-L. Wang *et al.* 2015; Rajendra *et al.* 2018). Au contraire, d'autres études contredisent ces conclusions allant jusqu'à associer les infections par HPV à une réduction de la survie des patients (Dreilich *et al.* 2006; Da Costa *et al.* 2017; Bognár *et al.* 2018).

Ces cancers sont des maladies multifactorielles, il est donc essentiel de ne pas considérer HPV comme unique agent carcinogène. Le débat sur l'implication d'HPV dans les cancers de l'œsophage reste ainsi ouvert. Cette controverse est principalement due aux limitations et au manque de « gold standard » des méthodes de détection d'HPV utilisées. En effet, les méthodes incluent souvent l'utilisation exclusive du biomarqueur indirect p16^{ink4a}, la détection de l'ADN d'HPV par hybridation *in situ* ou par PCR avec des amorces parfois différentes. D'autres facteurs entrent également en jeu, tels que le nombre restreint de patients inclus dans la plupart des études, les types de tissus examinés (tissus en paraffine ou congelés), ainsi que les différentes régions géographiques et populations considérées (X. Li *et al.* 2014; Rajendra *et al.* 2020; Petrelli *et al.* 2021).

Ces résultats controversés empêchent l'OMS de faire des déclarations concluantes sur la relation entre HPV et les cancers de l'œsophage (ESCC et EAC), contrairement à l'adaptation faite pour d'autres types de cancers (exemple : les cancers de l'oropharynx) en fonction de leur statut HPV (voir section 2.3.4 cancers de la tête et du cou) (El-Naggar *et al.* 2017; Alfred King-yin Lam 2021).

BUT DU PROJET

Les papillomavirus humains (HPVs) sont des virus à ADN double brin non enveloppés. Le groupe d'HPVs le plus largement étudié est le groupe des α -HPVs. Séparés des α -HPVs de bas risque par leur pouvoir oncogène, les α -HPVs de haut risque sont connus depuis longtemps comme agents étiologiques de certains cancers diagnostiqués dans le tractus ano-génitale et la sphère oropharyngée. En effet, ils sont la cause de plus de 690 000 cancers humains dans le monde chaque année. Les cancers les plus fréquemment associés à une infection par HPV (dans > 90% des cas) sont les cancers se développant dans le col de l'utérus. Mais ces virus peuvent également être impliqués dans une partie des cancers de la vulve (\approx 40%), du vagin (\approx 70%), du pénis (\approx 50%), de l'anus (\approx 85%) et de la tête et du cou (\approx 30%). Alors que le lien « HPV-cancer » est bien décrit dans le tractus ano-génital, l'implication potentielle des infections à HPV dans la cancérisation œsophagienne (tant épidermoïde que glandulaire) reste très controversée. Ce constat est également vrai pour les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin.

La première partie de ce projet se focalise sur l'œsophage et la potentielle implication d'HPV dans la cancérisation. Étant proche des cancers de la tête et du cou où HPV joue un rôle étiologique bien connu, il est spéculé depuis longtemps qu'une partie des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage pourrait également être liée à une infection par HPV. De plus, retrouvés au niveau de la jonction muqueuse gastro-œsophagienne, une fraction des adénocarcinomes sont également suspectés d'être HPV-dépendants. Cependant, ces observations ne font pas l'unanimité chez les chercheurs et cliniciens et l'idée d'intégrer le statut viral dans le système de classification reste encore hypothétique. Ce projet vise à caractériser histopathologiquement les cancers œsophagiens (épidermoïde et glandulaire) et à mieux comprendre le potentiel rôle des α -HPVs dans la cancérisation de ces derniers.

La deuxième partie de ce projet concerne l'implication d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin. Représentant 10 à 15% des cancers du col de l'utérus, les adénocarcinomes sont un groupe hétérogène de tumeur où le rôle étiologique d'HPV est également très certainement hétérogène. Bien que reclassés par l'OMS en 2020 comme dépendants ou indépendants d'HPV, certains sous-types d'adénocarcinome sont rares, ce qui rend leur caractérisation précise très complexe. De plus, certaines questions restent en suspens comme les génotypes d'HPV associés à chaque sous-type de tumeur ou encore les différences géographiques potentielles. Ce projet vise donc à la réalisation d'une revue systématique et méta-analyse afin d'obtenir une vue d'ensemble complète sur l'implication d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin.

MATÉRIEL & MÉTHODES

1. Récolte des échantillons et données cliniques

Afin d'étudier la potentielle implication d'HPV dans les cancers de l'œsophage, un ensemble d'échantillons inclus en bloc de paraffine ont été récoltés : 230 carcinomes épidermoïdes et 119 adénocarcinomes de l'œsophage. Ces blocs ont été coupés au microtome afin d'obtenir des coupes histologiques de 5µm sur lame Superfrost Plus (Thermo Scientific) pour réaliser des immunomarquages, RNAscope et Hybridation *in situ*. Des copeaux disposés dans des Eppendorfs ont également été récoltés afin de tester la présence d'HPV (après extraction d'ADN/ARN). Les échantillons de carcinome épidermoïde proviennent des biobanques du CHU de Liège (Belgique), CHU de Besançon (France), CHU de Lausanne (Suisse) ainsi que de l'université de Tours (France). Les échantillons d'adénocarcinome proviennent du CHU de Liège (Belgique) et de l'institut Bordet (Bruxelles, Belgique). Les données cliniques de l'ensemble des échantillons anonymisés ont été récoltées. Le comité d'éthique a été accordé le 24/03/2020 sous la référence 2020/76.

Pour l'ensemble de ces échantillons, le statut HPV a été déterminé (ADN et ARN). Les échantillons ont ensuite été classés en 3 catégories : HPV négatif, HPV ADN+/ARN- et HPV ADN+/ARN+. Ces catégories ont été comparées entre elles sur base de diverses caractéristiques immunohistochimiques et clinico-pathologiques.

2. Détermination du statut HPV

Pour pouvoir déterminer le plus précisément possible le statut HPV des échantillons, nous avons réalisé un ensemble de tests précis et spécifiques.

2.1 Génotypage

La première étape a été d'analyser la présence de l'ADN viral au sein des échantillons tissulaires.

2.1.1 Extraction ADN

Pour cela, une extraction d'ADN à partir des copeaux disposés dans les Eppendorfs a été réalisée. Le kit utilisé est le NucleoSpin DNA FFPE XS Macherey-Nagel (Ref : 740980.250) selon les recommandations du fournisseur. Premièrement, l'échantillon est déparaffiné 3min à 60°C à l'aide de « Paraffin Dissolver » fournit dans le kit. Ensuite, le tissu est digéré toute la nuit à 56°C par de la protéinase K (22.4mg/ml) afin de libérer l'ADN dans la solution. Avant de récupérer l'ADN, une incubation de 30min à 90°C dans du « D-Link Buffer » (solution contenant des sels inorganiques pH 4.5-5) est réalisée. Cela permet d'éliminer les liens croisés de l'ADN causés par l'étape précédente. L'ADN est ensuite récupéré sur colonne de silice et centrifugé 30 sec à 2000g. La colonne est lavée 2 fois avec du tampon contenant de l'éthanol suivi d'une centrifugation (2x11 000g) afin d'éliminer les métabolites et macromolécules présents dans l'échantillon. Finalement, l'ADN est élué (centrifugation 11 000g, 30 sec) avec un tampon d'éluion (5mM Tris/HCl, pH8). Les échantillons sont alors dosés au spectrophotomètre [NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science)]. L'ADN est ensuite stocké à -20°C.

2.2 Hybridation *in situ*

Nous avons confirmé les résultats du génotypage par la technique d'Hybridation *in situ* (Ventana INFORM HPV III family 16 probe) de la firme Ventana Medical Systems réalisée par le département d'Anatomie et Cytologie pathologiques du CHU de Liège.

La technique d'hybridation *in situ* permet de mettre en évidence et de localiser des séquences d'ADN dans un tissu. Le principe se base sur l'hybridation d'une sonde simple brin avec une séquence d'ADN complémentaire. Le système de détection utilisé est enzymatique (phosphatase alcaline) et chromogénique (BlueMap®). Ici le kit Ventana INFORM HPV III family 16 probe contient un cocktail de sondes ciblant les HPVs de haut risque les plus commun (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 et 66).

2.3 RT-qPCR

La deuxième étape a été de déterminer si les infections virales étaient transcriptionnellement actives.

2.3.1 Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN des échantillons (copeaux de paraffine dans un Eppendorf) a été réalisée grâce au kit ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System Promega (Ref : Z1002) selon les recommandations du fournisseur. Premièrement, l'échantillon est déparaffiné (à l'aide d'huile minérale 1 min à 80°C) puis le tissu est digéré par de la protéinase K (20mg/ml) (15min à 56°C puis 1 heure à 80°C) afin de libérer l'ARN dans la solution. Ensuite, un traitement de 15 min à température ambiante contenant du MnCl₂ 0.09M, un tampon pour la DNase et l'enzyme DNase (1U/μl) permet d'éliminer l'ADN présent dans l'échantillon. De l'isopropanol 100% est ajouté avant centrifugation 10 000g pendant 15 sec. L'ARN est ensuite récupéré sur colonne puis centrifugé 30 sec à 10 000g. La colonne est lavée (2 fois avec une solution contenant de l'éthanol) et centrifugée (2x10 000g) afin d'éliminer les métabolites et macromolécules présents dans l'échantillon. Finalement, la colonne est séchée par centrifugation (16 000g, 3min) avant que l'ARN ne soit élué avec de l'eau déionisée. Le dosage d'ARN a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre [NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science)]. L'ARN est ensuite stocké à -80°C.

2.3.2 Synthèse d'ADN complémentaire

Afin de réaliser une PCR, nos échantillons d'ARN ont été synthétisés en ADN_{complémentaire} à l'aide du kit FastGene Scriptase II cDNA Synthesis 5x ReadyMix (Nippon LS64) selon les recommandations du fournisseur. Dans un Eppendorf, 4μL de 5x FastGene Scriptase II sont mélangés avec 250ng d'échantillon d'ARN puis complétés en eau stérile afin d'atteindre 20μL au total. Le mix est alors incubé 10 min à 25°C puis 1 heure à 42°C et enfin 5 min à 85°C avant d'être stocké à -20°C.

2.3.3 Quantitative PCR

La PCR est réalisée dans une plaque 96 puits (Thermo Scientific). Chaque puits de réaction contient 30ng/5μL d'ADN_c ainsi que 15μL de mix d'amorces. Le mix d'amorces contient : 300nM d'amorce sens + amorce antisens (concentration de travail : 10μM), 10μL de FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche)¹ ainsi que de l'eau « RNase free ». Les résultats

¹ Composé de : FastStart Taq ADN Polymérase, tampon de réaction, dNTPs, SYBR Green I

sont obtenus à l'aide de la machine qPCR QuantStudio3 Appliedbiosystems (Thermo Fisher Scientific). Le 18S a été utilisé comme « *housekeeping gene* ».

Les amorces (Eurogentec) utilisées sont les suivantes :

- HPV16 E6 sens : GTT-ACT-GCG-ACG-TGA-GGT-ATA-TG
- HPV16 E6 antisens : CAT-TTA-TCA-CAT-ACA-GCA-TAT-GGA-TTC
- HPV18 E6 sens : CAG-AGG-TAT-TTG-AAT-TTG-CAT-TT
- HPV18 E6 antisens : AAT-CTA-TAC-ATT-TAT-GGC-ATG-CAG
- 18S sens : AGT-CCC-TGC-CCT-TTG-TAC-ACA
- 18S antisens : GAT-CCG-AGG-GCC-TCA-CTA-AAC

2.4 RNAscope

Le RNAscope est une méthode (similaire à l'hybridation *in situ*) permettant la visualisation de molécules d'ARN au sein d'un tissu. Nous avons utilisé cette technique pour confirmer la RT-qPCR mais aussi pour visualiser l'ARN viral.

Afin d'obtenir un signal, il faut 2 sondes en Z. L'utilisation d'une sonde en Z permet de lier d'un côté une séquence spécifique d'ARN et de l'autre côté d'avoir un site de liaison pour les différents amplificateurs du signal. L'importance d'avoir deux sondes est que les liaisons aspécifiques sont limitées. Le préamplificateur lie les deux sondes par complémentarité. Ensuite, un ensemble d'amplificateurs viennent s'ajouter sur la structure. Enfin, des sondes marquées par une enzyme chromogène se fixent sur l'ensemble des sites prévus sur les amplificateurs permettant une visualisation intense du marquage (Figure 36).

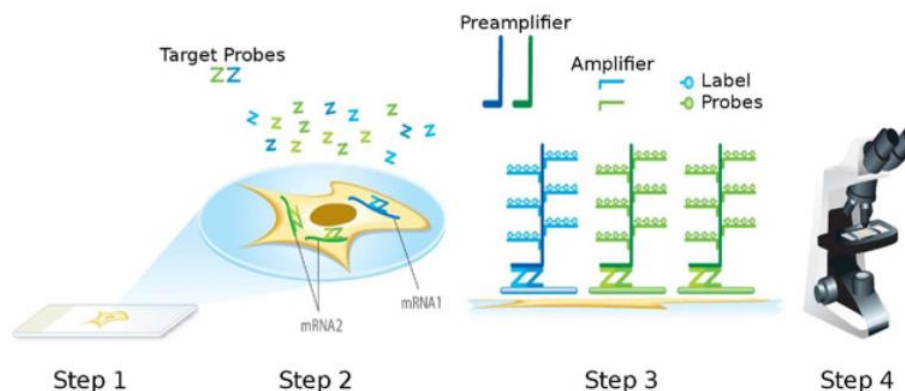


Figure 36: Représentation de la technique RNAscope. Après un prétraitement, 2 sondes en Z viennent s'hybrider à une séquence spécifique d'ARN. Un ensemble d'amplificateurs de signal puis des sondes marquées permettent la visualisation de l'ARN d'intérêt sur lame (F. Wang et al. 2012).

La technique de RNAscope a été réalisée grâce au kit RNAscope® 2.5 HD Duplex Detection kit (ACD biotechne brand) selon les recommandations du fournisseur. Cette technique se déroule en deux grandes étapes : le prétraitement et le traitement. L'entièreté des solutions est fournie par la firme (sauf le SSC 20x préparé manuellement).

2.4.1 Le prétraitement

Tout d'abord, les lames sont déparaffinées à l'aide de xylène 100% (2x5min à température ambiante) puis passées dans deux bains successifs d'éthanol 100% (2x1min à température ambiante) pour enfin être séchées 5min. Ensuite, du peroxyde d'hydrogène (fourni par la

firme) est appliqué sur le tissu afin de bloquer les peroxydases endogènes pendant 10min à température ambiante. Le démasquage des épitopes est réalisé par le « target retrieval » (dilué 10 fois) au bain-marie (95°C) pendant 15min. Enfin, une solution de « protéase plus » est appliquée 30min à 40°C. Entre chaque étape, les lames sont lavées à l'eau déionisée (3x1min). Les lames seront gardées toute la nuit dans une solution de SSC 5x pH7 préparée à partir d'une solution SSC 20X à pH=7 et autoclavée (composée de 175.3g de NaCl, 88.2g de citrate de sodium et 1L d'eau déionisée).

2.4.2 Le traitement

Le traitement des lames débute par l'hybridation des sondes spécifiques (ici ciblant l'ARNm de HPV16 et/ou HPV18) pendant deux heures à 42°C. Ensuite s'ensuit une cascade de 10 amplificateurs de signal utilisés à température ambiante ou à 42°C pendant 15 ou 30min selon l'amplificateur. Entre chaque étape, les lames sont lavées (3x1min) avec une solution de tampon de lavage (fournie par la firme). Le système de détection utilisé est la peroxydase de Raifort (HRP) pour HPV16 (couleur verte) et la phosphatase alcaline pour HPV18 (couleur rouge). Ces étapes sont réalisées pendant 10min à température ambiante. Enfin, l'hématoxyline de Gill I (25%) (Sigma-Aldrich) est utilisée comme contre coloration (15sec). Les lames sont montées avec une lamelle couvre objet à l'aide du kit « VectaMount mounting ». La détection du signal est réalisée visuellement au microscope.

3. Comparaison des catégories

L'ensemble des échantillons a été assigné à une catégorie : HPV négatif ; HPV ADN+/ARN- et HPV ADN+/ARN+. Ces catégories ont ensuite été comparées entre elles selon diverses caractéristiques immunohistochimiques et histologiques.

3.1 Immunohistochimie

Afin de détecter les protéines d'intérêts au sein des échantillons tumoraux, la technique d'immunohistochimie a été utilisée. Tout d'abord, les coupes en paraffine sont déparaffinées à l'aide de xylène 100% (2x5min) puis réhydratées par des bains successifs d'éthanol aux concentrations décroissantes : 100% (2x2min), 95% (1x1min) et 70% (1x2min). Les peroxydases endogènes sont bloquées 5min à l'aide de méthanol 100% + 4.5% H₂O₂ (Acros Organics). Les lames sont plongées 2x2min dans de l'eau déionisée avant de passer aux étapes suivantes. Le démasquage des épitopes est réalisé à l'aide d'un micro-onde (23min) ou d'une marmite à pression (11min) dans du citrate pH6 (Sigma Aldrich), du citrate + détergent (Target Retrieval solution : Dako) ou de l'EDTA pH9 (Invitrogen). Après le démasquage, les sites aspécifiques sont bloqués par du bloquant « Animal-Free Blocking Solution » (Cell Signaling) pendant 20min. Les anticorps primaires puis secondaires (couplés au système streptavidine-HRP) sont successivement ajoutés (tableau 3). Entre chaque étape, les lames sont lavées au PBS 1x. Enfin, la révélation est réalisée à l'aide du chromogène DAB (Signal Strain ; Cell Signaling) pendant 10min puis les lames sont contre colorées à l'hématoxyline durant 30 sec.

Cible d'Ac	Référence	Firme	Clone	Dilution	Temps d'incubation	Spécimen	Conditions de démasquage
<i>p16^{ink4a}</i>	ENZ-ABS377	Enzo	Monoclonal	1/100	1h	Souris	Citrate/micro-onde
<i>p53</i>	800-2912	Ventana	DO-7	Prêt à l'emploi	1h	Souris	Citrate/marmite à pression
<i>Ki67</i>	790-4286	Ventana	30-9	Prêt à l'emploi	1h	Lapin	EDTA/micro-onde
<i>Ker7</i>	790-4462	Ventana	SP52	Prêt à l'emploi	1h	Lapin	EDTA/marmite à pression
<i>PD1</i>	Ab52587	Abcam	NAT105	1/200	1h	Souris	Target retrieval/marmite à pression
<i>CD8</i>	790-4460	Ventana	SP57	Prêt à l'emploi	1h	Lapin	EDTA/marmite à pression
<i>Anti-lapin</i>	K4003	Dako	EnVision+System-HRP	/	30min	Chèvre	/
<i>Anti-souris</i>	K4001	Dako	EnVision+System-HRP	/	30min	Chèvre	/

Tableau 3: Informations concernant l'ensemble des anticorps utilisés lors des marquages immunohistochimiques.

3.2 Attribution de score

Un score a été attribué de façon visuelle pour les marqueurs *p16^{ink4a}*, Kératine 7, *Ki67* et *p53*. L'analyse de ces marquages a été réalisée indépendamment par 2 évaluateurs. Les résultats ont été ensuite comparés et les éventuelles discordances ont été résolues par consensus. Une quantification précise a été réalisée pour les marquages *PD1* et *CD8* par le logiciel QuPath-0.3.0.

3.2.1 Visuellement

Pour évaluer les marqueurs Kératine 7 (marquage cytoplasmique) et *Ki67* (marquage nucléaire), nous avons utilisé des scores basés sur l'étendue du marquage dans la zone tumorale, attribuant les scores comme suit :

- score 0 : pas de marquage
- score 1 : 1 à 25% de cellules tumorales positives
- score 2 : 26 à 50% de cellules tumorales positives
- score 3 : 51 à 75% de cellules tumorales positives
- score 4 : >75% de cellules tumorales positives

En ce qui concerne le marqueur *p16^{ink4a}*, les expressions cytoplasmiques et nucléaires de la protéine ont été regroupées pour l'analyse. Un seuil de positivité, fixé à 50% de marquage diffus (en bloc) et intense, a été choisi afin de concilier sensibilité et spécificité. Un statut négatif est attribué lorsque l'étendue de cellules tumorales marquées est en dessous de 50% ou non diffuse (« patchy »).

Pour le marqueur *p53* (marquage nucléaire), nous avons utilisé une classification préétablie pour les cancers de l'ovaire (Yemelyanova et al. 2011). Le marquage *p53* est considéré comme

aberrant en cas d'absence totale de marquage ou lorsque plus de 50% de cellules tumorales sont positives (expression forte et diffuse de p53). Au contraire, si les tumeurs présentent un marquage p53 d'intensité faible et une étendue limitée (entre 1 et 49% de cellules tumorales positives), un statut non aberrant est attribué.

La différenciation tumorale a également été analysée visuellement (2 évaluateurs) sur base de caractéristiques morphologiques (histologiques). En effet, les tumeurs peuvent présenter différents degrés de différenciation en fonction de leur similitude avec le tissu normal dont elles dérivent. Concernant les adénocarcinomes, une tumeur est dite bien différenciée lorsque celle-ci est constituée de structures glandulaires irrégulières, moyennement différenciée lorsque ces structures glandulaires sont plus compactes et moins évidentes à distinguer et faiblement différenciée lorsque l'architecture glandulaire est totalement perdue. En ce qui concerne les carcinomes épidermoïdes, une tumeur est bien différenciée lorsque la tumeur est composée d'amas de cellules épithéliales kératinisées disposées de manière similaire à un « bulbe d'oignon » avec une accumulation de kératine au centre (globe corné). Une tumeur est moyennement différenciée lorsque cette architecture « typique » commence à se perdre et faiblement différenciée lorsque l'architecture est entièrement perdue. La tumeur peut également être de type basaloïde, lorsque l'architecture tumorale ressemble à la couche basale de l'épithélium épidermoïde.

Des images représentatives sont disponibles dans les sections 1.1 et 2.1 de la partie 1 des résultats.

3.2.2 QuPath-0.3.0

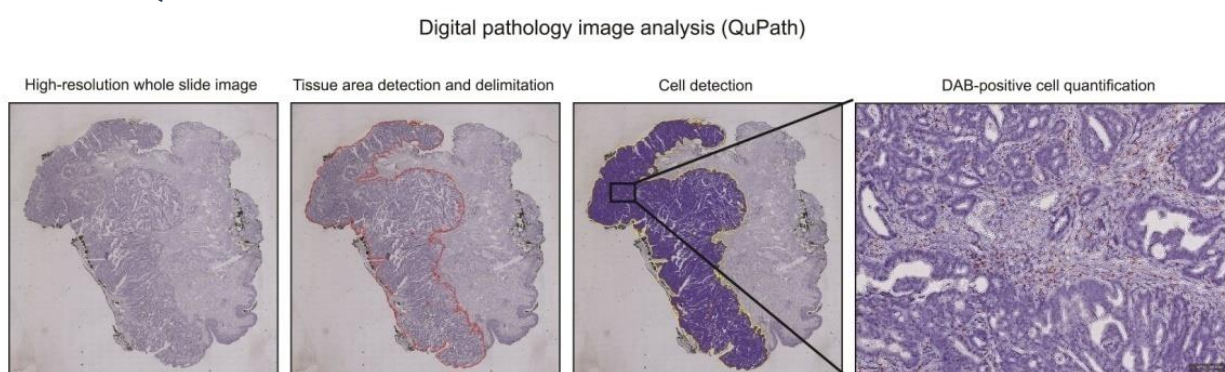


Figure 37: Représentation de la délimitation de la tumeur et de la quantification des cellules positives par le logiciel QuPath-0.3.0 (Herfs et al. 2018).

Les marquages ciblant les cellules immunitaires ont été analysés par l'intermédiaire du logiciel QuPath-0.3.0 afin d'évaluer l'infiltration immunitaire intra-tumorale.

Dans un premier temps, les lames ont été scannées à l'aide du scanner Panoramic 250 (Sysmex). Ensuite, la tumeur est délimitée manuellement et le logiciel permet la détection des cellules positives parmi l'ensemble des cellules. Les valeurs sont alors exprimées en nombre de cellules positives par mm^2 (un exemple représentatif est montré dans la figure 37).

4. Analyse des données clinico-pathologiques

Les données clinico-pathologiques de chaque patient ont été récoltées sous forme de tableau anonymisé. Ce tableau reprend les informations suivantes : âge ; genre ; statut TNM ; stade tumoral ; consommation tabac/alcool ; traitements radio et chimio thérapeutiques ; statut HPV ; différenciation tumorale ; score p53 ; score Ki67 ; score p16^{ink4a} ; score Kératine 7, cellules PD1+/mm²; cellules CD8+/mm²; statut « décédé ou vivant » ; 1 ère date du diagnostic ou du prélèvement ; date de la dernière visite ou du décès ; récurrence ou non.

5. Analyses statistiques

Les tests statistiques utilisés pour comparer les données clinico-pathologiques entre chaque groupe sont le test exact de Fisher et le test du χ^2 en fonction du nombre de variables à comparer.

Des analyses de risque ont ensuite été réalisées en analyse univariée (logiciel Prism 8.3.0) et multivariée (logiciel R). Afin de réaliser des analyses de survie globale (OS : *overall survival*) et de survie sans récurrence de la maladie (PFS : *progression-free survival*), nous avons attribué un score à chaque patient. Un score de 1= décédé ou présentant une récurrence et un score 0= vivant ou ne présentant pas de récurrence. Nous avons également calculé le nombre de mois entre la date du diagnostic ou du premier prélèvement et la date du décès (ou de la dernière visite si le patient est toujours vivant) pour l'OS. Pour la PFS, le nombre de mois est calculé entre la date du diagnostic ou du premier prélèvement et la date de la récurrence (ou de la dernière visite si le patient ne présente pas de récurrence).

La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour obtenir les courbes OS et PFS. La distribution des courbes de survie entre les groupes a été comparée par le test statistique non paramétrique du Log-Rank. Les différences sont considérées comme significatives lorsque la *p-value* est inférieure à 0.05.

Les analyses multivariées sont basées sur le modèle de régression CoxPH. Ce modèle vise à quantifier l'effet des covariables sur la survie en fournissant des estimations des rapports de taux de risque (Hazard Ratios) associés à chaque covariable. Il permet également de prendre en compte plusieurs covariables simultanément. Afin de définir une différence significative entre les groupes, le test du Log-Rank a été utilisé.

RÉSULTATS

Partie 1 : Implication des infections par HPV de haut risque dans la carcinogenèse œsophagienne

1. Caractérisation clinico-pathologique des carcinomes épidermoïdes œsophagiens et analyse de la potentielle implication d'HPV dans ces cancers

1.1 Description de la population étudiée

1.1.1 Caractéristiques cliniques et démographiques

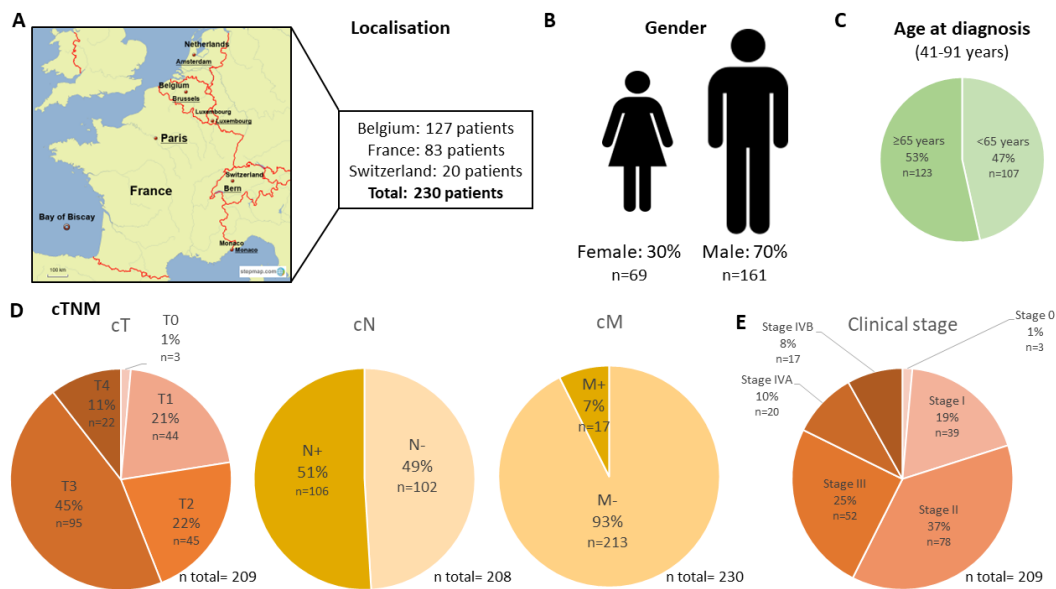


Figure 38: Description des caractéristiques démographiques et cliniques de la cohorte étudiée (n=230). (A) Pays participant à cette étude. (B) Pourcentage des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage réparti en fonction du sexe des patients. (C) Répartition démographique entre les individus de moins de 65 ans et ceux âgés de 65 ans et plus. (D) Distribution des tumeurs des patients en corrélation avec leur classification cTNM. (E) Répartition des tumeurs en fonction de leur stade clinique déterminé par la 8^e édition de l'AJCC.

Deux cent trente patients souffrant d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage ont été inclus dans cette étude. Parmi eux, 127 patients sont originaires de Belgique (région liégeoise), 83 patients résident dans les régions de Besançon et Tours en France tandis que les 20 derniers patients proviennent de la région de Lausanne en Suisse. Cette cohorte englobe 70% d'hommes (161/230, 70%) et 30% de femmes (69/230, 30%). L'âge des patients varie entre 41 et 91 ans, dont 53% ont dépassé le seuil des 65 ans (123/230, 53%) (Figure 38 A, B et C). Les données TNM et le stade clinique ont pu être obtenus pour 209 patients (pour le cT et le stade clinique) et 208 patients pour le cN. Parmi les 209 patients, on observe une répartition des tumeurs de la manière suivante : 45% présentent une tumeur ayant envahi l'adventice (T3 : 95/209, 45%). Les 55% restants sont répartis comme suit : 1% présentent des tumeurs *in situ* (T0 : 3/209) ; 21% ont des tumeurs envahissant la *lamina propria*, la *muscularis mucosae* ou la sous-muqueuse (T1 : 44/209) ; 22% montrent des tumeurs envahissant la musculature (T2 : 45/209) ; enfin, 11% ont des tumeurs ayant envahi les structures adjacentes (T4 : 22/209). Lors du diagnostic, 51% des patients étudiés (106/208, 51%) présentent une atteinte

ganglionnaire par les cellules tumorales tandis que 7% des patients (17/230, 7%) présentent des métastases. Déterminés par la 8^e édition de l’AJCC, les stades cliniques des tumeurs sont répartis de la manière suivante : stade 0 : 3/209, 1% ; stade I : 39/209, 19% ; stade II : 78/209, 37% ; stade III : 52/209, 25% ; stade IVA : 20/209, 10% et stade IVB : 17/209, 8% (Figure 38 D et E).

1.1.2 Caractérisation clinico-pathologique

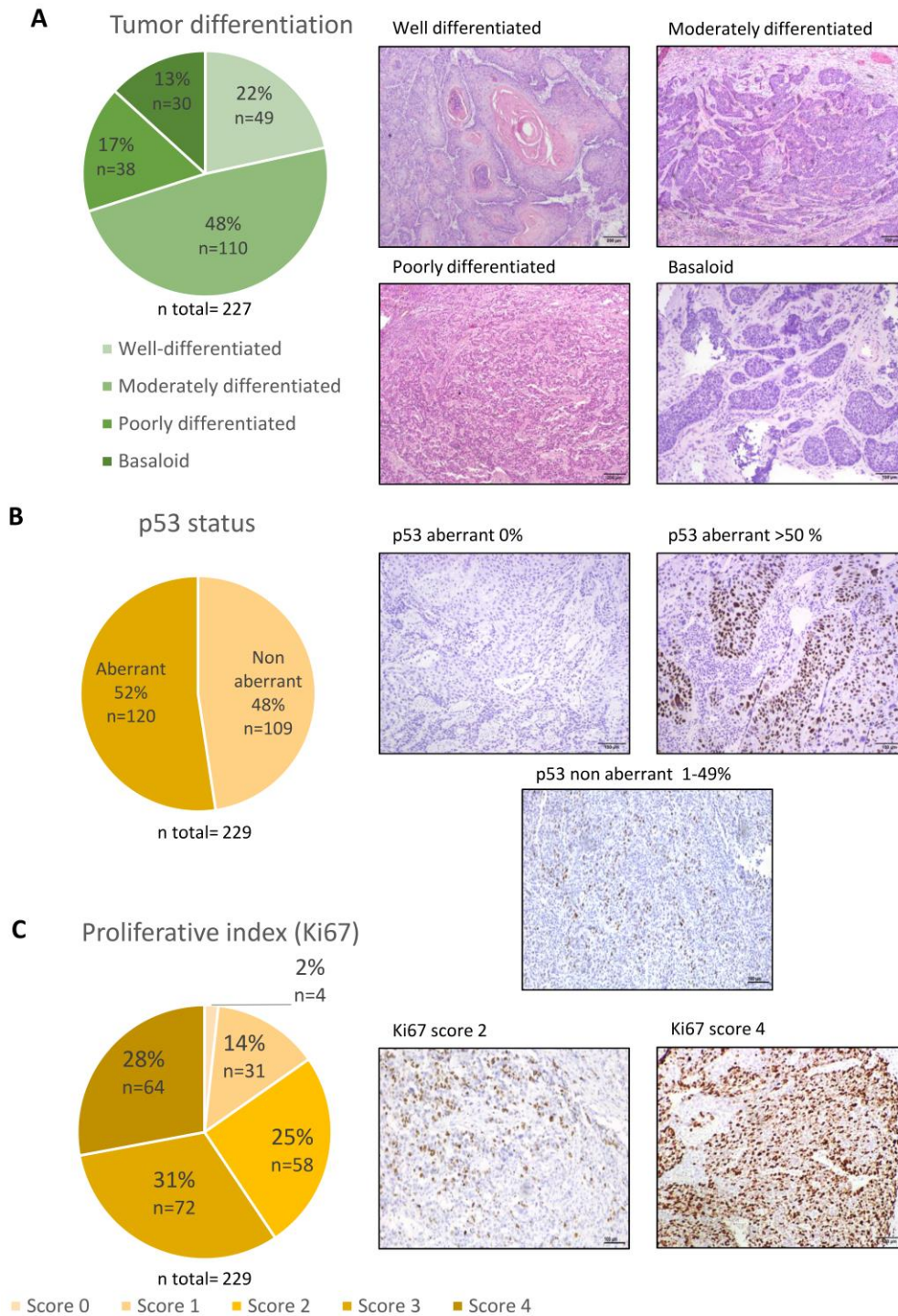


Figure 39: Caractéristiques (immuno)histologiques de la cohorte de patients atteints d’un carcinome épidermoïde de l’œsophage. (A) Représentation graphique et illustrations des différents degrés de différenciation retrouvés : bien différencié

(BD), moyennement différencié (MD), faiblement différencié (FD) et basaloïde [la barre d'échelle représente 200µm (BD, MD et FD) ou 100µm (Basaloïde)]. (B) Représentation graphique et illustrations du statut p53 (la barre d'échelle représente 100µm). La catégorie p53 aberrant contient les tumeurs ne présentant pas de marquage p53 et les tumeurs présentant plus de 50% de cellules positives. La catégorie p53 non aberrant reprend les tumeurs avec un marquage compris entre 1 et 49%. (C) Représentation graphique et illustrations de la prolifération cellulaire (marquage Ki67) (la barre d'échelle représente 100µm). Score 0= pas de marquage ; score 1= 1-25% de marquage ; score 2= 26-50% de marquage ; score 3= 51-75% de marquage et score 4= >75% de marquage.

Diverses variables histopathologiques ont été analysées par immunohistochimie (IHC) et par coloration hématoxyline-éosine pour l'ensemble de la cohorte de carcinomes épidermoïdes. Les caractéristiques étudiées incluent la différenciation tumorale, le statut p53, la prolifération cellulaire (Ki67) et l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires CD8⁺ et PD1⁺ (Figures 39 et 40). En raison de problèmes techniques (absence de lames résiduelles, détachement du tissu lors du déparaffinage), la différenciation tumorale et le nombre de cellules positives pour PD1 n'ont pas pu être déterminés pour 3 patients. Le statut p53 et l'indice de prolifération n'ont également pas pu être évalués pour un patient, tout comme le nombre de cellules CD8⁺ qui n'a pas pu être déterminé pour 5 patients.

La première caractéristique étudiée est la différenciation tumorale (déterminée à partir d'une « simple » coloration hématoxyline-éosine). Les tumeurs peuvent présenter différents degrés de différenciation (bien, moyennement ou faiblement différencié) ou peuvent être de type basaloïde (voir section 3.2.2.3 de l'introduction). Au sein de notre cohorte, un peu moins de la moitié des tumeurs, 48%, sont moyennement différenciées (110/227, 48%). Le reste des tumeurs sont bien différenciées dans 22% des cas (49/227, 22%), faiblement différenciées dans 17% des cas (38/227, 17%) et les 13% restants sont de type basaloïde (30/227, 13%) (Figure 39 A). Le deuxième paramètre étudié (en IHC) concerne p53. Corrélié à une mutation/délétion du gène *TP53*, le statut p53 est considéré comme aberrant lorsqu'aucun marquage n'est observé ou lorsque plus de 50% des cellules sont positives. Un statut p53 non aberrant est déterminé lorsque 1 à 49% des cellules tumorales sont marquées positivement (Murnyák and Hortobágyi 2016). Dans notre cohorte, on recense autant de tumeurs présentant un statut p53 non aberrant (109/229, 48%) que de tumeurs avec un statut p53 aberrant (120/229, 52%) (Figure 39 B). Afin d'étudier la prolifération cellulaire, un immunomarquage Ki67 a été réalisé sur l'ensemble des échantillons. Les tumeurs sont ainsi séparées en fonction du pourcentage de cellules tumorales Ki67 positives (voir section 3.2.1 du matériel et méthodes). 2% des tumeurs (4/229, 2%) ne présentent pas de prolifération cellulaire et seulement 14% ont un score 1 (31/229, 14%). Plus de 80% des tumeurs présentent au moins un score 2 montrant une prolifération cellulaire importante [score 2 (26-50% de cellules positives) : 58/229, 25% ; score 3 (51-75% de cellules positives) : 72/229, 31% et score 4 (>75% de cellules positives) : 64/229, 28%] (Figure 39 C).

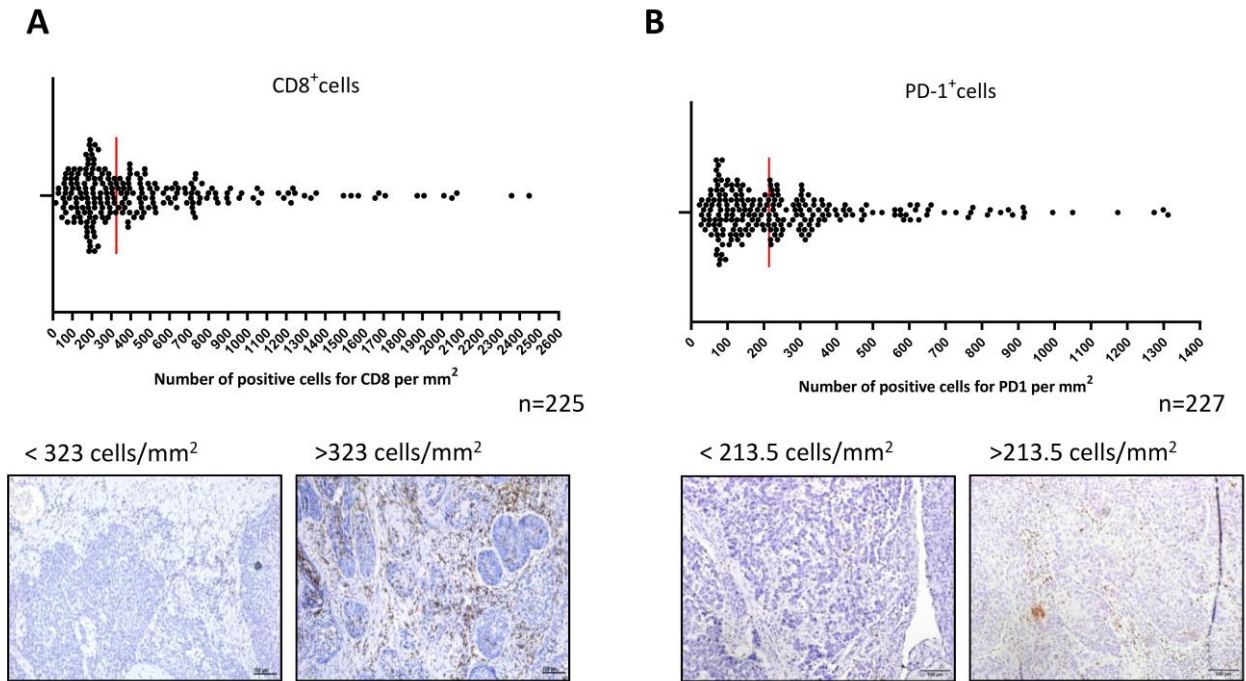


Figure 40: Représentation graphique et illustrations de l'infiltration immunitaire (la barre d'échelle représente 100µm). (A) Nombre de cellules CD8+ par mm². Chaque point sur le graphique représente un patient (médiane : 323 cellules/mm²). (B) Nombre de cellules PD1+ par mm². Chaque point sur le graphique représente un patient (médiane : 213.5 cellules/mm²).

Enfin, l'infiltration immunitaire intra-tumorale a été analysée à l'aide des marqueurs CD8 et PD1 et évaluée grâce au logiciel QuPath 0.3.0 (voir section 3.2.2 du matériel et méthodes). Malgré une variation inter-individus considérable, la plupart des tumeurs présentent une haute densité intra-tumorale de lymphocytes T CD8⁺ (médiane : 323 cellules/mm²). Concernant le nombre de cellules PD1⁺, il est moins abondant dans le microenvironnement tumoral de façon générale (médiane : 213.5 cellules/mm²) (Figure 40 A et B).

1.1.2.1 Statut HPV des carcinomes épidermoïdes

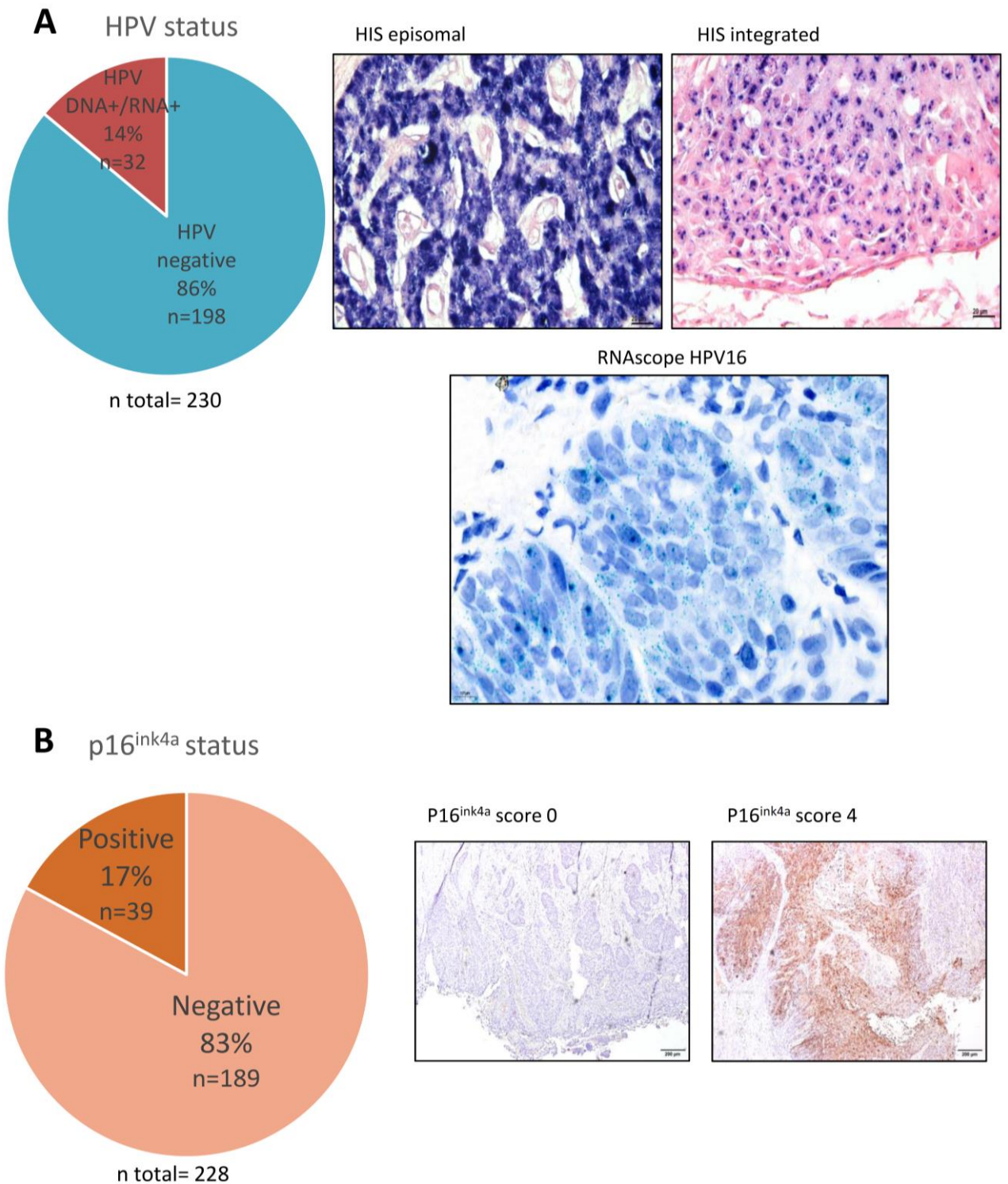


Figure 41: Représentation graphique et illustrations du statut HPV et p16^{ink4a} des carcinomes épidermoïdes. (A) Répartition des tumeurs en fonction de leur statut HPV : HPV négatif et HPV ADN+/ARN+. HIS montrant un profil d'infection épisomale et intégrée (points mauves) (la barre d'échelle représente 20µm). RNAscope montrant l'ARN d'HPV16 (points verts) (la barre d'échelle représente 10µm). (B) Répartition des tumeurs en fonction de leur statut p16^{ink4a}. La catégorie négative reprend les scores 0 à 2 (0 à 50% de marquage), la catégorie positive reprend les scores 3 et 4 (plus de 50% de marquage) (la barre d'échelle représente 100µm).

Basé sur un ensemble de tests précis et spécifiques, le statut HPV (ADN et ARN) de l'ensemble des échantillons de la cohorte a été déterminé. Le génotypage effectué *via* les méthodes *Abbott RealTime assay*, *Cobas 6800 assay* ou *Luminex assay* a permis d'identifier la présence d'une infection par HPV16 chez 14% des patients (32/230, 14%). Aucun autre génotype d'HPV n'a été identifié. Ces résultats ont été confirmés par la technique d'Hybridation *in situ* (HIS). L'HIS a également permis d'observer des profils d'infection soit épisodale soit intégrée, comme illustrée dans la figure 41 A. En ce qui concerne l'activité transcriptionnelle du virus, celle-ci a été déterminée par RT-qPCR et confirmée en RNAscope. Ces techniques ont mis en évidence la présence d'ARN d'HPV16 dans toutes les tumeurs infectées par le virus (ADN+) (32/230, 14%). Les images obtenues grâce à la technique de RNAscope démontrent de manière concluante que la totalité des cellules tumorales sont infectées par le virus (Figure 41 A). De plus, l'immunomarquage p16^{ink4a} (biomarqueur indirect d'une infection par HPV) présente une très bonne corrélation avec le statut HPV des tumeurs. 29 tumeurs HPV ADN+/ARN+ affichent, en effet, une forte positivité pour p16^{ink4a} avec plus de 50% des cellules marquées dans chaque tumeur. Quant aux tumeurs HPV négatives, 186 montrent moins de 50% de cellules tumorales positives et sont donc catégorisées comme négatives pour p16^{ink4a} (186/196, 95%). Il est toutefois important de mentionner que, bien que le statut p16^{ink4a} de 2 tumeurs n'a pas pu être évalué, 10 lésions HPV- présentent un marquage positif pour p16^{ink4a}. La catégorie p16^{ink4a} positive comprend donc 39 tumeurs (39/228, 17%) (Figure 41 B).

1.2 Comparaison des caractéristiques clinico-pathologiques des patients en fonction de leur statut HPV

Characteristics	HPV negative (n= 198) (86.09%)	HPV positive (n=32) (13.91%)	p value
<i>Age at diagnosis</i> (41-91 years)	n=198	n=32	<i>p</i> = 0.1811
<65	96 (48.48%)	11 (34.38%)	
≥65	102 (51.52%)	21 (65.62%)	
<i>Gender</i>	n=198	n=32	<i>p</i> = 0.2111
Male	142 (71.72%)	19 (59.38%)	
Female	56 (28.28%)	13 (40.62%)	
<i>cTNM</i>			<i>p</i> = 0.0491*
<i>cT</i>	n=178	n=31	
T0-T2	73 (41.01%)	19 (61.29%)	
T3-T4	105 (58.99%)	12 (38.71%)	
<i>cN</i>	n=180	n=28	<i>p</i> = 0.2243
N-	85 (47.22%)	17 (60.71%)	
N+	95 (52.78%)	11 (39.29%)	
<i>cM</i>	n=198	n=32	<i>p</i> = 0.0685
M-	186 (93.94%)	27 (84.38%)	
M+	12 (6.06%)	5 (15.62%)	

<i>Clinical stage (AJCC 8th edition)</i>	n=178	n=31	<i>p</i> = 0.2412
Stage 0-II	99 (55.62%)	21 (67.74%)	
Stage III-IVB	79 (44.38%)	10 (32.26%)	
<i>p16^{ink4a} status</i>	n=196	n=32	<i>p</i> < 0.0001****
Negative (0-50%)	186 (94.90%)	3 (9.37%)	
Positive (51-100%)	10 (5.10%)	29 (90.63%)	
<i>Tumor differentiation</i>	n=195	n=32	<i>p</i> = 0.041*
Well differentiated	45 (23.08%)	4 (12.5%)	
Moderately differentiated	92 (47.18%)	18 (56.25%)	
Poorly differentiated	36 (18.46%)	2 (6.25%)	
Basaloid	22 (11.28%)	8 (25%)	
<i>p53 status</i>	n=197	n=32	<i>p</i> = 0.5689
Aberrant (0 or >50%)	105 (53.3%)	15 (46.88%)	
Non aberrant	92 (46.7%)	17 (53.12%)	
<i>Proliferative index (Ki67)</i>	n=197	n=32	<i>p</i> = 0.8465
0-50%	81 (41.12%)	12 (37.5%)	
51-100%	116 (58.88%)	20 (62.5%)	
<i>CD8⁺ cells</i> (median: 323 cells/mm ²)	n=195	n=30	<i>p</i> = 0.6953
<323 cells/mm ²	93 (47.69%)	16 (53.33%)	
>323 cells/mm ²	102 (52.31%)	14 (46.67%)	
<i>PD1⁺ cells</i> (median: 213.5 cells/mm ²)	n=196	n=31	<i>p</i> = 0.1222
<213.5 cells/mm ²	101 (51.53%)	11 (35.48%)	
>213.5 cells/mm ²	95 (48.47%)	20 (64.52%)	

Tableau 4: Caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage en fonction de leur statut HPV (négatif ou positif). Le test statistique utilisé est le test du Fisher Exact. La *p*-value est déterminée comme significative lorsque celle-ci est inférieure à 0.05.

Après détermination du statut HPV de l'ensemble des patients, ceux-ci ont été séparés en deux catégories : HPV négatif et HPV positif (ADN+/ARN+). Ces deux catégories ont été comparées selon diverses caractéristiques clinico-pathologiques listées dans le tableau 4 ci-dessus. Certaines informations sont manquantes pour un nombre réduit de patients. Le nombre précis de patients inclus dans les deux catégories est spécifié pour chaque critère sous la forme n=x. Certaines données relatives au cT, au stade clinique et à l'indice de prolifération ont été regroupées pour permettre le calcul de la *p*-value à l'aide du test statistique de Fisher Exact.

L'âge ($p= 0.1811$), le sexe ($p=0.2111$), l'infiltration ganglionnaire (cN) ($p=0.2243$), la présence de métastase (cM) ($p=0.0685$), le stade tumoral clinique ($p=0.2412$), le statut p53 ($p=0.5689$), la prolifération cellulaire (Ki67) ($p=0.8465$), l'infiltration immunitaire en terme de cellules CD8⁺ ($p= 0.6953$) et PD1⁺ ($p= 0.1222$) ne sont pas des caractéristiques statistiquement différentes entre les deux catégories de patients (HPV négatif *versus* HPV positif). Cependant, certaines différences significatives existent entre les deux catégories. Les patients de la catégorie HPV+ présentent une différence significative en terme de taille tumorale, avec une prédominance de tumeurs plus petites (T0-T2 : 61.29%) en comparaison aux patients de la catégorie HPV- chez qui l'on observe une plus grande proportion de tumeurs de plus grande taille (T3-T4 : 58.99%) ($p= 0.0491$). En ce qui concerne la différenciation tumorale, il est notable qu'il y a deux fois plus de tumeurs de type basaloïde dans la catégorie HPV+ (25%) par rapport à la catégorie HPV- (11.28%). De plus, la catégorie HPV+ présente un pourcentage inférieur de tumeurs bien différenciées (12.5%) par rapport à la catégorie HPV- (23.08%) ($p=0.041$). Enfin, en accord avec le statut HPV défini, les patients de la catégorie HPV+ possèdent significativement plus de tumeurs p16^{ink4a} positives (90.63%) par rapport aux patients de la catégorie HPV- (p16^{ink4a} positives : 5.10%) ($p<0.0001$).

1.3 Analyse des facteurs pronostiques associés à la survie des patients

Des analyses de survie sans récurrence (PFS : *Progression free survival*) et globale (OS : *Overall survival*) univariées et multivariées ont été réalisées sur la cohorte de patients atteints d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage. 17 patients présentant des métastases ont été exclus de ces analyses. Les *p-values* sont déterminées par le test statistique non paramétrique du Log-rank. Le modèle de régression CoxPH est utilisé pour les analyses multivariées. Les données de différenciation tumorale ont été regroupées en deux groupes : bien et moyennement différenciées *versus* faiblement différenciées et basaloïdes.

1.3.1 Facteurs de risque prédictifs de la récurrence/ progression de la maladie

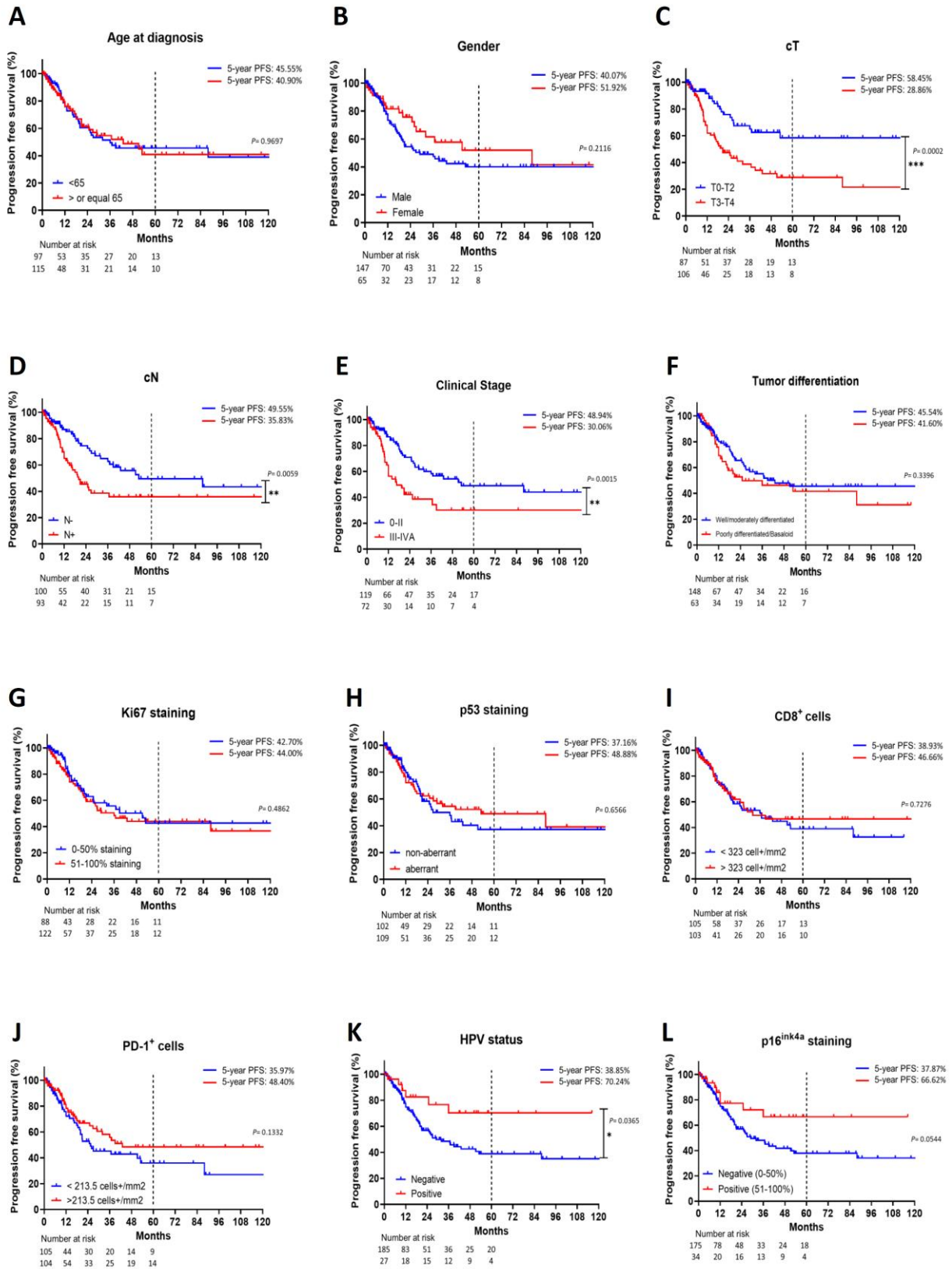


Figure 42: Analyse univariée de la survie des patients sans récurrence (Progression free survival). Le test statistique utilisé est le Log-rank. Les p-values sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$. Le « number at risk » représente le nombre de

patients en vie après 0, 12, 24, 36, 48 et 60 mois. La PFS est étudiée en fonction (A) de l'âge au diagnostic ; (B) du sexe ; (C) de la taille de la tumeur (cT) ; (D) de l'infiltration ganglionnaire par les cellules tumorales (cN) ; (E) du stade clinique ; (F) de la différenciation tumorale ; (G) de la prolifération cellulaire (marquage Ki67) ; (H) du statut p53 ; (I) de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires CD8+ ; (J) de l'infiltration tumorales par les cellules immunitaires PD1+ ; (K) du statut HPV et (L) de l'expression de la protéine p16^{ink4A}.

La survie des patients sans récurrence de la maladie (PFS) a été étudiée en fonction des différents paramètres repris dans le tableau précédent (Tableau 4 ; section 1.2 des résultats). Les courbes de survie et les analyses univariées associées sont montrées dans la figure 42. De manière notable, l'âge avancé lors du diagnostic ne semble pas avoir d'impact sur la PFS par rapport à un âge plus jeune (<65ans) ($p=0.9697$). Le taux de survie sans récurrence après 5 ans (5-year PFS) se maintient globalement à des niveaux comparables pour les deux catégories de patients étudiées. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les sexes ($p=0.2116$) (Figure 42 A et B).

Contrairement aux deux paramètres précédents, le TNM et le stade clinique sont deux facteurs pronostiques importants. En effet, une tumeur de grande taille (T3-T4) ($p=0.0002$), la présence d'une atteinte ganglionnaire (N+) ($p=0.0059$) ainsi qu'un stade tumoral avancé (III-IVA) ($p=0.0015$) sont significativement associés à une réduction de la PFS (Figure 42 C, D et E). La différenciation tumorale ($p=0.3396$), la prolifération cellulaire ($p=0.4862$), le statut p53 ($p=0.6566$) et l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires CD8+ ($p=0.7276$) et PD1+ ($p=0.1332$) ne présentent, quant à eux, pas de capacité prédictive significative en ce qui concerne le risque de récurrence de la maladie (Figure 42 F à J).

Finalement, de façon intéressante, les patients HPV- affichent une survie sans récurrence significativement réduite ($p=0.0365$) en comparaison avec les patients infectés par HPV, qui eux présentent une PFS de 70.24% après 5 ans. Une tendance similaire se manifeste également pour le paramètre p16^{ink4a} ($p=0.0544$) (Figure 42 K et L).

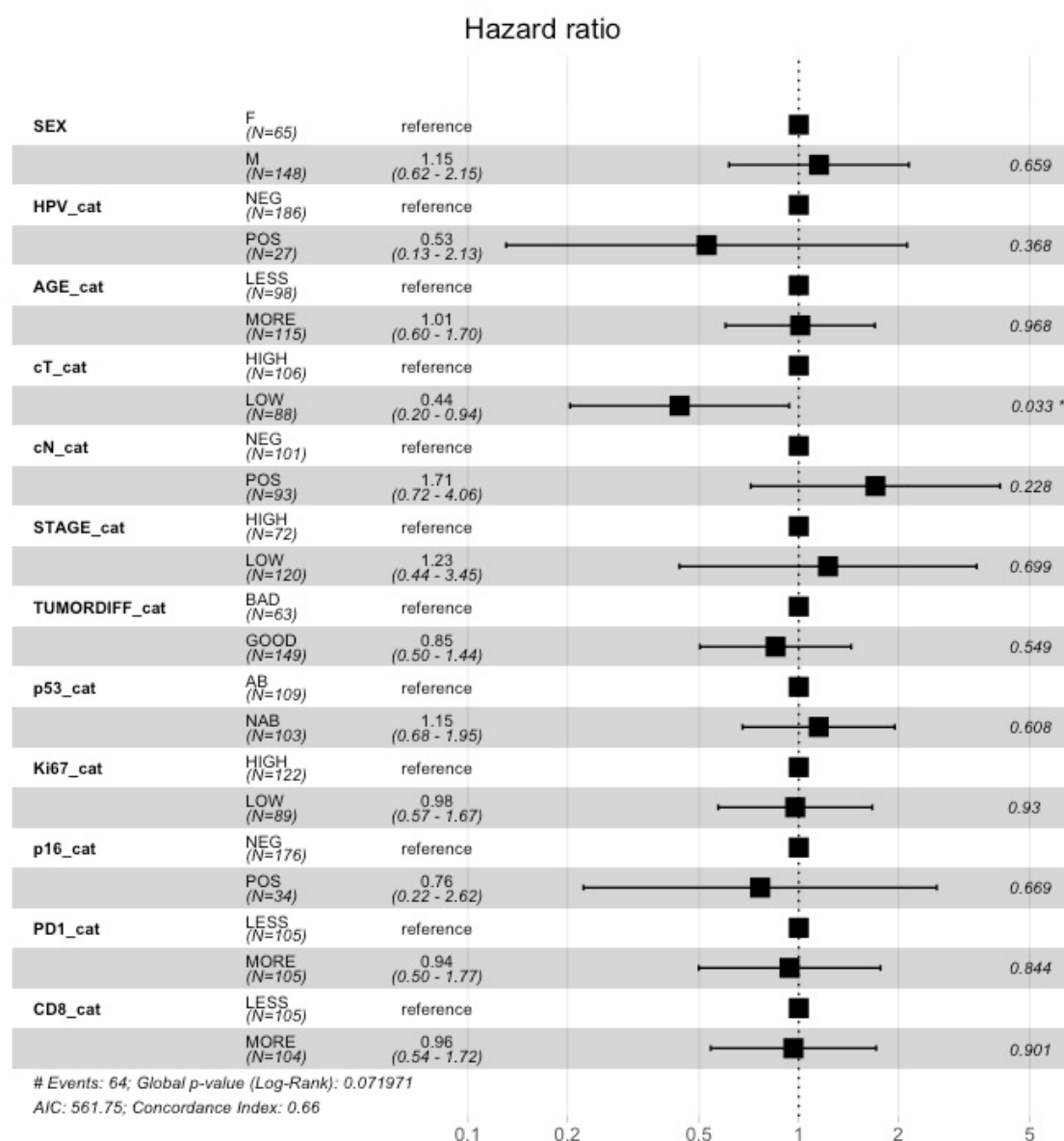


Figure 43: Représentation des paramètres clinico-pathologiques étudiés en analyse multivariée pour la survie des patients sans récurrence. (À gauche de la figure) Les différents paramètres ont été annotés comme ceci : Sexe : F (femme)/M (homme) ; HPV : négatif/positif ; âge : less (< de 65ans)/more (>de 65ans) ; cT : high (T3-T4)/ low (T0-T2) ; cN : neg (N-)/pos (N+) ; stade tumoral (stage) : high (III-IVA)/low (0-II) ; différenciation tumorale (tumordiff) : bad (faiblement différencié et basaloïde)/good (bien et moyennement différencié) ; p53 : AB (aberrant)/NAB (non aberrant) ; Ki67 : high (51-100% de marquage)/low (0-50% de marquage) ; p16 : neg (0-50% de marquage)/pos (51-100% de marquage) ; PD1 : less (<213.5 cellules/mm²)/more (>213.5 cellules/mm²) et CD8 : less (<323 cellules/mm²)/more (>323 cellules/mm²). (Au milieu) Les risques relatifs (Hazard Ratio) et les intervalles de confiance 95%. (À droite de la figure) Les p-values ont été calculées par le test statistique du Log-rank à l'aide du logiciel R. Le test statistique utilisé est le modèle de régression CoxPH.

À la suite de ces analyses univariées, une analyse multivariée a été réalisée. Les résultats de cette analyse, illustrés dans la figure 43, comprennent le risque relatif (HR : Hazard Ratio) pour chaque paramètre clinico-pathologique étudié repris dans un intervalle de confiance de 95% ainsi que la p-value associée. Cette analyse multivariée met en évidence que la taille de la tumeur (T3-T4) constitue, au sein de cette cohorte, l'unique facteur pronostique indépendant prédisant une réduction de la PFS ($p= 0.033$).

1.3.2 Facteurs pronostiques de la survie globale des patients

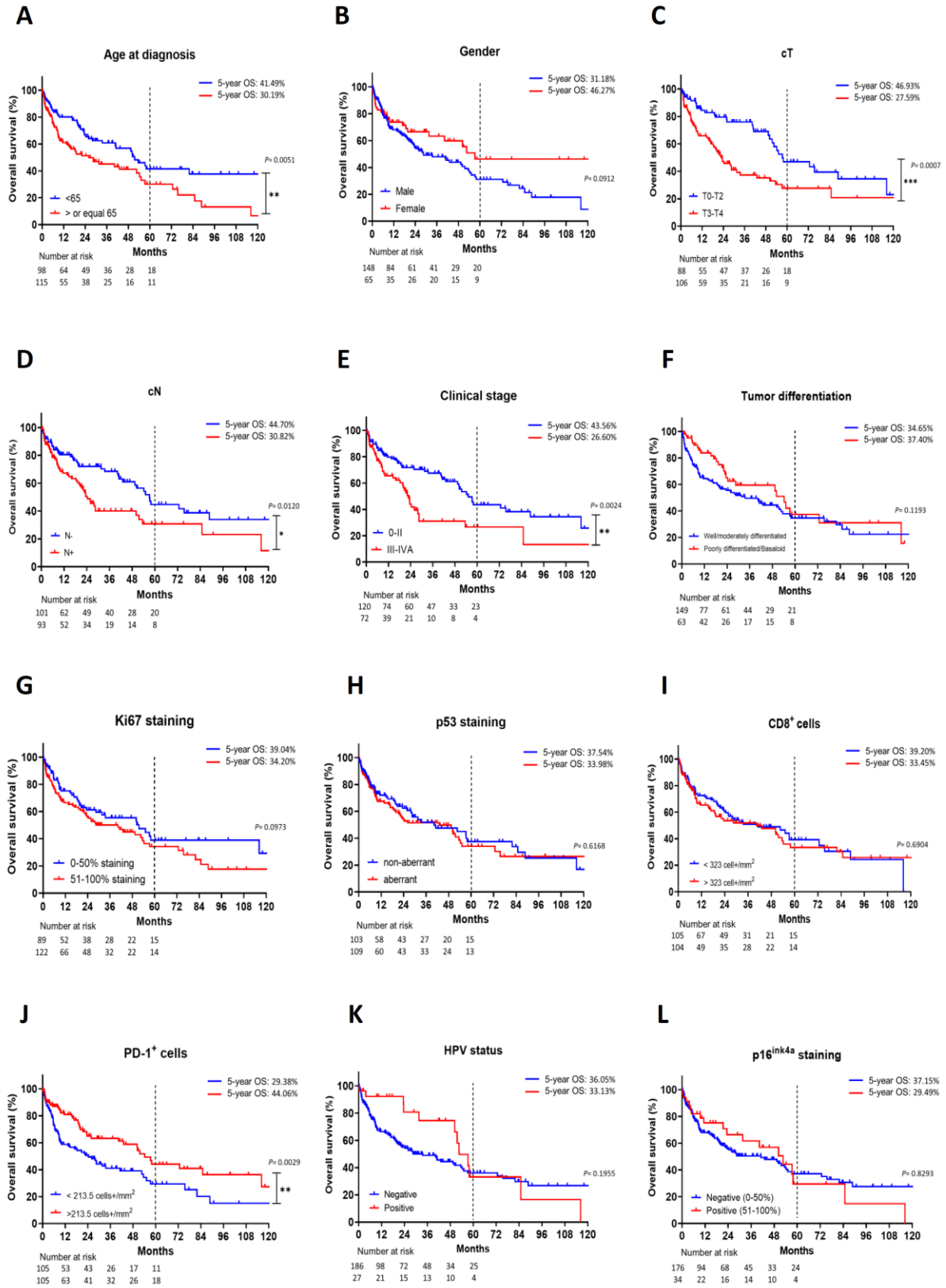


Figure 44 : Analyse univariée de la survie globale des patients (Overall survival). Le test statistique utilisé est le Log-rank. Les p-values sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$. Le « number at risk » représente le nombre de patients en vie

après 0, 12, 24, 36, 48 et 60 mois. L'OS est étudiée en fonction (A) de l'âge au diagnostic ; (B) du sexe ; (C) de la taille de la tumeur (cT) ; (D) de l'infiltration ganglionnaire par les cellules tumorales (cN) ; (E) du stade clinique ; (F) de la différenciation tumorale ; (G) de la prolifération cellulaire (marquage Ki67) ; (H) du statut p53 ; (I) de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires CD8+ ; (J) de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires PD1+ ; (K) du statut HPV et (L) de l'expression de la protéine p16^{ink4A}.

Durant la période de suivi, 109 patients sur 213 sont décédés (51.17%) à la suite de leur carcinome épidermoïde de l'œsophage ou d'une autre cause (non mentionnée). La survie globale (OS) des patients a été décomposée via des analyses univariées et multivariées.

Dans l'analyse univariée (Figure 44), la survie globale des patients est significativement réduite ($p=0.0051$) lorsque le diagnostic a été réalisé à un âge avancé (> 65 ans). Le paramètre homme présente également une tendance à diminuer l'OS ($p=0.0912$) par rapport au paramètre femme (Figure 44 A et B). Parallèlement à ce qui a été observé pour la PFS, une tumeur importante (T3-T4) ($p=0.0007$), une infiltration ganglionnaire (N+) ($p=0.0120$) ainsi qu'un stade tumoral avancé (III-IVA) ($p=0.0024$) engendre une réduction significative de la survie globale des patients (Figure 44 C, D et E). En revanche, les paramètres clinico-pathologiques suivants n'ont pas influencé significativement la survie globale des patients : la différenciation tumorale ($p=0.1193$) ; la prolifération cellulaire (Ki67) ($p=0.0973$) ; le statut p53 ($p=0.6168$) et l'infiltration par des lymphocytes T CD8+ ($p=0.6904$) (Figure 44 F à I). A noter qu'une faible infiltration par des cellules immunitaires PD1+ est associée à une diminution significative de la survie globale des patients ($p=0.0029$) (Figure 44 J). Enfin, la survie globale des patients n'est pas significativement améliorée par un statut HPV/p16^{ink4a} positif ($p=0.1955$ et $p=0.8293$ respectivement) contrairement à ce qui a été observé pour la PFS (tel que décrit dans la section 1.3.1 des résultats) (Figure 44 K et L).

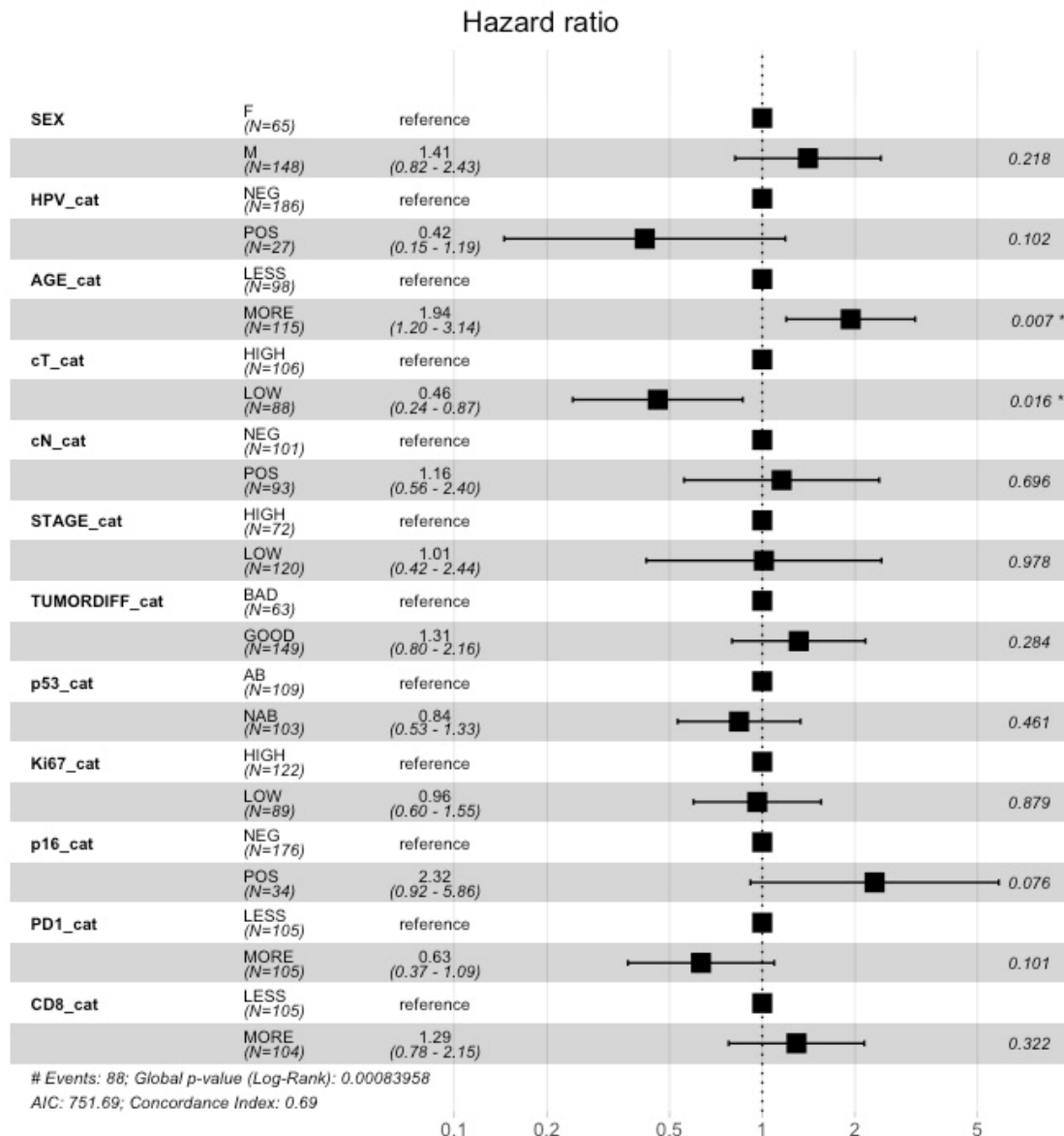


Figure 45: Représentation des paramètres clinico-pathologiques étudiés en analyse multivariée pour la survie globale des patients. (À gauche de la figure) Les différents paramètres ont été annotés comme ceci : Sexe : F (femme)/M (homme) ; HPV : négatif/positif ; âge : less (< de 65ans)/more (>de 65ans) ; cT : high (T3-T4)/low (T0-T2) ; cN : neg (N-)/pos (N+) ; stade tumoral (stage) : high (III-IVA)/low (0-II) ; différenciation tumorale (tumordiff) : bad (faiblement différencié et basaloïde)/good (bien et moyennement différencié) ; p53 : AB (aberrant)/NAB (non aberrant) ; Ki67 : high (51-100% de marquage)/low (0-50% de marquage) ; p16 : neg (0-50% de marquage)/pos (51-100% de marquage) ; PD1 : less (<213.5 cellules/mm²)/more (>213.5 cellules/mm²) et CD8 : less (<323 cellules/mm²)/more (>323 cellules/mm²). (Au milieu de la figure) Les risques relatifs (Hazard Ratio) et les intervalles de confiance 95%. (À droite de la figure) Les p-values ont été calculées par le test statistique du Log-rank à l'aide du logiciel R. Le test statistique utilisé est le modèle de régression CoxPH.

Une analyse multivariée (Figure 45) a également été réalisée pour examiner l'effet de l'ensemble des paramètres clinico-pathologiques sur la survie globale des patients. Il est important de noter que l'âge et la taille de la tumeur (cT) se révèlent être deux facteurs pronostiques indépendants et significatifs pour la survie globale des patients atteints d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage ($p=0.007$ et $p=0.016$ respectivement).

2. Caractérisation clinico-pathologique des adénocarcinomes œsophagiens et analyse de la potentielle implication d'HPV dans ces cancers

2.1 Description de la population étudiée

2.1.1 Caractéristiques cliniques et démographiques

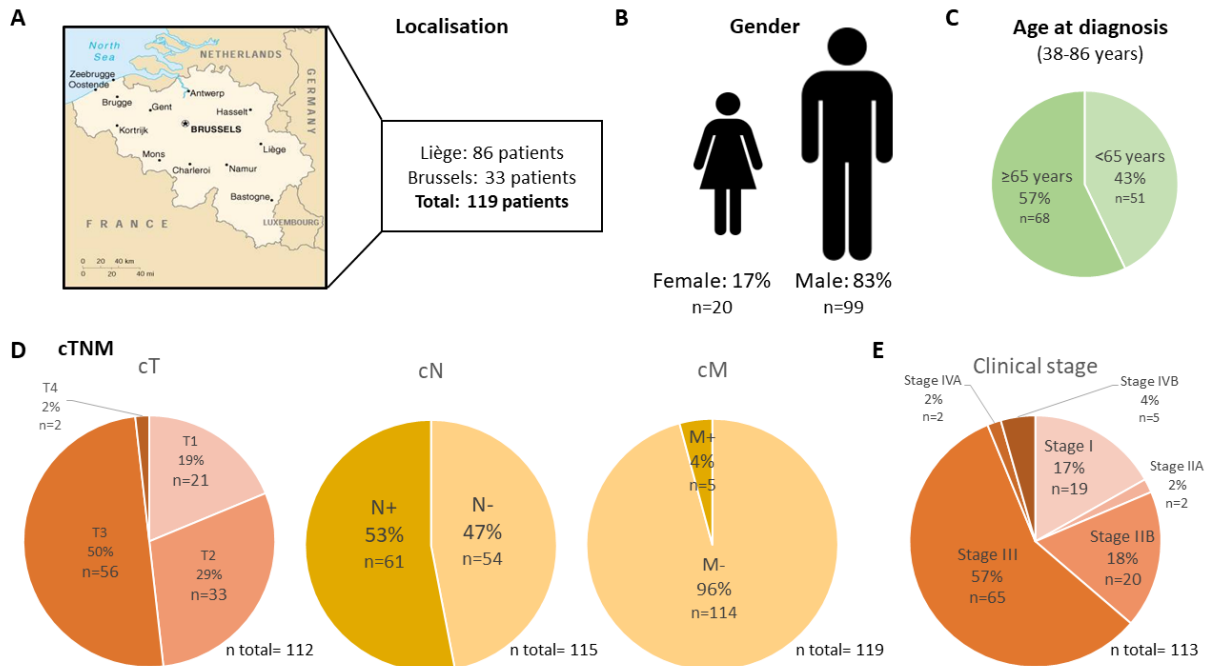


Figure 46: Description des caractéristiques démographiques et cliniques de la cohorte étudiée (n=119). (A) Régions de Belgique participant à cette étude. (B) Pourcentage des adénocarcinomes de l'œsophage réparti en fonction du sexe des patients. (C) Répartition démographique entre les individus de moins de 65 ans et ceux âgés de 65 ans et plus. (D) Distribution des tumeurs des patients en corrélation avec leur classification cTNM. (E) Répartition des tumeurs en fonction de leur stade clinique déterminé par la 8^e édition de l'AJCC.

Dans le but d'effectuer une caractérisation clinico-pathologique des adénocarcinomes de l'œsophage et d'explorer la possible implication d'une infection par HPV dans leur carcinogenèse, cent dix-neuf patients ont été inclus dans cette étude. Tous les patients sélectionnés proviennent de Belgique soit 86 patients issus de la région de Liège et 33 patients de Bruxelles. Au sein de cette population, 83% sont de sexe masculin (99/119, 83%) et 17% de sexe féminin (20/119, 17%). Concernant l'âge, parmi les patients de cette étude (âge compris entre 38 à 86 ans), 57% ont dépassé les 65 ans (68/119, 57%) (Figure 46 A, B et C). Les données relatives au cTNM et au stade clinique des tumeurs n'ont pas pu être obtenues pour une faible proportion de patients inclus dans cette cohorte. Ainsi, pour l'évaluation de la taille de la tumeur (cT), 112 patients ont été pris en compte, pour l'étude de l'infiltration ganglionnaire par des cellules tumorales (cN), 115 patients ont été inclus et pour le stade clinique, l'analyse a porté sur 113 patients. Au niveau de la taille tumorale (cT), il est notable que 50% présentent un adénocarcinome de taille T3 (56/112, 50%) tandis que l'autre moitié des patients se répartit entre les catégories de tumeur T1 (21/112, 19%) ; T2 (33/112, 29%) et T4 (2/112, 2%). Plus de la moitié des patients présentent une infiltration ganglionnaire (N+) (61/115, 53%) tandis que 4% sont atteints de métastases (5/119, 4%). Au niveau du stade clinique, on remarque que

57% des patients sont classés en stade III (65/113, 57%) alors que le reste de la population se répartit de manière variable entre les stades suivants : stade I (19/113, 17%) ; stade IIA (2/3, 2%) ; stade IIB (20/113, 18%) ; stade IVA (2/113, 2%) et stade IVB (5/113, 4%) (Figure 46 D et E).

2.1.2 Caractérisation clinico-pathologique

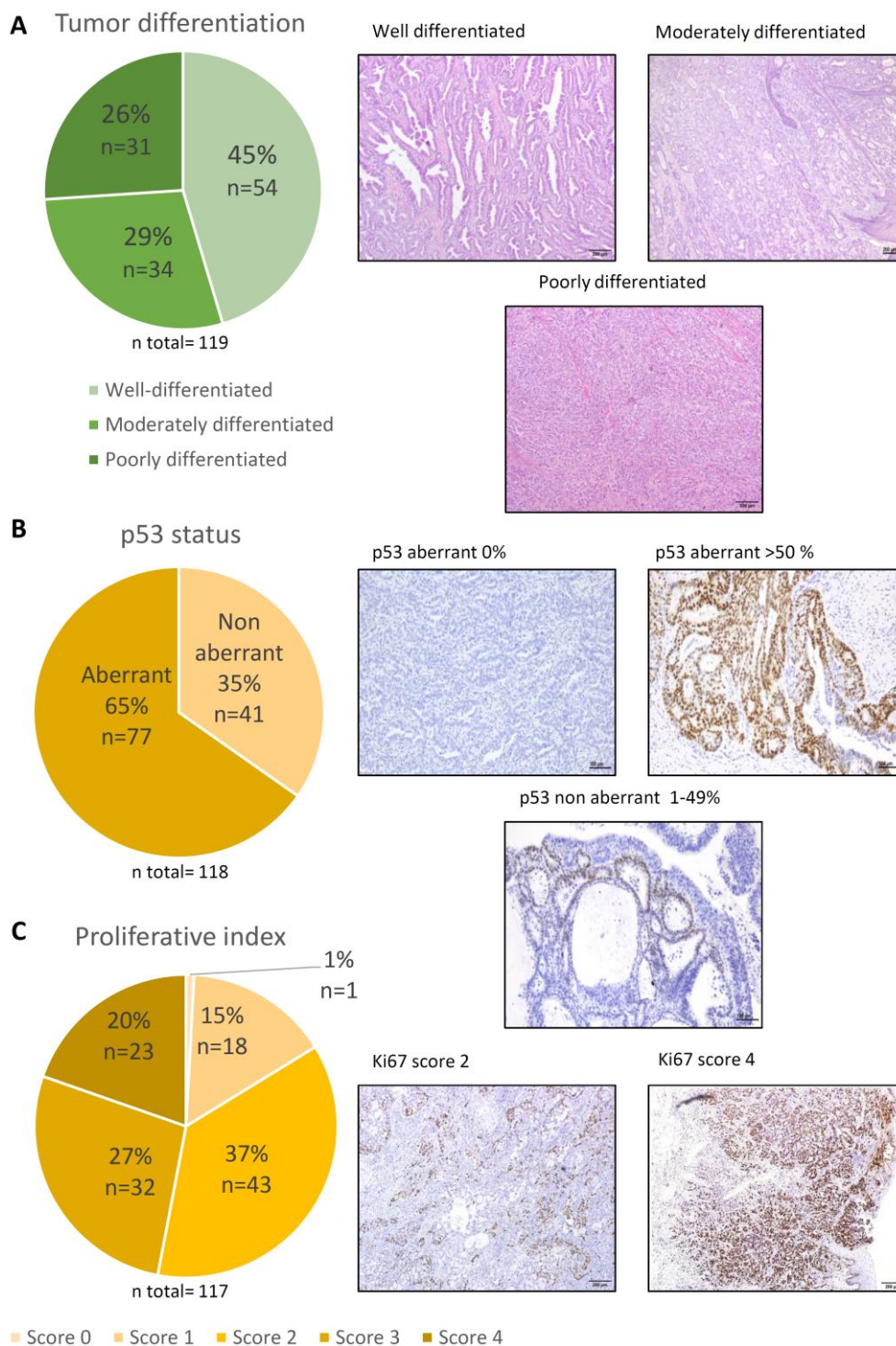


Figure 47: Caractéristiques (immuno)histologiques de la cohorte d'adénocarcinomes de l'œsophage. (A) Représentation graphique et illustrations des différents degrés de différenciation retrouvés : bien différencié, moyennement différencié et

faiblement différencié (la barre d'échelle représente 200µm). (B) Représentation graphique et illustrations du statut p53 (la barre d'échelle représente 100µm). La catégorie p53 aberrant contient les tumeurs ne présentant pas de marquage p53 et les tumeurs présentant une expression dans plus de 50% des cellules tumorales. La catégorie p53 non aberrant reprend les tumeurs avec un marquage compris entre 1 et 49%. (C) Représentation graphique et illustrations de la prolifération cellulaire (marquage Ki67). Score 0= pas de marquage ; score 1= 1-25% de marquage ; score 2= 26-50% de marquage ; score 3= 51-75% de marquage et score 4= >75% de marquage (la barre d'échelle représente 100µm).

Différentes variables histopathologiques ont été analysées par immunohistochimie (IHC) et par coloration hématoxyline-éosine pour l'ensemble de la cohorte d'adénocarcinomes de l'œsophage. Les caractéristiques étudiées sont la différenciation tumorale, le statut p53, la prolifération cellulaire, l'infiltration par les cellules inflammatoires CD8⁺ et PD1⁺ et le marqueur « jonctionnel » kératine 7. En raison de problèmes techniques (absence de lames résiduelles, détachement du tissu lors du déparaffinage), le statut p53 ainsi que l'expression de Kératine 7 n'ont pas pu être évalués pour 1 patient. De plus, la prolifération cellulaire (Ki67) et l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires CD8⁺ et PD1⁺ n'ont également pas pu être déterminées pour 2 patients.

Comme illustré dans la figure 47 A, on peut constater que 45% des adénocarcinomes sont bien différenciés (54/119, 45%) alors que 29% affichent une différenciation moyenne (34/119, 29%) et 26% une différenciation faible (31/119, 26%). Plus de 60% des tumeurs présentent un statut p53 aberrant caractérisé par l'absence de marquage ou un marquage supérieur à 50% (77/118, 65%) et plus de 45% des tumeurs ont une prolifération cellulaire importante, avec plus de 50% des cellules marquées par Ki67 (Score 3 : 32/117, 27% et score 4 : 23/117, 20%) (Figure 47 B et C).

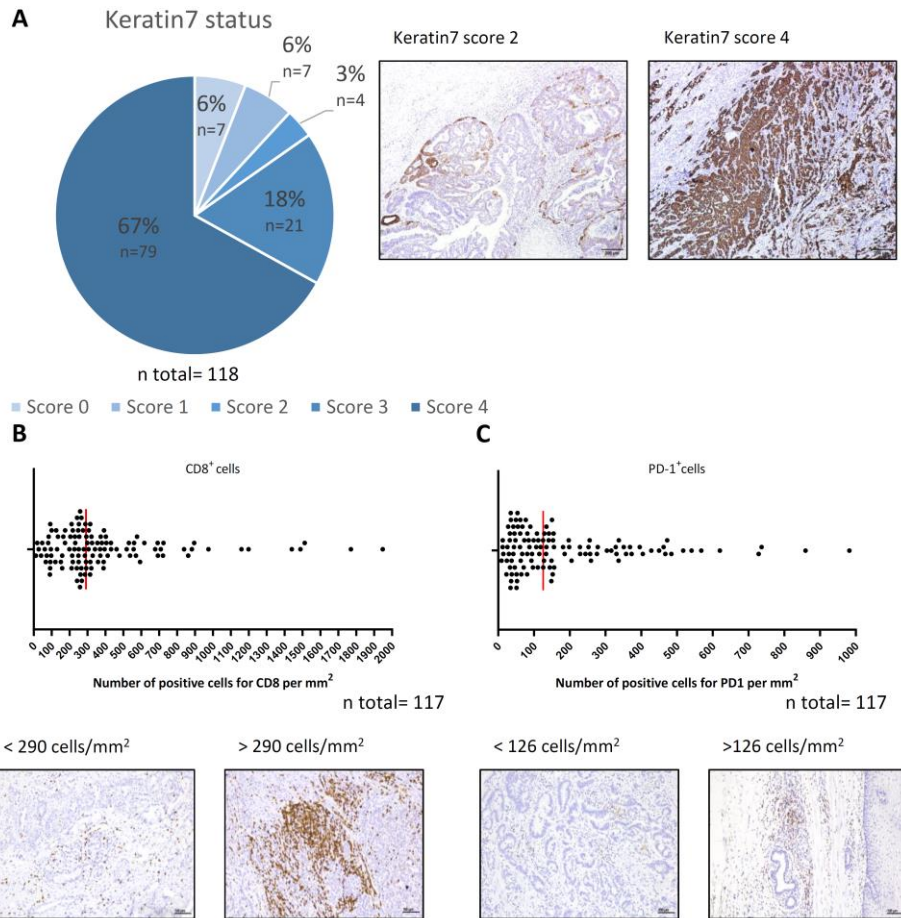


Figure 48: Représentation graphique et illustrations de l'expression de kératine 7 dans les tumeurs et de l'infiltration immunitaire. (A) Le statut kératine 7 est réparti en différents scores de marquage : score 0= pas de marquage ; score 1= 1-25% de marquage ; score 2= 26-50% de marquage ; score 3= 51-75% de marquage et score 4= >75% de marquage (la barre d'échelle représente 200µm). (B) Nombre de cellules CD8+ par mm². Chaque point sur le graphique représente un patient (médiane : 290 cellules/mm²) (la barre d'échelle représente 100µm). (C) Nombre de cellules PD1+ par mm². Chaque point sur le graphique représente un patient (médiane : 126 cellules/mm²) (la barre d'échelle représente 100µm).

Le marqueur kératine 7 montre que 85% des tumeurs ont un score 3 (21/118, 18%) ou un score 4 (79/118, 67%) démontrant l'origine « jonctionnelle » de ces adénocarcinomes (Figure 48 A). En ce qui concerne l'infiltration immunitaire, les marquages CD8 et PD1 ont été analysés de manière similaire aux ESCC par le programme QuPath 0.3.0. Malgré une considérable variation inter-individus, la plupart des tumeurs révèlent une densité intra-tumorale relativement élevée pour les lymphocytes T CD8⁺ (médiane : 290 cellules/mm²) et une densité clairement moindre en cellules PD1⁺ (médiane : 126 cellules/mm²) (Figure 48 B et C).

2.1.2.1 Statut HPV des adénocarcinomes

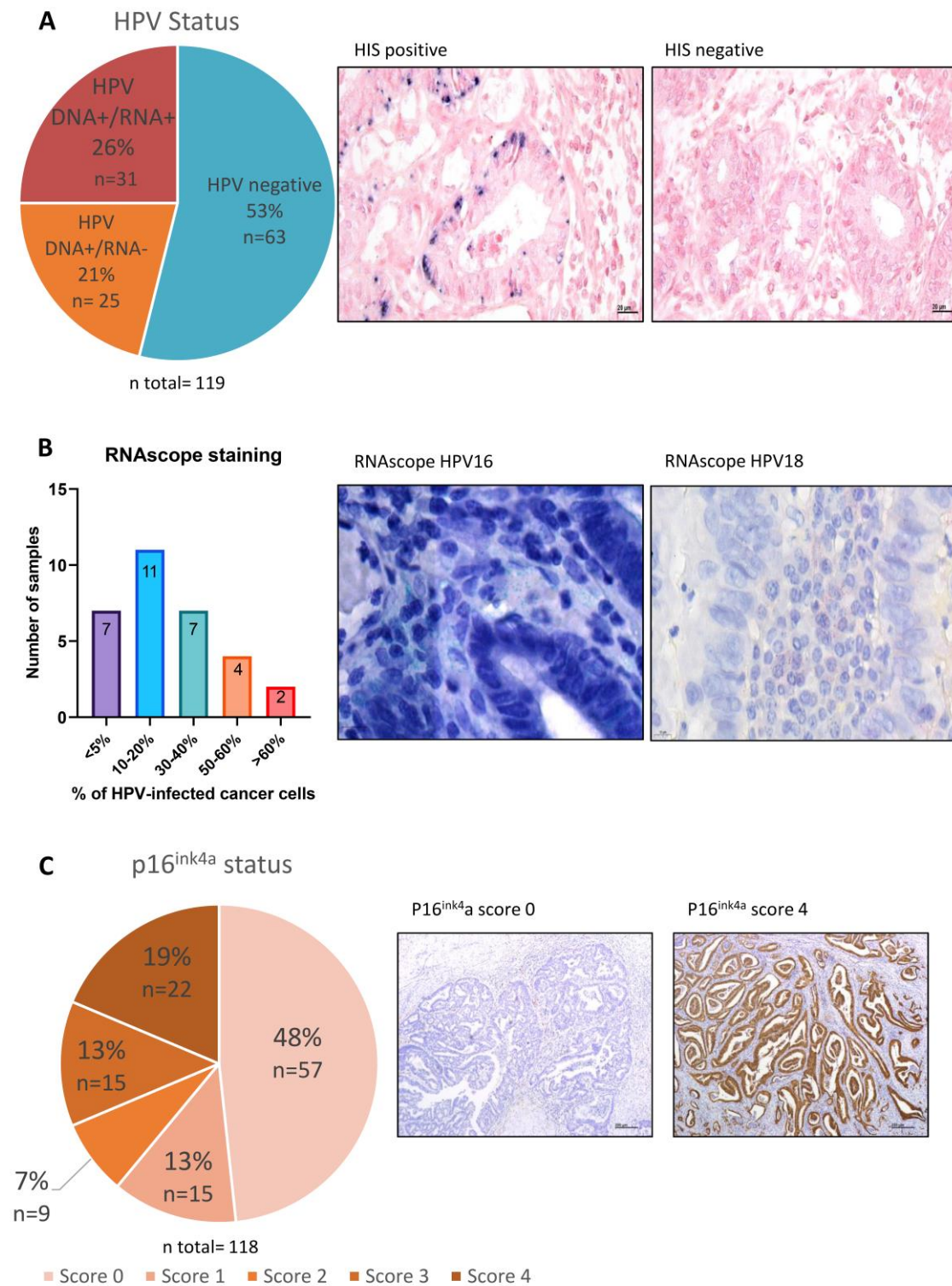


Figure 49: Représentation graphique et illustrations du statut HPV et p16^{ink4a} des adénocarcinomes œsophagiens. (A) Répartition des tumeurs en fonction de leur statut HPV : HPV négatif, HPV ADN+/ARN- et HPV ADN+/ARN+. Hybridation in situ positive (points mauves) et négative. la barre d'échelle représente 20µm. (B) Graphique exprimant le pourcentage de cellules positives HPV16 et/ou HPV18 en RNAscope et illustrations de la technique RNAscope montrant l'ARN d'HPV16 (points verts) et HPV18 (points rouges) (la barre d'échelle représente 10µm). (C) Répartition des tumeurs en fonction de leur statut p16^{ink4a} : score 0= pas de marquage ; score 1= 1-25% de marquage ; score 2= 26-50% de marquage ; score 3= 51-75% de marquage et score 4= >75% de marquage (la barre d'échelle représente 200µm).

De façon similaire aux carcinomes épidermoïdes, le statut HPV des adénocarcinomes a été évalué au moyen de tests spécifiques et sensibles. Nous avons procédé à un génotypage à l'aide des techniques *Abbott RealTime assay*, *Cobas 6800 assay* ou *Luminex assay* afin de détecter la présence d'ADN d'HPV dans les échantillons. Parmi les 119 adénocarcinomes inclus dans notre étude, nous avons observé une infection par HPV (ADN+) dans 47% des cas (56/119, 47%). Les génotypes d'HPV détectés comprennent principalement HPV16 (présent dans 45 tumeurs) et HPV18 (dans 21 tumeurs) ainsi que d'autres HPV comme HPV 33 et 39 repris dans la catégorie « autre » (11 tumeurs). L'hybridation *in situ* a permis de confirmer ces résultats. Cependant, en raison de manques techniques et d'informations sur les génotypes retrouvés dans la catégorie « autre », nous n'avons pas pu les prendre en compte dans les analyses transcriptionnelles ultérieures. La RTqPCR et le RNAscope ont révélé la présence d'une infection par HPV transcriptionnellement active dans 26% des cas (HPV16 et/ou HPV18) (31/119, 26%) (Figure 49 A et B). Cependant, contrairement aux ESCC, toutes les cellules tumorales ne sont pas infectées par HPV comme le montre le graphique de la Figure 49 B. Le pourcentage de cellules infectées par HPV est, en effet, majoritairement compris entre 10% et 40%. Enfin, un pourcentage élevé de tumeurs (68%) ne présente que peu ou pas de marquage pour p16^{ink4a} (score 0 : 57/118, 48% ; score 1 : 15/118, 13% et score 2 : 9/118, 7%) (Figure 49 C). Un échantillon n'a pas pu être évalué pour le marquage p16^{ink4a}.

2.2 Comparaison des caractéristiques clinico-pathologiques des patients en fonction de leur statut HPV

Characteristics	HPV - (n= 63) (52.94%)	HPV DNA+/RNA- (n=25) (21.01%)	HPV DNA+/RNA+ (n=31) (26.05%)	p value
<i>Age at diagnosis</i> (38-86 years)	n=63	n=25	n=31	p= 0.8625
<65	28 (44.44%)	11 (44%)	12 (38.71%)	
≥65	35 (55.56%)	14 (56%)	19 (61.29%)	
<i>Gender</i>	n=63	n=25	n=31	p = 0.5954
Male	54 (85.71%)	21 (84%)	24 (77.42%)	
Female	9 (14.29%)	4 (16%)	7 (22.58%)	
<i>cTNM</i>				p = 0.0057**
<i>cT</i>	n=60	n=22	n=30	
T1-T2	27 (45%)	17 (77.27%)	10 (33.33%)	
T3-T4	33 (55%)	5 (22.73%)	20 (66.67%)	
<i>cN</i>	n=61	n=24	n=30	p = 0.7119
N-	27 (44.26%)	13 (54.17%)	14 (46.67%)	
N+	34 (55.74%)	11 (45.83%)	16 (53.33%)	
<i>cM</i>	n=63	n=25	n=31	/
M-	58 (92.06%)	25 (100%)	31 (100%)	
M+	5 (7.94%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	

<i>Clinical stage (AJCC 8th edition)</i>	n=61	n=22	n=30	<i>p</i> = 0.1348
Stage I-IIb	20 (32.79%)	12 (54.55%)	9 (30%)	
Stage III-IVb	41 (67.21%)	10 (45.45%)	21 (70%)	
<i>p16^{ink4a} staining</i>	n=62	n=25	n=31	<i>p</i> = 0.9484
Negative (0-50%)	42 (67.74%)	17 (68%)	22 (70.97%)	
Positive (51-100%)	20 (32.26%)	8 (32%)	9 (29.03%)	
<i>Tumor differentiation</i>	n=63	n=25	n=31	<i>p</i> = 0.6335
Well differentiated	30 (47.62%)	13 (52%)	11 (35.48%)	
Moderately differentiated	16 (25.40%)	6 (24%)	12 (38.71%)	
Poorly differentiated	17 (26.98%)	6 (24%)	8 (25.81%)	
<i>p53 status</i>	n=62	n=25	n=31	<i>p</i> = 0.2519
Aberrant (0 or >50%)	38 (61.29%)	15 (60%)	24 (77.42%)	
Non aberrant	24 (38.71%)	10 (40%)	7 (22.58%)	
<i>Proliferative index (Ki67)</i>	n=62	n=25	n=30	<i>p</i> = 0.9326
0-50%	32 (51.61%)	14 (56%)	16 (53.33%)	
51-100%	30 (48.39%)	11 (44%)	14 (46.67%)	
<i>Keratin7 staining</i>	n=63	n=25	n=30	/
0-50%	9 (14.29%)	1 (4%)	8 (26.67%)	
51-100%	54 (85.71%)	24 (96%)	22 (73.33%)	
<i>CD8⁺ cells</i> (median: 290 cells/mm ²)	n=62	n=25	n=30	<i>p</i> = 0.7861
<290 cells/mm ²	30 (48.39%)	11 (44%)	16 (53.33%)	
>290 cells/mm ²	32 (51.61%)	14 (56%)	14 (46.67%)	
<i>PD1⁺ cells</i> (median: 126 cells/mm ²)	n=63	n=24	n=30	<i>p</i> = 0.5468
<126 cells/mm ²	31 (49.21%)	10 (41.67%)	17 (56.67%)	
>126 cells/mm ²	32 (50.79%)	14 (58.83%)	13 (43.33%)	

Tableau 5: Caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage en fonction de leur statut HPV (négatif, ADN+/ARN-, ADN+/ARN+). Le test statistique utilisé est le test du χ^2 . La p-value est déterminée comme significative lorsque celle-ci est inférieure à 0.05.

Après avoir déterminé précisément le statut HPV de l'ensemble de la population étudiée, les patients ont été séparés en 3 catégories : HPV négatif, HPV ADN+/ARN- et HPV ADN+/ARN+. Ces catégories ont ensuite été comparées selon diverses caractéristiques clinico-pathologiques présentés dans le tableau 5 ci-dessus. Certaines données de patient sont manquantes, c'est pourquoi le nombre de patients par catégorie et par critère étudié est indiqué au-dessus de chaque résultat. Les données relatives au cT, au stade clinique, à l'indice

de prolifération et au statut kératine 7 ont été regroupées en deux lignes afin de pouvoir calculer la *p-value* (montrant les différences entre les catégories) par le test statistique du χ^2 . 2 caractéristiques : la présence de métastase (cM) et kératine 7 n'ont pas pu être évalués statistiquement vu le peu (voire l'absence) de données dans certaines catégories. Les résultats ont montré que l'âge ($p=0.8625$); le sexe ($p=0.5954$); l'atteinte ganglionnaire (cN) ($p=0.7119$); le stade clinique ($p=0.1348$); le statut p16^{ink4a} ($p=0.9484$); la différenciation tumorale ($p=0.6335$); le statut p53 ($p=0.2519$); la prolifération cellulaire ($p=0.9326$) et l'infiltration immunitaire des cellules CD8⁺ ($p=0.7861$) et PD1⁺ ($p=0.5468$) ne sont pas des caractéristiques statistiquement différentes entre les 3 catégories. Cependant, il est à noter que la taille de la tumeur se distingue de manière significative entre les catégories ($p=0.0057$). En effet, une proportion de 66.67% des tumeurs de la catégorie HPV ADN+/ARN+ sont classées en tant que T3-T4 [tumeurs envahissant l'adventice (T3) ou les structures adjacentes (T4)], en comparaison avec la catégorie HPV ADN+/ARN- où seulement 22.73% des tumeurs sont de taille T3-T4.

2.3 Analyse des facteurs pronostiques associés à la survie des patients

Des analyses de survie sans récurrence de la maladie (PFS) et globale (OS) univariées et multivariées ont été réalisées sur notre cohorte de patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage. 5 patients présentant des métastases ont été exclus de ces analyses. Les *p-values* sont déterminées par le test statistique non paramétrique du Log-rank. Le modèle de régression CoxPH est utilisé pour les analyses multivariées. Les données de différenciation tumorale ont été regroupées en deux groupes : bien et moyennement différenciées *versus* faiblement différenciées. Pour l'analyse de survie en fonction d'HPV, les patients ont été regroupés en HPV négatifs (catégories HPV- et HPV ADN+/ARN-) et HPV positifs (catégorie HPV ADN+/ARN+).

2.3.1 Facteurs de risque prédictifs de la récurrence/ progression de la maladie

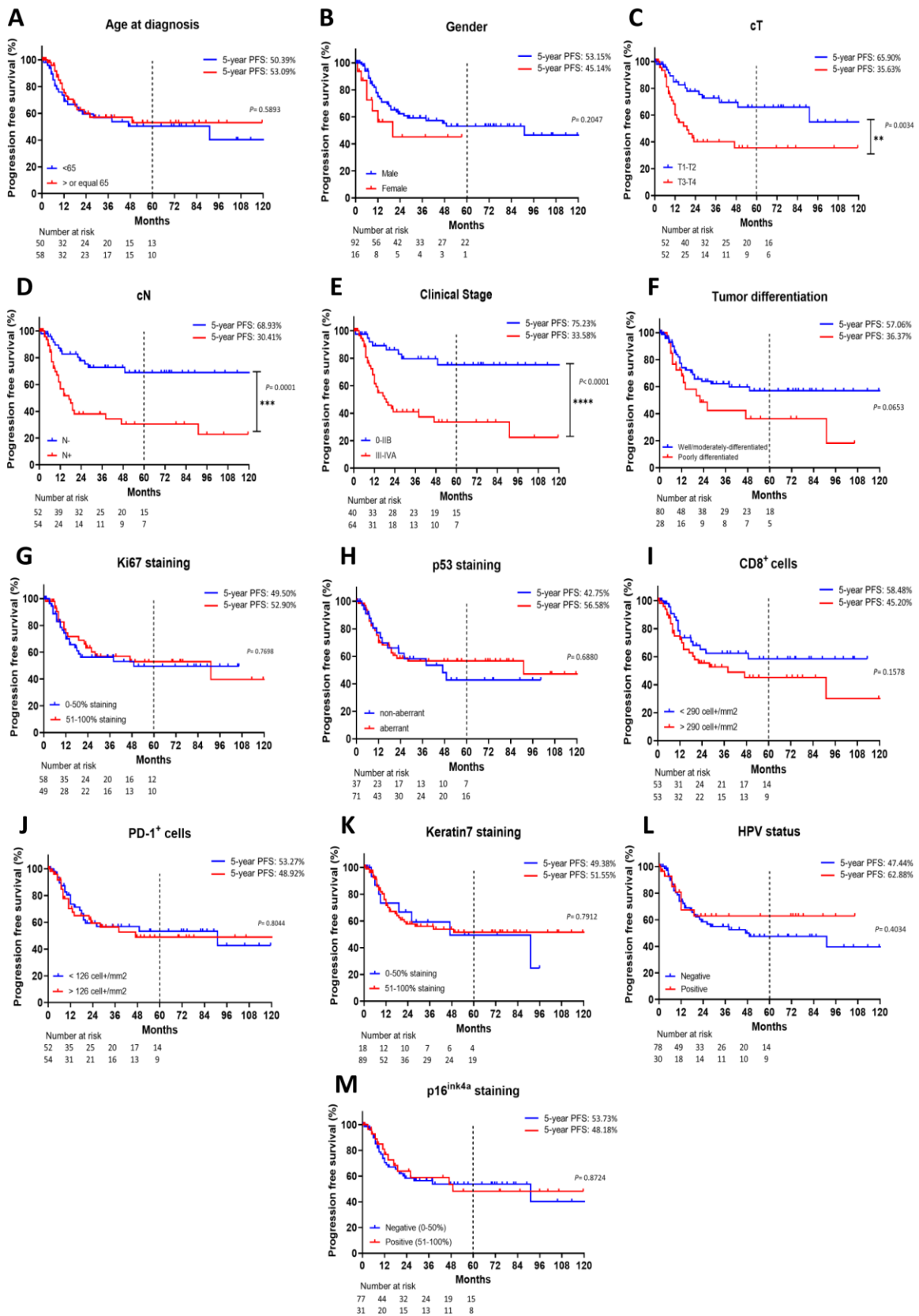


Figure 50: Analyse univariée de la survie des patients sans récurrence (Progression free survival). Le test statistique utilisé est le Log-rank. Les p-values sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$. Le « number at risk » représente le nombre de

patients en vie après 0, 12, 24, 36, 48 et 60 mois. La PFS est étudiée en fonction (A) de l'âge au diagnostic ; (B) du sexe ; (C) de la taille de la tumeur (cT) ; (D) de l'infiltration ganglionnaire par les cellules tumorales (cN) ; (E) du stade clinique ; (F) de la différenciation tumorale ; (G) de la prolifération cellulaire (marquage Ki67) ; (H) du statut p53 ; (I) de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires CD8+ ; (J) de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires PD1+ ; (K) du marquage kératine 7 ; (L) du statut HPV et (M) de l'expression de la protéine p16^{ink4A}.

La survie des patients sans récurrence de la maladie (PFS) a été étudiée en fonction des différents paramètres repris dans le tableau précédent (Tableau 5 ; section 2.2 des résultats). Les courbes de survie et les analyses univariées associées sont montrées dans la figure 50. Les facteurs tels que l'âge ($p=0.5893$) et le sexe ($p=0.2047$) ne semblent pas influencer la PFS bien que le faible nombre de femmes incluses dans la cohorte doit être mentionné (Figure 50 A et B). De façon similaire aux études réalisées sur les ESCC, le TNM et le stade clinique s'avèrent être des excellents facteurs pronostiques. En effet, une tumeur de grande taille (T3-T4) ($p=0.0034$), la présence d'une atteinte ganglionnaire (N+) ($p=0.0001$) ainsi qu'un stade tumoral avancé (III-IVA) ($p<0.0001$) sont statistiquement corrélés à une réduction de la PFS (Figure 50 C, D et E). Par ailleurs, une tendance à une diminution de la PFS est également observée lorsque les tumeurs sont faiblement différenciées ($p=0.0653$) (Figure 50 F). Les paramètres suivants n'ont pas démontré d'influence significative en tant que facteurs pronostiques sur la survie des patients sans récurrence : la prolifération cellulaire ($p=0.7698$) ; le statut p53 ($p=0.6880$) ; l'infiltration par les lymphocytes T CD8+ ($p=0.1578$) et les cellules PD1+ ($p=0.8044$) et l'expression de la kératine7 ($p=0.7912$) (Figure 50 G à K). En ce qui concerne le statut HPV des patients, bien que la PFS après 5 ans soit supérieure chez les patients HPV+ (62.88%) par rapport aux patients HPV- (47.44%), cette différence de 15% n'est pas statistiquement significative ($p=0.4034$). Cette observation est également applicable au statut p16^{ink4a} des patients ($p=0.8724$) (Figure 50 L et M).

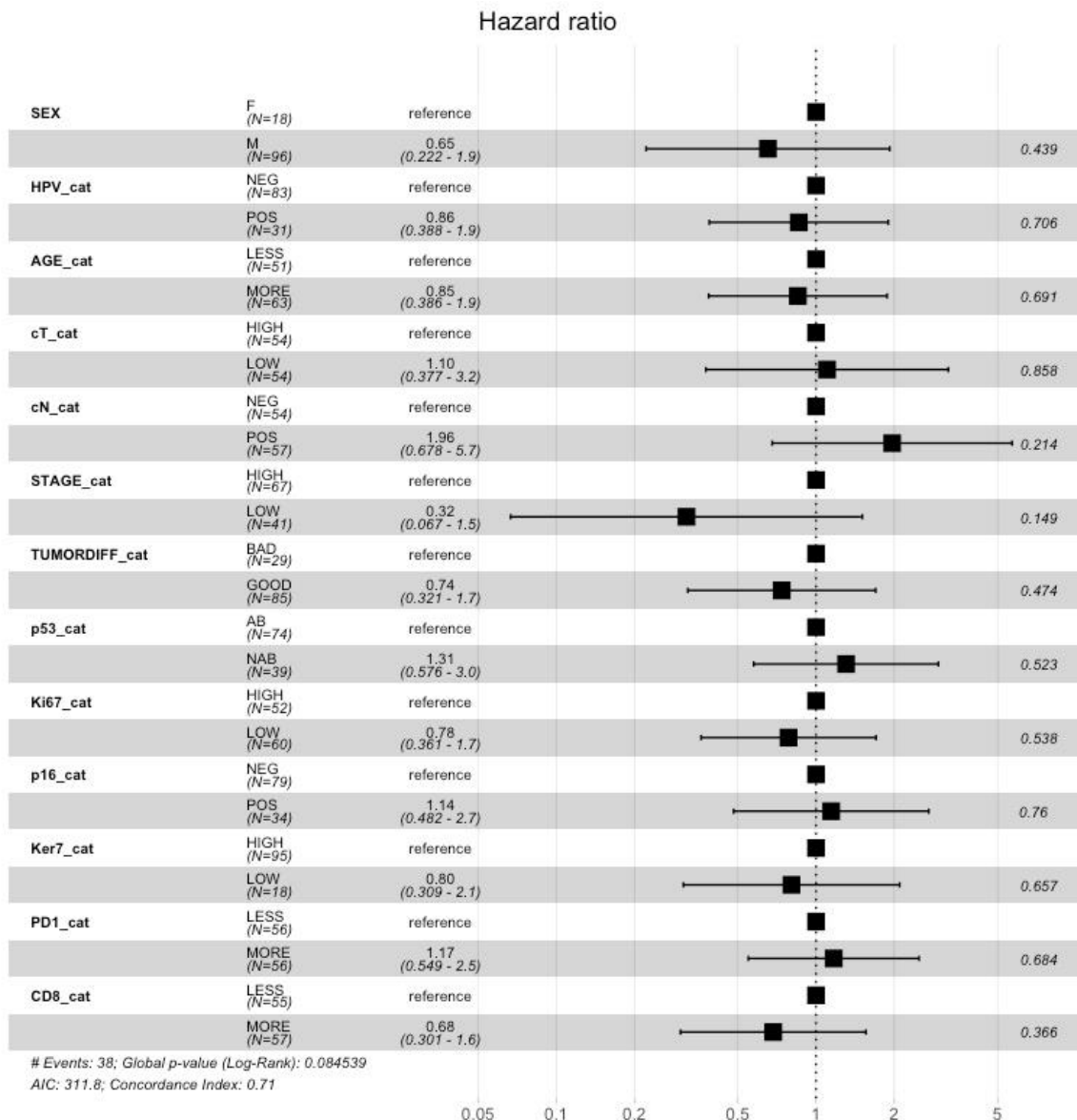


Figure 51: Représentation des paramètres clinico-pathologiques étudiés en analyse multivariée pour la survie des patients sans récurrence. (À gauche de la figure) Les différents paramètres ont été annotés comme ceci : Sexe : F (femme)/M (homme) ; HPV : négatif/positif ; âge : less (< de 65ans)/more (>de 65ans) ; cT : high (T3-T4)/ low (T0-T2) ; cN : neg (N-)/pos (N+) ; stade tumoral (stage) : high (III-IVA)/low (0-IIb) ; différenciation tumorale (tumordiff) : bad (faiblement différencié)/good (bien et moyennement différencié) ; p53 : AB (aberrant)/NAB (non aberrant) ; Ki67 : high (51-100% de marquage)/low (0-50% de marquage) ; p16 : neg (0-50% de marquage)/pos (51-100% de marquage) ; Ker7 : high (51-100% de marquage)/low (0-50% de marquage) ; PD1 : less (<126 cellules/mm²)/more (>126 cellules/mm²) et CD8 : less (<290 cellules/mm²)/more (>290 cellules/mm²). (Au milieu) Les risques relatifs (Hazard Ratio) et les intervalles de confiance 95%. (À droite de la figure) Les p-values ont été calculées par le test statistique du Log-rank à l'aide du logiciel R. Le test statistique utilisé est le modèle de régression CoxPH.

À la suite de ces analyses univariées, une analyse multivariée a été réalisée. La figure 51 montre les résultats de cette analyse comprenant le risque relatif (HR : Hazard Ratio) de chaque paramètre clinico-pathologique étudié repris dans un intervalle de confiance de 95% ainsi que la p-value associée. Malgré des différences significatives constatées en analyse univariée, aucun paramètre ne s'est révélé être un facteur pronostique indépendant dans l'analyse multivariée.

2.3.2 Facteurs pronostiques de la survie globale des patients

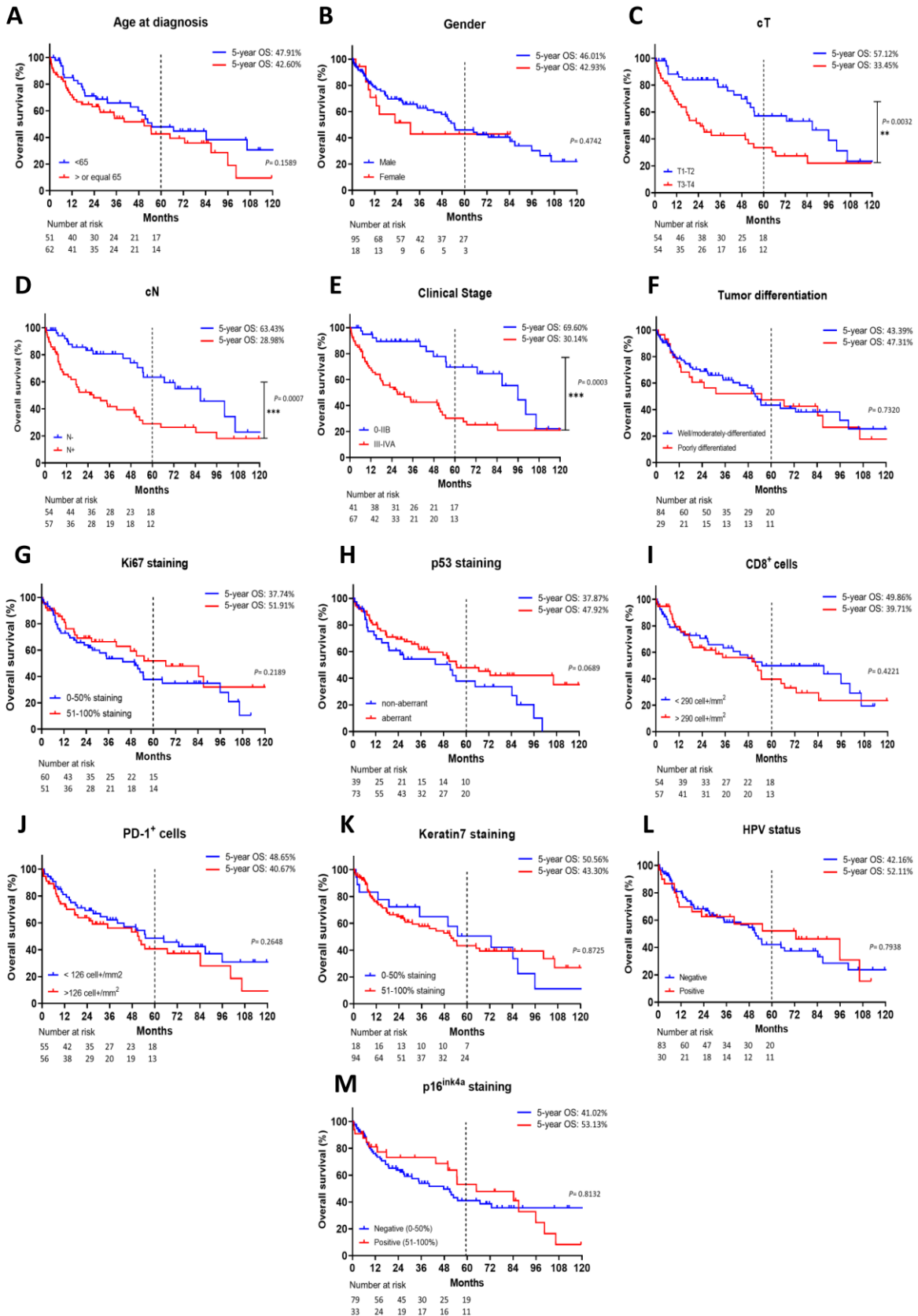


Figure 52: Analyse univariée de la survie globale des patients (Overall survival). Le test statistique utilisé est le Log-rank. Les p-values sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$. Le « number at risk » représente le nombre de patients en vie

après 0, 12, 24, 36, 48 et 60 mois. L'OS est étudiée en fonction (A) de l'âge au diagnostic ; (B) du sexe ; (C) de la taille de la tumeur (cT) ; (D) de l'infiltration ganglionnaire par les cellules tumorales (cN) ; (E) du stade clinique ; (F) de la différenciation tumorale ; (G) de la prolifération cellulaire (marquage Ki67) ; (H) du statut p53 ; (I) de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires CD8+ ; (J) de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires PD1+ ; (K) du marquage kératine 7 ; (L) du statut HPV et (M) de l'expression de la protéine p16^{ink4A}.

La survie globale (OS) (analyses univariées et multivariées) des patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage a également été étudiée pour l'ensemble des paramètres clinico-pathologiques cités précédemment. Les différents graphiques et les analyses univariées associées sont repris dans la figure 52. De façon similaire à la PFS, l'âge ($p=0.1589$) et le sexe ($p=0.4742$) n'ont pas d'influence sur la survie globale des patients (Figure 52 A et B) alors que le TNM et le stade tumoral clinique sont deux facteurs pronostiques robustes. En effet, une tumeur large (T3-T4) ($p=0.0032$), la présence de cellules tumorales dans les ganglions (N+) ($p=0.0007$) et un stade tumoral avancé (III-IVA) ($p=0.0003$) sont statistiquement corrélés à une réduction de la survie globale des patients (Figure 52 C, D et E). Cependant, aucune différence significative n'est observée pour les paramètres suivants : la différenciation tumorale ($p=0.7320$) ; la prolifération cellulaire ($p=0.2189$) ; le statut p53 ($p=0.0689$) ; l'infiltration tumorale par les lymphocytes T CD8+ ($p=0.4221$) et les cellules PD1+ ($p=0.2648$) ainsi que l'expression de la kératine7 ($p=0.8725$) (Figure 52 F à K). Finalement, il est important de souligner que le statut HPV/p16^{ink4a} positif n'est pas associé significativement à une meilleure survie globale des patients ($p=0.7938$ et $p=0.8132$ respectivement) (Figure 52 L et M).

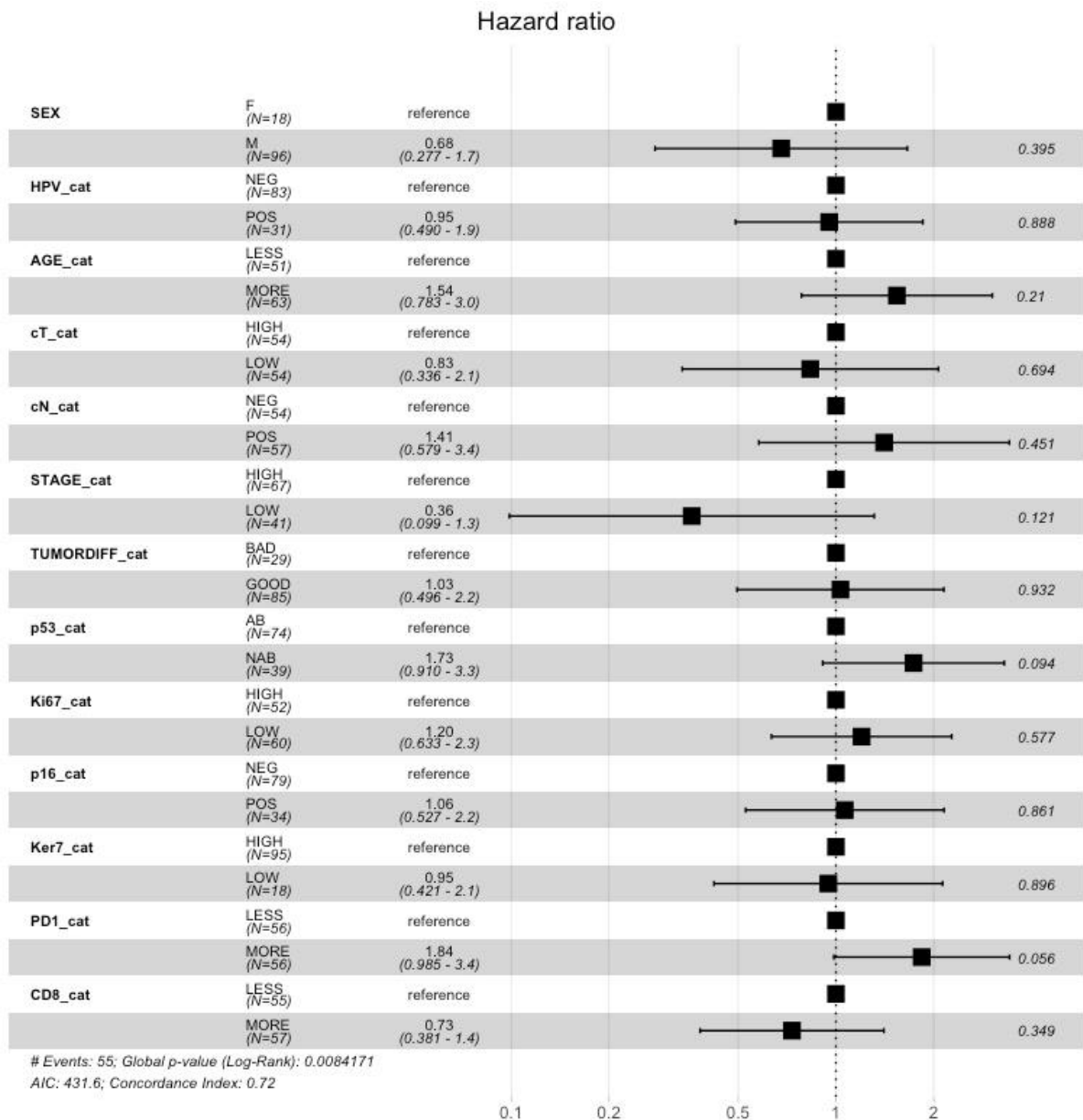


Figure 53: Représentation des paramètres clinico-pathologiques étudiés en analyse multivariée pour la survie globale des patients. (À gauche de la figure) Les différents paramètres ont été annotés comme ceci : Sexe : F (femme)/M (homme) ; HPV : négatif/positif ; âge : less (< de 65ans)/more (> de 65ans) ; cT : high (T3-T4)/ low (T0-T2) ; cN : neg (N-)/pos (N+) ; stade tumoral (stage) : high (III-IVA)/low (0-IIb) ; différenciation tumorale (tumordiff) : bad (faiblement différencié)/good (bien et moyennement différencié) ; p53 : AB (aberrant)/NAB (non aberrant) ; Ki67 : high (51-100% de marquage)/low (0-50% de marquage) ; p16 : neg (0-50% de marquage)/pos (51-100% de marquage) ; Ker7 : high (51-100% de marquage)/low (0-50% de marquage) ; PD1 : less (<126 cellules/mm²)/more (>126 cellules/mm²) et CD8 : less (<290 cellules/mm²)/more (>290 cellules/mm²). (Au milieu) Les risques relatifs (Hazard Ratio) et les intervalles de confiance 95%. (À droite de la figure) Les p-values ont été calculées par le test statistique du Log-rank à l'aide du logiciel R. Le test statistique utilisé est le modèle de régression CoxPH.

L'analyse multivariée, comme illustrée dans la figure 53, n'a pas révélé de paramètre pouvant être identifié comme un facteur pronostique indépendant exerçant une influence sur la survie globale des patients.

Partie 2 : Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma (usual type and variants) : a systematic review and meta-analysis

Under review in Journal of Medical Virology

Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma (usual type and variants): a systematic review and meta-analysis

Celia Reynders^{1*}, Thomas Lerho^{1*}, Emily A Goebel^{2§}, Christopher P Crum², Sandrina Vandenput³, Charlotte Beaudart^{4#} and Michael Herfs^{1#}

¹Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

²Department of Pathology, Division of Women's and Perinatal Pathology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

³Health sciences library, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

⁴Division of Public Health, Epidemiology and Health Economics, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

*CR and TL contributed equally as first authors

#CB and MH contributed equally as last authors

§Current address: Department of Pathology and Laboratory Medicine, London Health Sciences Centre and Western University, London, ON, Canada

Running title: HPV infection in cervical glandular neoplasms

Keywords: cervical adenocarcinoma, HPV, epidemiology, meta-analysis

Author to whom correspondence, proofs and reprint requests should be sent:

Michael Herfs, PhD

Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer (B23 +4)

University of Liege

4000 Liege

Belgium

Tel: (+32) 4 366 42 82

Email: M.Herfs@uliege.be

Abstract

Cervical glandular neoplasms represent a heterogeneous group of tumors for which a comprehensive overview of the involvement of high-risk human papillomaviruses (HPV) in pathogenesis is still lacking. We first searched MEDLINE (PubMed), Embase and Scopus databases (until October 2022) and systematically reviewed available literature. We then quantitatively estimated both pooled and genotype-specific prevalence of HPV DNA as well as the influence of various factors (e.g. geographical region, histological subtype, tissue/sample type) on computed effect size by means of random effects meta-analysis. In total, 379 studies comprising 17,129 cases of cervical adenocarcinoma were identified. The pooled HPV prevalence was 78.4% (95% CI: 76.2-80.3) with a significant between-study heterogeneity ($I^2=79.4\%$, Q test $p<0.0001$). Subgroup analyses indicated that the effect size differed substantially by geographical region [from 72.5% (95% CI: 68.7-76.1) in Asia to 86.8% (95% CI: 82.2-90.3) in Oceania] ($p<0.0001$) and histological subtype of cancer [from 9.8% (95% CI: 5.5-17) in gastric-type to 85% (95% CI: 79.6-89.2) in usual-type cervical adenocarcinoma] ($p<0.0001$). HPV16 and HPV18 were by far the most frequently detected viral strains with specific prevalence of 49.8% (95% CI: 46.9-52.6) and 45.3% (95% CI: 42.8-47.8), respectively. When stratified by continent or histologic variant, these genotype-specific results varied in a relatively limited manner. Altogether, these findings support that all histological subtypes of cervical adenocarcinoma are etiologically linked to high-risk HPV but to varying degrees. Therefore, a dual-criteria classification taking into account accurately both morphological and virological aspects could be an interesting evolution of the current binary WHO classification, better reflecting the pathogenic diversity of the disease.

Introduction

If you are working in the biomedical field, you have most certainly already heard about HeLa cells. Isolated from a penny-size cervical biopsy taken from Henrietta Lacks [1], these cancer cells showed a remarkable division potential *in vitro* and became the first human cell line. Established in 1951, HeLa cells were used in numerous seminal advances in medicine (e.g. polio vaccine, cloning, drug discovery/validation,...) and are still currently used in most experimental research laboratories [2]. Despite this worldwide notoriety, over the years, most basic researchers have forgotten that this cell line was originally derived from an aggressive human papillomavirus (HPV)-positive cervical adenocarcinoma. Contradicting deep-rooted paradigms among the “HPV community” (such as that linked to basal keratinocyte as the exclusive target cell for HPV infection) and associated with several poorly characterized mechanisms (e.g. viral life cycle in non-stratified epithelia), both virologists and epidemiologists also frequently fail to mention that, beside squamous cell carcinomas (SCC), glandular malignancies etiologically linked to high-risk HPV infections also develop in the uterine cervix. Accounting for ~15% of cervical cancers, the incidence of adenocarcinomas of the endocervix has been increasing for more than half a century [3, 4]. Much more heterogeneous than SCC, cervical glandular neoplasms have been recently the subject of intense discussions/controversies among pathologists with respect to histologic classification and potential association with HPV [5, 6], culminating in the current WHO classification (5th edition, 2020) [7]. The existence of several histological subtypes (Figure 1) likely explains the high diversity of data reported in the literature and the extraordinary rarity of some of these variants (e.g. serous, mesonephric or signet-ring) makes their precise characterization very complex. Altogether, while the implication of HPV infection in the pathogenesis of a certain percentage of cervical adenocarcinoma is well established, an overview on this specific subject is still lacking and several uncertainties remain regarding the exact prevalence of virus-driven

adenocarcinomas, the HPV genotypes associated with each individual subtype or the potential geographic differences. Here, we collected and carefully reviewed relevant studies published in the 21st century about these underestimated aggressive lesions.

Material and methods

This study was performed in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA 2020) reporting guidelines [8]. The protocol has been previously deposited in Open Science Framework (<https://osf.io/2r7hy/>).

Search strategy and study selection

Available literature was first searched through the online bibliographic databases MEDLINE (PubMed), Embase (Elsevier) and Scopus (Elsevier) without restriction of language, publication date or article type. The search string used for the research included three main concepts: “human papillomavirus” AND “adenocarcinoma” AND “uterine cervix”. This search strategy, which included all identified keywords and index terms, was customized for each database. The list of keywords and the search strategies are detailed in Supplementary Table 1. Additional (manual) searches on health/medical information websites (e.g. American Cancer Society, Centers for Disease Control and Prevention,...) and within the bibliography of relevant articles were performed in order to complete the bibliographic search and to try to find any missing references.

All identified references were uploaded into Covidence software (Veritas Health Innovation, Melbourne, Australia) and duplicate records were removed through the program (and verified manually). The entire process of selection was performed independently by two researchers (CR and TL). Any disagreements were resolved through discussion with a third author (MH). Both titles and abstracts were screened to determine whether or not eligibility criteria were met.

After this initial selection, all potentially relevant articles were then read in full to assess the inclusion/exclusion criteria. The reasons for exclusion were reported.

Eligibility and inclusion/exclusion criteria

Original articles (no review, editorial or conference abstract) were considered as eligible if they were written in English and published in peer-reviewed journals after January 1, 2000. Given the rarity of some subtypes of cervical adenocarcinoma, case reports were also taken into account. The inclusion criteria were as follows: 1) the use of a sensitive and well-accepted HPV test (e.g. PCR-based assays, Hybrid Capture II test,...), 2) the cytologic and/or histologic diagnosis of *in situ*/invasive adenocarcinoma (if the cancer subtype was mentioned, a histologic examination was required to ascertain the diagnosis), 3) the record of data allowing the accurate calculation of HPV prevalence in cervical adenocarcinoma specimens (separately from other pathological types of cervical cancer). The exclusion criteria were as follows: 1) the absence of details about viral detection or the use of unreliable, poorly sensitive or indirect (e.g. p16^{ink4a} immunostaining) methods for HPV testing, 2) self-sampling, 3) non-primary cervical adenocarcinoma, 4) neoplasms displaying a squamous, neuroendocrine or mixed phenotype (e.g. adenosquamous or stratified mucin-producing intraepithelial lesion), 5) preselection of HPV-positive or -negative tumors, 6) missing/incomplete data. When a set of data was suspected of having been used in more than one published article, the corresponding author was methodically contacted (by email) and, in case of confirmation or absence of response, only the study with the largest sample size was included.

Data extraction

Using a dedicated software (Covidence, Veritas Health Innovation) allowing a double data entry, the following information was extracted independently by two researchers (CR and TL):

first author, journal, year of publication, geographical region, sample size and type [e.g. formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE), cytology, frozen,...], HPV status/prevalence, HPV detection methods, HPV genotypes (when available), tumor subtypes (when available).

Risk of bias assessment

The quality of each study was evaluated using a 9-item tool tailored for prevalence studies and adapted from Hoy et al [9] (Supplementary Table 2). A low (score= 0) or high (score= 1) risk of bias was determined for each specific item. In case of insufficient information in the article to accurately judge a particular point, this latter was systematically considered to be at high risk of bias. To provide a global score for each study, the results for all 9 items were summed. The studies were finally classified into two groups according to their risk of bias [low risk (≤ 5) versus high risk (>5)].

Statistical analysis

R statistical software (version 4.2.1 and appropriate packages) was used to conduct the statistical analyses. A random effect model was chosen given the expected heterogeneity in terms of HPV rate, sample size and type across studies. Pooled HPV prevalence, HPV genotype-specific prevalence [for HPV16, 18, 45 and other (grouped) high-risk strains] and 95% confidence intervals (CI) were estimated. The heterogeneity in the present meta-analysis was examined using both the I^2 statistic and Cochran's Q test [10]. An I^2 value greater than 75% (associated with Q test $p < 0.05$) indicated high inter-study heterogeneity, in which case subgroup analyses were performed to explore this heterogeneity according to the following characteristics: publication date (≤ 2010 versus > 2010), cohort size (< 30 versus > 30), geographical region (continent), histological subtype of adenocarcinoma, sample type and study quality (risk of bias). Potential publication bias was detected using a contour-enhanced

funnel plot and the Egger's regression asymmetry test [11]. In case of significant funnel plot asymmetry (further confirmed by the Egger's test), the Trim and Fill method was applied [12]. In order to assess the potential impact of each individual study on the computed effect size, a "one-study-removed" procedure (sensitivity analysis) was performed. Differences were considered as statistically significant when two-sided P values were less than 0.05.

Results

Description of study selection and characteristics

A total of 6633 citations were identified using the search strategies applied to the 3 databases [MEDLINE (Pubmed), Embase and Scopus] on October 10, 2022. After removing duplicates, the title/abstract of 3129 references were screened for eligibility and 935 remained for full-text assessment. Among these studies, 420 met our inclusion criteria. In the last step of the study selection, 41 articles were excluded because the patient cohort was suspected of having been used in more than one published article (a confirmation by the corresponding author was formally obtained for 9 out of 41). Altogether, 379 studies (totalizing 17,129 cases) were finally included (Figure 2). Of these studies, 18 (191 cases) were not included in the calculation of the overall HPV prevalence (and only integrated in subgroup analyses) given that a preselection of one specific (rare) subtype of adenocarcinoma was initially done. The excluded studies as well as their respective reasons of exclusion are listed in Supplementary Table 3. The characteristics and quality of each individual article included in the present systematic review and meta-analysis are detailed in Supplementary Table 4.

Out of these 379 included studies, most were conducted in Asia (n=145), Europe (n=107) and North America (n=69). The remaining studies came from Africa (n=18), South America (n=17) and Oceania (n=7). Sixteen articles included specimens from different continents. One hundred eighteen (31.1%) articles had a sample size greater than 30 and the mean number of cervical

adenocarcinoma cases per study was 45. The vast majority of studies performed HPV testing on FFPE (236/379, 62.3%) and/or cytology samples (131/379, 34.6%). Twenty-three used several (up to 3) different sample types. Regarding HPV detection, classical PCR using L1 consensus primers (GP5⁺/6⁺, n=63 or MY09/11, n=43) as well as various sensitive commercially available kits (PCR-based or not) have been used, among which Hybrid capture II (n= 55) (Quiagen, Venlo, The Netherlands), SPF10-LiPA25 (n=39) (Labo Bio-medical Products, Rijswijk, The Netherlands), Linear Array HPV Genotyping (n=31) (Roche, Basel, Switzerland) and INNO-LiPA (n=25) (Innogenetics, Gent, Belgium) were the most frequently mentioned in included studies.

HPV prevalence in cervical adenocarcinoma

From the present random effects meta-analysis, the pooled prevalence of HPV DNA in cervical adenocarcinoma was 78.4% (95% CI: 76.2-80.3) (Table 1). Of note, the HPV prevalence varied considerably [from 0% (in 15 studies, among which 12 were case reports) to 100%]. As expected, a significant heterogeneity between studies was found ($I^2= 79.4%$, Q test $p<0.0001$).

Subgroup analyses

To explore the sources of heterogeneity, subgroup analyses were performed and detailed results are presented in Table 1. Forest plots illustrating both the individual and pooled prevalence estimates derived from various subgroup analyses are shown in Supplementary Figures 1 to 8. The highest pooled HPV prevalence in cervical adenocarcinoma was observed in Oceania (86.8%; 95% CI: 82.2-90.3), followed by that in North America (83.2%; 95% CI: 78.6-87) and in South America (82%; 95% CI: 77.1-86.1). As for the lowest HPV rate, it was reported in Asia (72.5%; 95% CI: 68.7-76.1). Interestingly, the Cochrane's Q test yields a Q value=29.63, $df(Q)= 5$ and $p<0.0001$, indicating that the effect size differed significantly by geographical

region. Subgroup analysis based on histological subtype of adenocarcinoma also highlighted substantial variations (Q value= 187.05, df(Q)= 9, $p < 0.0001$). Indeed, HPV prevalence ranged from 9.8% (95% CI: 5.5-17) in gastric-type to 85% (95% CI: 79.6-89.2) in usual-type cervical adenocarcinoma. Of note, we did not consider the term “mucinous” because it encompasses several subtypes (intestinal, signet-ring, gastric) analyzed individually in the present study. Stratified analysis by number of sample (≤ 30 versus > 30) analyzed in each included study showed that HPV prevalence was slightly higher in so-called "large studies" (80.8%; 95% CI: 77.8-83.6) compared to their counterparts examining 30 tissue specimens or less (75.4%; 95% CI: 72.4-78.2) ($p = 0.011$). In contrast, the effect size did not differ significantly with the publication date (≤ 2010 versus > 2010) ($p = 0.642$) or sample type (FFPE versus cytology) ($p = 0.615$). Finally, in order to detect a potential bias related to the quality of the included studies, an additional subgroup analysis was performed. Importantly, as shown in Table 1, estimates of pooled HPV prevalence using studies at low or high risk of bias did not differ significantly (78.4% versus 79.1%, $p = 0.894$).

HPV genotype-specific prevalence

Beside the pooled HPV prevalence, genotype-specific infection rates were also estimated (Table 2). Overall, HPV16, HPV18 and HPV45 were the most frequently detected strains in HPV-positive cervical adenocarcinomas with a specific prevalence of 49.8% (95% CI: 46.9-52.6) (201 studies, 9185 analyzed samples), 45.3% (95% CI: 42.8-47.8) (206 studies, 8964 samples) and 8.6% (95% CI: 7-10.4) (74 studies, 5150 samples), respectively. Given the rarity of other high-risk HPV genotypes (HPV31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), these latter were grouped and a computed prevalence of 14.6% (95% CI: 11.7-18) (86 studies, 5646 samples) was obtained. Type-specific prevalence in HPV-positive cervical adenocarcinomas according to geographic region and histological subtype are also detailed in Table 2 and Forest

plots are shown in Supplementary Figures 9 to 15. When stratified by continent or histologic variants, notably, HPV16 and 18 positivity rates varied relatively modestly and these two viral strains remained, by far, the most commonly detected high-risk HPVs in cervical glandular neoplasms. It is, however, interesting to notice that, while HPV16 is the most prevalent genotype in Europe, America and Africa, HPV18 is the most frequently detected strain in both Asia and Oceania.

Sensitivity analysis

In order to assess the impact of each individual study on the stability of our data, a sensitivity analysis was executed and pooled prevalence of HPV DNA in cervical adenocarcinomas was recalculated when excluding one study at a time. Given the high number of included studies in this meta-analysis, as expected, the influence of each study on the overall effect-size estimate was almost insignificant (pooled HPV prevalence varied by a maximum of 1.2%).

Publication bias

The visual asymmetry detected in the funnel plot (Figure 3), which was further confirmed by the Egger's test ($t= 4.98$, $df= 359$, $p<0.0001$), indicated a significant publication bias. In order to adjust for publication bias, the Trim and Fill method was applied to all studies and 89 potentially missing studies were identified. After applying this nonparametric data augmentation technique, the pooled HPV prevalence in cervical adenocarcinoma was only slightly reduced (70.8%, 95% CI: 68-73.5).

Discussion

With a worldwide annual incidence of approximately 70,000 new cases [13], cervical adenocarcinoma has historically been understudied compared to its counterpart displaying a squamous phenotype. Potential obstacles to a cohesive view of this subset of cervical cancers include lack of experimental (mouse) models, heterogeneous group of tumors, suboptimal cytologic detection/diagnosis, regional variations and rarity of some discrete subtypes. Aiming at especially exploring the prevalence of HPV-positive cervical glandular neoplasms, the presence of high-risk (carcinogenic) genotypes in each histological subtype as well as at highlighting potential geographic differences, the present exhaustive systematic review and meta-analysis is, to the best of our knowledge, the first of its kind.

Involving 16,938 cases from 361 published studies, the overall prevalence of HPV in cervical adenocarcinoma was 78.4% (95% CI: 76.2-80.3). The high between-study heterogeneity ($I^2=79.4%$, Q test $p<0.0001$) was partly explained by geographical region, tumor subtype and cohort size of included studies. Despite the variations that existed in the literature (justifying the chosen random effect model), it is important to notice that this computed pooled result closely confirms the presumed detection rate (around 70-80%) mentioned in most textbooks of pathology. Although lower than that reported for cervical and anal SCC (which are virtually all etiologically linked to high-risk HPV infection and detected in ~90% of cases, respectively) [14-16], the fraction of cervical adenocarcinomas attributable to HPV is nevertheless the third highest reported in all human cancers and, by far, the highest when only glandular neoplasms are considered. Indeed, the percentage of HPV-positive adenocarcinomas diagnosed in the lungs, in the gastrointestinal tract or in the upper part of the female reproductive system never exceed 15% and the involvement of HPV oncoproteins in carcinogenesis of these various mucosal surfaces remains extremely controversial [17-20]. Taken together, these data further confirm the unique vulnerability of the uterine cervix for HPV-related (pre)cancer development.

Still the subject of debate, a peculiar immune-tolerant microenvironment and the presence of an unique (and probably multipotent) epithelial cell population located in close proximity to the cervical squamo-columnar junction have been proposed to explain this high susceptibility to persistent HPV infection [21, 22].

When subgroup analyses were performed, significant geographical differences in the prevalence of HPV detected in cervical adenocarcinoma were highlighted, with Oceania and Asia displaying the highest (86.8%) and lowest (72.5%) rate of positivity, respectively. Already reported in the context of other HPV-driven cancers (e.g. those diagnosed in the upper aerodigestive tract [23, 24]), these geographical variations cannot be easily explained by differences in terms of analyzed sample type, sensitivity of the HPV tests used or frequency of one/several specific histological subtype(s) of tumor and rely very likely on indirect (hardly assessable) factors such as sexual behavior, socio-economic status, (epi)genetic variations,... Not mentioned in most studies included in this meta-analysis, patient age is presumed to impact our conclusions in a very limited manner since invasive cervical adenocarcinomas are most often diagnosed between the ages of 46 and 55 (very rarely observed before 30) [25] and, importantly, overall HPV infection rate in the gynecological tract has been shown to be relatively stable following the peak identified among females aged 14 to 24 years [26].

Besides the geographical region, we found that HPV prevalence differs substantially according to the considered histological subtype of cervical adenocarcinoma. Actually, it was not surprising that so-called “HPV-related” subtypes (usual type, villoglandular, intestinal and signet-ring) were associated with a high viral positivity (ranged from 69.9 to 85%), while HPV DNA was less frequently detected (between 9.8 and 58.6%) in their “HPV-unrelated” counterparts (gastric, endometrioid, clear cell, mesonephric, serous). Of note, the extremely low association with HPV displayed by both mesonephric and gastric subtypes is in agreement with recent case reports reporting their unique origin (mesonephric duct remnants) and syndromic

(Peutz-Jeghers) association, respectively [27-30]. The unexpected finding was that the contrasting reality reported in this meta-analysis is quite far from that (mutually exclusive) presented in the latest WHO classification (5th edition, 2020) [7]. Indeed, supported by the International Endocervical adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC) [5, 6], this latter considers each histological subtype as HPV-associated or HPV-independent (based on morphological criteria alone) while, in fact, all adenocarcinoma variants seem to be etiologically linked to high-risk HPV but to varying degrees. Otherwise, these collected results also support that viral oncoproteins most likely do not affect tumor differentiation (which would be acquired by still unknown mechanisms several months/years after tumor initiation). Of course, misclassification of cancer subtypes by pathologists as well as a few false positive/negative HPV test results cannot be excluded, however, given the high number of analyzed samples (in independent studies), it seems fair to say that these two parameters alone cannot explain all presented data. Although the IECC-based latest WHO classification has been recently shown to be beneficial in terms of interobserver agreement [31] and represents, undoubtedly, a promising step towards an incorporation of HPV status in diagnosis (similar to what is currently done for oropharyngeal or vulvar SCC [32, 33]), overall, a dual-criteria classification that accurately considers both cancer subtype (determined by clear and reproductive morphological characteristics) and potential viral etiology (HPV status evaluated, for example, by a sensitive PCR-based assay) could be regarded as an interesting evolution, better reflecting the pathogenic diversity of endocervical glandular malignancies. Furthermore, this viro-pathological approach would allow to more precisely determine HPV-positive cervical adenocarcinomas which, like their oropharyngeal, anal or vulvar squamous counterparts [15, 16, 34], could be associated with better overall/disease-free survivals as well as with a reduced recurrence rate compared to HPV-negative tumors [35]. Although never investigated in the specific context of cervical adenocarcinoma, the reasons of this favorable prognosis related to

the presence of HPV are very likely multiple: high densities of T-cell subsets within tumor microenvironment resulting from the immune recognition of viral neoantigens, elevated radio/chemosensitivity due to the hijacking of host DNA repair by E6/E7 oncoproteins, low frequency of *TP53* mutations,... [36-39]

Whatever the tumor subtype or geographical region, HPV16 and 18 were by far the most frequently identified genotypes in cervical adenocarcinomas. While the overall percentage of HPV16 positivity (49.8%, 95% CI: 46.9-52.6) was relatively close to that commonly reported in cervical SCC (~55%), HPV18 was approximately 3 times more prevalent in glandular neoplasms (45.3%, 95% CI: 42.8-47.8) compared to their squamous counterparts (~15%). As for HPV45, another alpha-7 HPV strain, it was also proportionally over-detected in adenocarcinoma (8.6% *versus* ~3% in cervical SCC). These results mimic those previously reported in cervical adenosquamous lesions [40]. Altogether, the substantial differences of HPV genotype-specific prevalence between cervical adenocarcinoma and SCC, which are mostly observed in the same microenvironment (squamo-columnar junction/transformation zone), remain a complete enigma. Therefore, determining whether some viral strains (especially HPV18 and 45) are more prone to infect and/or persist in a progenitor cell displaying a glandular phenotype compared to basal keratinocyte could be an important area of future investigation. Alternatively, if the cell of origin is found to have multipotent properties (as proposed by our group and others), assessing whether alpha-7 HPV genotypes can more easily promote glandular differentiation is another hypothesis interesting to explore.

In conclusion, the present meta-analysis provides quantitative estimates of both overall and HPV genotype-specific prevalence for cervical glandular neoplasms and highlight significant differences related to geographical region (continents) and histological subtype of interest. Considering the high cumulative HPV16/18 positivity (>90%) reported in HPV-driven cervical adenocarcinomas, 15 years after the beginning of vaccination campaigns in adolescents, the

beneficial effect of commercially available prophylactic HPV vaccines on the incidence rate of these invasive tumors is expected to appear very soon. Unfortunately, a fifth of glandular malignancies diagnosed in the uterine cervix are virus-independent and an improved patient management/treatment will first require an in-depth characterization (at the immunologic, genomic and epidemiologic levels) of these understudied aggressive lesions in order to better understand their pathobiology and, ultimately, their associated vulnerabilities.

Author contributions

MH designed the study; CR, TL, SV and MH performed the literature search; CR, TL and MH performed the data extraction; CB performed statistical analyses; CR, TL, EG, CPC, CB, MH interpreted the data; CB, MH generated the Figures/Tables; MH wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank their clinical colleagues at the University Hospital of Liege (Belgium) and at Brigham and Women's Hospital (Boston, USA) for helpful discussions. This work was supported in part by the FNRS [CDR J.0088.21 (MH)], the University of Liege [Crédits Sectoriels de Recherche en Sciences de la Santé 2021-2023 (MH)], the Télévie [PDR Televie 7.8507.19 (MH)] and the Leon Fredericq Foundation (MH). CR and TL are Televie fellows. MH is a Research Associate at the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS).

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare.

Data availability

The data underlying this article are available in the article or in its online supplementary materials.

ORCID

Michael Herfs: <https://orcid.org/0000-0002-4382-8997>

References

1. Henrietta Lacks: science must right a historical wrong. *Nature* 2020;585(7823):7.
2. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 1953;97(5):695-710.
3. Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, *et al.* The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States--a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol* 2000;78(2):97-105.
4. van der Horst J, Siebers AG, Bulten J, *et al.* Increasing incidence of invasive and in situ cervical adenocarcinoma in the Netherlands during 2004-2013. *Cancer Med* 2017;6(2):416-423.
5. Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, *et al.* International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): A New Pathogenetic Classification for Invasive Adenocarcinomas of the Endocervix. *Am J Surg Pathol* 2018;42(2):214-226.
6. Stolnicu S, Park KJ, Kiyokawa T, *et al.* Tumor Typing of Endocervical Adenocarcinoma: Contemporary Review and Recommendations From the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol* 2021;40(Suppl 1):S75-S91.
7. Herrington C, Kim K, Kong C, *et al.* Tumours of the uterine cervix. The WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds) *Female genital tumours WHO classification of tumours 2020*;4:335-389.
8. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, *et al.* The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *J Clin Epidemiol* 2021;134:178-189.
9. Hoy D, Brooks P, Woolf A, *et al.* Assessing risk of bias in prevalence studies: modification of an existing tool and evidence of interrater agreement. *J Clin Epidemiol* 2012;65(9):934-9.
10. Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med* 2002;21(11):1539-58.
11. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, *et al.* Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997;315(7109):629-34.
12. Duval S, Tweedie R. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 2000;56(2):455-63.
13. Pimenta JM, Galindo C, Jenkins D, *et al.* Estimate of the global burden of cervical adenocarcinoma and potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination. *BMC Cancer* 2013;13(1):553.
14. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-9.

15. Bruyere D, Monnier F, Colpart P, *et al.* Treatment algorithm and prognostic factors for patients with stage I-III carcinoma of the anal canal: a 20-year multicenter study. *Mod Pathol* 2021;34(1):116-130.
16. Serup-Hansen E, Linnemann D, Skovrider-Ruminski W, *et al.* Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. *J Clin Oncol* 2014;32(17):1812-7.
17. Cherif S, Amine A, Thies S, *et al.* Prevalence of human papillomavirus detection in ovarian cancer: a meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021;40(9):1791-1802.
18. Olesen TB, Svahn MF, Faber MT, *et al.* Prevalence of Human Papillomavirus in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2014;134(1):206-15.
19. Karnosky J, Dietmaier W, Knuettel H, *et al.* HPV and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Rep (Hoboken)* 2021;4(4):e1350.
20. Baandrup L, Thomsen LT, Olesen TB, *et al.* The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2014;50(8):1446-61.
21. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(26):10516-21.
22. Herfs M, Soong TR, Delvenne P, *et al.* Deciphering the Multifactorial Susceptibility of Mucosal Junction Cells to HPV Infection and Related Carcinogenesis. *Viruses* 2017;9(4).
23. Mehanna H, Franklin N, Compton N, *et al.* Geographic variation in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: Data from 4 multinational randomized trials. *Head Neck* 2016;38 Suppl 1(Suppl 1):E1863-9.
24. Hauck F, Oliveira-Silva M, Dreyer JH, *et al.* Prevalence of HPV infection in head and neck carcinomas shows geographical variability: a comparative study from Brazil and Germany. *Virchows Archiv* 2015;466(6):685-693.
25. Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Román-Bassaure E, *et al.* The distribution of high-risk human papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. *PLoS One* 2014;9(10):e109406.
26. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, *et al.* Prevalence of HPV infection among females in the United States. *Jama* 2007;297(8):813-9.
27. Li X, Qi Y, Zhang W, *et al.* Peutz-Jeghers syndrome with gastric-type mucinous endocervical adenocarcinoma and sex-cord tumor with annular tubules: A case report. *Front Med (Lausanne)* 2023;10:1094839.
28. Vu Dinh G, Doan Thi Hong N, Vo Ngoc T, *et al.* Peutz - Jeghers syndrome with gastric type mucinous endocervical adenocarcinoma in a young woman: A case report. *Ann Med Surg (Lond)* 2021;69:102700.
29. Montalvo N, Redroban L, Galarza D. Mesonephric adenocarcinoma of the cervix: a case report with a three-year follow-up, lung metastases, and next-generation sequencing analysis. *Diagn Pathol* 2019;14(1):71.
30. Dierickx A, Goker M, Braems G, *et al.* Mesonephric adenocarcinoma of the cervix: Case report and literature review. *Gynecol Oncol Rep* 2016;17:7-11.
31. Hodgson A, Park KJ, Djordjevic B, *et al.* International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification: Validation and Interobserver Reproducibility. *Am J Surg Pathol* 2019;43(1):75-83.
32. Badoual C. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Oropharynx and Nasopharynx. *Head Neck Pathol* 2022;16(1):19-30.
33. Rakislova N, Clavero O, Alemany L, *et al.* "Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: A study of 1,594 cases". *Int J Cancer* 2017;141(12):2517-2527.
34. Ang KK, Harris J, Wheeler R, *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363(1):24-35.

35. Chen H, Xiong W, Dong X, *et al.* Infection status and survival impact of high-risk human papillomavirus in cervical adenocarcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2022;167(1):129-136.
36. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, *et al.* Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. *Cancer Sci* 2014;105(4):409-17.
37. Bruyere D, Roncarati P, Lebeau A, *et al.* Human papillomavirus E6/E7 oncoproteins promote radiotherapy-mediated tumor suppression by globally hijacking host DNA damage repair. *Theranostics* 2023;13(3):1130-1149.
38. Jung AC, Guihard S, Krugell S, *et al.* CD8-alpha T-cell infiltration in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma correlates with improved patient prognosis. *Int J Cancer* 2013;132(2):E26-36.
39. Wallace NA. Catching HPV in the Homologous Recombination Cookie Jar. *Trends Microbiol* 2020;28(3):191-201.
40. Clifford G, Franceschi S. Members of the human papillomavirus type 18 family (alpha-7 species) share a common association with adenocarcinoma of the cervix. *Int J Cancer* 2008;122(7):1684-5.

Figure/Table legends

Figure 1. Examples of endocervical adenocarcinomas (hematoxylin and eosin) classified by the updated 2020 World Health Organization (WHO) classification.

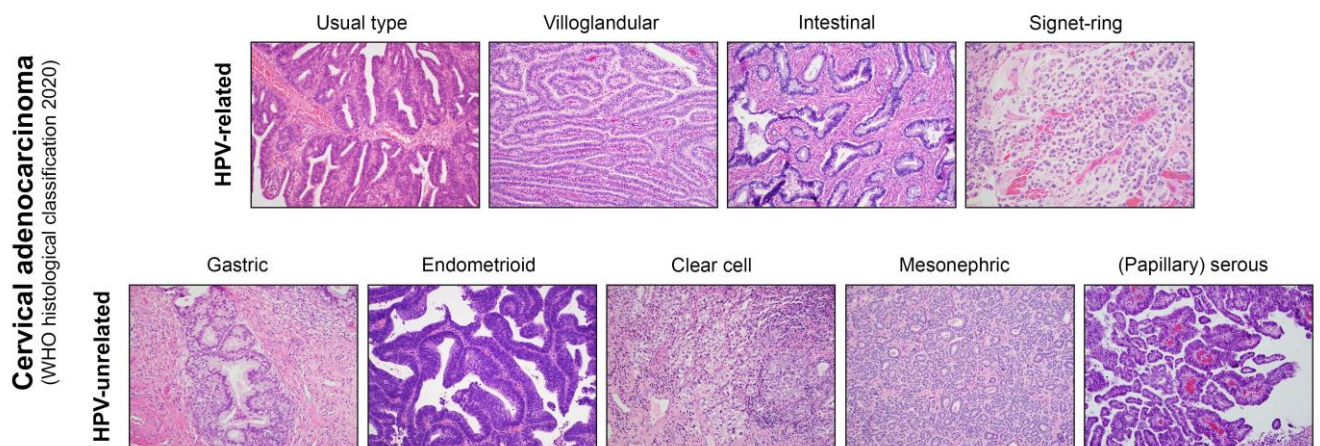


Figure 2. Flowchart of the study selection for the present meta-analysis

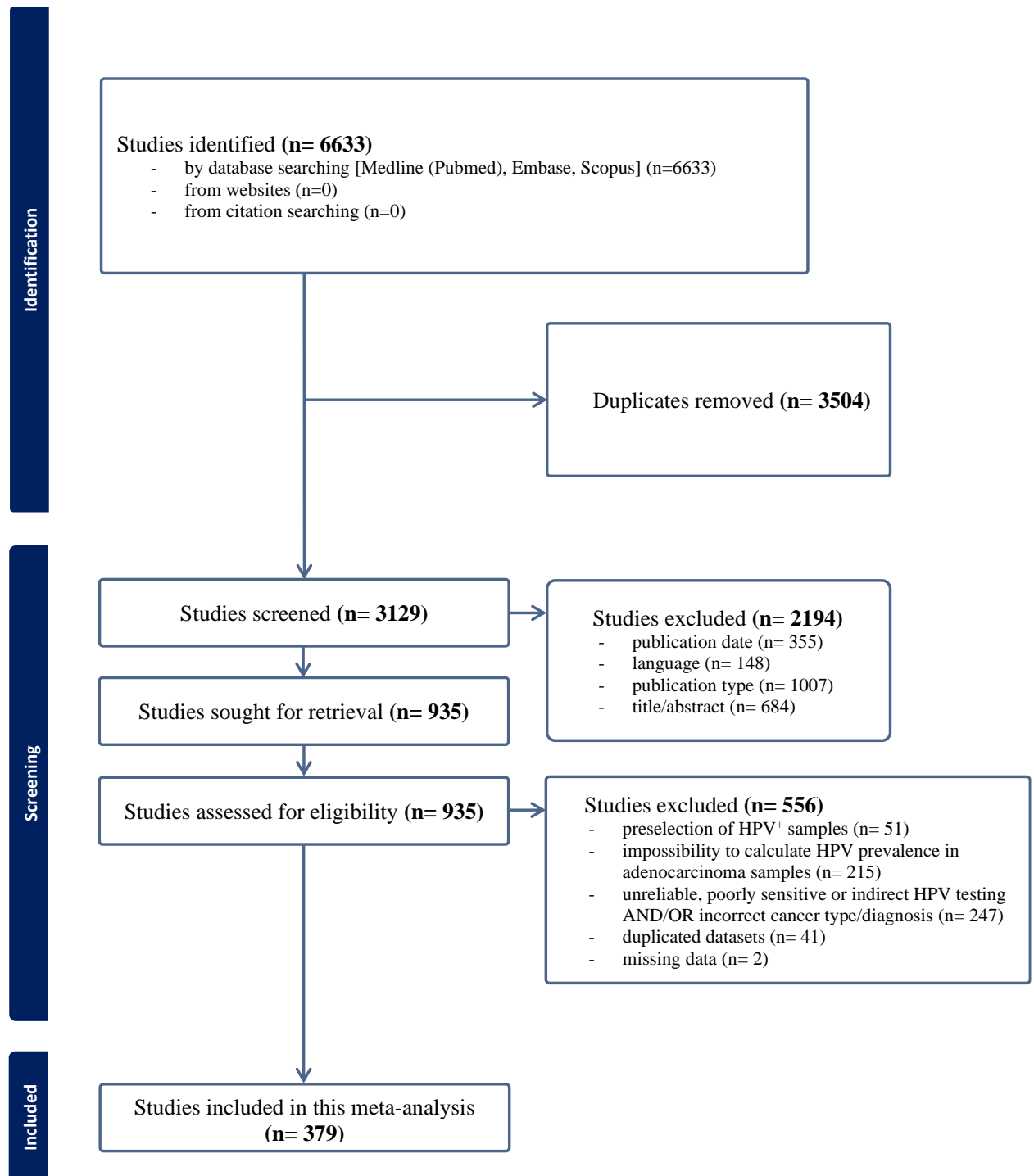


Figure 3. Contour-enhanced funnel plot of studies included in the meta-analysis. An asymmetry (suggesting a potential publication bias) should be noticed.

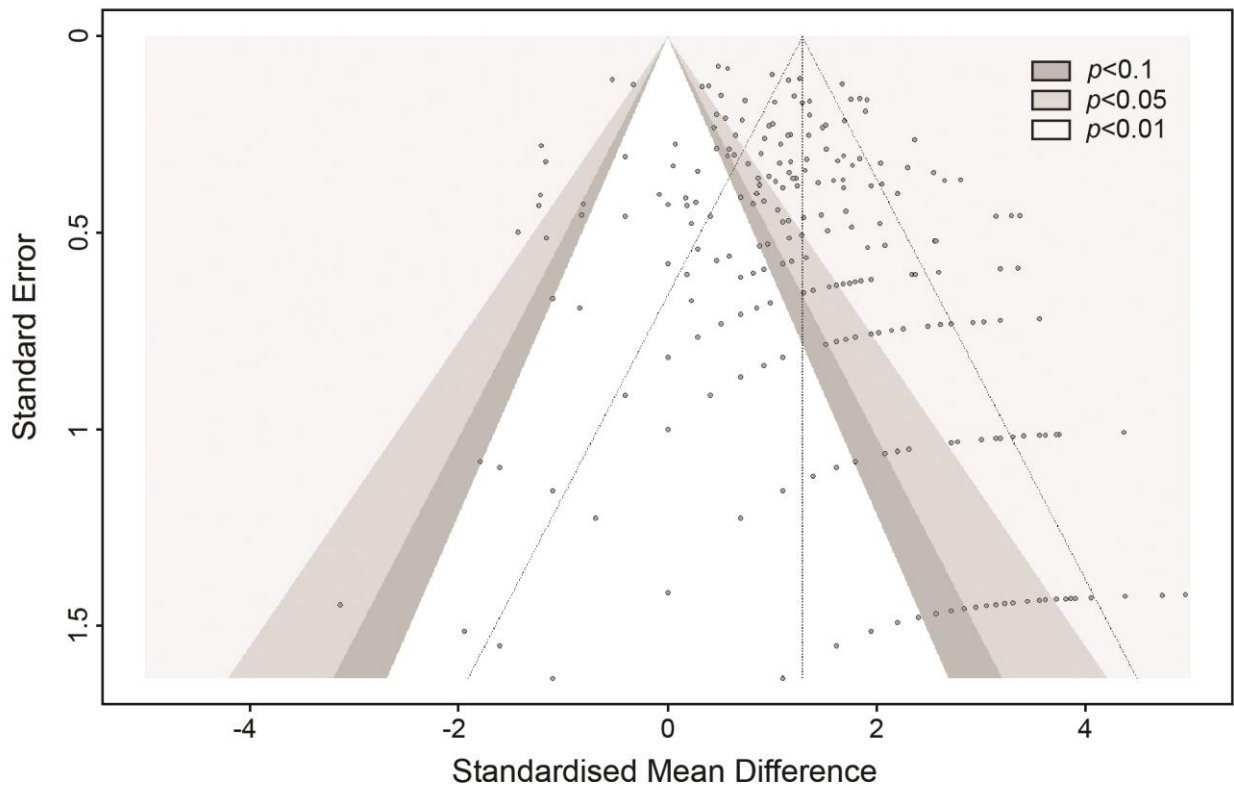


Table 1. Subgroup analyses for pooled HPV prevalence in cervical adenocarcinoma according to geographical region, histological subtype, cohort size, publication date, sample type and risk of bias.

Variables	Studies (n)	Nb cases (%)	Pooled HPV prevalence % (95% CI)	Heterogeneity tests	
				I ²	<i>p</i> (Q test)
Overall	361	16938 (100)	78.4 (76.2-80.3)	79.4%	
Geographical region					<i>p</i> <0.0001
Asia	140	5529 (32.6)	72.5 (68.7-76.1)	73.8%	
Europe	103	5017 (29.6)	81.4 (77.5-84.8)	79.3%	
North America	63	3237 (19.1)	83.2 (78.6-87)	86.9%	
South America	17	826 (4.9)	82 (77.1-86.1)	25.1%	
Africa	18	254 (1.5)	78.3 (69.9-84.9)	26.2%	
Oceania	6	276 (1.6)	86.8 (82.2-90.3)	0%	
Histological subtype					<i>p</i> <0.0001
Usual type	24	1768 (10.4)	85 (79.6-89.2)	62.4%	
Villoglandular	15	78 (0.5)	78.9 (68-86.8)	0%	
Intestinal	14	64 (0.4)	69.9 (56.1-80.8)	0%	
Signet-ring	7	17 (0.1)	77.3 (55.6-90.3)	0%	
Gastric	21	163 (1)	9.8 (5.5-17)	0%	
Endometrioid	30	259 (1.5)	58.6 (43.9-71.9)	65.5%	
Clear cell	34	223 (1.3)	37.7 (28.9-47.4)	21.8%	
Mesonephric	7	17 (0.1)	16.3 (5.7-38.2)	0%	
Serous	25	141 (0.8)	41.8 (33.3-50.9)	0%	
Cohort size					<i>p</i> =0.011
<30	243	2247 (13.3)	75.4 (72.4-78.2)	36.6%	
>30	118	14691 (86.7)	80.8 (77.8-83.6)	91.4%	
Year of publication					<i>p</i> =0.642
2000-2010	119	3569 (21.1)	77.7 (73.9-81)	70%	
2011-2023	242	13369 (78.9)	78.7 (76.1-81.1)	82.1%	
Sample type					<i>p</i> =0.615
FFPE	201	12362 (73)	77.7 (74.8-80.3)	82%	
Cytology	111	3390 (20)	78.9 (74.9-82.5)	77.1%	
Risk of bias					<i>p</i> =0.894
Low	342	15949 (94.2)	78.4 (76.2-80.4)	79.1%	
High	19	989 (5.8)	79.1 (67.4-87.4)	82.7%	

Table 2. HPV genotype-specific prevalence in HPV-positive cervical adenocarcinoma, stratified by geographic region and histological subtype

Variables	Nb cases (%)	HPV16 prevalence % (95% CI)	Nb cases (%)	HPV18 prevalence % (95% CI)	Nb cases (%)	HPV45 prevalence % (95% CI)	Nb cases (%)	Other HPV prevalence % (95% CI)
Overall	9185 (100)	49.8 (46.9-52.6)	8964 (100)	45.3 (42.8-47.8)	5150 (100)	8.6 (7-10.4)	5646 (100)	14.6 (11.7-18)
Geographical region								
Asia	3039 (33.1)	42.2 (38.1-46.5)	3022 (33.7)	49.8 (44.9-54.6)	1251 (24.3)	8.6 (4.2-16.7)	2039 (36.1)	17.6 (12.4-24.4)
Europe	2596 (28.3)	51.5 (46.4-56.5)	2574 (28.7)	45.9 (41.9-50)	2063 (40.1)	7.8 (6.7-9.1)	1796 (31.8)	11.8 (7.5-18.1)
North America	1713 (18.6)	53.9 (49.1-58.6)	1569 (17.5)	41.8 (37.7-46)	504 (9.8)	7.3 (4-12.8)	585 (10.4)	9.4 (4.8-17.5)
South America	496 (5.4)	56.2 (42.9-68.6)	492 (5.5)	36.2 (28-45.4)	247 (4.8)	11.7 (6.1-21.2)	280 (5.0)	25 (2.1-81.3)
Africa	188 (2)	54.1 (38.4-69)	169 (1.9)	43.6 (32.8-55)	85 (1.7)	14.2 (8-23.9)	139 (2.5)	26.2 (19-35)
Oceania	15 (0.2)	40 (19.2-65.2)	16 (0.2)	49.5 (27.1-72)	/	/	16 (0.3)	32.3 (2.8-89)
Histological subtype								
Usual type	1083 (11.8)	52.3 (44.3-60.3)	1079 (12)	47.4 (41.9-53.1)	791 (15.4)	11.4 (3.7-28.8)	798 (14.1)	10.5 (3.2-29.5)
Villoglandular	42 (0.5)	64.1 (45.5-79.3)	46 (0.5)	52.7 (38.2-66.8)	5 (0.1)	20 (2.7-69.1)	1 (0.02)	100 (2-100)
Intestinal	30 (0.3)	55.4 (29.6-78.7)	40 (0.4)	53.6 (25.7-79.3)	23 (0.4)	32.1 (1-96.7)	19 (0.3)	25.5 (1-94.1)
Signet-ring	11 (0.1)	53.6 (26.7-78.6)	13 (0.1)	64.8 (38.8-84.3)	/	/	6 (0.1)	33.3 (8.4-73.2)
Gastric	/	/	/	/	/	/	/	/
Endometrioid	100 (1.1)	64.3 (50.4-76.2)	80 (0.9)	46.4 (35.2-58)	18 (0.3)	11.2 (2.8-35.4)	28 (0.5)	30 (9.1-64.9)
Clear cell	55 (0.6)	51.7 (29.7-73.2)	59 (0.7)	42.7 (23.4-64.5)	13 (0.2)	7.7 (1.1-39.1)	33 (0.6)	22 (10.7-39.8)
Mesonephric	/	/	/	/	/	/	/	/
Serous	33 (0.4)	63.6 (45.8-78.3)	26 (0.3)	47.1 (25.7-69.6)	7 (0.1)	28.6 (7.2-67.3)	1 (0.02)	100 (2-100)

Discussion et conclusion

Partie 1 : Caractérisation clinico-pathologique des carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes œsophagiens et analyse de la potentielle implication d'HPV dans ces cancers

Les infections par papillomavirus humain sont responsables d'environ 5% des cancers dans le monde (de Martel et al. 2020). L'impact carcinogène d'HPV a tout d'abord été établi dans le contexte des carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus. Toutefois, d'autres sites anatomiques tels que le vagin, la vulve, le pénis, l'anus et le tractus aéro-digestif supérieur, sont également sujets au développement cancéreux induits par HPV (Bruni et al. 2023). Dans la continuité de la sphère oropharyngée et caractérisé histologiquement (comme le col de l'utérus) par un épithélium épidermoïde terminé par une jonction épidermo-glandulaire, l'œsophage pourrait apparaître comme un organe propice aux infections par HPV. Pourtant, l'implication de ces virus dans la carcinogenèse œsophagienne (tant épidermoïde que glandulaire) est très controversée (Nakanishi 2006; Rajendra et al. 2017; Petrelli et al. 2021). Par cette étude, nous avons voulu caractériser précisément les cancers de l'œsophage d'un point de vue clinique, histopathologique, immunologique et virologique. L'utilisation de techniques spécifiques et sensibles ont permis de mettre en évidence la présence d'infections transcriptionnellement actives dans un certain pourcentage de carcinomes épidermoïdes (32/230, 14%) et d'adénocarcinomes (31/119, 26%). La caractérisation clinico-pathologique de ces deux cancers a révélé quelques différences intéressantes/importantes.

1) Analyse des résultats obtenus pour la cohorte de patients atteints d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage

Dans cette étude, la cohorte de patients atteints de carcinome épidermoïde (ESCC) est essentiellement masculine (161/230, 70%), âgée de plus de 65 ans (123/230, 53%) et présente des stades cliniques relativement avancés (stade II : 78/209, 37% ; stade III : 52/209, 25%). Compte tenu du côté asymptomatique de la maladie, cette cohorte est une représentation assez proche de ce qui s'observe globalement dans une population donnée (C.-Q. Liu et al. 2023). Le pourcentage (14%) de carcinome épidermoïde HPV positif retrouvé dans cette cohorte correspond également au taux d'infection établi par plusieurs études sur le sujet (Cao et al. 2014; W.-L. Wang et al. 2015; Petrelli et al. 2021). D'une manière intéressante, ce taux de positivité se rapproche assez fort de celui observé dans les cancers de la tête et du cou (hors oropharynx), qui est d'environ 10-15%. De plus, 100% des infections par HPV retrouvées dans cette cohorte sont liées à l'HPV16. Ce génotype est également identifié dans plus de 50% des cancers touchant le tractus aéro-digestif supérieur (Sastre-Garau and Harlé 2020). La technique du RNAscope indique une infection présente dans l'entièreté des cellules tumorales, ce qui laisse supposer qu'HPV y joue un rôle étiologique. Lors de la comparaison des caractéristiques clinico-pathologiques des patients en fonction de leur statut HPV (section 1.2 des résultats), des différences significatives ont été observées pour les paramètres taille de la tumeur (cT) ($p=0.0491$), statut p16^{ink4a} ($p<0.0001$) et différenciation tumorale ($p=0.041$). Pour une raison inexplicée, 61.29% des patients de la catégorie HPV+ présentent des tumeurs in situ ou envahissant la *lamina propria* jusque la musculature (T0 à T2) par rapport à la catégorie HPV- où 58.99% présentent des tumeurs envahissant l'adventice et les structures

adjacentes (T3-T4). En ce qui concerne la différenciation tumorale, nous avons divisé les tumeurs en deux catégories : bien et moyennement différenciées *versus* faiblement différenciées/basaloïdes. Bien que les ESCC présentant une différenciation basaloïde aient été initialement considérés comme plus agressifs, avec un pronostic moins favorable, ils sont maintenant reconnus comme génétiquement et « pronostiquement » similaires aux carcinomes épidermoïdes dits « conventionnels », ce qui justifie leur classification dans les différenciations traditionnelles (Sauer et al. 2022). Dans notre étude, nous notons que 25% des tumeurs HPV+ sont de type basaloïde alors que cette différenciation s'observe 2 fois plus rarement dans la catégorie HPV- (11.28%). Cette observation intéressante a également été réalisée au niveau des cancers de la tête et du cou (Fritsch and Lentsch 2014). Plusieurs études ont montré que 80 à 90% des cancers basaloïdes sont infectés par un HPV de haut risque transcriptionnellement actif. De manière notoire, les patients qui en sont atteints présentent un pronostic généralement meilleur (C. H. Chung and Gillison 2009; Chernock et al. 2010; Jacobi et al. 2014; Lewis 2017). Enfin, le dernier paramètre significativement différent entre nos deux catégories de patients est p16^{ink4a}. Dans la catégorie HPV+, remarquablement, 90.63% des tumeurs montrent une positivité pour ce biomarqueur indirect d'HPV, ce qui contraste fortement avec la catégorie HPV- où seulement 5.10% des tumeurs expriment fortement p16^{ink4a}. Dans notre étude, le seuil de positivité pour le marquage de p16^{ink4a} a été précautionneusement défini à 50% de cellules tumorales positives afin d'allier spécificité et sensibilité de l'immunomarquage. En effet, bien qu'un grand nombre d'études, notamment se focalisant sur les cancers de la tête et du cou, utilisent un seuil de positivité de 70% de cellules marquées (Merlano et al. 2016), (car la distribution des marquages de p16^{ink4a} montre souvent deux extrêmes : moins de 5% de marquage ou plus de 95% de marquage), une minorité de cas peut présenter un marquage partiel (50-75% de marquage) tout en étant infectée par HPV (Lewis et al. 2012). Cette distribution particulière suggère que l'utilisation d'un seuil de positivité à 50% de cellules marquées pourrait être plus appropriée, surtout dans le contexte d'un cancer présentant une fréquente méthylation du gène *CDKN2A* (comme c'est le cas pour les tumeurs se développant dans l'œsophage). Étant donné que 90.63% de tumeurs HPV+ présentent un marquage p16^{ink4a} positif, ce marqueur peut être employé comme indicateur indirect d'une infection par HPV dans le cadre de notre étude. Une attention particulière doit tout de même être faite pour les catégories HPV+/p16^{ink4a}- (9.37% des HPV+) et HPV-/p16^{ink4a}+ (5.10% des HPV-) montrant une discordance entre ce biomarqueur et le statut HPV. Ces discordances ont également été retrouvées au niveau des cancers de l'oropharynx et pourraient être expliquées par des altérations génomiques et épigénétiques causées par le tabac (Mehanna et al. 2023). L'information sur le statut fumeur n'a pu être récoltée que pour 151 patients en provenance de Besançon et de Liège. Parmi les patients HPV-, 56.92% sont fumeurs (74/130, 56.92%) et pour les patients HPV+, 38.10% sont fumeurs (8/21, 38.10%). Si l'on reprend la catégorie de patients HPV- et fumeurs, 5 patients ont un statut p16^{ink4a} positif (5/74, 6.76%). Cette catégorie de patients pourrait expliquer, en partie, les discordances obtenues entre le statut HPV et le statut p16^{ink4a}. Néanmoins, aucune conclusion ne peut être émise avec fermeté à ce sujet car le statut fumeur est inconnu pour 34% des patients inclus dans notre étude. Par ailleurs, la catégorie HPV+/p16^{ink4a}- pourrait être expliquée par le fait qu'environ 50% des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage présentent une hyperméthylation au niveau du promoteur du gène *CDKN2A* codant pour la protéine p16^{ink4a}. Au vu de ces résultats et de ceux récemment reportés dans le contexte des cancers tête et cou, il est recommandé d'adopter une approche combinée, en utilisant à la

fois une méthode de détection spécifique d'HPV (ex : un test PCR) ainsi qu'un immunomarquage anti-p16^{ink4a} afin de pouvoir détecter avec précision les « vrais » cancers HPV-induits.

À côté des paramètres significativement différents entre les deux catégories de patients (section 1.2 des résultats), les formes aberrantes et non aberrantes de p53 sont réparties de façon similaire entre nos deux catégories. Au sein de la catégorie HPV-, 53.3% des patients présentent un statut p53 muté. Cette observation concorde avec la littérature montrant des mutations du gène *TP53* dans plus de 50% des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage (Y. Song et al. 2014). De façon plus étonnante, p53 présente une expression aberrante dans 46.88% des tumeurs HPV+. En effet, grâce à la capacité de l'oncogène E6 d'HPV à induire la dégradation de p53, il est couramment observé que la majorité (80-90%) des cancers HPV-positifs (peu importe la localisation anatomique) présentent un statut p53 non aberrant (Tommasino et al. 2003). A noter que la présence d'HPV et certains types de mutation p53 (non perturbatrices) peuvent coexister au sein de la même tumeur (Westra et al. 2008; Maruyama et al. 2014). Dans le contexte de notre catégorie de patients HPV+, il serait, dès lors, instructif de réaliser des analyses génétiques du gène *TP53*. Dans notre cohorte, il est à noter qu'un tiers des patients de cette catégorie est fumeur (8/21, 38.10%). Connaissant l'association entre le tabac et les mutations p53 dans les cancers (Pfeifer et al. 2002; Ronchetti et al. 2004), la présence de mutation du gène *TP53* dans la catégorie de patients HPV+ pourrait être partiellement expliquée. A côté des mutations du gène *TP53*, identifiées par un marquage aberrant de la protéine, il est important de considérer la possibilité d'une surexpression de p53 due à un traitement préalable (néoadjuvant), tel que la radiothérapie ou la chimiothérapie. En effet, l'accumulation de cassures à l'ADN provoquée par ces traitements entraîne une surexpression de la protéine p53. Son rôle est de bloquer le cycle cellulaire et de permettre la réparation de l'ADN endommagé. Lors de l'immunohistochimie, cette surexpression peut se manifester par un marquage intense de la protéine (sans que le gène *TP53* ne soit muté). Etant donné que nous ne disposons pas d'informations sur les traitements néoadjuvants administrés avant la chirurgie, nous ne pouvons pas exclure que le pourcentage relativement élevé de tumeur HPV+ affichant une expression aberrante de p53 soit simplement lié à un traitement antérieur. Dès lors, une perspective intéressante consisterait à réaliser un séquençage sur la catégorie de tumeurs HPV+/p53 aberrant afin de vérifier la corrélation entre l'expression aberrante de la protéine et la mutation de son gène codant.

En ce qui concerne la survie sans récurrence (PFS) et la survie globale (OS) de la population de patients atteints d'un carcinome épidermoïde (section 1.3 des résultats), l'âge, la taille de la tumeur (cT), l'infiltration ganglionnaire par des cellules tumorales (cN) et le stade clinique des tumeurs sont des facteurs pronostiques connus, ce qui valide notre analyse (Figures 42 et 44). En parallèle, l'importante infiltration tumorale par des cellules PD1⁺ est identifiée comme marqueur pronostique (Figure 44 J). Cette constatation n'est pas complètement inattendue, étant donné que des études antérieures ont déjà établi ce lien pour les cancers de la tête et du cou HPV-induits. Ce résultat est souvent expliqué comme une réaction immunitaire antérieure (Badoual et al. 2013; Pokrývková et al. 2022). Enfin, le statut HPV positif se révèle être un nouveau facteur pronostique pour la survie des patients sans récurrence de la maladie. Cette observation s'inscrit en parallèle avec les constatations faites pour la quasi-totalité des cancers associés à HPV, tels que les cancers de la tête et du cou, de l'anus, du vagin, de la vulve et du pénis (Ang et al. 2010; Christina Louise Rasmussen et al. 2018; Chu et al. 2020; Bruyère

et al. 2021; Christina L. Rasmussen et al. 2021). Confirmant le statut viral positif, le biomarqueur p16^{ink4a}, qui a également été évalué, présente aussi une tendance à être associé à un pronostic positif. Ce constat concorde étroitement avec les données existantes sur les cancers de la tête et du cou et de l'anus, soulignant ainsi la valeur prédictive de ce biomarqueur (Salazar et al. 2014; Serup-Hansen et al. 2014; Bruyère et al. 2021).

Si l'on regarde le traitement des patients, les recommandations de pratique clinique ESMO préconisent une chirurgie par résection endoscopique pour les tumeurs précoces (cT1 N0 M0). En ce qui concerne les tumeurs avancées localement (cT2-T4 ou cN1-3 M0), une radiochimiothérapie préalable à l'intervention chirurgicale est recommandée (Obermannová et al. 2022). En raison d'un manque d'information concernant le traitement de certains patients de notre cohorte (environ 35%), nous n'avons pas pu étudier ce paramètre au sein de cette thèse. Il est important de noter que nous ne pouvons pas affirmer de manière concluante que les patients dont le traitement chimio/radiothérapeutique n'est pas documenté n'ont pas été soumis à d'autres approches thérapeutiques, telles que la chirurgie. Néanmoins, les données recueillies indiquent clairement que la radiochimiothérapie est largement la méthode de traitement privilégiée pour les cancers présentant un stade ≥ 2 (74% des patients traités) suivie de la chimiothérapie (21%) et de la radiothérapie (5%). Au sein de notre cohorte, il est courant que la dose de rayonnement administrée en radiothérapie soit comprise entre 45 et 50.4 Gray tandis que les protocoles de chimiothérapie les plus fréquemment employés incluent la Cisplatine en combinaison avec le 5-FU, ainsi que la Carboplatine associée au Paclitaxel. Malgré le manque de données pour certains patients, il est fort probable que les résultats pronostiques que nous avons obtenus (ex : paramètre HPV) ne sont pas ou peu biaisés par une différence de traitement entre les patients au vu du grand nombre de patients traités de la même façon. De manière intéressante, les cancers HPV-induits (de la sphère oropharyngée) répondent mieux à la radiochimiothérapie que les cancers HPV négatifs. Par cette observation, les doses de traitement ont été adaptées en fonction du statut HPV des patients (Mehanna et al. 2019). Cette constatation ouvre une perspective intéressante pour la personnalisation des approches thérapeutiques. Une analyse plus approfondie dans cette direction pourrait apporter des informations précieuses pour guider les choix thérapeutiques dans le contexte du carcinome épidermoïde de l'œsophage.

En conclusion, HPV16 se révèle être un acteur clé au sein d'une petite portion des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage et cette implication est corrélée à un meilleur pronostic pour les patients. Le biomarqueur indirect de la présence d'HPV, p16^{ink4a}, émerge comme un outil valable pour analyser le statut viral dans ce type de cancer. La combinaison de ces deux facteurs devrait pouvoir pallier les éventuelles rares discordances retrouvées. La classification clinique actuelle des cancers de l'œsophage, qui repose exclusivement sur les critères TNM, se heurte à certaines limitations. En s'inspirant des connaissances accumulées au fil des années concernant les cancers du tractus aéro-digestif supérieur ainsi que ceux touchant la vulve, le vagin, l'anus et le pénis, il pourrait être utile que les patients atteints d'un carcinome épidermoïde de l'œsophage soient systématiquement catégorisés en fonction de leur statut HPV/p16^{ink4a}. Cette approche pourrait aider à mieux prédire la survie des patients et, en fin de compte, contribuer à une prise en charge thérapeutique plus personnalisée et efficace.

2) Analyse des résultats obtenus pour la cohorte de patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage

Au cours de cette thèse, nous avons également étudié les caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage (EAC) (section 2.1.1 des résultats). Cette cohorte est essentiellement masculine (99/119, 83%) et âgée de plus de 65 ans dans 57% des cas (68/119, 57%). Les stades cliniques au diagnostic sont assez avancés, avec 57% des patients présentant un stade III (65/113, 57%). Les techniques de génotypage (test HPV) ont permis de détecter la présence d'ADN d'HPV 16, 18 et/ou d'autres HPVs dans 47% des adénocarcinomes (56/119, 47%). Parmi ces tumeurs, le génotype HPV16 a été identifié dans 80.36% des cas (45/56, 80.36%) tandis que HPV18 a été détecté dans 37.5% des cas (21/56, 37.5%). A noter que des infections multiples ont également été retrouvées. La prédominance du génotype HPV16 au sein des tumeurs était relativement prévisible, compte tenu des résultats collectés lors de la dernière décennie dans les cancers HPV-induits touchant la sphère oropharyngée et le tractus ano-génital (So et al. 2019; Mashiana et al. 2021). De manière intéressante, nous avons observé que 37.5% des EACs étaient positifs pour HPV18. Ce résultat est en concordance avec les données de la littérature signalant une prévalence d'HPV18 entre 40 et 50% dans les adénocarcinomes du col utérin (voir la méta-analyse réalisée au cours de cette thèse). Cependant, il est à noter que ce génotype n'a pas été retrouvé dans notre cohorte d'ESCC. Cette observation suggère qu'HPV18 pourrait posséder un tropisme particulier pour les cellules glandulaires. Bien que les raisons de ce phénomène demeurent totalement inexpliquées, cette disparité dans la distribution des génotypes reflète probablement des interactions complexes entre les virus et les cellules de l'hôte, des mécanismes de transmission spécifiques et des affinités variées pour les différents types tissulaires, propres à chaque génotype.

Contrairement à la cohorte d'ESCC, toutes les infections par HPV ne sont pas transcriptionnellement actives dans les EAC. Une catégorie HPV ADN+/ARN- a été retrouvée. Cette observation s'aligne avec des constatations antérieures dans le contexte des cancers de la tête et du cou (en particulier dans les sites anatomiques près de l'oropharynx) (Jung et al. 2010; Lewis Jr et al. 2012; Bishop et al. 2014). Ces tumeurs présentent des caractéristiques relativement similaires à celles négatives pour HPV. De plus, les patients présentant des tumeurs de cette catégorie affichent une survie comparable à celle des patients diagnostiqués avec des tumeurs HPV négatives. Ces résultats renforcent l'importance de combiner la détection de l'ADN viral et du statut transcriptionnel de l'infection pour une classification précise des patients (Jung et al. 2010; Lewis Jr et al. 2012). De façon intéressante, le RNAscope réalisé sur les échantillons tissulaires HPV ADN+/ARN+ montre un faible pourcentage de cellules tumorales positives (10 à 40%), ce qui contraste complètement avec les observations faites pour les carcinomes épidermoïdes. Cette différence suggère que le virus HPV pourrait ne pas jouer de rôle déterminant dans la carcinogenèse de ce type de cancer et n'être, pour une raison mystérieuse, qu'un « simple passager ».

Si l'on compare les 3 catégories selon diverses caractéristiques clinico-pathologiques (section 2.2 des résultats), une seule différence significative est observée entre les catégories au niveau de la taille des tumeurs. 66.67% des tumeurs de la catégorie HPV ADN+/ARN+ sont de taille T3-T4 contrairement au pourcentage retrouvé dans la catégorie HPV ADN+/ARN- (22.73%). Cependant, aucun autre paramètre n'est différent entre les catégories. Alors que le

biomarqueur p16^{ink4a} est corrélé à une infection par HPV dans notre cohorte de carcinomes épidermoïdes, 70.97% des adénocarcinomes HPV ADN+/ARN+ sont p16^{ink4a} négatif. Deux hypothèses étroitement liées émergent pour expliquer ces observations. Tout d'abord, il est important de noter que le promoteur de *CDKN2A*, gène codant pour la protéine p16^{ink4a}, est hyperméthylé dans une grande proportion (jusqu'à 80% dans certaines études) des adénocarcinomes de l'œsophage (Hardie et al. 2005; Kaz et al. 2015). D'autre part, nos résultats de RNAscope suggèrent qu'un pourcentage limité de cellules tumorales sont infectées par HPV. Par conséquent, il est plausible que l'expression de la protéine p16^{ink4a} (conséquence de l'interaction entre pRb et l'oncoprotéine virale E7) au sein de la tumeur ne soit que très partielle. Si une infection active d'HPV n'est que partiellement présente dans la tumeur et que le promoteur de p16^{ink4a} est hyperméthylé, il ne serait pas étonnant de n'observer que peu de cellules positives. En conséquence, nos résultats révèlent clairement que le biomarqueur p16^{ink4a} ne peut pas être utilisé comme indicateur indirect d'une infection par HPV dans ce type spécifique de tumeur. En ce qui concerne le statut p53, plus de 60% des tumeurs de chaque catégorie ont un statut p53 aberrant. Ce résultat est en corrélation avec la littérature montrant un taux de mutation de *TP53* de plus de 70% dans les adénocarcinomes œsophagiens (S. M. Chung et al. 2007). Pour la catégorie HPV ADN+/ARN+, nous pouvions nous attendre à observer un pourcentage de tumeurs p53 non aberrant plus important comme au niveau des cancers HPV-induits observés dans le tractus ano-génitale ou la sphère oropharyngée (Tommasino et al. 2003). Toutefois, au vu des résultats de RNAscope et de p16^{ink4a} précédemment décrits, cette observation suggère qu'HPV (même transcriptionnellement actif) n'intervient pas dans l'initiation de la carcinogenèse de ce type de tumeur.

Au sein de notre cohorte d'adénocarcinome, le marqueur Kératine 7 a été étudié. A l'origine, considéré comme un marqueur de jonction, il avait pour objectif de distinguer les adénocarcinomes provenant de la jonction gastro-œsophagienne, des adénocarcinomes de l'estomac distal (Driessen et al. 2004). Toutefois, il est apparu par la suite que ce marqueur était exprimé par la grande majorité des tumeurs gastriques, quel que soit leur emplacement. Par conséquent, l'analyse de ce marquage n'a pas pu apporter de valeur ajoutée à notre travail.

En ce qui concerne la survie globale et sans récurrence des patients (section 2.3 des résultats), les paramètres suivants ont montré une valeur pronostique : la taille de la tumeur, l'infiltration ganglionnaire par les cellules tumorales et le stade clinique. Étant, bien évidemment, des facteurs connus pour influencer la survie des patients, ces résultats valident notre analyse. Cependant, parmi les autres paramètres examinés, aucun n'a exercé une influence significative sur la survie des patients. A ce titre, la présence d'une infection par HPV n'est pas associée à une amélioration de la survie des patients. Nos résultats contredisent les conclusions avancées par une première équipe de recherche qui a proposé qu'une infection par HPV transcriptionnellement active jouait un rôle dans la carcinogenèse des adénocarcinomes œsophagiens (Rajendra et al. 2013). Cette équipe a également suggéré que la survie des patients présentant des tumeurs HPV-induites était améliorée (Rajendra et al. 2018). Toutefois, ces résultats n'ont jamais été confirmés et notre étude, bien plus robuste, ne permet pas non plus d'expliquer ces résultats collectés sur des échantillons australiens.

En conclusion, bien que nous ayons constaté la présence d'infections virales transcriptionnellement active (26%) au sein de notre cohorte d'adénocarcinomes œsophagiens, aucune différence n'a été observée, ni sur les aspects clinico-pathologiques, ni au niveau de la survie entre cette catégorie de patients et les catégories HPV négatives et HPV ADN+/ARN-. Le marqueur p16^{ink4a} n'est clairement pas utilisable comme biomarqueur indirect d'HPV dans ce type de tumeur. La coexistence d'une catégorie HPV ADN+/ARN- et le faible pourcentage de cellules tumorales affichant des ARNm d'HPV met en évidence qu'HPV pourrait agir comme un facteur opportuniste plutôt que comme initiateur de la progression et la croissance des adénocarcinomes œsophagiens. D'un point de vue clinique, il n'y aurait pas d'intérêt de distinguer les tumeurs en fonction de leur statut HPV.

Partie 2 : Revue systématique et méta-analyse : prévalence et distribution des génotypes d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin

Parmi les cancers du col de l'utérus, environ 15% sont des adénocarcinomes (Prendiville and Sankaranarayanan 2017). Caractérisés par un groupe hétérogène de tumeurs, les adénocarcinomes sont sujets à une controverse importante, au sein de la communauté de pathologistes, vis-à-vis de la classification histologique de ces tumeurs et de leur potentielle association à une infection par HPV (Stolnicu et al. 2018; 2021). Bien que reclassés par l'OMS en 2020 comme dépendants ou indépendants d'HPV (Höhn et al. 2021), certains sous-types d'adénocarcinome sont rares, ce qui explique la diversité des données reportées dans la littérature et ce qui rend leur caractérisation précise très complexe. Par l'intermédiaire d'une revue systématique de la littérature suivie d'une méta-analyse, nous avons réalisé une vue d'ensemble sur l'implication d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin. A partir de 361 études (comprenant 16 938 cas d'adénocarcinomes) incluses dans notre analyse, la prévalence globale d'HPV est de 78.4% avec une hétérogénéité importante entre les études. Cette hétérogénéité est en partie expliquée par les différentes régions géographiques, les sous-types d'adénocarcinome et la variation dans la taille des cohortes reprises dans les différentes études. D'un point de vue géographique, la plus haute prévalence est de 86.8% en Océanie et la plus basse est retrouvée en Asie avec une prévalence de 72.5%. Observées aussi au niveau des cancers de la tête et du cou, ces différences seraient probablement dues à des facteurs extérieurs comme les comportements sexuels, le statut socio-économique et les variations (épi)généétiques (Mehanna et al. 2016). Au niveau des sous-types d'adénocarcinome, les adénocarcinomes gastriques ont une prévalence d'HPV de 9.8% contrairement aux adénocarcinomes dits « classiques » (*Usual-type*) où la prévalence d'HPV est de 85%. Ces résultats sont relativement inattendus par rapport à la dernière classification reportée par l'OMS (2020). En effet, basé exclusivement sur des critères morphologiques, cette classification considère chaque sous-type d'adénocarcinome comme complètement associé ou indépendant à HPV (Höhn et al. 2021). Toutefois, nos résultats révèlent que tous les sous-types adénocarcinome semblent, en réalité, liés à HPV, bien que des degrés variables de liaison soient observés. Cette classification (OMS 2020) est une avancée considérable dans le diagnostic des adénocarcinomes cervicaux (car mentionne le statut HPV pour la première

fois) mais l'utilisation d'un test HPV reconnu afin de classer précisément les tumeurs d'un point de vue histologique et virologique serait une évolution intéressante à cette classification actuelle.

La prévalence par génotype d'HPV spécifique a également été analysée. De façon générale, HPV16, HPV18 et HPV45 sont les génotypes les plus fréquemment retrouvés dans les adénocarcinomes du col utérin avec une prévalence de 49.8%, 45.3% et 8.6% respectivement. Lorsque l'on compare la distribution des génotypes HPV16 et HPV18 en fonction des continents ou des sous-types d'adénocarcinome, les variabilités sont assez modestes. Comme souligné précédemment (dans la partie se focalisant sur les adénocarcinomes œsophagiens), la présence trois fois plus importante d'HPV18 au sein des tumeurs glandulaires cervicales par rapport à leurs homologues épidermoïdes est une énigme (Bruni et al. 2023).

Grâce à cette revue systématique et méta-analyse, nous avons fourni une estimation quantitative de la prévalence générale d'HPV dans les différents sous-types d'adénocarcinome du col utérin et mis en évidence des différences en fonction des continents et des sous-types histologiques. L'ajout de l'analyse du statut viral (par exemple via PCR) dans la classification actuelle des adénocarcinomes cervicaux permettrait de gagner en précision et, espérons-le, permettra à l'avenir une meilleure prise en charge de ces patients.

Finalement, de nombreuses interrogations subsistent concernant le rôle d'HPV dans le développement des cancers. Pourquoi certains sites anatomiques spécifiques présentent-ils une prédisposition élevée aux infections persistantes ? Hormis les cellules de la couche basale de l'épithélium pluristratifié, est-il possible que d'autres types cellulaires soient également vulnérables aux infections par HPV, pouvant potentiellement contribuer à la genèse des cancers ?

Bien que la proportion d'adénocarcinomes cervicaux attribuée à une infection par HPV soit plus faible que celle reportée pour les carcinomes épidermoïdes du col utérin et de l'anus (plus de 90%) (Walboomers et al. 1999; Bruyère et al. 2021), elle reste néanmoins la troisième proportion la plus importante reportée dans les cancers HPV-induits. De façon intéressante, ce sont les seuls cancers de type glandulaire présentant une prévalence d'HPV aussi importante. En effet, si l'on considère le pourcentage d'adénocarcinomes HPV positifs diagnostiqué au niveau des poumons, du tractus gastro-intestinal ou de la partie supérieure de l'appareil reproducteur féminin, celui-ci ne dépasse jamais les 15% et l'implication d'HPV dans la carcinogenèse de ces derniers est extrêmement controversée (Olesen et al. 2014; Baandrup et al. 2014; Cherif et al. 2021; Karnosky et al. 2021). Si l'on compare ces observations à notre étude effectuée sur les adénocarcinomes de l'œsophage, bien que la prévalence d'HPV retrouvée est légèrement plus élevée que 15%, la controverse est toujours existante et HPV ne semble pas jouer un rôle étiologique dans ces cancers. De plus, cette faible prévalence d'HPV et cette controverse au niveau du rôle étiologique d'HPV ont également été observées pour des cancers se situant dans d'autres sites anatomiques peu évoqués (Sofiani et al. 2023). En effet, en association avec le virus de l'hépatite B, il a été suggéré que HPV pouvait intervenir dans le développement des carcinomes hépatocellulaires (Scinicariello et al. 1992; T. Ma et al. 2012). Des infections par HPV ont également été détectées dans l'épithélium urothéliale, où 15% des carcinomes urothéliaux de la vessie sont HPV-induits. Cependant, le rôle étiologique de ce virus dans ce type de cancer reste controversé (Shigehara, Sasagawa, and Namiki 2014; Ohadian Moghadam et al. 2020; Khatami, Salavatiha, and Razizadeh 2022). De manière

similaire, certaines études mettent en évidence la présence d'HPV (environ 10-20%) dans les cancers de la prostate et dans les cancers du sein. Néanmoins, le rôle étiologique d'HPV dans la carcinogenèse de ces derniers est très peu probable et des infections occasionnelles (durant l'analyse ou non) reste l'explication la plus plausible à ces faibles pourcentages de positivité (Lin et al. 2011; N. Li et al. 2011; R. G. Silva and da Silva 2011; Yin et al. 2017; Khodabandehlou et al. 2019).

Le virus HPV s'avère être présent dans une multitude de cancers mais son rôle en tant qu'oncogène dans ces derniers est très peu probable. De nombreuses études ont tenté d'expliquer ces controverses en invoquant des variations géographiques, la limitation de la reproductivité des techniques de détection d'HPV utilisées ainsi que la diversité des échantillons analysés (exemple : congelés ou inclus en paraffine). Cependant, ces justifications ne suffisent pas à expliquer la totalité des résultats. Malgré des aspects inexpliqués, il est curieux de constater que l'infection par HPV entraînerait une cancérisation uniquement dans certains sites anatomiques. Dans d'autres organes et tissus, HPV n'est pas considéré comme agent carcinogène mais pourrait plutôt être un facteur aggravant (Kombe Kombe et al. 2021). L'ensemble de ces données suscite l'idée que le virus HPV pourrait éventuellement infecter une variété de cellules épithéliales de manière temporaire et pas uniquement les kératinocytes des épithélia pluristratifié qui étaient, à l'origine, considérées comme les seules cellules pouvant être infectées. L'origine cellulaire (ou la cellule cible) des infections par HPV est donc largement remise en question.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Latif, Mohamed M. M., James O’Riordan, Henry J. Windle, Eleanor Carton, Nagunivan Ravi, Dermot Kelleher, and John V. Reynolds. 2004. “NF-κB Activation in Esophageal Adenocarcinoma.” *Annals of Surgery* 239 (4): 491–500. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000118751.95179.c6>.
- Accardi, Rosita, Rosa Rubino, Mariafrancesca Scalise, Tarik Gheit, Naveed Shahzad, Miranda Thomas, Lawrence Banks, et al. 2011. “E6 and E7 from Human Papillomavirus Type 16 Cooperate To Target the PDZ Protein Na/H Exchange Regulatory Factor 1^α.” *Journal of Virology* 85 (16): 8208–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.00114-11>.
- Adams, Tracey S., Linda J. Rogers, and Mauricio A. Cuello. 2021. “Cancer of the Vagina: 2021 Update.” *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 155 Suppl 1 (Suppl 1): 19–27. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13867>.
- Ajani, Jaffer A., Thomas A. D’Amico, David J. Bentrem, David Cooke, Carlos Corvera, Prajnan Das, Peter C. Enzinger, et al. 2023. “Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, Version 2.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.” *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 21 (4): 393–422. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2023.0019>.
- Aksoy, Pinar, Elinor Y. Gottschalk, and Patricio I. Meneses. 2017. “HPV Entry into Cells.” *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* 772: 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.004>.
- Ang, K. Kian, Jonathan Harris, Richard Wheeler, Randal Weber, David I. Rosenthal, Phuc Felix Nguyen-Tân, William H. Westra, et al. 2010. “Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 363 (1): 24–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>.
- Antonsson, Annika, Lani Knight, and David C. Whiteman. 2016. “Human Papillomavirus Not Detected in Esophageal Adenocarcinoma Tumor Specimens.” *Cancer Epidemiology* 41 (April): 96–98. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.01.014>.
- Araldi, Rodrigo Pinheiro, Suely Muro Reis Assaf, Rodrigo Franco De Carvalho, Márcio Augusto Caldas Rocha De Carvalho, Jacqueline Mazzuchelli De Souza, Roberta Fiusa Magnelli, Diego Grando Módolo, Franco Peppino Roperto, Rita De Cassia Stocco, and Willy Beçak. 2017. “Papillomaviruses: A Systematic Review.” *Genetics and Molecular Biology* 40 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0128>.
- Aziz, Hafsa, Areej A. Sattar, Humera Mahmood, Shazia Fatima, Mona Khurshid, and Mohammad Faheem. 2023. “Prevalence of HPV Types in HIV-Positive and Negative Females with Normal Cervical Cytology or Dysplasia.” *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 37 (4): e24851. <https://doi.org/10.1002/jcla.24851>.
- Baandrup, Louise, Louise T. Thomsen, Tina Bech Olesen, Klaus Kaae Andersen, Bodil Norrild, and Susanne K. Kjaer. 2014. “The Prevalence of Human Papillomavirus in Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 50 (8): 1446–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.01.019>.
- Badoual, Cécile, Stéphane Hans, Nathalie Merillon, Cordélia Van Ryswick, Patrice Ravel, Nadine Benhamouda, Emeline Levionnois, et al. 2013. “PD-1–Expressing Tumor-Infiltrating T Cells Are a Favorable Prognostic Biomarker in HPV-Associated Head and Neck Cancer.” *Cancer Research* 73 (1): 128–38. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2606>.

- Barnard, Paula, and Nigel A J McMillan. 1999. "The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Abrogates Signaling Mediated by Interferon." *Virology* 259 (April): 305–213.
- Bergvall, Monika, Thomas Melendy, and Jacques Archambault. 2013. "The E1 Proteins." *Virology* 445 (1–2): 35–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>.
- Bernard, Hans-Ulrich, Robert D. Burk, Zigui Chen, Koenraad Van Doorslaer, Harald Zur Hausen, and Ethel-Michele De Villiers. 2010. "Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments." *Virology* 401 (1): 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>.
- Bienkowska-Haba, Malgorzata, Carlyn Williams, Seong Man Kim, Robert L. Garcea, and Martin Sapp. 2012. "Cyclophilins Facilitate Dissociation of the Human Papillomavirus Type 16 Capsid Protein L1 from the L2/DNA Complex Following Virus Entry." *Journal of Virology* 86 (18): 9875–87. <https://doi.org/10.1128/JVI.00980-12>.
- Bishop, Justin A., Raluca Yonescu, Denise Batista, Anna Yemelyanova, Patrick K. Ha, and William H. Westra. 2014. "Mucoepidermoid Carcinoma Does Not Harbor Transcriptionally Active High Risk Human Papillomavirus Even in the Absence of the MAML2 Translocation." *Head and Neck Pathology* 8 (3): 298–302. <https://doi.org/10.1007/s12105-014-0541-9>.
- Bognár, Laura, Ivett Hegedűs, Szabolcs Bellyei, Éva Pozsgai, László Zoltán, Katalin Gombos, Örs Péter Horváth, András Vereczkei, and András Papp. 2018. "Prognostic Role of HPV Infection in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Infectious Agents and Cancer* 13 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0210-9>.
- Boyer, Sarah N, David E Wazer, and Vimla Band. 1996. "E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma."
- Brown, Darron R., Douglas Kitchin, Brahim Qadadri, Nicole Neptune, Teresa Batteiger, and Aaron Ermel. 2006. "The Human Papillomavirus Type 11 E1–E4 Protein Is a Transglutaminase 3 Substrate and Induces Abnormalities of the Cornified Cell Envelope." *Virology* 345 (1): 290–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.048>.
- Bruni, L, G Albero, B Serrano, M Mena, JJ Collado, D Gomez, J Munoz, FX Bosch, and S De Sanjosé. 2023. "Human Papillomavirus and Related Diseases in the World." ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre).
- Bruyère, Diane, Franck Monnien, Prudence Colpart, Patrick RONCARATI, Lucine Vuitton, Elodie Hendrick, Alexis Lepinoy, et al. 2021. "Treatment Algorithm and Prognostic Factors for Patients with Stage I–III Carcinoma of the Anal Canal: A 20-Year Multicenter Study." *Modern Pathology* 34. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0637-6>.
- Bruyere, Diane, Patrick RONCARATI, Alizée Lebeau, Thomas Lerho, Florian Poulain, Elodie Hendrick, Charlotte Pilard, et al. 2023. "Human papillomavirus E6/E7 oncoproteins promote radiotherapy-mediated tumor suppression by globally hijacking host DNA damage repair." *Theranostics* 13 (3). <https://doi.org/10.7150/thno.78091>.
- Buck, Christopher B., Naiqian Cheng, Cynthia D. Thompson, Douglas R. Lowy, Alasdair C. Steven, John T. Schiller, and Benes L. Trus. 2008. "Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid." *Journal of Virology* 82 (11): 5190–97. <https://doi.org/10.1128/JVI.02726-07>.
- Buck, Christopher B., Patricia M. Day, and Benes L. Trus. 2013. "The Papillomavirus Major Capsid Protein L1." *Virology* 445 (0): 169–74. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038>.

- Buck, Christopher B., Cynthia D. Thompson, Yuk-Ying S. Pang, Douglas R. Lowy, and John T. Schiller. 2005. "Maturation of Papillomavirus Capsids." *Journal of Virology* 79 (5): 2839–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2839-2846.2005>.
- Burgers, W. A., L. Blanchon, S. Pradhan, Y. de Launoit, T. Kouzarides, and F. Fuks. 2007. "Viral Oncoproteins Target the DNA Methyltransferases." *Oncogene* 26 (11): 1650–55. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209950>.
- Businello, Gianluca, Paola Parente, Luca Mastracci, Gianmaria Pennelli, Giulia Traverso, Massimo Milione, Elena Bellan, et al. 2020. "The Pathologic and Molecular Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinogenesis." *Cancers* 12 (8): 2160. <https://doi.org/10.3390/cancers12082160>.
- Campo, M.S., S.V. Graham, M.S. Cortese, G.H. Ashrafi, E.H. Araibi, E.S. Dornan, K. Miners, C. Nunes, and S. Man. 2010. "HPV-16 E5 down-Regulates Expression of Surface HLA Class I and Reduces Recognition by CD8 T Cells." *Virology* 407 (1): 137–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.044>.
- Cao, Fangli, Hui Han, Fang Zhang, Baozhong Wang, Wei Ma, Yanwen Wang, Guiming Sun, Miao Shi, Yubo Ren, and Yufeng Cheng. 2014. "HPV Infection in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Relationship to the Prognosis of Patients in Northern China." *The Scientific World Journal* 2014: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/804738>.
- Carreras-Diequez, Nuria, Adela Saco, Marta Del Pino, Lorena Marimon, Ricardo López Del Campo, Carolina Manzotti, Pere Fusté, et al. 2023. "Human Papillomavirus and P53 Status Define Three Types of Vulvar Squamous Cell Carcinomas with Distinct Clinical, Pathological, and Prognostic Features." *Histopathology* 83 (1): 17–30. <https://doi.org/10.1111/his.14925>.
- Casey, Shauna, Ian Harley, Jackie Jamison, Anco Molijn, Henk van den Munckhof, and W. Glenn McCluggage. 2015. "A Rare Case of HPV-Negative Cervical Squamous Cell Carcinoma." *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 34 (2): 208–12. <https://doi.org/10.1097/PGP.000000000000132>.
- Castellsagué, X., A. R. Giuliano, S. Goldstone, A. Guevara, O. Mogensen, J. M. Palefsky, T. Group, et al. 2015. "Immunogenicity and Safety of the 9-Valent HPV Vaccine in Men." *Vaccine* 33 (48): 6892–6901. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.088>.
- Castro-Muñoz, Leonardo Josué, Joaquín Manzo-Merino, J. Omar Muñoz-Bello, Leslie Olmedo-Nieva, Alberto Cedro-Tanda, Luis Alberto Alfaro-Ruiz, Alfredo Hidalgo-Miranda, Vicente Madrid-Marina, and Marcela Lizano. 2019. "The Human Papillomavirus (HPV) E1 Protein Regulates the Expression of Cellular Genes Involved in Immune Response." *Scientific Reports* 9 (1): 13620. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49886-4>.
- Cerqueira, Carla, Pilar Samperio Ventayol, Christian Vogeley, and Mario Schelhaas. 2015. "Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space To Facilitate Entry into Host Cells." *Journal of Virology* 89 (14): 7038–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.00234-15>.
- Chahoud, Jad, Manish Kohli, and Philippe E. Spiess. 2021. "Management of Advanced Penile Cancer." *Mayo Clinic Proceedings* 96 (3): 720–32. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.06.031>.
- Chaiwongkot, Arkom, Svetlana Vinokurova, Chamsai Pientong, Tipaya Ekalaksananan, Bunkerd Kongyingyoes, Pilaiwan Kleebkaow, Bandit Chumworathayi, Natcha Patarapadungkit, Miriam Reuschenbach, and Magnus Von Knebel Doeberitz. 2013.

- “Differential Methylation of E2 Binding Sites in Episomal and Integrated HPV 16 Genomes in Preinvasive and Invasive Cervical Lesions.” *International Journal of Cancer* 132 (9): 2087–94. <https://doi.org/10.1002/ijc.27906>.
- Chaturvedi, Anil K., Barry I. Graubard, Tatevik Broutian, Robert K.L. Pickard, Zhen-Yue Tong, Weihong Xiao, Lisa Kahle, and Maura L. Gillison. 2018. “Effect of Prophylactic Human Papillomavirus (HPV) Vaccination on Oral HPV Infections Among Young Adults in the United States.” *Journal of Clinical Oncology* 36 (3): 262–67. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.0141>.
- Chen, S. -L., C. -H. Huang, T. -C. Tsai, K. -Y. Lu, and Y. -P. Tsao. 1996. “The Regulation Mechanism of C-Jun and junB by Human Papillomavirus Type 16 E5 Oncoprotein.” *Archives of Virology* 141 (5): 791–800. <https://doi.org/10.1007/BF01718155>.
- Chen, S-L, S-T Lin, T-C Tsai, W-C Hsiao, and Y-P Tsao. 2007. “ErbB4 (JM-b/CYT-1)-Induced Expression and Phosphorylation of c-Jun Is Abrogated by Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein.” *Oncogene* 26 (1): 42–53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209768>.
- Chen, Wen, Anco Molijn, Wu Enqi, Xun Zhang, David Jenkins, Xiaohong Yu, Wim Quint, et al. 2016. “The Variable Clinicopathological Categories and Role of Human Papillomavirus in Cervical Adenocarcinoma: A Hospital Based Nation-Wide Multi-Center Retrospective Study across China: Variable Clinicopathological Categories.” *International Journal of Cancer* 139 (12): 2687–97. <https://doi.org/10.1002/ijc.30401>.
- Chen, Xiaohua, Jun Xian Loo, Xin Shi, Wenjun Xiong, Yong Guo, Haiqiang Ke, Mingkun Yang, et al. 2018. “E6 Protein Expressed by High-Risk HPV Activates Super-Enhancers of the *EGFR* and *c-MET* Oncogenes by Destabilizing the Histone Demethylase KDM5C.” *Cancer Research* 78 (6): 1418–30. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2118>.
- Chen, Zigui, Mark Schiffman, Rolando Herrero, Rob DeSalle, Kathryn Anastos, Michel Segondy, Vikrant V. Sahasrabudhe, et al. 2018. “Classification and Evolution of Human Papillomavirus Genome Variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61).” *Virology* 516 (March): 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.002>.
- Cherif, Soumia, Abdessamad Amine, Sarah Thies, Eliane T. Taube, Elena Ioana Braicu, Jalid Sehoul, and Andreas M. Kaufmann. 2021. “Prevalence of Human Papillomavirus Detection in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis.” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 40 (9): 1791–1802. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04282-7>.
- Chernock, Rebecca D., James S. Lewis, Qin Zhang, and Samir K. El-Mofty. 2010. “Human Papillomavirus–Positive Basaloid Squamous Cell Carcinomas of the Upper Aerodigestive Tract: A Distinct Clinicopathologic and Molecular Subtype of Basaloid Squamous Cell Carcinoma.” *Human Pathology* 41 (7): 10.1016/j.humpath.2009.11.015. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.11.015>.
- Chirieac, Lucian R., Stephen G. Swisher, Arlene M. Correa, Jaffer A. Ajani, Ritsuko R. Komaki, Asif Rashid, Stanley R. Hamilton, and Tsung-Teh Wu. 2005. “Signet-Ring Cell or Mucinous Histology after Preoperative Chemoradiation and Survival in Patients with Esophageal or Esophagogastric Junction Adenocarcinoma.” *Clinical Cancer Research* 11 (6): 2229–36. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1840>.

- Chitsike, Lennox, and Penelope J. Duerksen-Hughes. 2021. "PPI Modulators of E6 as Potential Targeted Therapeutics for Cervical Cancer: Progress and Challenges in Targeting E6." *Molecules* 26 (10): 3004. <https://doi.org/10.3390/molecules26103004>.
- Cho, Won Kyung, Hyun-Soo Kim, Won Park, Yeon-Sil Kim, Jun Kang, Yong Bae Kim, Young Seok Kim, et al. 2023. "The Updated World Health Organization Classification Better Predicts Survival in Patients With Endocervical Adenocarcinoma (KROG 20-07)." *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, March, S0360301623002882. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2023.03.048>.
- Chong, T., D. Apt, B. Gloss, M. Isa, and H. U. Bernard. 1991. "The Enhancer of Human Papillomavirus Type 16: Binding Sites for the Ubiquitous Transcription Factors Oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 Participate in Epithelial Cell-Specific Transcription." *Journal of Virology* 65 (11): 5933–43. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.11.5933-5943.1991>.
- Chow, Louise T., Thomas R. Broker, and Bettie M. Steinberg. 2010. "The Natural History of Human Papillomavirus Infections of the Mucosal Epithelia: NATURAL HISTORY OF HPV INFECTIONS AND PATHOLOGY." *APMIS* 118 (6–7): 422–49. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02625.x>.
- Christiansen, Irene Kraus, Geir Kjetil Sandve, Martina Schmitz, Matthias Dürst, and Eivind Hovig. 2015. "Transcriptionally Active Regions Are the Preferred Targets for Chromosomal HPV Integration in Cervical Carcinogenesis." Edited by Maria Lina Tornesello. *PLOS ONE* 10 (3): e0119566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119566>.
- Chu, Chengbiao, Keming Chen, Xingliang Tan, Jiangli Lu, Yuanzhong Yang, YiJun Zhang, Kai Yao, and Yun Cao. 2020. "Prevalence of Human Papillomavirus and Implication on Survival in Chinese Penile Cancer." *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 477 (5): 667–75. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02831-7>.
- Chung, Christine H., and Maura L. Gillison. 2009. "Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer: Its Role in Pathogenesis and Clinical Implications." *Clinical Cancer Research* 15 (22): 6758–62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0784>.
- Chung, Sun M., Jean Kao, Elizabeth Hyjek, and Yao-Tseng Chen. 2007. "P53 in Esophageal Adenocarcinoma: A Critical Reassessment of Mutation Frequency and Identification of 72Arg as the Dominant Allele." *International Journal of Oncology* 31 (6): 1351–55.
- Clifford, Gary M., Vanessa Tenet, Damien Georges, Laia Alemany, Miquel Angel Pavón, Ziguí Chen, Meredith Yeager, et al. 2019. "Human Papillomavirus 16 Sub-Lineage Dispersal and Cervical Cancer Risk Worldwide: Whole Viral Genome Sequences from 7116 HPV16-Positive Women." *Papillomavirus Research* 7 (June): 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.02.001>.
- Contreras-Paredes, Adriana, Erick De La Cruz-Hernández, Imelda Martínez-Ramírez, Alfonso Dueñas-González, and Marcela Lizano. 2009. "E6 Variants of Human Papillomavirus 18 Differentially Modulate the Protein Kinase B/Phosphatidylinositol 3-Kinase (Akt/PI3K) Signaling Pathway." *Virology* 383 (1): 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.040>.
- Conway, Michael J., Samina Alam, Eric J. Ryndock, Linda Cruz, Neil D. Christensen, Richard B. S. Roden, and Craig Meyers. 2009. "Tissue-Spanning Redox Gradient-Dependent Assembly of Native Human Papillomavirus Type 16 Virions." *Journal of Virology* 83 (20): 10515–26. <https://doi.org/10.1128/JVI.00731-09>.

- Culp, Timothy D., Lynn R. Budgeon, M. Peter Marinkovich, Guerrino Meneguzzi, and Neil D. Christensen. 2006. "Keratinocyte-Secreted Laminin 5 Can Function as a Transient Receptor for Human Papillomaviruses by Binding Virions and Transferring Them to Adjacent Cells." *Journal of Virology* 80 (18): 8940–50. <https://doi.org/10.1128/JVI.00724-06>.
- Da Costa, Allini Mafra, José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, Paula Roberta Aguiar Pastrez, Vânia Sammartino Mariano, Estela Maria Silva, Cristovam Scapulatempo Neto, Denise Peixoto Guimarães, et al. 2017. "HPV Infection and P53 and P16 Expression in Esophageal Cancer: Are They Prognostic Factors?" *Infectious Agents and Cancer* 12 (1): 54. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0163-4>.
- Daling, Janet R., Margaret M. Madeleine, Stephen M. Schwartz, Katherine A. Shera, Joseph J. Carter, Barbara McKnight, Peggy L. Porter, Denise A. Galloway, James K. McDougall, and Hisham Tamimi. 2002. "A Population-Based Study of Squamous Cell Vaginal Cancer: HPV and Cofactors." *Gynecologic Oncology* 84 (2): 263–70. <https://doi.org/10.1006/gyno.2001.6502>.
- Damgaard, Rikke Kamp, David Jenkins, Maurits Nc De Koning, Wim Gv Quint, Mark H Stoler, John Doorbar, Johnny Kahlert, et al. 2022. "Performance of HPV E4 and P16^{INK4a} Biomarkers in Predicting Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 (CIN2): Protocol for a Historical Cohort Study." *BMJ Open* 12 (7): e059593. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-059593>.
- Day, Patricia M., Douglas R. Lowy, and John T. Schiller. 2003. "Papillomaviruses Infect Cells via a Clathrin-Dependent Pathway." *Virology* 307 (1): 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(02\)00143-5](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(02)00143-5).
- Della Fera, Ashley N., Alix Warburton, Tami L. Coursey, Simran Khurana, and Alison A. McBride. 2021. "Persistent Human Papillomavirus Infection." *Viruses* 13 (2): 321. <https://doi.org/10.3390/v13020321>.
- DeNardi, F. G., and R. H. Riddell. 1991. "The Normal Esophagus." *The American Journal of Surgical Pathology* 15 (3): 296–309. <https://doi.org/10.1097/00000478-199103000-00010>.
- Deng, Wentao, Biing Yuan Lin, Ge Jin, Crystal G. Wheeler, Tianlin Ma, J. Wade Harper, Thomas R. Broker, and Louise T. Chow. 2004. "Cyclin/CDK Regulates the Nucleocytoplasmic Localization of the Human Papillomavirus E1 DNA Helicase." *Journal of Virology* 78 (24): 13954–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13954-13965.2004>.
- Devine, Catherine, Chitra Viswanathan, Silvana Faria, Leonardo Marcal, and Tara L. Sagebiel. 2019. "Imaging and Staging of Cervical Cancer." *Seminars in Ultrasound, CT, and MR* 40 (4): 280–86. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2019.03.001>.
- Di Bonito, P., M. Iaconelli, T. Gheit, M. Tommasino, S. Della Libera, L. Bonadonna, and G. La Rosa. 2017. "Detection of Oncogenic Viruses in Water Environments by a Luminex-Based Multiplex Platform for High Throughput Screening of Infectious Agents." *Water Research* 123 (October): 549–55. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.088>.
- DiGiuseppe, Stephen, Malgorzata Bienkowska-Haba, Lucile G. M. Guion, Timothy R. Keiffer, and Martin Sapp. 2017. "Human Papillomavirus Major Capsid Protein L1 Remains Associated with the Incoming Viral Genome throughout the Entry Process." *Journal of Virology* 91 (16): e00537-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00537-17>.
- Doorbar, John. 2007. "Papillomavirus Life Cycle Organization and Biomarker Selection." *Disease Markers* 23 (4): 297–313. <https://doi.org/10.1155/2007/613150>.

- Doorbar, John. 2013. "The E4 Protein; Structure, Function and Patterns of Expression." *Virology* 445 (1–2): 80–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.008>.
- Doorbar, John, Nagayasu Egawa, Heather Griffin, Christian Kranjec, and Isao Murakami. 2015. "Human Papillomavirus Molecular Biology and Disease Association." *Reviews in Medical Virology* 25 (Suppl Suppl 1): 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>.
- Doorbar, John, Wim Quint, Lawrence Banks, Ignacio G. Bravo, Mark Stoler, Tom R. Broker, and Margaret A. Stanley. 2012. "The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses." *Vaccine* 30 (November): F55–70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>.
- Dreer, Marcel, Saskia Van De Poel, and Frank Stubenrauch. 2017. "Control of Viral Replication and Transcription by the Papillomavirus E8^{E2} Protein." *Virus Research* 231 (March): 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.005>.
- Dreilich, Martin, Michael Bergqvist, Martin Moberg, Daniel Brattström, Inger Gustavsson, Stefan Bergström, Alkwin Wanders, Patrik Hesselius, Gunnar Wagenius, and Ulf Gyllensten. 2006. "High-Risk Human Papilloma Virus (HPV) and Survival in Patients with Esophageal Carcinoma: A Pilot Study." *BMC Cancer* 6 (April): 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-94>.
- Driessen, A., P. Nafteux, T. Lerut, D. Van Raemdonck, P. De Leyn, L. Filez, F. Penninckx, K. Geboes, and N. Ectors. 2004. "Identical Cytokeratin Expression Pattern CK7+/CK20- in Esophageal and Cardiac Cancer: Etiopathological and Clinical Implications." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17 (1): 49–55. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800011>.
- Dvorak, Katerina, Melissa Chavarria, Claire M. Payne, Lois Ramsey, Cara Crowley-Weber, Barbora Dvorakova, Bohuslav Dvorak, et al. 2007. "Activation of the Interleukin-6/STAT3 Antiapoptotic Pathway in Esophageal Cells by Bile Acids and Low pH: Relevance to Barrett's Esophagus." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (18 Pt 1): 5305–13. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0483>.
- Dyson, Nicholas, and Peter M Howley. 1989. "The Human Papilloma Virus--16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product." *Science*.
- Egawa, Nagayasu, Kiyofumi Egawa, Heather Griffin, and John Doorbar. 2015. "Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia." *Viruses* 7 (7): 3863–90. <https://doi.org/10.3390/v7072802>.
- El-Naggar, Adel K., John K. C. Chan, Takashi Takata, Jennifer R. Grandis, and Pieter J. Slootweg. 2017. "The Fourth Edition of the Head and Neck World Health Organization Blue Book: Editors' Perspectives." *Human Pathology* 66 (August): 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.014>.
- El-Serag, H. B., J. M. Hollier, P. Gravitt, A. Alsarraj, and M. Younes. 2013. "Human Papillomavirus and the Risk of Barrett's Esophagus: HPV in Barrett's Esophagus." *Diseases of the Esophagus* 26 (5): 517–21. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2012.01392.x>.
- Fakhry, Carole, Nicholas Fung, Sakshi R. Tewari, and Gypsyamber D'Souza. 2020. "Unique Role of HPV16 in Predicting Oropharyngeal Cancer Risk More than Other Oncogenic Oral HPV Infections." *Oral Oncology* 111 (December): 104981. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104981>.
- Fassan, Matteo, Stefano Volinia, Jeff Palatini, Marco Pizzi, Raffaele Baffa, Marina De Bernard, Giorgio Battaglia, et al. 2011. "MicroRNA Expression Profiling in Human Barrett's

- Carcinogenesis." *International Journal of Cancer* 129 (7): 1661–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.25823>.
- Fehrmann, Frauke, David J. Klumpp, and Laimonis A. Laimins. 2003. "Human Papillomavirus Type 31 E5 Protein Supports Cell Cycle Progression and Activates Late Viral Functions upon Epithelial Differentiation." *Journal of Virology* 77 (5): 2819–31. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.2819-2831.2003>.
- Fertey, Jasmin, Ingo Ammermann, Michael Winkler, Reinhard Stöger, Thomas Iftner, and Frank Stubenrauch. 2010. "Interaction of the Papillomavirus E8/E2C Protein with the Cellular CHD6 Protein Contributes to Transcriptional Repression." *Journal of Virology* 84 (18): 9505–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.00678-10>.
- Filippova, Maria, Melyssa M. Johnson, Marnelli Bautista, Valery Filippov, Nadja Fodor, Sandy S. Tungteakkhun, Kadia Williams, and Penelope J. Duerksen-Hughes. 2007. "The Large and Small Isoforms of Human Papillomavirus Type 16 E6 Bind to and Differentially Affect Procaspase 8 Stability and Activity." *Journal of Virology* 81 (8): 4116–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.01924-06>.
- Fischer, A. 2014. "Fundamentals of Cytological Diagnosis and Its Biological Basis." In *Pathobiology of Human Disease*, edited by Linda M. McManus and Richard N. Mitchell, 3311–44. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.06501-1>.
- Fitzgerald, Rebecca C., Massimiliano di Pietro, Krish Rangunath, Yeng Ang, Jin-Yong Kang, Peter Watson, Nigel Trudgill, et al. 2014. "British Society of Gastroenterology Guidelines on the Diagnosis and Management of Barrett's Oesophagus." *Gut* 63 (1): 7–42. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305372>.
- Fléjou, J.-F. 2005. "Barrett's Oesophagus: From Metaplasia to Dysplasia and Cancer." *Gut* 54 Suppl 1 (Suppl 1): i6-12. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.041525>.
- Florin, Luise, Frank Schäfer, Karl Sotlar, Rolf E. Streeck, and Martin Sapp. 2002. "Reorganization of Nuclear Domain 10 Induced by Papillomavirus Capsid Protein L2." *Virology* 295 (1): 97–107. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1360>.
- Fradet-Turcotte, Amélie, Cary Moody, Laimonis A. Laimins, and Jacques Archambault. 2010. "Nuclear Export of Human Papillomavirus Type 31 E1 Is Regulated by Cdk2 Phosphorylation and Required for Viral Genome Maintenance." *Journal of Virology* 84 (22): 11747–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.01445-10>.
- Fritsch, Valerie A., and Eric J. Lentsch. 2014. "Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Location Means Everything." *Journal of Surgical Oncology* 109 (6): 616–22. <https://doi.org/10.1002/jso.23536>.
- Ganti, Ketaki, Justyna Broniarczyk, Wiem Manoubi, Paola Massimi, Suruchi Mittal, David Pim, Anita Szalmas, et al. 2015. "The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy." *Viruses* 7 (7): 3530–51. <https://doi.org/10.3390/v7072785>.
- Gao, Huiqin, Lunan Li, Chenjing Zhang, Jiangfeng Tu, Xiaoge Geng, Jingya Wang, Xiaolu Zhou, Jiyong Jing, and Wensheng Pan. 2019. "Systematic Review with Meta-Analysis: Association of Helicobacter Pylori Infection with Esophageal Cancer." *Gastroenterology Research and Practice* 2019: 1953497. <https://doi.org/10.1155/2019/1953497>.
- Garland, Suzanne M., Mauricio Hernandez-Avila, Cosette M. Wheeler, Gonzalo Perez, Diane M. Harper, Sepp Leodolter, Grace W.K. Tang, et al. 2007. "Quadrivalent Vaccine against

- Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases.” *New England Journal of Medicine* 356 (19): 1928–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061760>.
- Garnett, T O, M Filippova, and P J Duerksen-Hughes. 2006. “Accelerated Degradation of FADD and Procaspase 8 in Cells Expressing Human Papilloma Virus 16 E6 Impairs TRAIL-Mediated Apoptosis.” *Cell Death & Differentiation* 13 (11): 1915–26. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401886>.
- Georgantis, Georgios. 2015. “Detection of Human Papillomavirus DNA in Esophageal Carcinoma in Greece.” *World Journal of Gastroenterology* 21 (8): 2352. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i8.2352>.
- Giacinti, C, and A Giordano. 2006. “RB and Cell Cycle Progression.” *Oncogene* 25 (38): 5220–27. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>.
- Gillespie, Kenric A., Kavi P. Mehta, Laimonis A. Laimins, and Cary A. Moody. 2012. “Human Papillomaviruses Recruit Cellular DNA Repair and Homologous Recombination Factors to Viral Replication Centers.” *Journal of Virology* 86 (17): 9520–26. <https://doi.org/10.1128/JVI.00247-12>.
- Giroglou, T., L. Florin, F. Schäfer, R. E. Streeck, and M. Sapp. 2001. “Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate.” *Journal of Virology* 75 (3): 1565–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1565-1570.2001>.
- Giuliano, Anna R., Joel M. Palefsky, Stephen Goldstone, Edson D. Moreira, Mary E. Penny, Carlos Aranda, Eftyhia Vardas, et al. 2011. “Efficacy of Quadrivalent HPV Vaccine against HPV Infection and Disease in Males.” *The New England Journal of Medicine* 364 (5): 401–11. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909537>.
- Gormley, Mark, Grant Creaney, Andrew Schache, Kate Ingarfield, and David I. Conway. 2022. “Reviewing the Epidemiology of Head and Neck Cancer: Definitions, Trends and Risk Factors.” *British Dental Journal* 233 (9): 780–86. <https://doi.org/10.1038/s41415-022-5166-x>.
- Gotovac, Jovana R., Tanjina Kader, Julia V. Milne, Kenji M. Fujihara, Luis E. Lara-Gonzalez, Kylie L. Gorringer, Sangeetha N. Kalimuthu, et al. 2021. “Loss of SMAD4 Is Sufficient to Promote Tumorigenesis in a Model of Dysplastic Barrett’s Esophagus.” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 12 (2): 689–713. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.03.008>.
- Goyal, Raj K., and Arun Chaudhury. 2008. “Physiology of Normal Esophageal Motility.” *Journal of Clinical Gastroenterology* 42 (5): 610–19. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31816b444d>.
- Gravitt, Patti E. 2011. “The Known Unknowns of HPV Natural History.” *The Journal of Clinical Investigation* 121 (12): 4593–99. <https://doi.org/10.1172/JCI57149>.
- Gribb, Jacob P., John H. Wheelock, and Etern S. Park. 2023. “Human Papilloma Virus (HPV) and the Current State of Oropharyngeal Cancer Prevention and Treatment.” *Delaware Journal of Public Health* 9 (1): 26–28. <https://doi.org/10.32481/djph.2023.04.008>.
- Gruener, Myriam, Ignacio G Bravo, Frank Momburg, Angel Alonso, and Pascal Tomakidi. 2007. “The E5 Protein of the Human Papillomavirus Type 16 Down-Regulates HLA-I Surface Expression in Calnexin-Expressing but Not in Calnexin-Deficient Cells.” *Virology Journal* 4 (1): 116. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-116>.
- Guo, Haitao, Renate König, Meng Deng, Maximilian Riess, Jinyao Mo, Lu Zhang, Alex Petrucelli, et al. 2016. “NLRX1 Sequesters STING to Negatively Regulate the Interferon Response,

- Thereby Facilitating the Replication of HIV-1 and DNA Viruses.” *Cell Host & Microbe* 19 (4): 515–28. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.001>.
- Hadisejdi, Ita, and Maja Kra. 2007. “Distribution of Human Papillomavirus Types in Different Histological Subtypes of Cervical Adenocarcinoma.” *Coll. Antropol.*
- Hakenberg, Oliver Walther, Desiree Louise Dräger, Andreas Erbersdobler, Carsten Maik Naumann, Klaus-Peter Jünemann, and Chris Protzel. 2018. “The Diagnosis and Treatment of Penile Cancer.” *Deutsches Arzteblatt International* 115 (39): 646–52. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0646>.
- Hardie, Laura J., S. Jane Darnton, Yvonne L. Wallis, Anita Chauhan, Pierre Hainaut, Christopher P. Wild, and Alan G. Casson. 2005. “P16 Expression in Barrett’s Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma: Association with Genetic and Epigenetic Alterations.” *Cancer Letters* 217 (2): 221–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.06.025>.
- Harwood, Mara C., Tai-Ting Woo, Yuka Takeo, Daniel DiMaio, and Billy Tsai. 2023. “HPV Is a Cargo for the COPI Sorting Complex during Virus Entry.” *Science Advances* 9 (3): eadc9830. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adc9830>.
- Hausen, Harald zur. 2002. “Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application.” *Nature Reviews Cancer* 2 (5): 342–50. <https://doi.org/10.1038/nrc798>.
- Hay, Ashley, and Iain J. Nixon. 2018. “Recent Advances in the Understanding and Management of Oropharyngeal Cancer.” *F1000Research* 7 (August): F1000 Faculty Rev-1362. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14416.1>.
- Herfs, Michael, Pascale Hubert, and Philippe Delvenne. 2009. “Epithelial Metaplasia: Adult Stem Cell Reprogramming and (Pre)Neoplastic Transformation Mediated by Inflammation?” *Trends in Molecular Medicine* 15 (6): 245–53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.04.002>.
- Herfs, Michael, Patrick Roncarati, Benjamin Koopmansch, Olivier Peulen, Diane Bruyere, Alizee Lebeau, Elodie Hendrick, et al. 2018. “A Dualistic Model of Primary Anal Canal Adenocarcinoma with Distinct Cellular Origins, Etiologies, Inflammatory Microenvironments and Mutational Signatures: Implications for Personalised Medicine.” *British Journal of Cancer* 118 (10): 1302–12. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0049-2>.
- Herfs, Michael, Yusuke Yamamoto, Anna Laury, Xia Wang, Marisa R. Nucci, Margaret E. McLaughlin-Drubin, Karl Münger, et al. 2012. “A Discrete Population of Squamocolumnar Junction Cells Implicated in the Pathogenesis of Cervical Cancer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (26): 10516–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202684109>.
- Hodgson, Anjelica, Kay J. Park, Bojana Djordjevic, Brooke E. Howitt, Marisa R. Nucci, Esther Oliva, Simona Stolnicu, Bin Xu, Robert A. Soslow, and Carlos Parra-Herran. 2019. “International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification: Validation and Interobserver Reproducibility.” *American Journal of Surgical Pathology* 43 (1): 75–83. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001095>.
- Höhn, Anne Kathrin, Christine E. Brambs, Grit Gesine Ruth Hiller, Doris May, Elisa Schmoeckel, and Lars-Christian Horn. 2021. “2020 WHO Classification of Female Genital Tumors.” *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde* 81 (10): 1145–53. <https://doi.org/10.1055/a-1545-4279>.
- Holl, Katsiaryna, Andrzej M. Nowakowski, Ned Powell, W. Glenn McCluggage, Edyta C. Pirog, Sabrina Collas De Souza, Wiebren A. Tjalma, et al. 2015. “Human Papillomavirus

- Prevalence and Type-Distribution in Cervical Glandular Neoplasias: Results from a European Multinational Epidemiological Study." *International Journal of Cancer* 137 (12): 2858–68. <https://doi.org/10.1002/ijc.29651>.
- Hrudka, Jan, Zuzana Prouzová, Michaela Kendall Bártů, Jan Hojný, David Čapka, Nicolette Zavillová, Radoslav Matěj, and Petr Waldauf. 2023. "Immune Cell Infiltration, Tumour Budding, and the P53 Expression Pattern Are Important Predictors in Penile Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study of 152 Cases." *Pathology* 55 (5): 637–49. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2023.03.010>.
- Huang, Yaxuan, Yunyun Lan, Zhe Zhang, Xue Xiao, and Tingting Huang. 2022. "An Update on the Immunotherapy for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma." *Frontiers in Oncology* 12 (March): 800315. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.800315>.
- IARC. 2007. *Human Papillomaviruses*. Vol. 90. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France.
- IARC. 2022. *Cervical Cancer Screening*. Vol. 18:1-456. Handbooks of Cancer Prevention. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Handbooks-Of-Cancer-Prevention/Cervical-Cancer-Screening-2022>.
- Iyer, A., V. Rajendran, C.S.C. Adamson, Z. Peng, K. Cooper, and M.F. Evans. 2011. "Human Papillomavirus Is Detectable in Barrett's Esophagus and Esophageal Carcinoma but Is Unlikely to Be of Any Etiologic Significance." *Journal of Clinical Virology* 50 (3): 205–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.11.015>.
- Jacobi, Christian, Isabelle Ayx, Kristin Fritsche, Guido Piontek, Dieter Hoffmann, Gregor Weirich, and Andreas Knopf. 2014. "Potential Impact of Human Papilloma Virus on Survival of Basaloid Squamous Carcinoma of the Head and Neck." *Oncotarget* 6 (5): 3462–70. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3062>.
- Januszewicz, Wladyslaw, and Rebecca C. Fitzgerald. 2019. "Barrett's Oesophagus and Oesophageal Adenocarcinoma." *Medicine* 47 (5): 275–85. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.02.005>.
- Jeon, S, B L Allen-Hoffmann, and P F Lambert. 1995. "Integration of Human Papillomavirus Type 16 into the Human Genome Correlates with a Selective Growth Advantage of Cells." *Journal of Virology* 69 (5): 2989–97.
- Jhaveri, Jaymin, Lael Rayfield, Yuan Liu, Mudrit Chowdhary, Richard J. Cassidy, Nicholas A. Madden, Daniel G. Tanenbaum, et al. 2017. "Prognostic Relevance of Human Papillomavirus Infection in Anal Squamous Cell Carcinoma: Analysis of the National Cancer Data Base." *Journal of Gastrointestinal Oncology* 8 (6): 998–1008. <https://doi.org/10.21037/jgo.2017.10.05>.
- Jhingran, Anuja. 2022. "Updates in the Treatment of Vaginal Cancer." *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 32 (3): 344–51. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2021-002517>.
- Jiang, Ming, Haiyan Li, Yongchun Zhang, Ying Yang, Rong Lu, Kuanan Liu, Sijie Lin, et al. 2017. "Transitional Basal Cells at the Squamous–Columnar Junction Generate Barrett's Oesophagus." *Nature* 550 (7677): 529–33. <https://doi.org/10.1038/nature24269>.
- Jin, Yan, Xueke Zhao, Xin Song, Ran Wang, Zongmin Fan, Panpan Wang, Miaomiao Yang, Fuyou Zhou, Qide Bao, and Lidong Wang. 2023. "The High Expression of P53 Is Predictive of Poor Survival Rather TP53 Mutation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Journal of Oncology* 2023 (January): 3801526. <https://doi.org/10.1155/2023/3801526>.

- Johansson, Cecilia, and Stefan Schwartz. 2013. "Regulation of Human Papillomavirus Gene Expression by Splicing and Polyadenylation." *Nature Reviews Microbiology* 11 (4): 239–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2984>.
- Johnson, Bryan A., Heather L. Aloor, and Cary A. Moody. 2017. "The Rb Binding Domain of HPV31 E7 Is Required to Maintain High Levels of DNA Repair Factors in Infected Cells." *Virology* 500 (January): 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.029>.
- Joura, Elmar A., Anna R. Giuliano, Ole-Erik Iversen, Celine Bouchard, Constance Mao, Jesper Mehlsen, Edson D. Moreira, et al. 2015. "A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women." *The New England Journal of Medicine* 372 (8): 711–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1405044>.
- Jung, Alain C., Jenny Briolat, Régine Millon, Aurélien de Reyniès, David Rickman, Emilie Thomas, Joseph Abecassis, Christine Clavel, and Bohdan Wasyluk. 2010. "Biological and Clinical Relevance of Transcriptionally Active Human Papillomavirus (HPV) Infection in Oropharynx Squamous Cell Carcinoma: HPV Associated with HNSCC." *International Journal of Cancer* 126 (8): 1882–94. <https://doi.org/10.1002/ijc.24911>.
- Kabsch, Kirsten, Nina Mossadegh, Annette Kohl, Gerda Komposch, Johannes Schenkel, Angel Alonso, and Pascal Tomakidi. 2004. "The HPV-16 E5 Protein Inhibits TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in Human Keratinocyte Raft Cultures." *Intervirolgy* 47 (1): 48–56. <https://doi.org/10.1159/000076642>.
- Kanaan, Christina, Diane Lorenzo, Maximilien Barret, Anne Audebourg, Sarah Leblanc, Stanislas Chaussade, Frédéric Prat, and Benoît Terris. 2020. "Early Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Western Series Is Not Associated with Active HPV Infection." *Virchows Archiv* 477 (5): 697–704. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02860-2>.
- Kanginakudru, Sriramana, Marsha DeSmet, Yanique Thomas, Iain M. Morgan, and Elliot J. Androphy. 2015. "Levels of the E2 Interacting Protein TopBP1 Modulate Papillomavirus Maintenance Stage Replication." *Virology* 478 (April): 129–36. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.011>.
- Kapoor, Harit, Devendra K. Agrawal, and Sumeet K. Mittal. 2015. "Barrett's Esophagus: Recent Insights into Pathogenesis and Cellular Ontogeny." *Translational Research* 166 (1): 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.01.009>.
- Karim, Rezaul, Craig Meyers, Claude Backendorf, Kristina Ludigs, Rienk Offringa, Gert-Jan B. van Ommen, Cornelis J. M. Melief, Sjoerd H. van der Burg, and Judith M. Boer. 2011. "Human Papillomavirus Deregulates the Response of a Cellular Network Comprising of Chemotactic and Proinflammatory Genes." *PLOS ONE* 6 (3): e17848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017848>.
- Karnosky, Julia, Wolfgang Dietmaier, Helge Knuettel, Viola Freigang, Myriam Koch, Franziska Koll, Florian Zeman, and Christian Schulz. 2021. "HPV and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis." *Cancer Reports* 4 (4): e1350. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1350>.
- Kasamatsu, Elena, María Isabel Rodríguez Riveros, Ana María Soilan, Marina Ortega, Pamela Mongelós, Malvina Páez, Amalia Castro, et al. 2019. "Factors Associated with High-Risk Human Papillomavirus Infection and High-Grade Cervical Neoplasia: A Population-Based Study in Paraguay." *PLoS One* 14 (6): e0218016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218016>.

- Kashofer, Karl, Elke Winter, Iris Halbwedl, Andrea Thueringer, Marisa Kreiner, Stefan Sauer, and Sigrid Regauer. 2017. "HPV-Negative Penile Squamous Cell Carcinoma: Disruptive Mutations in the TP53 Gene Are Common." *Modern Pathology* 30 (7): 1013–20. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.26>.
- Kato, Ken, Byoung Chul Cho, Masanobu Takahashi, Morihito Okada, Chen-Yuan Lin, Keisho Chin, Shigenori Kadowaki, et al. 2019. "Nivolumab versus Chemotherapy in Patients with Advanced Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Refractory or Intolerant to Previous Chemotherapy (ATTRACTION-3): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial." *The Lancet Oncology* 20 (11): 1506–17. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30626-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30626-6).
- Katzka, David A., and Peter J. Kahrilas. 2020. "Advances in the Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 371 (November): m3786. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3786>.
- Kaz, Andrew M., William M. Grady, Matthew D. Stachler, and Adam J. Bass. 2015. "Genetic and Epigenetic Alterations in Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma." *Gastroenterology Clinics of North America* 44 (2): 473. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.02.015>.
- Keller, C., R. Nanda, R. L. Shannon, A. Amit, and A. L. Kaplan. 2001. "Concurrent Primaries of Vaginal Clear Cell Adenocarcinoma and Endometrial Adenocarcinoma in a 39-Year Old Woman with in Utero Diethylstilbestrol Exposure." *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 11 (3): 247–50. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1438.2001.01007.x>.
- Khatami, Alireza, Zahra Salavatiha, and Mohammad Hossein Razizadeh. 2022. "Bladder Cancer and Human Papillomavirus Association: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Infectious Agents and Cancer* 17 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s13027-022-00415-5>.
- Khodabandehlou, Niloofar, Shayan Mostafaei, Ashkan Etemadi, Amir Ghasemi, Mehrdad Payandeh, Shima Hadifar, Amir Hossein Norooznezhad, Anoshirvan Kazemnejad, and Mohsen Moghoofei. 2019. "Human Papilloma Virus and Breast Cancer: The Role of Inflammation and Viral Expressed Proteins." *BMC Cancer* 19 (1): 61. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5286-0>.
- Kieback, Elisa, and Martin Müller. 2006. "Factors Influencing Subcellular Localization of the Human Papillomavirus L2 Minor Structural Protein." *Virology* 345 (1): 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.047>.
- Kines, Rhonda C., Cynthia D. Thompson, Douglas R. Lowy, John T. Schiller, and Patricia M. Day. 2009. "The Initial Steps Leading to Papillomavirus Infection Occur on the Basement Membrane Prior to Cell Surface Binding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (48): 20458–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908502106>.
- Knappe, Maren, Sabrina Bodevin, Hans-Christoph Selinka, Dorothe Spillmann, Rolf E. Streeck, Xiaojiang S. Chen, Ulf Lindahl, and Martin Sapp. 2007. "Surface-Exposed Amino Acid Residues of HPV16 L1 Protein Mediating Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (38): 27913–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705127200>.
- Kombe Kombe, Arnaud John, Bofeng Li, Ayesha Zahid, Hylemariam Mihiretie Mengist, Guy-Armel Bounda, Ying Zhou, and Tengchuan Jin. 2021. "Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine

- Evaluation." *Frontiers in Public Health* 8 (January): 552028. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.552028>.
- Krawczyk, Ewa, Frank A. Suprynowicz, Xuefeng Liu, Yuhai Dai, Dan P. Hartmann, John Hanover, and Richard Schlegel. 2008. "Koilocytosis." *The American Journal of Pathology* 173 (3): 682–88. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080280>.
- Kumar, Rajeev, Sankar Kumar Ghosh, Akalesh Kumar Verma, Anuradha Talukdar, Monoj Kumar Deka, Mira Wagh, H.M. Iqbal Bahar, Ritesh Tapkire, Kali Pankaj Chakraborty, and R. Ravi Kannan. 2015. "P16 Expression as a Surrogate Marker for HPV Infection in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Can Predict Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16 (16): 7161–65. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.16.7161>.
- Kunzmann, Andrew T., Suzanne Graham, Charlene M. McShane, James Doyle, Massimo Tommasino, Brian Johnston, Jackie Jamison, Jacqueline A. James, Damian McManus, and Lesley A. Anderson. 2017. "The Prevalence of Viral Agents in Esophageal Adenocarcinoma and Barrett's Esophagus: A Systematic Review." *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 29 (7): 817–25. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000868>.
- Lace, Michael J., Christina Isacson, James R. Anson, Attila T. Lörincz, Sharon P. Wilczynski, Thomas H. Haugen, and Lubomír P. Turek. 2009. "Upstream Regulatory Region Alterations Found in Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Isolates from Cervical Carcinomas Increase Transcription, Ori Function, and HPV Immortalization Capacity in Culture." *Journal of Virology* 83 (15): 7457–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.00285-09>.
- Lagergren, Jesper, Elizabeth Smyth, David Cunningham, and Pernilla Lagergren. 2017. "Oesophageal Cancer." *The Lancet* 390 (10110): 2383–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31462-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31462-9).
- Lai, Yu-Hsuan, Chien-Chou Su, Shang-Yin Wu, Wei-Ting Hsueh, Yuan-Hua Wu, Helen H. W. Chen, Jenn-Ren Hsiao, Ching-Hsun Liu, and Yi-Shan Tsai. 2022. "Impact of Alcohol and Smoking on Outcomes of HPV-Related Oropharyngeal Cancer." *Journal of Clinical Medicine* 11 (21): 6510. <https://doi.org/10.3390/jcm11216510>.
- Lam, Alfred K. 2018a. "Application of Pathological Staging in Esophageal Adenocarcinoma." In *Esophageal Adenocarcinoma: Methods and Protocols*, edited by Alfred K. Lam, 93–103. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7734-5_9.
- Lam, Alfred K. 2018b. "Histopathological Assessment for Esophageal Adenocarcinoma." In *Esophageal Adenocarcinoma: Methods and Protocols*, edited by Alfred K. Lam, 67–76. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7734-5_6.
- Lam, Alfred K. 2020. "Histopathological Assessment for Esophageal Squamous Cell Carcinoma." In *Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Methods and Protocols*, edited by Alfred K. Lam, 7–18. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0377-2_2.
- Lam, Alfred King-yin. 2021. "Updates on World Health Organization Classification and Staging of Esophageal Tumors: Implications for Future Clinical Practice." *Human Pathology* 108 (February): 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.10.015>.

- Lambert, Paul F., Karl Munger, Frank Rosl, Daniel Hasche, and Massimo Tommasino. 2020. "Beta Human Papillomaviruses and Skin Cancer." *Nature* 588 (7838): E20–21. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3023-0>.
- Łaniewski, Paweł, Dominique Barnes, Alison Goulder, Haiyan Cui, Denise J. Roe, Dana M. Chase, and Melissa M. Herbst-Kralovetz. 2018. "Linking Cervicovaginal Immune Signatures, HPV and Microbiota Composition in Cervical Carcinogenesis in Non-Hispanic and Hispanic Women." *Scientific Reports* 8 (May): 7593. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25879-7>.
- Lau, Laura, Elizabeth E. Gray, Rebecca L. Brunette, and Daniel B. Stetson. 2015. "DNA Tumor Virus Oncogenes Antagonize the cGAS-STING DNA-Sensing Pathway." *Science* 350 (6260): 568–71. <https://doi.org/10.1126/science.aab3291>.
- Lebeau, Alizée, Diane Bruyère, Patrick RONCARATI, Paul Peixoto, Eric Hervouet, Gaël COBRAIVILLE, Bernard Taminiau, et al. 2022. "HPV infection alters vaginal microbiome through down-regulating host mucosal innate peptides used by Lactobacilli as amino acid sources." *Nature Communications* 13 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28724-8>.
- Lewis, James S. 2017. "Morphologic Diversity in Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: Catch Me If You Can!" *Modern Pathology* 30 (1): S44–53. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.152>.
- Lewis, James S, Rebecca D Chernock, Xiao-Jun Ma, John J Flanagan, Yuling Luo, Ge Gao, Xiaowei Wang, and Samir K El-Mofty. 2012. "Partial P16 Staining in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: Extent and Pattern Correlate with Human Papillomavirus RNA Status." *Modern Pathology* 25 (9): 1212–20. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.79>.
- Lewis Jr, James S., Odey C. Ukpo, Xiao-Jun Ma, John J. Flanagan, Yuling Luo, Wade L. Thorstad, and Rebecca D. Chernock. 2012. "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* 60 (6): 982–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04169.x>.
- Li, Le, Xuewei Dong, Yiming Tang, Zenghui Lao, Xuhua Li, Jiangtao Lei, and Guanghong Wei. 2022. "Deciphering the Mechanisms of HPV E6 Mutations in the Destabilization of E6/E6AP/P53 Complex." *Biophysical Journal* 121 (9): 1704–14. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.03.030>.
- Li, Ni, Xiaofeng Bi, Yawei Zhang, Ping Zhao, Tongzhang Zheng, and Min Dai. 2011. "Human Papillomavirus Infection and Sporadic Breast Carcinoma Risk: A Meta-Analysis." *Breast Cancer Research and Treatment* 126 (2): 515–20. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1128-0>.
- Li, Pei, Wei-Min Mao, Zhi-Guo Zheng, Zi-Ming Dong, and Zhi-Qiang Ling. 2013. "Down-Regulation of PTEN Expression Modulated by Dysregulated miR-21 Contributes to the Progression of Esophageal Cancer." *Digestive Diseases and Sciences* 58 (12): 3483–93. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2854-z>.
- Li, X. C., M. Y. Wang, M. Yang, H. J. Dai, B. F. Zhang, W. Wang, X. L. Chu, et al. 2018. "A Mutational Signature Associated with Alcohol Consumption and Prognostically Significantly Mutated Driver Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (4): 938–44. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy011>.

- Li, X., C. Gao, Y. Yang, F. Zhou, M. Li, Q. Jin, and L. Gao. 2014. "Systematic Review with Meta-Analysis: The Association between Human Papillomavirus Infection and Oesophageal Cancer." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 39 (3): 270–81. <https://doi.org/10.1111/apt.12574>.
- Lin, Y., Q. Mao, X. Zheng, K. Yang, H. Chen, C. Zhou, and L. Xie. 2011. "Human Papillomavirus 16 or 18 Infection and Prostate Cancer Risk: A Meta-Analysis." *Irish Journal of Medical Science* 180 (2): 497–503. <https://doi.org/10.1007/s11845-011-0692-6>.
- Liu, Chun-Quan, Yun-Lei Ma, Qi Qin, Pei-Hao Wang, Yi Luo, Peng-Fei Xu, and Yong Cui. 2023. "Epidemiology of Esophageal Cancer in 2020 and Projections to 2030 and 2040." *Thoracic Cancer* 14 (1): 3–11. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14745>.
- Liu, Jia, Lei Liu, Yang Su, Yi Wang, Yuchun Zhu, Xiaobin Sun, Yuanbiao Guo, and Jing Shan. 2022. "IL-33 Participates in the Development of Esophageal Adenocarcinoma." *Pathology Oncology Research: POR* 28: 1610474. <https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610474>.
- Liu, Yuqi, Jonathan J. Cherry, Joseph V. Dineen, Elliot J. Androphy, and James D. Baleja. 2009. "Determinants of Stability for the E6 Protein of Papillomavirus Type 16." *Journal of Molecular Biology* 386 (4): 1123–37. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.018>.
- Lordick, F., F. Carneiro, S. Cascinu, T. Fleitas, K. Haustermans, G. Piessen, A. Vogel, and E. C. Smyth. 2022. "Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up☆." *Annals of Oncology* 33 (10): 1005–20. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.004>.
- Lörinc, Ester, and Stefan Öberg. 2012. "Submucosal Glands in the Columnar-Lined Oesophagus: Evidence of an Association with Metaplasia and Neosquamous Epithelium." *Histopathology* 61 (1): 53–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04180.x>.
- Luo, Xiaobo, Christopher R. Donnelly, Wang Gong, Blake R. Heath, Yuning Hao, Lorenza A. Donnelly, Toktam Moghbeli, et al. 2020. "HPV16 Drives Cancer Immune Escape via NLRX1-Mediated Degradation of STING." *The Journal of Clinical Investigation* 130 (4): 1635–52. <https://doi.org/10.1172/JCI129497>.
- Lydiatt, William M., Snehal G. Patel, Brian O’Sullivan, Margaret S. Brandwein, John A. Ridge, Jocelyn C. Migliacci, Ashley M. Loomis, and Jatin P. Shah. 2017. "Head and Neck Cancers—Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (2): 122–37. <https://doi.org/10.3322/caac.21389>.
- Ma, Tianzhong, Zhongjing Su, Ling Chen, Shuyan Liu, Ningxia Zhu, Lifeng Wen, Yan Yuan, et al. 2012. "Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Genes Integrate into Human Hepatoma Derived Cell Line Hep G2." *PloS One* 7 (5): e37964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037964>.
- Ma, X.-Q., Y. Cao, R. Wang, X. Yan, Y. Zhao, D. Zou, M.-A. Wallander, et al. 2009. "Prevalence of, and Factors Associated with, Gastroesophageal Reflux Disease: A Population-Based Study in Shanghai, China." *Diseases of the Esophagus: Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* 22 (4): 317–22. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2008.00904.x>.
- Machiels, J.-P., C. René Leemans, W. Golusinski, C. Grau, L. Licitra, and V. Gregoire. 2020. "Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity, Larynx, Oropharynx and Hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-

- Up†.” *Annals of Oncology* 31 (11): 1462–75. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>.
- Madathil, Sreenath, Marie-Claude Rousseau, Lawrence Joseph, François Coutlée, Nicolas F. Schlecht, Eduardo Franco, and Belinda Nicolau. 2020. “Latency of Tobacco Smoking for Head and Neck Cancer among HPV-Positive and HPV-Negative Individuals.” *International Journal of Cancer* 147 (1): 56–64. <https://doi.org/10.1002/ijc.32708>.
- Markowitz, Lauri E., Allison L. Naleway, Rayleen M. Lewis, Bradley Crane, Troy D. Querec, Sheila Weinmann, Martin Steinau, and Elizabeth R. Unger. 2019. “Declines in HPV Vaccine Type Prevalence in Women Screened for Cervical Cancer in the United States: Evidence of Direct and Herd Effects of Vaccination.” *Vaccine* 37 (29): 3918–24. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.099>.
- Martel, Catherine de, Damien Georges, Freddie Bray, Jacques Ferlay, and Gary M Clifford. 2020. “Global Burden of Cancer Attributable to Infections in 2018: A Worldwide Incidence Analysis.” *The Lancet Global Health* 8 (2): e180–90. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7).
- Marth, C., F. Landoni, S. Mahner, M. McCormack, A. Gonzalez-Martin, and N. Colombo. 2017. “Cervical Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up†.” *Annals of Oncology* 28 (July): iv72–83. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx220>.
- Martinez-Zapien, Denise, Francesc Xavier Ruiz, Juline Poirson, André Mitschler, Juan Ramirez, Anne Forster, Alexandra Cousido-Siah, et al. 2016. “Structure of the E6/E6AP/P53 Complex Required for HPV-Mediated Degradation of P53.” *Nature* 529 (7587): 541–45. <https://doi.org/10.1038/nature16481>.
- Maruyama, Hiromi, Toshimichi Yasui, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Eiichi Morii, Yoshifumi Yamamoto, Tadashi Yoshii, Yukinori Takenaka, et al. 2014. “Human Papillomavirus and P53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma among Japanese Population.” *Cancer Science* 105 (4): 409–17. <https://doi.org/10.1111/cas.12369>.
- Mashiana, S. S., P. Navale, B. Khandakar, S. Sobotka, M. R. Posner, B. A. Miles, W. Zhang, et al. 2021. “Human Papillomavirus Genotype Distribution in Head and Neck Cancer: Informing Developing Strategies for Cancer Prevention, Diagnosis, Treatment and Surveillance.” *Oral Oncology* 113 (February): 105109. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.105109>.
- Maslenkina, Ksenia, Liudmila Mikhaleva, Maxim Naumenko, Rositsa Vandysheva, Michail Gushchin, Dmitri Atiakshin, Igor Buchwalow, and Markus Tiemann. 2023. “Signaling Pathways in the Pathogenesis of Barrett’s Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma.” *International Journal of Molecular Sciences* 24 (11): 9304. <https://doi.org/10.3390/ijms24119304>.
- Maslyonkina, Ksenia S., Alexandra K. Konyukova, Darya Y. Alexeeva, Mikhail Y. Sinelnikov, and Liudmila M. Mikhaleva. 2022. “Barrett’s Esophagus: The Pathomorphological and Molecular Genetic Keystones of Neoplastic Progression.” *Cancer Medicine* 11 (2): 447–78. <https://doi.org/10.1002/cam4.4447>.
- Matsubara, Akiko, Shigeki Sekine, Reiko Ogawa, Masayuki Yoshida, Takahiro Kasamatsu, Hitoshi Tsuda, and Yae Kanai. 2014. “Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia Is a Neoplastic Entity With Frequent Activating GNAS Mutations.” *American Journal of Surgical Pathology* 38 (3): 370–76. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000093>.

- Maufort, John P., Sybil M. Genter Williams, Henry C. Pitot, and Paul F. Lambert. 2007. "Human Papillomavirus 16 E5 Oncogene Contributes to Two Stages of Skin Carcinogenesis." *Cancer Research* 67 (13): 6106–12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0921>.
- Maufort, John P., Anny Shai, Henry C. Pitot, and Paul F. Lambert. 2010. "A Role for HPV16 E5 in Cervical Carcinogenesis." *Cancer Research* 70 (7): 2924–31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3436>.
- McBride, Alison A. 2017a. "Mechanisms and Strategies of Papillomavirus Replication." *Biological Chemistry* 398 (8): 919–27. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0113>.
- McBride, Alison A. 2017b. "Oncogenic Human Papillomaviruses." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1732): 20160273. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0273>.
- McBride, Alison A. 2022. "Human Papillomaviruses: Diversity, Infection and Host Interactions." *Nature Reviews Microbiology* 20 (2): 95–108. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00617-5>.
- McCluggage, W Glenn, Naveena Singh, and C Blake Gilks. 2022. "Key Changes to the World Health Organization (WHO) Classification of Female Genital Tumours Introduced in the 5th Edition (2020)." *Histopathology* 80 (5): 762–78. <https://doi.org/10.1111/his.14609>.
- McKinney, Caleb C., Min Jung Kim, Dan Chen, and Alison A. McBride. 2016. "Brd4 Activates Early Viral Transcription upon Human Papillomavirus 18 Infection of Primary Keratinocytes." Edited by Michael J. Imperiale. *mBio* 7 (6): e01644-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01644-16>.
- McLaughlin-Drubin, Margaret E., and Karl Münger. 2009. "The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein." *Virology* 384 (2): 335–44. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006>.
- Mehanna, Hisham, Natalie Franklin, Natalie Compton, Max Robinson, Ned Powell, Nigel Biswas-Baldwin, Vindh Paleri, et al. 2016. "Geographic Variation in Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Cancer: Data from 4 Multinational Randomized Trials." *Head & Neck* 38 (Suppl 1): E1863–69. <https://doi.org/10.1002/hed.24336>.
- Mehanna, Hisham, Max Robinson, Andrew Hartley, Anthony Kong, Bernadette Foran, Tessa Fulton-Lieuw, Matthew Dalby, et al. 2019. "Radiotherapy plus Cisplatin or Cetuximab in Low-Risk Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Cancer (De-ESCALaTE HPV): An Open-Label Randomised Controlled Phase 3 Trial." *The Lancet* 393 (10166): 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32752-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32752-1).
- Mehanna, Hisham, Miren Taberna, Christian von Buchwald, Sara Tous, Jill Brooks, Marisa Mena, Francisca Morey, et al. 2023. "Prognostic Implications of P16 and HPV Discordance in Oropharyngeal Cancer (HNCIG-EPIC-OPC): A Multicentre, Multinational, Individual Patient Data Analysis." *The Lancet Oncology* 24 (3): 239–51. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(23\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00013-X).
- Mehta, Kavi, and Laimonis Laimins. 2018. "Human Papillomaviruses Preferentially Recruit DNA Repair Factors to Viral Genomes for Rapid Repair and Amplification." *mBio* 9 (1): e00064-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00064-18>.
- Meites, Elissa, Peter G. Szilagyi, Harrell W. Chesson, Elizabeth R. Unger, José R. Romero, and Lauri E. Markowitz. 2019. "Human Papillomavirus Vaccination for Adults: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices." *Morbidity*

and *Mortality Weekly Report* 68 (32): 698–702.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6832a3>.

- Merlano, Marco Carlo, Nerina Denaro, Daniela Vivenza, Martino Monteverde, Elvio Russi, Walter Lerda, Alberto Comino, and Cristiana Lo Nigro. 2016. "P16 Cutoff in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Correlation between Tumor and Patient Characteristics and Outcome." *The International Journal of Biological Markers* 31 (1): 44–52. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000175>.
- Merlo, Sebastjan. 2020. "Modern Treatment of Vulvar Cancer." *Radiology and Oncology* 54 (4): 371–76. <https://doi.org/10.2478/raon-2020-0053>.
- Mesri, Enrique A., Mark A. Feitelson, and Karl Munger. 2014. "Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis." *Cell Host & Microbe* 15 (3): 266–82. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.011>.
- Michaelsen, Sanne Høxbroe, Christian Grønhoj Larsen, and Christian von Buchwald. 2014. "Human Papillomavirus Shows Highly Variable Prevalence in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and No Significant Correlation to p16INK4a Overexpression: A Systematic Review." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (6): 865–71. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000166>.
- Mikuličić, Snježana, and Luise Florin. 2019. "The Endocytic Trafficking Pathway of Oncogenic Papillomaviruses." *Papillomavirus Research (Amsterdam, Netherlands)* 7 (June): 135–37. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.03.004>.
- Milano, Francesca, Jantine W. P. M. van Baal, Navtej S. Buttar, Agnieszka M. Rygiel, Floor de Kort, Cathrine J. DeMars, Wilda D. Rosmolen, et al. 2007. "Bone Morphogenetic Protein 4 Expressed in Esophagitis Induces a Columnar Phenotype in Esophageal Squamous Cells." *Gastroenterology* 132 (7): 2412–21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.026>.
- Miura, Shiho, Kei Kawana, Danny J. Schust, Tomoyuki Fujii, Terufumi Yokoyama, Yuki Iwasawa, Takeshi Nagamatsu, et al. 2010. "CD1d, a Sentinel Molecule Bridging Innate and Adaptive Immunity, Is Downregulated by the Human Papillomavirus (HPV) E5 Protein: A Possible Mechanism for Immune Evasion by HPV." *Journal of Virology* 84 (22): 11614–23. <https://doi.org/10.1128/JVI.01053-10>.
- Moalic, V., B. Mercier, and C. Ferec. 2004. "Technologie Luminex™ : principe, applications, et perspectives." *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 19 (4): 181–87. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2004.05.004>.
- Moch, Holger, Mahul B. Amin, Daniel M. Berney, Eva M. Compérat, Anthony J. Gill, Arndt Hartmann, Santosh Menon, et al. 2022. "The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours." *European Urology* 82 (5): 458–68. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.06.016>.
- Moody, Cary A., and Laimonis A. Laimins. 2009. "Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation." Edited by Denise Galloway. *PLoS Pathogens* 5 (10): e1000605. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000605>.
- Moody, Sarah, Sergey Senkin, S. M. Ashiqul Islam, Jingwei Wang, Dariush Nasrollahzadeh, Ricardo Cortez Cardoso Penha, Stephen Fitzgerald, et al. 2021. "Mutational Signatures

- in Esophageal Squamous Cell Carcinoma from Eight Countries with Varying Incidence.” *Nature Genetics* 53 (11): 1553–63. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00928-6>.
- Morante, Anthony V., Daniel Davidnan Baboolal, Xavier Simon, Elizabeth/Mark Cheng-Ying Pan, and Patricio I. Meneses. 2022. “Human Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 Mediates Intracellular Trafficking into and Passage beyond the Endoplasmic Reticulum.” *Microbiology Spectrum* 10 (3): e01505-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01505-22>.
- Morgan, Eileen, Isabelle Soerjomataram, Harriet Rumgay, Helen G. Coleman, Aaron P. Thrift, Jérôme Vignat, Mathieu Laversanne, Jacques Ferlay, and Melina Arnold. 2022. “The Global Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Esophageal Adenocarcinoma Incidence and Mortality in 2020 and Projections to 2040: New Estimates From GLOBOCAN 2020.” *Gastroenterology* 163 (3): 649-658.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.05.054>.
- Morgan, Ethan L., and Andrew Macdonald. 2019. “Autocrine STAT3 Activation in HPV Positive Cervical Cancer through a Virus-Driven Rac1—NFκB—IL-6 Signalling Axis.” *PLoS Pathogens* 15 (6): e1007835. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007835>.
- Morgan, Ethan L., James A. Scarth, Molly R. Patterson, Christopher W. Wasson, Georgia C. Hemingway, Diego Barba-Moreno, and Andrew Macdonald. 2021. “E6-Mediated Activation of JNK Drives EGFR Signalling to Promote Proliferation and Viral Oncoprotein Expression in Cervical Cancer.” *Cell Death & Differentiation* 28 (5): 1669–87. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00693-9>.
- Morgan, Ethan L., Christopher W. Wasson, Lucy Hanson, David Kealy, Ieisha Pentland, Victoria McGuire, Cinzia Scarpini, et al. 2018. “STAT3 Activation by E6 Is Essential for the Differentiation-Dependent HPV18 Life Cycle.” Edited by Denise A. Galloway. *PLOS Pathogens* 14 (4): e1006975. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006975>.
- Muñoz Bello, Jesus Omar, Leslie Olmedo Nieva, Adriana Contreras Paredes, Alma Mariana Fuentes Gonzalez, Leticia Rocha Zavaleta, and Marcela Lizano. 2015. “Regulation of the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins.” *Viruses* 7 (8): 4734–55. <https://doi.org/10.3390/v7082842>.
- Murnyák, Balázs, and Tibor Hortobágyi. 2016. “Immunohistochemical Correlates of TP53 Somatic Mutations in Cancer.” *Oncotarget* 7 (40): 64910–20. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11912>.
- Naini, Bita V., Rhonda F. Souza, and Robert D. Odze. 2016. “Barrett’s Esophagus: A Comprehensive and Contemporary Review for Pathologists.” *The American Journal of Surgical Pathology* 40 (5): e45–66. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000598>.
- Nakanishi, Yukihiro. 2006. “Histopathological Features of the Esophagogastric Junction.” *Esophagus* 3 (4): 139–43. <https://doi.org/10.1007/s10388-006-0089-1>.
- Nees, Matthias, Joel M Geoghegan, Tehila Hyman, Stephan Frank, Lance Miller, and Craig D Woodworth. 2001. “Papillomavirus Type 16 Oncogenes Downregulate Expression of Interferon-Responsive Genes and Upregulate Proliferation- Associated and NF-κB-Responsive Genes in Cervical Keratinocytes.” *J. VIROL.* 75.
- Nguyen, Christine L., and Karl Münger. 2008. “Direct Association of the HPV16 E7 Oncoprotein with Cyclin A/CDK2 and Cyclin E/CDK2 Complexes.” *Virology* 380 (1): 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.017>.
- Nguyen, Harrison P., Marigdalia K. Ramírez-Fort, and Peter L. Rady. 2014. “The Biology of Human Papillomaviruses.” In *Current Problems in Dermatology*, edited by M.K.

- Ramírez-Fort, F. Khan, P.L. Rady, and S.K. Tying, 45:19–32. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000355959>.
- Nilsson, Kersti, Chengjun Wu, and Stefan Schwartz. 2018. “Role of the DNA Damage Response in Human Papillomavirus RNA Splicing and Polyadenylation.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6): 1735. <https://doi.org/10.3390/ijms19061735>.
- Nishimura, Akiko, Takeshi Ono, Akinori Ishimoto, Jennifer J. Dowhanick, Margaret A. Frizzell, Peter M. Howley, and Hiroyuki Sakai. 2000. “Mechanisms of Human Papillomavirus E2-Mediated Repression of Viral Oncogene Expression and Cervical Cancer Cell Growth Inhibition.” *Journal of Virology* 74 (8): 3752–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3752-3760.2000>.
- Nones, Katia, Nicola Waddell, Nicci Wayte, Ann-Marie Patch, Peter Bailey, Felicity Newell, Oliver Holmes, et al. 2014. “Genomic Catastrophes Frequently Arise in Esophageal Adenocarcinoma and Drive Tumorigenesis.” *Nature Communications* 5 (1): 5224. <https://doi.org/10.1038/ncomms6224>.
- Obermannová, R., M. Alsina, A. Cervantes, T. Leong, F. Lordick, M. Nilsson, N. C. T. van Grieken, A. Vogel, and E. C. Smyth. 2022. “Oesophageal Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up☆.” *Annals of Oncology* 33 (10): 992–1004. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.003>.
- Oezcelik, Arzu, and Steven R. DeMeester. 2011. “General Anatomy of the Esophagus.” *Thoracic Surgery Clinics* 21 (2): 289–97. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2011.01.003>.
- Oh, J.-M., S.-H. Kim, E.-A. Cho, Y.-S. Song, W.-H. Kim, and Y.-S. Juhnn. 2010. “Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis by Stimulating Ubiquitin-Proteasome-Mediated Degradation of Bax in Human Cervical Cancer Cells.” *Carcinogenesis* 31 (3): 402–10. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp318>.
- Ohadian Moghadam, Solmaz, Kamyar Mansori, Mohammad Reza Nowroozi, Davoud Afshar, Behzad Abbasi, and Ali Nowroozi. 2020. “Association of Human Papilloma Virus (HPV) Infection with Oncological Outcomes in Urothelial Bladder Cancer.” *Infectious Agents and Cancer* 15 (1): 52. <https://doi.org/10.1186/s13027-020-00318-3>.
- Olawaiye, Alexander B., Mauricio A. Cuello, and Linda J. Rogers. 2021. “Cancer of the Vulva: 2021 Update.” *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 155 (S1): 7–18. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13881>.
- Olesen, Tina Bech, Malene Frøsig Svahn, Mette Tuxen Faber, Anne Katrine Duun-Henriksen, Jette Junge, Bodil Norrild, and Susanne K. Kjaer. 2014. “Prevalence of Human Papillomavirus in Endometrial Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Gynecologic Oncology* 134 (1): 206–15. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.02.040>.
- Olthof, Nadine C., Ernst-Jan M. Speel, Jutta Kolligs, Annick Haesevoets, Mieke Henfling, Frans C. S. Ramaekers, Simon F. Preuss, et al. 2014. “Comprehensive Analysis of HPV16 Integration in OSCC Reveals No Significant Impact of Physical Status on Viral Oncogene and Virally Disrupted Human Gene Expression.” Edited by Suminori Akiba. *PLoS ONE* 9 (2): e88718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088718>.
- O’Riordan, J. M., M. M. Abdel-latif, N. Ravi, D. McNamara, P. J. Byrne, G. S. A. McDonald, P. W. N. Keeling, D. Kelleher, and J. V. Reynolds. 2005. “Proinflammatory Cytokine and Nuclear Factor Kappa-B Expression along the Inflammation–Metaplasia–Dysplasia–Adenocarcinoma Sequence in the Esophagus.” *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 100 (6): 1257.

- Paavonen, Jorma, David Jenkins, F. Xavier Bosch, Paulo Naud, Jorge Salmerón, Cosette M. Wheeler, Song-Nan Chow, et al. 2007. "Efficacy of a Prophylactic Adjuvanted Bivalent L1 Virus-like-Particle Vaccine against Infection with Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Young Women: An Interim Analysis of a Phase III Double-Blind, Randomised Controlled Trial." *The Lancet* 369 (9580): 2161–70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60946-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60946-5).
- Pangarkar, Meena A. 2022. "The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology." *CytoJournal* 19 (April): 28. https://doi.org/10.25259/CMAS_03_07_2021.
- Petrelli, Fausto, Gabriella De Santi, Valentina Rampulla, Antonio Ghidini, Paola Mercurio, Marco Mariani, Michele Manara, et al. 2021. "Human Papillomavirus (HPV) Types 16 and 18 Infection and Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 147 (10): 3011–23. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03738-9>.
- Pfeifer, Gerd P., Mikhail F. Denissenko, Magali Olivier, Natalia Tretyakova, Stephen S. Hecht, and Pierre Hainaut. 2002. "Tobacco Smoke Carcinogens, DNA Damage and P53 Mutations in Smoking-Associated Cancers." *Oncogene* 21 (48): 7435–51. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205803>.
- Pirog, Edyta C. 2017. "Cervical Adenocarcinoma: Diagnosis of Human Papillomavirus–Positive and Human Papillomavirus–Negative Tumors." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 141 (12): 1653–67. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0356-RA>.
- Poehlmann, A., D. Kuester, P. Malfertheiner, T. Guenther, and A. Roessner. 2012. "Inflammation and Barrett's Carcinogenesis." *Pathology - Research and Practice* 208 (5): 269–80. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2012.03.007>.
- Poirson, Juline, Irina Paula Suarez, Marie-Laure Straub, Alexandra Cousido-Siah, Paul Peixoto, Eric Hervouet, Anne Foster, et al. 2022. "High-Risk Mucosal Human Papillomavirus 16 (HPV16) E6 Protein and Cutaneous HPV5 and HPV8 E6 Proteins Employ Distinct Strategies To Interfere with Interferon Regulatory Factor 3-Mediated Beta Interferon Expression." Edited by Lawrence Banks. *Journal of Virology* 96 (10): e01875-21. <https://doi.org/10.1128/jvi.01875-21>.
- Pokryvková, Barbora, Marek Grega, Jan Klozar, Ondřej Vencálek, Jaroslav Nunvář, and Ruth Tachezy. 2022. "PD1+CD8+ Cells Are an Independent Prognostic Marker in Patients with Head and Neck Cancer." *Biomedicines* 10 (11): 2794. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112794>.
- Prendiville, Walter, and Rengaswamy Sankaranarayanan. 2017. *Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer*. IARC Technical Publications. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568370/>.
- Qu, Xudong, Qiwen Ben, and Ying Jiang. 2013. "Consumption of Red and Processed Meat and Risk for Esophageal Squamous Cell Carcinoma Based on a Meta-Analysis." *Annals of Epidemiology* 23 (12): 762-770.e1. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2013.09.003>.
- Quante, Michael, Govind Bhagat, Julian A. Abrams, Frederic Marache, Pamela Good, Michele D. Lee, Yoomi Lee, et al. 2012. "Bile Acid and Inflammation Activate Gastric Cardia Stem Cells in a Mouse Model of Barrett-like Metaplasia." *Cancer Cell* 21 (1): 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.004>.
- Que, Jianwen, Katherine S. Garman, Rhonda F. Souza, and Stuart Jon Spechler. 2019. "Pathogenesis and Cells of Origin of Barrett's Esophagus." *Gastroenterology* 157 (2): 349-364.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.03.072>.

- Rajendra, Shanmugarajah, Darren Pavey, Owen McKay, Neil Merrett, and Shweta Dutta Gautam. 2020. "Human Papillomavirus Infection in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Esophageal Adenocarcinoma: A Concise Review." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1482 (1): 36–48. <https://doi.org/10.1111/nyas.14509>.
- Rajendra, Shanmugarajah, Bin Wang, Elizabeth T Snow, Prateek Sharma, Darren Pavey, Neil Merrett, Madeleine J Ball, Terry Brain, Ruchira Fernando, and Iain K Robertson. 2013. "Transcriptionally Active Human Papillomavirus Is Strongly Associated With Barrett's Dysplasia and Esophageal Adenocarcinoma." *American Journal of Gastroenterology* 108 (7): 1082–93. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.94>.
- Rajendra, Shanmugarajah, Wei Xuan, Neil Merrett, Preeti Sharma, Prateek Sharma, Darren Pavey, Tao Yang, et al. 2018. "Survival Rates for Patients With Barrett High-Grade Dysplasia and Esophageal Adenocarcinoma With or Without Human Papillomavirus Infection." *JAMA Network Open* 1 (4): e181054. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.1054>.
- Rajendra, Shanmugarajah, Tao Yang, Wei Xuan, Prateek Sharma, Darren Pavey, Cheong Soon Lee, Son Le, Josephine Collins, and Bin Wang. 2017. "Active Human Papillomavirus Involvement in Barrett's Dysplasia and Oesophageal Adenocarcinoma Is Characterized by Wild-Type P53 and Aberrations of the Retinoblastoma Protein Pathway: HPV Biomarkers in BD and OAC." *International Journal of Cancer* 141 (10): 2037–49. <https://doi.org/10.1002/ijc.30896>.
- Rao, S., M. G. Guren, K. Khan, G. Brown, A. G. Renehan, S. E. Steigen, E. Deutsch, E. Martinelli, and D. Arnold. 2021. "Anal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up☆." *Annals of Oncology* 32 (9): 1087–1100. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.015>.
- Rasmussen, Christina L., Hanna K. Bertoli, Freja L. Sand, Alexander K. Kjaer, Louise T. Thomsen, and Susanne K. Kjaer. 2021. "The Prognostic Significance of HPV, P16, and P53 Protein Expression in Vaginal Cancer: A Systematic Review." *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 100 (12): 2144–56. <https://doi.org/10.1111/aogs.14260>.
- Rasmussen, Christina Louise, Freja Laerke Sand, Marie Hoffmann Frederiksen, Klaus Kaae Andersen, and Susanne K. Kjaer. 2018. "Does HPV Status Influence Survival after Vulvar Cancer?" *International Journal of Cancer* 142 (6): 1158–65. <https://doi.org/10.1002/ijc.31139>.
- Rho, Jaerang, Soyoung Lee, Ethel-Michele De Villiers, and Joonho Choe. 1997. "Identification of Cis-Regulatory Elements in the Upstream Regulatory Region of Human Papillomavirus Type 59." *Virus Research* 47 (2): 155–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(96\)01410-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(96)01410-4).
- Rice, Thomas W., Deepa T. Patil, and Eugene H. Blackstone. 2017. "8th Edition AJCC/UICC Staging of Cancers of the Esophagus and Esophagogastric Junction: Application to Clinical Practice." *Annals of Cardiothoracic Surgery* 6 (2): 119–30. <https://doi.org/10.21037/acs.2017.03.14>.
- Richards, Kathryn H., Christopher W. Wasson, Oliver Watherston, Rosella Doble, G. Eric Blair, Miriam Wittmann, and Andrew Macdonald. 2015. "The Human Papillomavirus (HPV) E7 Protein Antagonises an Imiquimod-Induced Inflammatory Pathway in Primary Human Keratinocytes." *Scientific Reports* 5 (1): 12922. <https://doi.org/10.1038/srep12922>.

- Richards, Rebecca M., Douglas R. Lowy, John T. Schiller, and Patricia M. Day. 2006. "Cleavage of the Papillomavirus Minor Capsid Protein, L2, at a Furin Consensus Site Is Necessary for Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5): 1522–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508815103>.
- Ronchetti, Domenica, Cesare B. Neglia, Bruno M. Cesana, Nadia Carboni, Antonino Neri, Giancarlo Pruneri, and Lorenzo Pignataro. 2004. "Association Between P53 Gene Mutations and Tobacco and Alcohol Exposure in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma." *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 130 (3): 303–6. <https://doi.org/10.1001/archotol.130.3.303>.
- Roveda, John David, and Clayton A. Smith. 2019. "Epidemiology and Pathogenesis of Anal Cancer." In *Anal Cancer: A Comprehensive Guide*, edited by Jeffrey Meyer and Lisa Kachnic, 11–32. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20253-8_2.
- Sakakibara, Nozomi, Dan Chen, and Alison A. McBride. 2013. "Papillomaviruses Use Recombination-Dependent Replication to Vegetatively Amplify Their Genomes in Differentiated Cells." *PLoS Pathogens* 9 (7): e1003321. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003321>.
- Sakakibara, Nozomi, Ruchira Mitra, and Alison A. McBride. 2011. "The Papillomavirus E1 Helicase Activates a Cellular DNA Damage Response in Viral Replication Foci." *Journal of Virology* 85 (17): 8981–95. <https://doi.org/10.1128/JVI.00541-11>.
- Salazar, Christian R., Nicole Anayannis, Richard V. Smith, Yanhua Wang, Missak Haigentz, Madhur Garg, Bradley A. Schiff, et al. 2014. "Combined P16 and Human Papillomavirus Testing Predicts Head and Neck Cancer Survival." *International Journal of Cancer* 135 (10): 2404–12. <https://doi.org/10.1002/ijc.28876>.
- Sarosi, G., G. Brown, K. Jaiswal, L. A. Feagins, E. Lee, T. W. Crook, R. F. Souza, Y. S. Zou, J. W. Shay, and Stuart Jon Spechler. 2008. "Bone Marrow Progenitor Cells Contribute to Esophageal Regeneration and Metaplasia in a Rat Model of Barrett's Esophagus." *Diseases of the Esophagus: Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* 21 (1): 43–50. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2050.2007.00744.x>.
- Sastre-Garau, Xavier, and Alexandre Harlé. 2020. "Pathology of HPV-Associated Head and Neck Carcinomas: Recent Data and Perspectives for the Development of Specific Tumor Markers." *Frontiers in Oncology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.528957>.
- Sauer, Madeline A., Jing Yang, Raymond A. Isidro, Fei Dong, Deepa T. Patil, Jon O. Wee, Agoston T. Agoston, Vikram Deshpande, and Lei Zhao. 2022. "Esophageal Squamous Cell Carcinoma with Basaloid Features Are Genetically and Prognostically Similar to Conventional Squamous Cell Carcinoma." *Modern Pathology* 35 (9): 1247–53. <https://doi.org/10.1038/s41379-022-01060-4>.
- Scarth, James A., Molly R. Patterson, Ethan L. Morgan, and Andrew Macdonald. 2021. "The Human Papillomavirus Oncoproteins: A Review of the Host Pathways Targeted on the Road to Transformation." *The Journal of General Virology* 102 (3): 001540. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001540>.
- Schiffman, Mark, John Doorbar, Nicolas Wentzensen, Silvia De Sanjosé, Carole Fakhry, Bradley J. Monk, Margaret A. Stanley, and Silvia Franceschi. 2016. "Carcinogenic Human Papillomavirus Infection." *Nature Reviews Disease Primers* 2 (1): 16086. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>.

- Schlottmann, Francisco, Nicolás H. Dreifuss, and Marco G. Patti. 2020. "Obesity and Esophageal Cancer: GERD, Barrett's Esophagus, and Molecular Carcinogenic Pathways." *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 14 (6): 425–33. <https://doi.org/10.1080/17474124.2020.1764348>.
- Schmidt, Mona W., Marco J. Battista, Marcus Schmidt, Monique Garcia, Timo Siepmann, Annette Hasenburg, and Katharina Anic. 2022. "Efficacy and Safety of Immunotherapy for Cervical Cancer—A Systematic Review of Clinical Trials." *Cancers* 14 (2): 441. <https://doi.org/10.3390/cancers14020441>.
- Schuck, Stephen, and Arne Stenlund. 2015. "A Conserved Regulatory Module at the C Terminus of the Papillomavirus E1 Helicase Domain Controls E1 Helicase Assembly." Edited by M. J. Imperiale. *Journal of Virology* 89 (2): 1129–42. <https://doi.org/10.1128/JVI.01903-14>.
- Schwartz, Stefan. 2013. "Papillomavirus Transcripts and Posttranscriptional Regulation." *Virology*, Special Issue: The Papillomavirus Episteme, 445 (1): 187–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.034>.
- Scinicariello, F., T. Sato, C. S. Lee, H. C. Hsu, T. S. Chan, and S. K. Tyring. 1992. "Detection of Human Papillomavirus in Primary Hepatocellular Carcinoma." *Anticancer Research* 12 (3): 763–66.
- Scott, Matthew L., David T. Coleman, Kinsey C. Kelly, Jennifer L. Carroll, Brittany Woodby, William K. Songock, James A. Cardelli, and Jason M. Bodily. 2018. "Human Papillomavirus Type 16 E5-Mediated Upregulation of Met in Human Keratinocytes." *Virology* 519 (June): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.021>.
- Scott, Matthew L., Brittany L. Woodby, Joseph Ulicny, Gaurav Raikhy, A. Wayne Orr, William K. Songock, and Jason M. Bodily. 2020. "Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance." Edited by Lawrence Banks. *Journal of Virology* 94 (2): e01582-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01582-19>.
- Sen, Prakriti, Pooja Ganguly, and Niladri Ganguly. 2018. "Modulation of DNA Methylation by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins in Cervical Cancer." *Oncology Letters* 15 (1): 11–22. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7292>.
- Serup-Hansen, Eva, Dorte Linnemann, Wojciech Skovrider-Ruminski, Estrid Høgdall, Poul Flemming Geertsen, and Hanne Havsteen. 2014. "Human Papillomavirus Genotyping and P16 Expression As Prognostic Factors for Patients With American Joint Committee on Cancer Stages I to III Carcinoma of the Anal Canal." *Journal of Clinical Oncology* 32 (17): 1812–17. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.3464>.
- Shaheen, Nicholas J., Gary W. Falk, Prasad G. Iyer, Lauren B. Gerson, and American College of Gastroenterology. 2016. "ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Barrett's Esophagus." *The American Journal of Gastroenterology* 111 (1): 30–50; quiz 51. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.322>.
- Sherer, Michael Vincent, Nikhil V. Kotha, Casey Williamson, and Jyoti Mayadev. 2022. "Advances in Immunotherapy for Cervical Cancer: Recent Developments and Future Directions." *International Journal of Gynecologic Cancer* 32 (3). <https://doi.org/10.1136/ijgc-2021-002492>.
- Shibata, Takashi, Yoshihiro Ikura, Yasuhiro Iwai, Hisato Tokuda, Yuka Cho, Noriyuki Morimoto, Satoshi Nakago, and Tetsuya Oishi. 2013. "Adenocarcinoma Arising from Vaginal Stump: Unusual Vaginal Carcinogenesis 7 Years After Hysterectomy Due to Cervical

- Intraepithelial Neoplasia." *International Journal of Gynecological Pathology* 32 (6): 606. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e31828deeb2>.
- Shigehara, Kazuyoshi, Toshiyuki Sasagawa, and Mikio Namiki. 2014. "Human Papillomavirus Infection and Pathogenesis in Urothelial Cells: A Mini-Review." *Journal of Infection and Chemotherapy* 20 (12): 741–47. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.033>.
- Shinohara, Shogo, Masahiro Kikuchi, Risa Tona, Yuji Kanazawa, Ippei Kishimoto, Hiroyuki Harada, Yukihiko Imai, and Yu Usami. 2014. "Prognostic Impact of P16 and P53 Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas." *Japanese Journal of Clinical Oncology* 44 (3): 232–40. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyt223>.
- Short, Matthew W., Kristina G. Burgers, and Vincent T. Fry. 2017. "Esophageal Cancer." *American Family Physician* 95 (1): 22–28.
- Sihvo, Eero I.T., Jukka T. Salminen, Tuomo K. Rantanen, O. Juhani Rämö, Markku Ahotupa, Martti Färkkilä, Merja I. Auvinen, and Jarmo A. Salo. 2002. "Oxidative Stress Has a Role in Malignant Transformation in Barrett's Oesophagus." *International Journal of Cancer* 102 (6): 551–55. <https://doi.org/10.1002/ijc.10755>.
- Silva Dalla Libera, Larisse, Keila Patrícia Almeida de Carvalho, Jéssica Enocencio Porto Ramos, Lázara Alyne Oliveira Cabral, Rita de Cassia Goncalves de Alencar, Luísa Lina Villa, Rosane Ribeiro Figueiro Alves, Silvia Helena Rabelo Santos, Megmar Aparecida Dos Santos Carneiro, and Vera Aparecida Saddi. 2019. "Human Papillomavirus and Anal Cancer: Prevalence, Genotype Distribution, and Prognosis Aspects from Midwestern Region of Brazil." *Journal of Oncology* 2019: 6018269. <https://doi.org/10.1155/2019/6018269>.
- Silva, Raimundo Gerônimo, and Benedito Borges da Silva. 2011. "No Evidence for an Association of Human Papillomavirus and Breast Carcinoma." *Breast Cancer Research and Treatment* 125 (1): 261–64. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1129-z>.
- Silva, Ruany C. O., Rita de Cássia P. Lima, Marcelo N. Cordeiro, Daffany L. dos Santos, Lindomar J. Pena, Ana P. A. D. Gurgel, Marcus V. A. Batista, Bárbara S. Chagas, and Antonio C. Freitas. 2020. "Functional Evaluation of Human Papillomavirus Type 31 Long Control Region Variants." *Genomics* 112 (6): 5066–71. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.008>.
- Škamperle, Mateja, Boštjan J. Kocjan, Polona J. Maver, Katja Seme, and Mario Poljak. 2013. "Human Papillomavirus (HPV) Prevalence and HPV Type Distribution in Cervical, Vulvar, and Anal Cancers in Central and Eastern Europe." *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Et Adriatica* 22 (1): 1–5.
- Smith, Jessica L., Samuel K. Campos, Angela Wandinger-Ness, and Michelle A. Ozbun. 2008. "Caveolin-1-Dependent Infectious Entry of Human Papillomavirus Type 31 in Human Keratinocytes Proceeds to the Endosomal Pathway for pH-Dependent Uncoating." *Journal of Virology* 82 (19): 9505–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.01014-08>.
- So, Kyeong A, In Ho Lee, Ki Heon Lee, Sung Ran Hong, Young Jun Kim, Hyun Hee Seo, and Tae Jin Kim. 2019. "Human Papillomavirus Genotype-Specific Risk in Cervical Carcinogenesis." *Journal of Gynecologic Oncology* 30 (4): e52. <https://doi.org/10.3802/jgo.2019.30.e52>.
- Sofiani, Vahideh Hamidi, Parsa Veisi, Mohammad Rezaei Zadeh Rukerd, Reza Ghazi, and Mohsen Nakhaie. 2023. "The Complexity of Human Papilloma Virus in Cancers: A Narrative Review." *Infectious Agents and Cancer* 18 (1): 13. <https://doi.org/10.1186/s13027-023-00488-w>.

- Sominsky, Sophia, Yael Kuslansky, Beny Shapiro, Anna Jackman, Ygal Haupt, Rina Rosin-Arbesfeld, and Levana Sherman. 2014. "HPV16 E6 and E6AP Differentially Cooperate to Stimulate or Augment Wnt Signaling." *Virology* 468–470 (November): 510–23. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.007>.
- Song, Heeyah, Eula Tetangco, Loc Ton, Amanda Barrett, and John Erikson L Yap. 2021. "Beyond Squamous Cell Carcinoma: Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus." *Cureus* 13 (1): e12619. <https://doi.org/10.7759/cureus.12619>.
- Song, Shiyu, Amy Liem, James A. Miller, and Paul F. Lambert. 2000. "Human Papillomavirus Types 16 E6 and E7 Contribute Differently to Carcinogenesis." *Virology* 267 (2): 141–50. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0106>.
- Song, Yongmei, Lin Li, Yunwei Ou, Zhibo Gao, Enmin Li, Xiangchun Li, Weimin Zhang, et al. 2014. "Identification of Genomic Alterations in Oesophageal Squamous Cell Cancer." *Nature* 509 (7498): 91–95. <https://doi.org/10.1038/nature13176>.
- Souza, Rhonda F., Kumar Krishnan, and Stuart Jon Spechler. 2008. "Acid, Bile, and CDX: The ABCs of Making Barrett's Metaplasia." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 295 (2): G211–218. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90250.2008>.
- Spayne, Jacqueline, and Therese Hesketh. 2021. "Estimate of Global Human Papillomavirus Vaccination Coverage: Analysis of Country-Level Indicators." *BMJ Open* 11 (9): e052016. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-052016>.
- Stachler, Matthew D., Amaro Taylor-Weiner, Shouyong Peng, Aaron McKenna, Agoston T. Agoston, Robert D. Odze, Jon M. Davison, et al. 2015. "Paired Exome Analysis of Barrett's Esophagus and Adenocarcinoma." *Nature Genetics* 47 (9): 1047–55. <https://doi.org/10.1038/ng.3343>.
- Stolnicu, Simona, Iulia Barsan, Lien Hoang, Prusha Patel, Cristina Terinte, Anna Pesci, Sarit Aviel-Ronen, et al. 2018. "International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): A New Pathogenetic Classification for Invasive Adenocarcinomas of the Endocervix." *American Journal of Surgical Pathology* 42 (2): 214–26. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000986>.
- Stolnicu, Simona, Lien Hoang, and Robert A. Soslow. 2019. "Recent Advances in Invasive Adenocarcinoma of the Cervix." *Virchows Archiv* 475 (5): 537–49. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02601-0>.
- Stolnicu, Simona, Kay J. Park, Takako Kiyokawa, Esther Oliva, W. Glenn McCluggage, and Robert A. Soslow. 2021. "Tumor Typing of Endocervical Adenocarcinoma: Contemporary Review and Recommendations From the International Society of Gynecological Pathologists." *International Journal of Gynecological Pathology* 40 (Supplement 1): S75–91. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000751>.
- Stolnicu, Simona, Karen L. Talia, and W. Glenn McCluggage. 2020. "The Evolving Spectrum of Precursor Lesions of Cervical Adenocarcinomas." *Advances in Anatomic Pathology* 27 (5): 278. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000266>.
- Straight, S W, P M Hinkle, R J Jewers, and D J McCance. 1993. "The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Transforms Fibroblasts and Effects the Downregulation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Keratinocytes." *Journal of Virology* 67 (8): 4521–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.8.4521-4532.1993>.

- Straub, Elke, Marcel Dreer, Jasmin Fertey, Thomas Iftner, and Frank Stubenrauch. 2014. "The Viral E8[^]E2C Repressor Limits Productive Replication of Human Papillomavirus 16." *Journal of Virology* 88 (2): 937–47. <https://doi.org/10.1128/JVI.02296-13>.
- Straub, Elke, Jasmin Fertey, Marcel Dreer, Thomas Iftner, and Frank Stubenrauch. 2015. "Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter." Edited by M. J. Imperiale. *Journal of Virology* 89 (14): 7304–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.00616-15>.
- Sundel, Margaret H., Lysandra Voltaggio, Ira L. Leeds, and Sandy Hwang Fang. 2019. "Anatomy and Histology of the Anus." In *Anal Cancer: A Comprehensive Guide*, edited by Jeffrey Meyer and Lisa Kachnic, 1–9. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20253-8_1.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Syrjänen, K., S. Pyrhönen, S. Aukee, and E. Koskela. 1982. "Squamous Cell Papilloma of the Esophagus: A Tumour Probably Caused by Human Papilloma Virus (HPV)." *Diagnostic Histopathology* 5 (4): 291–96.
- Taghavi, Noushin, Firouzeh Biramijamal, Masoud Sotoudeh, Hooman Khademi, Reza Malekzadeh, Omeed Moaven, Bahram Memar, Azadeh A'rab, and Mohammad Reza Abbaszadegan. 2010. "p16INK4ahypermethylation and P53, P16 and MDM2 Protein Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *BMC Cancer* 10 (1): 138. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-138>.
- Tanaka, Takako Imai, and Faizan Alawi. 2018. "Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer." *Dental Clinics of North America* 62 (1): 111–20. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.008>.
- Tekin, Leyla, Ayse Yazici, Eren Akbaba, and Melike Nur Akin. 2015. "Mesonephric Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: A Case Report and Review of the Literature." *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 65 (9): 1016–17.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. 2017. "Integrated Genomic Characterization of Oesophageal Carcinoma." *Nature* 541 (7636): 169–75. <https://doi.org/10.1038/nature20805>.
- Thierry, F, and C Demeret. 2008. "Direct Activation of Caspase 8 by the Proapoptotic E2 Protein of HPV18 Independent of Adaptor Proteins." *Cell Death & Differentiation* 15 (9): 1356–63. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.53>.
- Thomas, Miranda, and Lawrence Banks. 1998. "Inhibition of Bak-Induced Apoptosis by HPV-18 E6." *Oncogene* 17 (23): 2943–54. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202223>.
- Tomaić, Vjekoslav. 2016. "Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites." *Cancers* 8 (10): 95. <https://doi.org/10.3390/cancers8100095>.
- Tommasino, Massimo, Rosita Accardi, Sandra Caldeira, Wen Dong, Ilaria Malanchi, Anouk Smet, and Ingeborg Zehbe. 2003. "The Role of TP53 in Cervical Carcinogenesis." *Human Mutation* 21 (3): 307–12. <https://doi.org/10.1002/humu.10178>.
- Turashvili, Gulisa, and Kay J. Park. 2019. "Cervical Glandular Neoplasia: Classification and Staging." *Surgical Pathology Clinics, Gynecologic Pathology: Practical Issues and Updates*, 12 (2): 281–313. <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.01.002>.

- Turchan, William Tyler, and Stanley L. Liauw. 2021. "Chemoradiation for Anal Cancer: Clinical Outcomes and Strategies to Optimize the Therapeutic Ratio According to HPV Status." *Seminars in Radiation Oncology* 31 (4): 349–60. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.007>.
- Ueda, Yutaka, Takayuki Enomoto, Toshihiro Kimura, Kiyoshi Yoshino, Masami Fujita, and Tadashi Kimura. 2011. "Two Distinct Pathways to Development of Squamous Cell Carcinoma of the Vulva." *Journal of Skin Cancer* 2011: 951250. <https://doi.org/10.1155/2011/951250>.
- Ugalde, Paula A., Sergio Tadeu Pereira, and Cesar Araujo. 2011. "Correlative Anatomy for the Esophagus." *Thoracic Surgery Clinics* 21 (2): 307–17. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2010.12.007>.
- Van Doorslaer, Koenraad, Dan Chen, Sandra Chapman, Jameela Khan, and Alison A. McBride. 2017. "Persistence of an Oncogenic Papillomavirus Genome Requires Cis Elements from the Viral Transcriptional Enhancer." *mBio* 8 (6): e01758-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01758-17>.
- Van Doorslaer, Koenraad, Zigui Chen, Hans-Ulrich Bernard, Paul K. S. Chan, Rob DeSalle, Joakim Dillner, Ola Forslund, et al. 2018. "ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae." *The Journal of General Virology* 99 (8): 989–90. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001105>.
- Van Poppel, H., N. A. Watkin, S. Osanto, L. Moonen, A. Horwich, and V. Kataja. 2013. "Penile Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up†." *Annals of Oncology*, ESMO Updated Clinical Practice Guidelines, 24 (October): vi115–24. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt286>.
- Vandermark, Erik R., Krysta A. Deluca, Courtney R. Gardner, Daniel F. Marker, Cynthia N. Schreiner, David A. Strickland, Katelynn M. Wilton, Sumona Mondal, and Craig D. Woodworth. 2012. "Human Papillomavirus Type 16 E6 and E 7 Proteins Alter NF-κB in Cultured Cervical Epithelial Cells and Inhibition of NF-κB Promotes Cell Growth and Immortalization." *Virology* 425 (1): 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.023>.
- Veldman, Tim, Xuefeng Liu, Hang Yuan, and Richard Schlegel. 2003. "Human Papillomavirus E6 and Myc Proteins Associate *in Vivo* and Bind to and Cooperatively Activate the Telomerase Reverse Transcriptase Promoter." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (14): 8211–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1435900100>.
- Villa, Luisa L., Ronaldo LR Costa, Carlos A. Petta, Rosires P. Andrade, Kevin A. Ault, Anna R. Giuliano, Cosette M. Wheeler, et al. 2005. "Prophylactic Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-like Particle Vaccine in Young Women: A Randomised Double-Blind Placebo-Controlled Multicentre Phase II Efficacy Trial." *The Lancet Oncology* 6 (5): 271–78. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70101-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70101-7).
- Villiers, Ethel-Michele de, Claude Fauquet, Thomas R Broker, Hans-Ulrich Bernard, and Harald zur Hausen. 2004. "Classification of Papillomaviruses." *Virology* 324 (1): 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
- Vink, Margaretha A., Johannes A. Bogaards, Folkert J. van Kemenade, Hester E. de Melker, Chris J. L. M. Meijer, and Johannes Berkhof. 2013. "Clinical Progression of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia: Estimating the Time to Preclinical Cervical Cancer From Doubly Censored National Registry Data." *American Journal of Epidemiology* 178 (7): 1161–69. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt077>.

- Vojtechova, Zuzana, Ivan Sabol, Martina Salakova, Lubomir Turek, Marek Grega, Jana Smahelova, Ondrej Vencalek, Eva Lukesova, Jan Klozar, and Ruth Tachezy. 2015. "Analysis of the Integration of Human Papillomaviruses in Head and Neck Tumours in Relation to Patients' Prognosis: Integration of HPV and Survival." *International Journal of Cancer* 138 (2): 386–95. <https://doi.org/10.1002/ijc.29712>.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Muñoz. 1999. "Human Papillomavirus Is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide." *The Journal of Pathology* 189 (1): 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F).
- Wallace, Nicholas A., and Denise A. Galloway. 2014. "Manipulation of Cellular DNA Damage Repair Machinery Facilitates Propagation of Human Papillomaviruses." *Seminars in Cancer Biology* 26 (June): 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.003>.
- Wang, Bujiang, Haojun Song, Haizhong Jiang, Yangbo Fu, Xiaoyun Ding, and Chongchang Zhou. 2018. "Early Diagnostic Potential of APC Hypermethylation in Esophageal Cancer." *Cancer Management and Research* 10 (February): 181–98. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S148677>.
- Wang, Fay, John Flanagan, Nan Su, Li-Chong Wang, Son Bui, Allissa Nielson, Xingyong Wu, Hong-Thuy Vo, Xiao-Jun Ma, and Yuling Luo. 2012. "RNAscope A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues." *The Journal of Molecular Diagnostics* 14 (1): 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>.
- Wang, G-Q, C C Abnet, Q Shen, K J Lewin, X-D Sun, M J Roth, Y-L Qiao, et al. 2005. "Histological Precursors of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma: Results from a 13 Year Prospective Follow up Study in a High Risk Population." *Gut* 54 (2): 187–92. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.046631>.
- Wang, Joshua W., and Richard B.S. Roden. 2013. "Virus-like Particles for the Prevention of Human Papillomavirus-Associated Malignancies." *Expert Review of Vaccines* 12 (2): 10.1586/erv.12.151. <https://doi.org/10.1586/erv.12.151>.
- Wang, Qingxuan, Yuanjing Hu, Ya He, Tian Wang, and Pratima Ghimire. 2020. "Glassy Cell Carcinoma of Cervix: An Analysis for 20 Cases and Literatures Review." *Translational Cancer Research* 9 (4): 2357–62. <https://doi.org/10.21037/tcr.2020.03.35>.
- Wang, Sophia S., Mark E. Sherman, Allan Hildesheim, James V. Lacey Jr., and Susan Devesa. 2004. "Cervical Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma Incidence Trends among White Women and Black Women in the United States for 1976–2000." *Cancer* 100 (5): 1035–44. <https://doi.org/10.1002/cncr.20064>.
- Wang, Wen-Lun, Yu-Chi Wang, Ching-Tai Lee, Chi-Yang Chang, Jo-Lin Lo, Yao-Hung Kuo, Yao-Chun Hsu, and Lein-Ray Mo. 2015. "The Impact of Human Papillomavirus Infection on the Survival and Treatment Response of Patients with Esophageal Cancers: Human Papillomavirus in Esophageal SCC." *Journal of Digestive Diseases* 16 (5): 256–63. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12236>.
- Wang, Xia, Hong Ouyang, Yusuke Yamamoto, Pooja Ashok Kumar, Tay Seok Wei, Rania Dagher, Matthew Vincent, et al. 2011. "Residual Embryonic Cells as Precursors of a Barrett's-like Metaplasia." *Cell* 145 (7): 1023–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.026>.
- Wasson, Christopher W., Ethan L. Morgan, Marietta Müller, Rebecca L. Ross, Margaret Hartley, Sally Roberts, and Andrew Macdonald. 2017. "Human Papillomavirus Type 18

- E5 Oncogene Supports Cell Cycle Progression and Impairs Epithelial Differentiation by Modulating Growth Factor Receptor Signalling during the Virus Life Cycle." *Oncotarget* 8 (61): 103581–600. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21658>.
- Wechsler, Erin Isaacson, Sharof Tugizov, Rossana Herrera, Maria Da Costa, and Joel M. Palefsky. 2018. "E5 Can Be Expressed in Anal Cancer and Leads to Epidermal Growth Factor Receptor-Induced Invasion in a Human Papillomavirus 16-Transformed Anal Epithelial Cell Line." *Journal of General Virology* 99 (5): 631–44. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001061>.
- Westra, William H., Janis M. Taube, M.L. Poeta, Shanaz Begum, David Sidransky, and Wayne M. Koch. 2008. "Inverse Relationship between Human Papillomavirus-16 Infection and Disruptive P53 Gene Mutations in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck." *Clinical Cancer Research* 14 (2): 366–69. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1402>.
- Weusten, Bas, Raf Bisschops, Emanuel Coron, Mário Dinis-Ribeiro, Jean-Marc Dumonceau, José-Miguel Esteban, Cesare Hassan, et al. 2017. "Endoscopic Management of Barrett's Esophagus: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement." *Endoscopy* 49 (02): 191–98. <https://doi.org/10.1055/s-0042-122140>.
- White, Elizabeth A., Karl Münger, and Peter M. Howley. 2016. "High-Risk Human Papillomavirus E7 Proteins Target PTPN14 for Degradation." Edited by Michael J. Imperiale. *mBio* 7 (5): e01530-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01530-16>.
- Wilson, Regina, Frauke Fehrmann, and Laimonis A. Laimins. 2005. "Role of the E1 ^ E4 Protein in the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31." *Journal of Virology* 79 (11): 6732–40. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6732-6740.2005>.
- Wong, M Y W, B Wang, A Yang, A Khor, W Xuan, and S Rajendra. 2018. "Human Papillomavirus Exposure and Sexual Behavior Are Significant Risk Factors for Barrett's Dysplasia/Esophageal Adenocarcinoma." *Diseases of the Esophagus* 31 (12). <https://doi.org/10.1093/dote/doy051>.
- Wu, Qiuji, Miao Wang, Yixin Liu, Xulong Wang, Yi Li, Xiaoyan Hu, Ye Qiu, Wenjing Liang, Yongchang Wei, and Yahua Zhong. 2021. "HPV Positive Status Is a Favorable Prognostic Factor in Non-Nasopharyngeal Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients: A Retrospective Study From the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database." *Frontiers in Oncology* 11: 688615. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.688615>.
- Xie, Fa-Jun, Yi-Ping Zhang, Qiu-Qing Zheng, Hong-Chuan Jin, Fa-Liang Wang, Ming Chen, Lan Shao, De-Hong Zou, Xin-Min Yu, and Wei-Min Mao. 2013. "Helicobacter Pylori Infection and Esophageal Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis." *World Journal of Gastroenterology* 19 (36): 6098–6107. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i36.6098>.
- Yemelyanova, Anna, Russell Vang, Malti Kshirsagar, Dan Lu, Morgan A. Marks, le Ming Shih, and Robert J. Kurman. 2011. "Immunohistochemical Staining Patterns of P53 Can Serve as a Surrogate Marker for TP53 Mutations in Ovarian Carcinoma: An Immunohistochemical and Nucleotide Sequencing Analysis." *Modern Pathology* 24 (9): 1248–53. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.85>.
- Yin, Binbin, Weiwei Liu, Pan Yu, Chunhua Liu, Yue Chen, Xiuzhi Duan, Zhaoping Liao, et al. 2017. "Association between Human Papillomavirus and Prostate Cancer: A Meta-Analysis." *Oncology Letters* 14 (2): 1855–65. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6367>.
- Yordanov, Angel, Stoyan Kostov, Stanislav Slavchev, Strahil Strashilov, Assia Konsoulova, Jean Calleja-Agius, Riccardo Di Fiore, et al. 2021. "Adenosquamous Carcinoma of the

- Uterine Cervix – Impact of Histology on Clinical Management.” *Cancer Management and Research* 13 (June): 4979–86. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S311326>.
- Young, R. H., and P. B. Clement. 2002. “Endocervical Adenocarcinoma and Its Variants: Their Morphology and Differential Diagnosis.” *Histopathology* 41 (3): 185–207. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01462.x>.
- Yu, Canqing, Haijing Tang, Yu Guo, Zheng Bian, Ling Yang, Yiping Chen, Aiyu Tang, et al. 2018. “Hot Tea Consumption and Its Interactions with Alcohol Consumption and Tobacco Smoking on Risk of Esophageal Cancer: A Population-Based Cohort Study.” *Annals of Internal Medicine* 168 (7): 489–97. <https://doi.org/10.7326/M17-2000>.
- Yu, Lulu, Vladimir Majerciak, and Zhi-Ming Zheng. 2022. “HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation.” *International Journal of Molecular Sciences* 23 (9): 4943. <https://doi.org/10.3390/ijms23094943>.
- Yu, Wei-Yuan, Jonathan M. W. Slack, and David Tosh. 2005. “Conversion of Columnar to Stratified Squamous Epithelium in the Developing Mouse Oesophagus.” *Developmental Biology* 284 (1): 157–70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.042>.
- Zare, Maryam, Ferdous Rastgar Jazii, Mohammad Reza Alivand, Negin Karimi Nasser, Reza Malekzadeh, and Mansour Yazdanbod. 2009. “Qualitative Analysis of Adenomatous Polyposis Coli Promoter: Hypermethylation, Engagement and Effects on Survival of Patients with Esophageal Cancer in a High Risk Region of the World, a Potential Molecular Marker.” *BMC Cancer* 9 (January): 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-24>.
- Zhang, Baihua, Qin Xiao, Desong Yang, Xu Li, Jun Hu, Yonggang Wang, and Wenxiang Wang. 2016. “Spindle Cell Carcinoma of the Esophagus.” *Medicine* 95 (37): e4768. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004768>.
- Zhang, Benyue, Anjaiah Srirangam, David A Potter, and Ann Roman. 2005. “HPV16 E5 Protein Disrupts the C-Cbl–EGFR Interaction and EGFR Ubiquitination in Human Foreskin Keratinocytes.” *Oncogene* 24 (15): 2585–88. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208453>.
- Zhang, Lu, Binyu Sun, Xi Zhou, QiongQiong Wei, Sicheng Liang, Gang Luo, Tao Li, and Muhan Lü. 2021. “Barrett’s Esophagus and Intestinal Metaplasia.” *Frontiers in Oncology* 11 (June): 630837. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.630837>.
- Zhang, Wei, Teymur Kazakov, Andreea Popa, and Daniel DiMaio. 2014. “Vesicular Trafficking of Incoming Human Papillomavirus 16 to the Golgi Apparatus and Endoplasmic Reticulum Requires γ -Secretase Activity.” *mBio* 5 (5): e01777-01714. <https://doi.org/10.1128/mBio.01777-14>.
- Zhang, Yiyu, Aleksandra Dakic, Renxiang Chen, Yuhai Dai, Richard Schlegel, and Xuefeng Liu. 2017. “Direct HPV E6/Myc Interactions Induce Histone Modifications, Pol II Phosphorylation, and hTERT Promoter Activation.” *Oncotarget* 8 (56): 96323–39. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22036>.
- Zhou, J., X. Y. Sun, K. Louis, and I. H. Frazer. 1994. “Interaction of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Capsid Proteins with HPV DNA Requires an Intact L2 N-Terminal Sequence.” *Journal of Virology* 68 (2): 619–25. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.2.619-625.1994>.
- Zhou, Menghan, Yiping Li, Shaofeng Lin, Yanping Chen, Yanyan Qian, Zhujiang Zhao, and Hong Fan. 2019. “H3K9me3, H3K36me3, and H4K20me3 Expression Correlates with Patient Outcome in Esophageal Squamous Cell Carcinoma as Epigenetic Markers.” *Digestive Diseases and Sciences* 64 (8): 2147–57. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05529-2>.

- Zhu, Xiaoqin, Sarah Jamshed, Jian Zou, Azniv Azar, Xiuling Meng, Venu Bathini, Karen Dresser, et al. 2021. "Molecular and Immunophenotypic Characterization of Anal Squamous Cell Carcinoma Reveals Distinct Clinicopathologic Groups Associated with HPV and TP53 Mutation Status." *Modern Pathology* 34 (5): 1017–30. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00729-y>.
- Zwolinska, Katarzyna, Malgorzata Bienkowska-Haba, Rona S. Scott, Timothy Keiffer, and Martin Sapp. 2023. "Experimental Support for Human Papillomavirus Genome Amplification Early after Infectious Delivery." *Journal of Virology*, May, e0021423. <https://doi.org/10.1128/jvi.00214-23>.

ANNEXES

Contribution en tant que co-auteur :

Bruyere, D., RONCARATI, P., Lebeau, A., Lerho, T., Poulain, F., Hendrick, E., Pilard, C., **Reynders, C.**, Ancion, M., Luyckx, M., Renard, M., Jacob, Y., Twizere, J.-C., Peiffer, R., Peulen, O., Delvenne, P., Hubert, P. McBride, A., Gillet, N., ... Herfs, M. (2023). Human papillomavirus E6/E7 oncoproteins promote radiotherapy mediated tumor suppression by globally hijacking host DNA damage repair. *Theranostics*, 13 (3), 1130 - 1149.

(doi:10.7150/thno.78091)

Lebeau, A.*, Bruyère, D.* , RONCARATI, P., Peixoto, P., Hervouet, E., COBRAIVILLE, G., Taminiau, B., Masson, M., Gallego, C., Mazzucchelli, G., Smargiasso, N., Fleron, M., Baiwir, D., Hendrick, E., Pilard, C., Lerho, T., **Reynders, C.**, Ancion, M., GREIMERS, R., ... Herfs, M. (28 February 2022). HPV infection alters vaginal microbiome through down-regulating host mucosal innate peptides used by Lactobacilli as amino acid sources. *Nature Communications*, 13 (1), 1076. * *These authors have contributed equally to this work.*

(doi:10.1038/s41467-022-28724-8)

Hubert, P., RONCARATI, P., Demoulin, S., Pilard, C., Ancion, M., **Reynders, C.**, Lerho, T., Bruyère, D., Lebeau, A., Radermecker, C., Meunier, M., Nokin, M.-J., Hendrick, E., Peulen, O., Delvenne, P., & Herfs, M. (2021). Extracellular HMGB1 blockade inhibits tumor growth through profoundly remodeling immune microenvironment and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9 ((3)), 001966.

(doi:10.1136/jitc-2020-001966)

Bruyère, D., Monnien, F., Colpart, P., RONCARATI, P., Vuitton, L., Hendrick, E., Lepinoy, A., Luquain, A., Pilard, C., Lerho, T., Molimard, C., Maingon, P., Arnould, L., Bone-Lepinoy, M.-C., Dusserre, L., Martin, L., **Reynders, C.**, Ancion, M., Peiffert, D., ... Herfs, M. (2021). Treatment algorithm and prognostic factors for patients with stage I–III carcinoma of the anal canal: a 20-year multicenter study. *Modern Pathology*, 34, 116-130.

(doi:10.1038/s41379-020-0637-6)

Jacquet, M., Hervouet, E., Baudu, T., Herfs, M., Parratte, C., Feugeas, J.-P., Perez, V., **Reynders, C.**, Ancion, M., Vigneron, M., Baguet, A., Guittaut, M., Fraichard, A., & Despouy, G. (2021). GABARAPL1 Inhibits EMT Signaling through SMAD-Targeted Negative Feedback. *Biology*.

(doi:10.3390/biology10100956)