

**Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche
Scientifique et de la Technologie**

Université de Monastir

Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir



THESE DE DOCTORAT

**En vue de l'obtention du grade de
Docteur d'Université en Sciences Biologiques et Biotechnologiques**

**Contribution à l'étude de l'implication des virus
et évaluation de leur valeur pronostique dans le
cancer du sein de la femme dans la région du
centre tunisien**

Présentée par : Mohamed Ridha HACHANA

Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU Farhat Hached de Sousse

Soutenue le 31 octobre 2009 devant les membres de jury :

Président : Mr. Bartegi AGHLEB, Professeur

Rapporteur : Mr. Jawhar GHARBI, Maître de Conférences

Rapporteur : Mme. Besma BEL HAJ JRAD, Maître de Conférences

Examineur : Mr. Boulbaba SELMI, Maître de Conférences

Encadreur : Mr. Mounir TRIMECHE, Professeur Agrégé

Année Universitaire 2008-2009

REMERCIEMENTS

A l'occasion de la soutenance de ma thèse de doctorat, il m'est agréable d'exprimer ma gratitude envers tous ceux qui ont contribué à ma formation et qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

*En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Sadok Korbi**, chef de service du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached de Sousse pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir accordé la confiance pour mener à terme le sujet qui m'a été proposé. Qu'il trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude.*

*Je tiens aussi à adresser mes plus vifs remerciements au Professeur Agrégé **Mounir TRIMECHE** (laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached) pour sa présence remarquable durant la réalisation de ce travail et son engagement dans toute les étapes de mon encadrement.*

*Je souhaite remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font, Monsieur le professeur **Bartegi AGHLEB** (Département de Biochimie, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir), qui a accepté de présider ce jury, Monsieur le Maître de Conférences **Jawhar GHARBI** (Département de Microbiologie, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir) et Madame le Maître de Conférences **Besma BEL HAJ JRAD** (Département d'Immunologie, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir), qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse et Monsieur le Maître de Conférences **Boulbaba SELMI** (Département de Biochimie, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir), qui a accepté d'examiner ce travail.*

Mes remerciements s'adressent également aux membres du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU Farhat Hached de Sousse, en particulier Mme Intissar Toumi, pour leur aide.

J'aimerais aussi remercier mes parents, à qui je dois tout ce que je suis, que Dieu vous préserve et vous accorde longue vie.

Enfin, Je remercie de tout mon cœur mon épouse Essia qui n'a cessé de m'encourager tout au long de ces années, d'être à côté de moi dans les moments les plus difficiles et pour son aide précieuse dans la préparation et de la rédaction de ce mémoire.

Je dédie particulièrement ce travail à mon petit ange Mehdi, le nouveau rayon de soleil de ma vie.

Table de matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.1. Le cancer du sein	1
I.1.1. Définition	1
I.1.2. Epidémiologie	2
I.1.3. Facteurs pronostiques	3
I.1.3.1. Facteurs cliniques	3
I.1.3.2. Facteurs anatomopathologiques	4
I.1.3.3. Facteurs biologiques	5
I.1.4. Facteurs de risque	8
I.1.4.1. Facteurs de risques hormonaux	8
I.1.4.2. Facteurs de risques génétiques	8
I.1.4.3. Facteurs de risques environnementaux	9
I.1.5. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la carcinogenèse mammaire	10
I.2. Le virus simien 40 (SV40)	14
I.2.1. Epidémiologie et transmission du virus SV40	14
I.2.2. Structure et organisation du génome du virus SV40	15
I.2.3. Cycle de réplication du virus SV40	15
I.2.4. Pouvoir transformant du virus SV40	17
I.2.5. Pathologies associées au virus SV40	19
I.3. Le Virus MMTV-like	20
I.3.1. Introduction et caractéristiques du virus MMTV	20
I.3.2. MMTV et cancer du sein chez la femme	21
I.3.3. MMTV-like et cancer du sein chez la femme	22
I.4. Les papillomavirus humains (HPV)	24
I.4.1. Introduction et classification des papillomavirus humains	24
I.4.2. Structure du virus et organisation génomique	24
I.4.2.1. Cadre précoce de lecture: Région E	25
I.4.2.2. Cadre tardif de lecture: Région L	25
I.4.2.3. Longue région de contrôle: LCR	25
I.4.3. Physiopathologie de l'infection à papillomavirus	25
I.4.4. Pouvoir oncogène des HPV	26
I.4.5. Pathologies associées aux HPV	27
I.5. Les herpesvirus humains	29
I.5.1. Introduction et classification des herpesvirus humains	29
I.5.2. Structure et organisation du génome des herpesvirus	30
I.5.3. Le cycle de réplication virale	31
I.5.3.1. Les gènes intervenants dans le cycle de réplication des herpesvirus humains	31
I.5.3.2. Le cycle viral latent	31
I.5.3.3. Le cycle viral lytique	32
I.5.4. Pathologies associées aux herpesvirus humains	32
I.6. Epigénétique et cancer	34
I.6.1. La méthylation de l'ADN	34
I.6.2. Méthylation de l'ADN et cancers	36
I.6.2.1. Hypométhylation globale	36
I.6.2.2. Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs	37
I.6.3. Méthylation de l'ADN et virus	39
Objectifs et plan du travail	40

Chapitre II : Techniques générales

II.1. Population d'étude	42
II.2. Méthodes	43
II.2.1. Extraction de l'ADN à partir des tissus congelés	43
II.2.1.1. Principe	43
II.2.1.2. Protocole	43
II.2.1.3. Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait	44
II.2.2. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	45
II.2.2.1. Principe	45
II.2.2.2. Conditions expérimentales	46
II.2.2.2.1. Vérification de la qualité de l'ADN obtenu après extraction	46
II.2.2.2.2. Mise en évidence de l'ADN du virus SV40 par PCR	47
II.2.2.2.3. Mise en évidence du virus MMTV-like par PCR	53
II.2.2.2.4. Mise en évidence de l'ADN des papillomavirus humains par PCR	55
II.2.2.2.5. Mise en évidence de l'ADN des herpesvirus humains par PCR	58
II.2.3. Séquençage de l'ADN	59
II.2.3.1. Principe	57
II.2.3.2. Application du séquençage pour l'analyse de la séquence env du virus MMTV-like amplifiée par PCR	60
II.2.4. Immunohistochimie	61
II.2.4.1. Principe	61
II.2.4.2. Protocole	62
II.2.5. Hybridation in situ	64
II.2.5.1. Détection de l'EBV	64
II.2.5.2. Détection du virus HPV	66
II.2.6. Analyse de la méthylation de l'ADN	68
II.2.6.1. Principe	68
II.2.6.2. Les gènes étudiés	70
II.2.6.3. Conditions expérimentales	71
II.2.6.3.1. Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium	71
II.2.6.3.2. Contrôle de la qualité de l'ADN après traitement au bisulfite de sodium	73
II.2.6.3.3. Analyse de l'ADN traité par PCR spécifique à la méthylation (MSP)	73
II.2.7. Analyses statistiques	77
II.2.7.1. Association entre deux variables catégorielles	77
II.2.7.2. Analyse d'association entre une variable catégorielle et une variable continue	77
II.2.7.3. Analyse de la survie	77

Chapitre III : Prévalence et caractéristiques clinico-pathologiques des cancers du sein associés au virus SV40

III.1. Introduction	78
III.2. Méthodologie	79
III.2.1. Population d'étude	79
III.2.2. Extraction de l'ADN	80
III.2.3. Recherche de l'ADN du virus SV40 par PCR	80
III.2.3.1. Détection de la région de transcription précoce du virus	80
III.2.3.2. Détection de la région de transcription tardive du virus	80
III.2.3.3. Détection de la région régulatrice de la transcription virale	80
III.2.3.4. Contrôles positifs et négatifs de la PCR	81
III.2.4. Détection des oncoprotéines virales par immunohistochimie	81
III.2.5. Analyse statistique	82
III.3. Résultats	83
III.3.1. Contrôle de la qualité d'ADN après extraction	83
III.3.2. Détection du virus SV40 par PCR	84
III.3.3. Expression des oncoprotéines t/Tag du virus SV40	87
III.3.4. Caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés au virus SV40	89
III.3.5. Valeur pronostic de la détection du virus SV40	91
III.4. Discussion	92

Chapitre IV : Corrélation entre la présence du virus SV40 dans le cancer du sein et l'hyperméthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs

IV.1. Introduction	97
IV.2. Méthodologie	98
IV.2.1. Population d'étude	98
IV.2.2. Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium	98
IV.2.3. Contrôle de la qualité de l'ADN après traitement au bisulfite de sodium	98
IV.2.4. Amplification de l'ADN par PCR spécifique de la méthylation (MSP)	99
IV.2.5. Analyse statistique	99
IV.3. Résultats	100
IV.3.1. Contrôle de la qualité d'ADN après traitement par le bisulfite	100
IV.3.2. Profil de méthylation de l'ADN	101
IV.3.3. Relation entre l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs et la présence du virus SV40	104
IV.4. Discussion	105

Chapitre V : Prévalence et caractéristiques clinico-pathologiques des cancers du sein associés au MMTV-like en Tunisie

V.1. Introduction	118
V.2. Méthodologie	120
V.2.1. Population d'étude	120
V.2.2. Recherche de l'ADN du virus MMTV-like par PCR	120
V.2.3. Analyse des séquences du virus MMTV-like détectées par séquençage	120
V.2.3. Analyse statistique	120
V.3. Résultats	121
V.3.1. Détection du virus MMTV-like par PCR	121
V.3.2. Analyse des séquences du virus MMTV-like par séquençage	122
V.3.3. Caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés au virus MMTV-like	124
V.3.4. Valeur pronostic de la détection du virus MMTV-like	126
V.4. Discussion	127

Chapitre VI : Papillomavirus humains et cancer du sein en Tunisie

VI.1. Introduction	134
VI.2. Méthodologie	135
VI.2.1. Population d'étude	135
VI.2.2. Recherche des papillomavirus humains par PCR	135
VI.2.3. Recherche des HPV par hybridation in situ	136
VI.3. Résultats	137
VI.3.1. Recherche des papillomavirus humains par PCR	137
VI.3.2. Détection des papillomavirus humain par hybridation in situ	140
VI.4. Discussion	140

Chapitre VII : Herpesvirus humains et cancer du sein en Tunisie

VII.1. Introduction	147
VII.2. Méthodologie	148
VII.2.1. Population d'étude	148
VII.2.2. Recherche de l'ADN génomique des herpesvirus par PCR	148
VII.2.3. Immunohistochimie	148
VII.2.4. Hybridation in situ	148
VII.2.5. Analyse statistique	148
VII.3. Résultats	150
VII.3.1. Détection des herpesvirus par PCR	150
VII.3.2. Détection des protéines virales LMP-1 et ZEBRA par immunohistochimie	151
VII.3.3. Détection du génome de l'EBV par hybridation in situ	151
VII.3.4. Caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés à la présence de l'ADN génomique de l'EBV	151
VII.3.5. Valeur pronostic de la détection des herpesvirus humains	154
VII.4. Discussion	155
	163

Chapitre VIII : Discussion générale	
Chapitre IX : Conclusions	176
Références bibliographiques	184
Annexes	214

Liste des figures

Figure I-1: Mécanisme de méthylation de la cytosine au niveau de l'ADN.....	35
Figure II-1 : Schéma représentatif des différentes étapes de la PCR spécifique à la méthylation.....	69
Figure II-2 : Etapes de la réaction de conversion par le bisulfite de sodium.....	72
Figure III-1: Exemples représentatifs de l'amplification d'une séquence de 407 pb du gène de la β -globine par PCR dans les cas de carcinome canalaire infiltrant.....	83
Figure III-2: Exemples représentatifs de la détection de la région précoce du génome du virus SV40 par PCR dans les cas de carcinomes canauxaires infiltrants.....	85
Figure III-3: Exemples représentatifs de la détection de la région codant pour la protéine VP1 de la capsid et de la région régulatrice de la transcription du virus SV40 par PCR dans les cas de carcinomes canauxaires infiltrants.....	86
Figure III-4: Gel représentatif de la recherche d'une contamination des extraits d'ADN des tumeurs mammaires par le témoin positif.....	87
Figure III-5: Exemples de détection des oncoprotéines t/Tag du virus SV40 par immunohistochimie en utilisant l'anticorps Pab 108 sur coupes tissulaires déparaffinées.....	88
Figure III-6: Courbes de survie globale (a) et de survie sans rechute (b) des patients atteints de cancer du sein en Tunisie en fonction du statut du virus SV40 dans les tumeurs.....	91
Figure IV-1: Exemple représentatif d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par PCR visant la détection d'un fragment d'ADN de 133 pb appartenant au gène de la β -actine après traitement de l'ADN par le bisulfite de sodium.....	100
Figure IV-2 : Histogramme représentant la répartition des cas de carcinomes canauxaires infiltrants méthylés en fonction du nombre de gènes méthylés.....	102
Figure IV-3: Exemples représentatifs d'électrophorèses sur gels d'agarose à 2% montrant les produits d'amplification par PCR spécifique à la méthylation des allèles méthylés (M) et non méthylés (NM) des gènes <i>RASSF1A</i> , <i>SHP1</i> , <i>HIN1</i> , <i>BRCA1</i> , <i>PI6</i> , <i>ER</i> , <i>CDH1</i> , <i>APC</i> , <i>BLU</i> , <i>DAPK</i> , <i>RARβ2</i> , <i>GSTP1</i> , <i>TIMP3</i> , <i>CCND2</i> et <i>hMLH1</i> dans les cas de cancer du sein SV40-positifs et SV40-négatifs.....	103
Figure IV-4: Histogramme représentant les fréquences d'hyperméthylation des 15 gènes analysés et de l'index de méthylation dans les cas de cancer du sein SV40-positifs (n = 24 ; barres pleines) et les cas SV40-négatifs (n = 85 ; barres vides).....	104
Figure V-1 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% coloré par le bromure d'éthidium représentatif de la détection par PCR semi-nichée du virus MMTV-like utilisant les amorces 1X/2NR/5F qui permettent d'amplifier une séquence de 190 paires de bases (pb) appartenant à la région <i>env</i> du virus MMTV-like dans le tissu tumoral (T) et normal (N) du sein.....	121
Figure V-2: Alignements nucléotidiques des séquences <i>env</i> du virus MMTV-like obtenus a partir des cas de cancer du sein (indiqués par leurs numéros respectifs) avec les séquences références du <i>Mouse Mammary Tumor Virus</i> (MMTV) et <i>Human Mammary Tumor like Virus</i> (HMTV) publiés dans la base de données GenBank (numéros d'accès AF243039 et AY152721, respectivement).....	123
Figure V-3: Courbes de survie globale (a) et de survie sans rechute (b) des patientes atteints de cancer du sein en Tunisie en fonction du statut du virus MMTV-like dans les tumeurs.....	126
Figure VI-1 : Exemples représentatifs de gel d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium après électrophorèse des produits d'amplification par PCR pour la détection des papillomavirus humains dans des cas de cancer du sein.....	138
Figure VI-2 : Exemples représentatifs de gel d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium après électrophorèse des produits d'amplification par PCR spécifique pour la détection des papillomavirus humains suivants : a : HPV16, b : HPV18, c : HPV31, d : HPV33.....	139

Figure VII-1: Exemples représentatifs de gels d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium après électrophorèse des produits d'amplification par PCR pour la détection des herpesvirus humains dans des cas de cancer du sein.....	150
Figure VII-2 : Histogramme représentant la fréquence de l'hyperméthylation des 15 gènes analysés (a) et l'index de méthylation (b) dans les cancers du sein EBV-positifs (barres pleines) et les cancers du sein EBV-négatifs (barres vides).....	152
Figure VII-3: Courbes de survie globale (a) et de survie sans rechute (b) des patients atteints de cancer du sein en Tunisie en fonction de la présence et l'absence du virus EBV dans les tumeurs.....	154

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Classification histologique des carcinomes mammaires selon l’OMS.....	2
Tableau I-2 : Pathologies humaines associées à la présence du virus SV40.....	19
Tableau I-3 : Pathologies associées aux papillomavirus humains.....	27
Tableau II-1 : Amorces utilisées pour l’amplification d’une séquence du gène de la β -globine.....	47
Tableau II-2 : Amorces utilisées pour l’amplification de la séquence spécifique de la région de transcription précoce du virus SV40 et la sonde interne utilisée dans la technique de Southern blot.....	48
Tableau II-3 : Amorces utilisées pour l’amplification des séquences de la région de transcription tardive ainsi que la région régulatrice de la transcription appartenant au génome du virus SV40.....	51
Tableau II-4 : Amorces utilisées pour l’amplification de la région <i>env</i> du génome du virus MMTV-like...	54
Tableau II-5 : Amorces utilisées pour la détection et le typage des papillomavirus humains.....	57
Tableau II-6 : Amorces utilisées pour la détection des herpesvirus humains.....	59
Tableau II-7 : Liste des anticorps utilisés dans l’étude immunohistochimique.....	63
Tableau II-8 : Récapitulatif des gènes analysés au cours de ce travail.....	70
Tableau II-9 : Amorces utilisées pour contrôler la qualité de l’ADN après traitement.....	73
Tableau II-10 : Amorces utilisées pour l’analyse du statut de méthylation de 15 gènes suppresseurs de tumeurs.....	75
Tableau III-1 : Analyse comparative des caractéristiques clinico-pathologiques entre les cas de cancer du sein SV40-positifs et les cas SV40-négatifs.....	90
Tableau IV-1 : Récapitulatif des résultats de la fréquence de méthylation des gènes étudiés par PCR spécifique à la méthylation dans ce travail.....	101
Tableau V-1 : Analyse comparative des caractéristiques clinico-pathologiques entre les cancers du sein MMTV-like positifs et les cas MMTV-like négatifs.....	125
Tableau VI-1 : Récapitulatif des travaux concernant la recherche des HPV dans le cancer du sein à travers le monde.....	144
Tableau VII-1 : Analyse comparative des caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein EBV-positifs et EBV-négatifs.....	153
Tableau VII-2 : Récapitulatif des travaux concernant la recherche de l’EBV dans le cancer du sein à travers le monde.....	160

Introduction générale

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, avec plus de 800 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde (Parkin *et al.*, 2003). Il représente la première cause de mortalité féminine dans la tranche d'âge de 35 à 55 ans (Moss, 1997), constituant ainsi un sérieux problème de santé publique. Il est responsable de 20% des décès dus aux cancers (Ferly *et al.*, 2002). En Tunisie, le cancer du sein représente 25% des tumeurs malignes de la femme (Ben Abdallah *et al.*, 1997; Korbi *et al.*, 1995). Chaque année 800 à 1000 nouveaux cas de cancers du sein sont diagnostiqués en Tunisie, soit une incidence standardisée de 20/100 000 femmes par an (Maalej *et al.*, 1999 ; Ben Ahmed *et al.*, 2002). Ce cancer se caractérise en Tunisie par la fréquence particulièrement élevée des formes évoluées. En effet, les patientes tunisiennes consultent le plus souvent tardivement avec un délai moyen de 6 mois et une taille tumorale moyenne de 50 mm (Ben Ahmed *et al.*, 2002).

De nos jours, plusieurs facteurs de risque de développement du cancer du sein sont reconnus, tels que les antécédents familiaux de cancer du sein, l'âge avancé, la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité et l'obésité. Mais, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition, en particulier les gènes BRCA1 et 2, impliqués dans 5-10% des cas de cancer du sein. Néanmoins, certains facteurs étiologiques sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement du cancer du sein et les virus restent à l'heure actuelle les pathogènes associés aux cancers les plus étudiés. En effet, l'implication de nombreux virus est aujourd'hui reconnue dans le développement de différents cancers tels que les associations HPV (Human papillomavirus) et cancer du col utérin, HHV8 (Human papillomavirus-8) et sarcome de Kaposi, EBV (Epstein-Barr virus) et lymphome de Burkitt ou carcinome indifférencié du cavum.

De nombreux virus ont été soupçonnés dans l'étiologie des cancers du sein, et cela depuis la découverte par Bittner en 1936 que l'induction des tumeurs mammaires chez la souris est causée par un virus appelé MMTV pour « Mouse Mammary Tumor Virus ». Des séquences homologues au gène *env* du MMTV ont récemment été mises en évidence dans une proportion importante de cancers du sein sporadiques chez l'Homme, indiquant une étiologie virale possible du cancer du sein.

Depuis de nombreuses années, l'hypothèse selon laquelle un rétrovirus homologue au virus MMTV soit impliqué dans l'étiologie du cancer du sein chez l'Homme a fasciné les scientifiques, mais cela n'a jamais pu être démontré de manière convaincante. L'intérêt pour cette hypothèse s'est largement amplifié avec le développement des techniques de la biologie moléculaire et surtout de la PCR, qui ont permis à Wang (Wang *et al.*, 1995) de développer une technique visant la détection de séquences d'ADN homologues aux séquences du virus MMTV. Utilisant cette approche Wang et ses collaborateurs ont détecté des séquences du gène *env* du virus MMTV dans 30-40% des cas de cancer du sein chez des femmes dans diverses populations (Wang *et al.*, 1995).

Durant ces dernières années, d'autres équipes ont aussi signalé que le virus EBV pourrait être associé à la pathogenèse de cas sporadiques de cancer du sein chez l'Homme. Utilisant différentes techniques de PCR, d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, l'EBV a été retrouvé dans 2 à 66% de cas de cancer du sein (Gaffey *et al.*, 1993 ; Bonnet *et al.*, 1999 ; Lespagnard *et al.*, 1995 ; McCall *et al.*, 2001 ; Serraino *et al.*, 2001 ; Preciado *et al.*, 2005 ; Perkins *et al.*, 2006), mais cette association reste à ce jour un sujet de large controverse.

D'autre part, il a été démontré, *in vitro*, que la transfection de cellules épithéliales mammaires humaines par les virus HPV du type 16 ou 18 pouvait entraîner leur transformation en cellules cancéreuses (Band *et al.*, 1990 ; Wazer *et al.*, 1995). Ceci a soulevé l'hypothèse que les HPV pourraient être étiologiquement liés à certains cas de cancer du sein. Cependant, à la différence du carcinome du col utérin, qui est presque toujours associé aux HPV, le rôle de ces virus dans le développement du cancer du sein demeure un sujet de discussion. En effet, certaines études ont rapporté la détection de l'ADN des HPV dans des tumeurs mammaires, particulièrement les types 16, 18 et 33 (Di Lonardo *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002 ; Damin *et al.*, 2004 ; Widschwendter *et al.*, 2004 ; Kan *et al.*, 2005 ; de Villiers *et al.*, 2005 ; Kroupis *et al.*, 2006 ; Choi *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2008 ; Akil *et al.*, 2008 ; Mendizabal-Ruiz *et al.*, 2009 ; Cantu de Leon *et al.*, 2009), mais d'autres études n'ont pas retrouvé ces virus dans le cancer du sein (Wrede *et al.*, 1992 ; Gopalkrishna *et al.*, 1996 ; Bratthauer *et al.*, 1992 ; Lindel *et al.*, 2007 ; de Cremoux *et al.*, 2008).

Au cours des dernières années, différents laboratoires ont signalé la présence du polyomavirus SV40 dans plusieurs types de tumeurs humaines, y compris les tumeurs gliales du cerveau (Bergsagel *et al.*, 1992), les mésothéliomes (Carbone *et al.*, 1994), les ostéosarcomes

(Yamamoto *et al.*, 2000), les lymphomes (Vilchez *et al.*, 2002 ; Amara *et al.*, 2007), les hépato-carcinomes (Wong *et al.*, 2003), et les cancers de la thyroïde (Pacini *et al.*, 1998). Le pouvoir oncogénique du virus SV40 est en grande partie dû à l'expression d'une oncoprotéine virale appelée antigène grand T (Tag). Selon plusieurs études, l'oncoprotéine Tag induit la transformation néoplasique cellulaire par le biais de l'interaction et de l'inactivation fonctionnelle des produits d'expression de deux gènes suppresseurs de tumeur p53 (Mietz *et al.*, 1992) et pRb (Dyson *et al.*, 1989), induisant ainsi des anomalies dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

Deux études récentes indiquent la capacité du virus SV40 à transformer *in vitro* des cellules mammaires normales en cellules tumorales. La première étude a porté sur un modèle de souris transgénique exprimant l'oncoprotéine Tag du virus SV40 et conçue pour l'étude du cancer du sein. Dans ce modèle il a été mis en évidence une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs P53 et Rb. Suite à cette inactivation, se produit un développement anarchique et incontrôlé d'un clone cellulaire mammaire aboutissant à l'apparition chez ces souris d'un carcinome mammaire ressemblant fortement aux cancers du sein chez l'Homme (Green *et al.*, 2000). La deuxième étude a été réalisée sur des cultures de cellules mammaires humaines normales visant à déterminer les événements minimums nécessaires à la transformation maligne des cellules ; il a été prouvé que l'introduction de trois gènes codants respectivement pour l'oncoprotéine Tag du virus SV40, la sous-unité catalytique de la télomérase et l'oncoprotéine H-RAS, aboutit à une transformation maligne de ces cellules épithéliales mammaires (Elenbaas *et al.*, 2001). Mais paradoxalement à ce jour, aucune étude n'a tenté de vérifier si ce virus est impliqué dans le développement du cancer du sein chez l'Homme.

D'autre part, il a été rapporté, récemment, que la présence du virus SV40 dans les mésothéliomes humains était associée à l'hyperméthylation aberrante de la région promotrice de certains gènes suppresseurs de tumeurs (Toyooka *et al.*, 2001 ; Toyooka *et al.*, 2002), suggérant que le virus SV40 pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'hyperméthylation dans ce type de cancer. Actuellement, il semble de plus en plus clair que l'hyperméthylation aberrante de l'ADN joue un rôle primordial dans le processus de la cancérogenèse (Baylin *et al.*, 1998; Herman, 1999; Esteller, 2003). Dans les cancers, l'hyperméthylation des régions promotrices des gènes est l'altération épigénétique la plus souvent décrite ; elle est retrouvée dans presque tous les types de néoplasies et associée à l'inactivation transcriptionnelle de certains gènes, en particulier les gènes suppresseurs de tumeurs conférant ainsi un avantage aux cellules néoplasiques (Mompalmer et Bovenzi., 2000 ; Das et Singal, 2004 ; Esteller *et al.*,

2001 ; Esteller et Herman, 2002b ; Herman et Baylin 2003 ; Jones, 1996 ; Jones et Larid 1999 ; Jones et Baylin, 2002).

La mise en évidence de l'implication des virus dans le cancer du sein apparait donc cruciale pour la compréhension de la pathogénie de ce cancer et pour le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce travail de thèse nous nous sommes proposés d'évaluer la prévalence d'un large spectre de virus (SV40, MMTV-like, papillomavirus et herpesvirus) dans le cancer du sein chez la femme Tunisienne et de déterminer les caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires des cancers du sein associés à ces virus.

Chapitre I
Synthèse bibliographiques

I.1. Le cancer du sein

I.1.1. Définition

La notion de « cancer du sein » relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif. Le terme de « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes, potentiellement agressives, du sein tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes.

Le terme « carcinome » ou « épithélioma » est parfois utilisé, comme synonyme de « cancer ». En réalité le carcinome est un terme spécifique de morphologie microscopique (histologique) qui désigne les types les plus fréquents du cancer du sein d'origine épithéliale.

La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir des cellules épithéliales des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinomes canaux) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires. Dans de rares cas, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en carcinome in situ sans rupture de la lame basale, par opposition au carcinome infiltrant (Saglier et Antoine, 1996). Il existe 4 types architecturaux de carcinomes canaux in situ (massif, cribriforme, papillaire et comédo) dont le pronostic est favorable. Malheureusement, le carcinome est souvent infiltrant, ses formes les plus fréquentes sont le carcinome canalaire infiltrant (85%) et le carcinome lobulaire infiltrant (5%). Mais il existe d'autres formes rares de carcinomes infiltrants, tels que les carcinomes médullaires, les carcinomes mucineux (ou colloïdes), les carcinomes tubuleux, les carcinomes apocrines et la maladie de Paget (tumeur du mamelon). Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares, elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésenchymateux, les angiosarcomes et les lymphomes non hodgkiniens primitifs du sein (Tubiana et Koscielny, 1987; 1990). Le **Tableau I-1** montre la classification histologique des cancers mammaires préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (Tavassoli, 2003).

Tableau I-1: Classification histologique des carcinomes mammaires selon l’OMS (Tavassoli *et al.*, 2003).

Tumeurs épithéliales non infiltrantes
Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) (CCIS)
Carcinome lobulaire in situ (CLIS)
Tumeurs épithéliales infiltrantes
Carcinome canalaire infiltrant de forme commune
Carcinome canalaire infiltrant avec composante intra-canalaire prédominante
Carcinome lobulaire infiltrant
Carcinome mucineux
Carcinome médullaire
Carcinome papillaire
Carcinome tubuleux
Carcinome adénoïde kystique
Carcinome sécrétant juvénile
Carcinome apocrine
Carcinome métaplasique de type épidermoïde
Carcinome métaplasique de type à cellules fusiformes
Carcinome métaplasique de type chondroïde et osseux
Carcinome métaplasique de type mixte
Maladie de Paget du mamelon

I.1.2. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Une femme sur 12 en sera atteinte à un moment de sa vie et il représente la première cause de mortalité féminine dans la tranche d’âge de 35 à 55 ans (Moss, 1997). A l’échelle mondiale, l’incidence du cancer du sein (nombre de nouveaux cas recensés pour 100000 femmes et par an) semble plus forte dans les pays industrialisés (Ferly *et al.*, 2002), et les taux les plus élevés sont constatés en Europe de l’Ouest, aux États-Unis et au Canada. En France plus de 25 000 cancers du sein sont diagnostiqués chaque année. Il représente 8 à 10% des tumeurs féminines dans le monde, et est responsable de 20% des décès dus aux cancers (Ferly *et*

al., 2002).

En Tunisie, le cancer du sein représente 25 à 27% des tumeurs malignes féminines (Ben Abdallah *et al.*, 1997; Korbi *et al.*, 1995). Chaque année 800 à 1000 nouveaux cas de cancers du sein sont diagnostiqués en Tunisie, soit une incidence standardisée de 20/100 000 femmes par an (Maalej *et al.*, 1999 ; Ben Ahmed *et al.*, 2002). Du 1^{er} janvier 1990 au 30 juin 1998, 730 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués uniquement dans la région du centre tunisien (Ben Ahmed *et al.*, 2002). Ce cancer se caractérise en Tunisie par la fréquence particulièrement élevée des formes évoluées. En effet, les patientes tunisiennes consultent le plus souvent tardivement avec un délai moyen de 6 mois et une taille tumorale moyenne de 50 mm (Ben Ahmed *et al.*, 2002). Le développement des moyens de dépistage pourrait expliquer la fréquence dégressive (48,7% en 1974 contre 6,2% en 1999) des formes inflammatoires du cancer du sein dont le profil clinique est alarmant. Le cancer inflammatoire du sein (équivalent de T4d) intimement lié à la Tunisie était très probablement surestimé : les cancers qui étaient classés en “poussée évolutive” dans de nombreuses publications seraient en réalité localement évolués et négligés (Maalej *et al.*, 1999 ; Tabbane *et al.*, 1985).

Le cancer du sein s’observe à tout âge. Son pic de fréquence se situe entre 50 et 70 ans. Il est rare avant 30 ans et il est exceptionnel avant 20 ans. L’âge moyen en Tunisie est de 50 ans avec 2 pics qui se situent aux alentours de 45-50 ans et 60-65 ans (Maalej *et al.*, 1999).

I.1.3. Facteurs pronostiques

Les éléments de pronostic du cancer du sein sont de plusieurs ordres : cliniques, histologiques et biologiques.

I.1.3.1. Facteurs cliniques

a- La classification TNM

Plus la connaissance des tumeurs s’améliore, plus l’hétérogénéité s’accroît. Il est nécessaire de pouvoir regrouper les tumeurs en groupes homogènes sur un plan pronostique et thérapeutique. La classification TNM proposée par Pierre Denoix a le mérite de répondre à ces exigences.

Elle a été retenue comme base de classification par le comité de nomenclature et de statistique de l’UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (Broeders *et al.*, 2000).

Elle est basée sur le principe de l'extension anatomique déterminé par la clinique et l'histopathologie. A la base du système T (tumor-tumeur), N (nodes-ganglions), M (metastasis-métastases) il y a l'idée de coder l'extension locale, régionale et générale.

D'une façon générale, on associe à ces trois lettres des chiffres (dont la valeur augmente quand augmente la gravité) qui varie de 0 à 4 pour le T, de 0 à 3 pour le N, et soit 0 soit 1 pour le M. Cela conduit à un grand nombre de possibilités TNM.

b- L'âge

L'âge est le facteur de risque le plus important du cancer du sein, avec une courbe d'incidence monotone augmentant de 30 à 70 ans. Les cancers survenant avant 50 ans représentent 15 à 20% des cancers du sein. L'âge moyen de survenue du cancer du sein en Tunisie est de 55 ans. A taille égale, le cancer du sein est beaucoup plus agressif chez une femme ménopausée que chez une femme jeune.

c- Le délai de prise en charge

Le retard de prise en charge thérapeutique assombrit nettement le pronostic. Une méta-analyse de 87 études, a révélé que les patientes pour lesquelles ce délai était supérieur à 3 mois avaient un taux de survie de 12 % inférieur à celui des femmes prises en charge plus rapidement (Richards *et al.*, 1999). Il faut souligner la fréquence du diagnostic tardif dans notre pays, en effet une grande proportion des cancers diagnostiqués sont des formes localement évoluées (T3, T4), avec une taille moyenne de 50 mm et une patiente sur cinq présente des métastases lors du diagnostic.

I.1.3.2. Facteurs anatomopathologiques

a- Le type histologique

En général, le type histologique n'est pas un critère utilisé en pratique, même si il est reconnu que certains types histologiques sont de meilleurs pronostics tels que : les carcinomes lobulaires, mucineux (colloïdes) et médullaires.

b- La taille tumorale

Elle est liée à l'envahissement ganglionnaire même si à statut ganglionnaire identique l'augmentation de la taille tumorale est associée à un pronostic défavorable (Carter *et al.*, 1989). Une taille tumorale supérieure à 2 cm représente un facteur de mauvais pronostic.

c- Le grade histopronostique SBR

L'évolution d'un cancer est liée à son degré d'anaplasie par rapport au tissu d'origine. En effet, plus une tumeur est anaplasique plus l'évolution est péjorative. La classification histopronostique la plus utilisée actuellement est le grade de « Scarff, Bloom and Richardson » (SBR) (Bloom and Richardson, 1957), revu par le groupe de Nottingham (Amat *et al.*, 2002), repris par l'European Community Working group for Breast Pathology et préconisé par l'OMS.

La méthode du *grading* **SBR** consiste à évaluer trois paramètres morphologiques:

- La formation de tubules ou degré de différenciation
- Le pléomorphisme nucléaire ou degré d'anisonucléose
- La fréquence des mitoses.

Un score allant de 1 à 3 est attribué à chacun de ces paramètres. Les différents scores sont additionnés pour obtenir le grade histologique global :

- Grade I = score 3-5 (pronostic favorable)
- Grade II = score 6-7 (pronostic intermédiaire)
- Grade III = score 8-9 (pronostic sombre)

Les cancers de grade I sont mieux différenciés, tandis que les cancers de grade III le sont moins. Les cancers indifférenciés ont habituellement une évolution plus grave et plus rapide que les cancers différenciés (Amat *et al.*, 2002).

d- L'envahissement ganglionnaire

Le cancer du sein est très lymphophile. L'envahissement ganglionnaire est habituellement considéré comme le plus important des facteurs pronostiques. Sa présence est corrélée à la taille de la tumeur et au grade SBR. D'autres éléments tels que la taille ganglionnaire, l'importance de l'envahissement et la rupture capsulaire sont également discutés. Actuellement, beaucoup d'équipes s'intéressent au caractère micro métastatique de l'envahissement déterminé par immuno-marquage (Mauri *et al.*, 1999).

I.1.3.3. Facteurs biologiques

a- Les récepteurs hormonaux

Il existe 2 types de récepteurs hormonaux : les récepteurs à l'œstrogène (RE) et à la progestérone (RP). La première étude de la valeur pronostique des récepteurs aux œstrogènes publiée par Knight en 1977 indiquait une fréquence de récurrence nettement plus importante pour les patientes RE- que pour les malades RE+ (Knight *et al.*, 1977). Il existe

plusieurs méthodes de dosage de ces récepteurs, la référence étant la méthode de dosage immunohistochimique. Il est classique de distinguer les tumeurs de bon pronostic RE+ RP+ de celles de mauvais pronostic RE- RP-. Les carcinomes mammaires sont plus ou moins sensibles à l'hormonothérapie en fonction de l'état de ces récepteurs hormonaux.

b- HER2/neu (c-erb B2)

Ce gène HER2/neu est un proto-oncogène qui code pour un récepteur transmembranaire partageant une forte homologie de séquence avec le récepteur pour l'*epidermal growth factor* (EGF) (King *et al.*, 1985 ; Slamon *et al.*, 1987, 1989 ; Liur *et al.*, 1992). La protéine HER2 est surexprimée suite à l'amplification de son gène dans 15 à 30% des carcinomes mammaires (Slamon *et al.*, 1987, 1989). Ces anomalies peuvent être mises en évidence soit par la détection de l'amplification de ce gène dans le noyau par hybridation in situ, soit par analyse du niveau d'expression de ce gène par immunohistochimie (Dittadi *et al.*, 1993 ; Kallioniemi *et al.*, 1992). Ainsi la détermination du statut d'expression de HER2 dans les carcinomes mammaires aurait une valeur pronostique péjorative et une valeur prédictive de la réponse à la chimiothérapie et/ou à l'hormonothérapie. Il est actuellement connu que les carcinomes mammaires surexprimant HER2 sont habituellement de hauts grades et de mauvais pronostic.

c- Les marqueurs de prolifération

À côté de l'activité mitotique qui doit impérativement être évaluée pour établir le grade SBR, des marqueurs de prolifération peuvent être utilisés, tels que l'analyse de l'expression de Ki67 par immunohistochimie ou la détermination du pourcentage de cellules en phase S (synthétisant l'ADN) par cytométrie en flux ou en analyse d'image (Keshgegian et Cnaan, 1995).

Il a été démontré que l'expression de Ki67 dans les carcinomes mammaires est associée à un mauvais pronostic, mais les seuils de positivité varient dans la littérature de 1 à 20 %.

D'autre part, les différentes études ont montré que les taux de rechute et de mortalité étaient augmentés lorsque les tumeurs comportaient une proportion élevée de cellules en phase S (Wenger *et al.*, 1998). Une corrélation positive aurait aussi été démontrée entre le taux de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante et le pourcentage de cellules en phase S (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

d- La ploïdie

Cette technique évalue la quantité d'ADN dans les cellules tumorales (Hadley *et al.*, 1993). Elle permet d'identifier les tumeurs dites aneuploïdes plus agressives par opposition aux tumeurs diploïdes dont le contenu en ADN est normal.

e- Gène P53

Le gène *p53* localisé sur le chromosome 17 est un gène suppresseur de tumeur. Des mutations de ce gène ont été identifiées dans environ un tiers des carcinomes mammaires (Elledge et Allred, 1994). La recherche des mutations de *p53* pourrait représenter un marqueur pronostique intéressant pour les tumeurs sans envahissement ganglionnaire (Allred *et al.*, 1993), et permettrait d'identifier un sous-groupe de patientes répondant mieux à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie (Bergh *et al.*, 1995 ; Hawkins *et al.*, 1996). Malheureusement il n'y a pas, à l'heure actuelle, de consensus sur l'utilité des recherches de mutations de *p53* pour la prise en charge des patientes ayant un cancer du sein.

f- Autres

L'expression de *bcl-2* serait un marqueur de bon pronostic (Elledge *et al.*, 1995). Elle est associée à l'expression des récepteurs à l'œstrogène et s'accompagnerait d'une survie sans rechute plus longue et d'une meilleure réponse au tamoxifène.

La *protéine pS2* dont l'expression dans le cytoplasme serait induite par les œstrogènes, représente un témoin de la présence d'un récepteur aux œstrogènes fonctionnel (Schwartz *et al.*, 1991 ; Soubeyran *et al.*, 1996). Il a été démontré que les tumeurs exprimant pS2 auraient un meilleur pronostic et qu'elles répondraient mieux au tamoxifène, contrairement aux tumeurs négatives pour pS2.

La *cathepsine D*, qui est une enzyme lysosomiale, serait surexprimée dans les cancers du sein de mauvais pronostic : grade histologique élevé, taille importante, envahissement ganglionnaire (Gion *et al.*, 1995 ; Thorpe *et al.*, 1989). Elle est associée à un risque accru de rechute et à une diminution de la survie sans récurrence. Cependant, l'expression de la cathepsine D par les cellules tumorales ne semble pas représenter un facteur pronostique indépendant (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

La *surexpression de l'EGFR* a été démontrée dans certains carcinomes mammaires n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (Chrysogelos et Dikson, 1994 ; Fox *et al.*, 1994 ; Toi *et al.*, 1994). Elle serait associée à une mauvaise réponse au tamoxifène, mais actuellement aucun consensus quant à la relation entre la surexpression du récepteur à l'EGF et la survie sans récurrence n'a été établi.

I.1.4. Facteurs de risque

Les facteurs de risque du cancer du sein sont de trois types : hormonaux, génétiques et environnementaux.

I.1.4.1. Facteurs de risque hormonaux

L'équilibre oestroprogestatif permet le développement harmonieux de la glande mammaire. Ainsi, l'hyperoestrogénie relative ou absolue entraîne une hyperplasie épithéliale, un œdème du conjonctif source de sclérose péricanalaire et selon la part prépondérante de ces anomalies de base, peuvent se constituer des ectasies plus ou moins sécrétantes des galactophores principaux, une mastose sclérokystique, des hyperplasies régulières ou atypiques (adénose, épithéliose, papillomatose, hyperplasie atypique lobulaire ou galactophorique) , s'accompagnant parfois d'une prolifération mésenchymateuse : fibro-adénome ou tumeur phyllode. Cette hyperoestrogénie relative ou absolue varie en fonction de la vie génitale de la femme, et d'éventuels traitements hormonaux. Ainsi, la ménarche précoce, la ménopause tardive, la nulliparité, l'âge tardif de la première grossesse, l'absence d'allaitement et la prise d'œstrogènes seuls de façon prolongée augmentent le risque du cancer du sein. Le développement de la pathologie épithéliale est lié à des facteurs hormonaux (hyperoestrogénie), mais l'hormonodépendance des tumeurs du sein est inconstante : 30 à 35% des cancers du sein métastasés répondent à une hormonothérapie.

I.1.4.2. Facteurs de risque génétiques

Le risque relatif est multiplié par 4 pour une femme ayant un parent de premier degré ayant développé un cancer du sein. En Tunisie, les antécédents familiaux de cancer du sein sont notés dans 14% des cas, le lien de parenté étant de premier degré (mère et/ou sœur) dans 64% des cas (Ben Ahmed *et al.*, 1997). Plus le lien de parenté est étroit, plus le facteur de risque est élevé. Une transmission héréditaire pourrait être à l'origine de 5 à 10% des cancers du sein. Le risque cumulé au cours de la vie d'une femme de développer un cancer du sein sporadique est de 8 à 10% (soit une femme sur 10 ou 12). Si une femme est porteuse d'un gène de prédisposition héréditaire ce risque passe à plus de 80% (Eisinger *et al.*, 1995 ; 1999). Des études de liaisons génétiques effectuées dans des familles à cas multiples de cancer du sein ont permis de localiser les gènes *BRCA1* et *BRCA2* qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs. Une mutation de ces gènes est retrouvée dans 3 à 5% des cancers du sein (Miki *et al.*, 1994 ; Tavtigian *et al.*, 1996). Une personne porteuse de

mutation au niveau de ces gènes a un risque de 80 à 90% de développer un cancer du sein, généralement avant l'âge de 50 ans, mais la prévalence de ces mutations semble être faible (Futreal *et al.*, 1994). Un troisième gène *P53* est à l'origine de tableaux familiaux très particuliers de cancer du sein associant principalement des cas de sarcomes, de tumeurs cérébrales et d'hémopathies (Blackwood *et al.*, 1992).

I.1.4.3. Facteurs de risque environnementaux

- Le rôle des facteurs alimentaires avec excès de graisse animale, souvent source d'obésité, est discuté et expliquerait l'incidence croisée avec le cancer de l'endomètre. L'obésité après 50 ans augmente le risque de cancer du sein d'environ 20% (Kelsey *et al.*, 1996).
- Le rôle de l'irradiation a été prouvé par les explosions atomiques d'Hiroshima, ainsi que les expositions professionnelles aux polluants environnementaux et les agents chimiques (Henderson, 1993 ; Calaf et Russo, 1993 ; Krajcinovic *et al.*, 2001).
- Le niveau socio-économique : il est mis en évidence par la plupart des études que les femmes qui ont un niveau de vie élevée ont un risque multiplié par 2.
- Le tabagisme et la consommation d'alcool augmenterait le risque de 200% (Longneker et Tseng, 1998).
- Le facteur viral : de multiples études sont en cours dans ce domaine étant donné qu'une implication virale a déjà été prouvée pour plusieurs tumeurs : les papillomavirus et le cancer du col utérin, le virus d'Epstein-Barr et le lymphome de Burkitt et le cancer du Nasopharynx, le virus de l'hépatite B et le cancer primitif du foie, le virus HTLV1 et certaines leucémies et lymphomes T, le virus HIV et le sarcome de Kaposi. En effet, les virus ont la faculté d'intégrer leur génome dans l'ADN des cellules hôtes. On peut donc comprendre dans quelle mesure, ils peuvent être impliqués dans cette pathologie, puisqu'ils pourraient générer des mutations génétiques engendrant le cancer. L'implication du virus MMTV dans le développement du cancer mammaire chez la souris est bien admise (Medina *et al.*, 1976, Clarke *et al.*, 1990). En effet, cet agent infectieux se transmet de génération en génération par le lait maternel et peut s'intégrer dans le génome de la cellule perturbant l'activité des proto-oncogènes et accélérant la croissance cellulaire (Medina, 1996). Des séquences d'ADN montrant une homologie avec celles du virus MMTV ont été détectées dans le cancer du sein humain ce qui suggère que ce virus nommé MMTV-like pourrait être la forme humaine du virus de la tumeur

mammaire de souris (Ford *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 1985, 1998). Ces découvertes n'ont pas été confirmées par d'autres auteurs (Witt *et al.*, 2003, Mant *et al.*, 2004). Une association entre les papillomavirus humains (HPV) et le cancer du sein est très controversée. Certaines études ont décrit la présence des HPV dans le cancer du sein dans des proportions variables (Di Lonardo *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 1999), d'autres études montrent qu'ils ne sont pas impliqués (Bratthauer *et al.*, 1992 ; Wrede *et al.*, 1992 ; Gopalkrishna *et al.*, 1996 ; Czerwenka *et al.*, 1996). Depuis quelques années, l'étude du virus d'Epstein-Barr (EBV) prend de plus en plus d'importance. Ce virus a déjà été associé au développement de différents cancers : le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin, et le carcinome du nasopharynx. Mais, les différentes études sur le cancer du sein menées jusqu'à présent sont contradictoires. En effet, certaines études n'ont pas trouvé de corrélation entre ce virus et le cancer du sein (Glaser *et al.*, 1998 ; Chu *et al.*, 1998 ; Lespagnard *et al.*, 1995), d'autres ont constaté une association significative (Bonnet *et al.*, 199 ; Grinstein *et al.*, 2002 ; Labrecque *et al.*, 1995).

I.1.4. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la carcinogenèse mammaire

La cancérogenèse mammaire est un phénomène multifactoriel, impliquant plusieurs gènes, aussi bien dans les formes héréditaires (anomalies génétiques constitutionnelles) que dans les formes sporadiques (anomalies génétiques somatiques). Les modifications moléculaires les plus fréquemment décrites dans le cancer du sein sont des amplifications d'oncogènes, et des mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs (Thompson et Easton 2004). Les mutations peuvent toucher les chromosomes (nombre aberrant de copies, translocations, délétions, perte d'hétérozygotie, extension des télomères), l'ADN (mutations ponctuelles, altérations des microsatellites, évènements épigénétiques), l'ARN (sous ou surexpression, mutations), et les protéines (altérations ou modifications structurales, changement d'activité enzymatique, localisation, altération du pattern d'expression). Par ailleurs, les modifications génétiques les plus fréquemment observées sont les pertes d'hétérozygotie concernant soit le chromosome ou un bras du chromosome (1, 3p, 6q, 7q, 8p, 11, 13q, 16q, 17, 18p et 22q) (Bièche et Lidereau, 1995 ; Bièche *et al.*, 1999). A nos jours, de nombreuses modifications géniques ont donc été décrites dans les cancers du sein. Le nombre d'oncogènes et d'anti-oncogènes recensés ne cesse d'augmenter ; ces gènes codent pour des protéines impliquées dans de nombreuses cascades de transduction telles que les ligands et les récepteurs aux facteurs de croissance,

des facteurs de transcription ou encore des protéines régulatrices du cycle cellulaire. Comme pour toute tumeur solide, l'hétérogénéité du cancer du sein implique qu'il existe plusieurs voies menant à la carcinogenèse mammaire avec des étapes différentes. Le cancer solide n'est pas un état statique, mais un processus pathologique évolutif dans lequel les cellules cancéreuses en mutation ne prennent l'ascendant sur les autres que si leurs modifications leur confèrent un avantage sélectif (Hanahan et Weinberg, 2000).

Dans le cancer du sein, l'activation des oncogènes par amplification génique a été fréquemment décrite (Bièche et Lidereau, 1997) ; les mutations ponctuelles, les insertions ou les réarrangements géniques ont été moins observés. Le plus souvent une amplification génique est généralement associée à des niveaux élevés d'expression d'ARNm et de protéine. Cependant, il existe des cas de surexpression sans amplification du gène. Les amplifications les plus fréquentes dans le cancer sein concernent les oncogènes *myc*, *ccn1* et *HER2/neu*. Ces modifications au niveau des oncogènes se traduisent par des sites d'expression aberrants ou des niveaux d'expression anormalement élevés, et en conséquence, par des gains de fonctions tendant à favoriser la prolifération des cellules tumorales. La mise en évidence de gènes suppresseurs de tumeurs et leurs études sont plus récentes, et tendent à montrer leur intervention dans la carcinogenèse au même titre que les oncogènes.

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent à différents niveaux de la vie de la cellule et sont communément subdivisés selon leur fonction, en garants de la stabilité du génome, inhibiteurs de la croissance cellulaire au sens large et modulateurs du microenvironnement cellulaire.

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette inactivation. Actuellement, les pertes d'hétérozygotie (ou perte d'allèles), les mutations et les altérations épigénétiques représentent les 3 événements les plus observés dans le cancer du sein lors de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Certaines pertes d'hétérozygotie ont été mises en évidence sur l'ensemble du génome des cellules cancéreuses mammaires. Cependant, certaines régions semblent plus fréquemment concernées, parmi lesquelles on cite les bras longs des chromosomes 1, 6, 7, 8, 11, 16, 17, 18 et 22 et les bras courts des chromosomes 1, 3, 11 et 17 (Bièche et Lidereau, 1995, 1997). Il existe souvent plusieurs régions délétées sur un même bras de chromosome ce qui implique vraisemblablement la participation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs.

Des mutations ponctuelles sont également impliquées dans le processus de cancérisation inactivant les gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi des mutations du gène *p53* (localisé dans la région 17q13), considéré comme l'un des gardiens du génome, sont retrouvées

dans environ 15 à 60% des cancers du sein. Par ailleurs, les altérations génétiques (mutations, délétions, amplifications et translocations chromosomiques) développeraient le cancer, et favoriseraient la progression tumorale. Ainsi, le plus souvent ces altérations touchent les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs conduisant la cellule tumorale vers un statut de plus en plus agressif. Ces altérations mènent à des désordres protéiques d'ordre qualitatif et/ou quantitatif au sein des cellules cancéreuses, se traduisant par des gains et des pertes de fonctions biologiques. Mais lors du processus de cancérogenèse, d'autres altérations peuvent avoir lieu, et en particulier des altérations épigénétiques.

En effet, l'empaquetage de l'ADN dans le noyau, sous forme de chromatine, joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique (Davie *et al.*, 1999), et tend à montrer son rôle dans les modifications de l'ADN observées dans les cellules cancéreuses, expliquant ainsi la levée d'inhibition pour certains gènes ou l'effet inverse pour d'autres. L'acétylation et la méthylation sont les altérations épigénétiques les plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs mammaires. Le degré d'acétylation des histones (protéines impliquées dans la structure de la chromatine) influence la compaction de la chromatine, et régule ainsi l'accès des facteurs généraux de transcription à l'ADN et, par conséquent, l'activité génique (Rountree *et al.* 2001). L'autre mécanisme de régulation épigénétique est la méthylation des cytosines regroupées sous la forme d'îlots CpG au niveau du promoteur de la transcription de certains gènes (Rountree *et al.*, 2001 ; Davie *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2001 ; Widschwendter et Jones, 2002). Par conséquent, la perte d'expression de ces gènes joue un rôle important dans le cancer, puisqu'il peut faciliter l'accumulation de dommages fait à l'ADN conduisant à la transformation maligne. Aujourd'hui plusieurs gènes, dont la perte d'expression va de paire avec l'état de méthylation, sont identifiés, tels que : RASSF1A, RE, cycline D2, p16, BRCA1... Cette voie d'altération de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur sera détaillée plus loin dans ce chapitre.

Avec cette vue d'ensemble, on constate que les données scientifiques suggèrent que la perte de l'expression d'un gène est associée à l'évolution du cancer. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les altérations épigénétiques ont lieu sont encore peu connus. Cependant, les protéines intervenant dans ces modifications d'empaquetage de l'ADN semblent représenter un nouvel aspect thérapeutique pour lutter contre les cancers. Outre les altérations observées au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs, d'autres gènes sont, eux aussi modifiés au cours de la cancérogenèse mammaire.

Ces différents mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine du déclenchement de la carcinogenèse mammaire surviendraient en réponse à une agression extérieure. Plusieurs facteurs ont déjà été incriminés tels des facteurs chimiques (tabac...), physiques (radiation ionisante...) et récemment des facteurs infectieux et plus précisément viraux font l'objet de plusieurs travaux de recherches.

I.2. Le virus simien 40 (SV40)

I.2.1. Épidémiologie et transmission du virus SV40

Le virus simien 40 (SV40) a été identifié en 1960 par Sweet et Hilleman (Sweet et Hilleman, 1960) dans des lignées de cellules rénales de singes verts africains qui servaient à préparer le vaccin anti-poliomyélitique du Dr. Jonas Salk en 1955 (Dang-Tan *et al.*, 2004). Ce virus fut appelé SV40 (SV pour Simian Vacuolating) en raison de sa capacité à induire la formation de vacuoles dans le cytoplasme des cellules rénales de singe et le numéro 40 correspond au numéro du virus dans le système de décompte des virus du singe Rhésus. Dans la nature, le virus SV40 se trouve chez les singes africains, en particulier le singe vert et le singe rhésus *Macaca mulatta*. Ce virus ne semble pas associé à quelques symptômes ou maladies et l'état d'infection chronique chez son hôte naturel semble totalement inoffensif.

Le virus SV40 a été incriminé comme contaminant de vaccins anti-poliomyélite. En effet, ces vaccins ont été préparés à partir de cellules rénales de singes rhésus provenant d'animaux naturellement infectés par le virus SV40 (Carbone *et al.*, 1997b ; Barbanti-Brodano *et al.*, 2004 ; Vilchez *et al.*, 2003a). Plusieurs études épidémiologiques estiment que presque cent millions de personnes aux États-Unis ont été exposées par imprudence à ce virus et ceci à travers le vaccin de la poliomyélite entre 1955 et 1963 (Vilchez *et al.*, 2003a ; Shah et Rollison, 2001). Ces vaccins ont été aussi distribués dans d'autres pays comme la Russie, la France, l'Allemagne, l'Italie, le Mexique, les pays de l'Europe de l'Est et probablement dans plusieurs autres pays mais aucune donnée épidémiologique n'est disponible (Vilchez *et al.*, 2003a,b ; Barbanti-Brodano *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que le virus SV40 a pu être transmis aux humains par réception du vaccin contaminé.

En effet, plusieurs constatations supportent l'idée que le virus SV40 est présent dans les tissus humains et peut être transmis dans la population humaine de façon directe ou indirecte et ceci indépendamment de l'administration du vaccin anti-poliomyélite contaminé (Barbanti-Brodano *et al.*, 2004). Des séquences du virus SV40 ont été détectées dans des échantillons de sang et de sperme et des virions SV40 ont été retrouvés dans l'urine et les eaux usées indiquant ainsi que les voies de transmission sanguine, sexuelle et oro-fécale peuvent être responsables de la propagation du virus SV40 chez les humains par infection horizontale (Barbanti-Brodano *et al.*, 2004).

L'intérêt porté à ce virus a récemment augmenté car il a été retrouvé dans certaines formes de cancers humains : les mésothéliomes, les tumeurs du cerveau, les tumeurs osseuses (Carbone *et al.*, 1997 ; Jasani *et al.*, 2001) et plus récemment, le virus SV40 a été associé à certains types de lymphomes (Shivapurkar *et al.*, 2002 ; Vilchez *et al.*, 2002 ; Amara *et al.*, 2007).

I.2.2. Structure et organisation du génome du virus SV40

Le virus SV40 appartient au genre polyomavirus qui fait partie de la famille des *papovaviridae*, qui dans la classification systématique des virus, fait partie du groupe défini comme virus à ADN bicaténaire dépourvu d'enveloppe. Les polyomavirus sont des virus de petite taille non enveloppés, ayant une capsidie icosaédrique de symétrie cubique mesurant 45 nm de diamètre. Trois protéines structurales composent la capsidie : VP1, VP2 et VP3. VP1 représente 75% de la masse protéique virale et contient un site antigénique commun à tous les polyomavirus. Le génome viral est constitué d'un ADN bicaténaire, circulaire, composé d'environ 5,2 Kb.

Le génome du virus SV40 comporte trois régions fonctionnelles distinctes exprimées pendant les phases précoces et tardives de l'infection. La région précoce se situe du côté proximal de l'origine de réplication codant pour l'antigène grand T (Ag-T) et l'antigène petit t (Ag-t). L'Ag-T est une protéine de liaison de l'ADN ayant une affinité élevée et une forte spécificité pour des séquences de 5 nucléotides situées près de l'origine de la réplication de l'ADN viral. La fixation de l'Ag-T sur ces sites joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la réplication. Le rôle de l'Ag-t est moins connu; cette protéine pourrait servir à activer la réplication virale.

La région tardive se situe du côté distal de l'origine de la réplication, codant pour les trois protéines virales de structure de la capsidie VP1, VP2 et VP3 ainsi que pour l'agnoprotéine. La région non codante ou de régulation se situe entre les deux précédentes, contenant l'origine de la réplication ainsi que les promoteurs des transcriptions (ARN messagers) précoces et tardives.

I.2.3. Cycle de réplication du virus SV40

Le virus SV40 n'induit pas de tumeur ni de transformation cellulaire chez son hôte naturel. Ainsi, dans les cellules de son hôte habituel (cellules permissives), l'infection est suivie d'une réplication du virus, d'une lyse cellulaire et d'une libération des virions (Butel *et al.*, 1999 ; Carbone *et al.*, 2003). Comme toute cellule permissive est ainsi tuée par la

réplication virale, elle échappe à toute transformation. Cependant, le potentiel transformant de ce virus peut apparaître dans les cellules non permissives, celles où la réplication virale est bloquée ; il arrive alors que le génome viral s'intègre à l'ADN de ces cellules et que l'expression des gènes viraux singuliers transforme la cellule infectée. Le virus SV40 initie l'infection par la liaison à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules hôtes susceptibles qui est le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) (Breau *et al.*, 1992 ; Anderson *et al.*, 1998 ; Norkin, 1999), expliquant son large tropisme et sa capacité d'infecter et d'induire la transformation de divers types cellulaires et tissulaires (Vilchez *et al.*, 2003a).

En effet, après la liaison à la surface cellulaire, le virus pénètre par endocytose (Anderson *et al.*, 1996), la vacuole migre vers le noyau où il y aura décapsidation de l'ADN et initiation de la transcription de la région précoce (White et Khalili, 2004). La réplication de l'ADN viral commence juste après l'accumulation des Ag-T phosphorylés qui se lient au site Ori (Lednicky et Butel, 2001). Le transcrit primaire de la région précoce donne des ARNm codant l'Ag-T et l'Ag-t. L'Ag-T et une large phosphoprotéine nucléaire essentielle pour la réplication de l'ADN viral, elle se lie à un site spécifique de la région régulatrice du génome pour initier la réplication (Strickler *et al.*, 1996) en favorisant l'ouverture de la double hélice (Zhen *et al.*, 1999) et le recrutement des protéines cellulaires nécessaires pour la synthèse d'ADN comme l'ADN polymérase et la protéine A de réplication (White et Khalili, 2004). De plus, en se liant au site spécifique au niveau de la région de régulation, l'Ag-T autorégule sa propre synthèse (Lednicky et Butel, 2001). Comme la réplication se poursuit, les gènes tardifs commencent à être exprimés. L'Ag-T stimule la transcription à partir du promoteur tardif et réprime celle du promoteur précoce. Les produits des gènes tardifs sont les protéines de la capsid (VP1, VP2 et VP3) qui se réunissent avec l'ADN viral répliqué pour former les virions qui seront libérés par lyse cellulaire (White et Khalili, 2004).

D'un autre côté l'ADN du virus SV40 peut être intégré dans l'ADN chromosomique des cellules hôtes spécialement au cours d'une infection non permissive (White et Khalili, 2004). Après pénétration dans le noyau cellulaire, l'ADN viral va être intégré à l'ADN cellulaire et sera répliqué au rythme des divisions cellulaires. Les gènes viraux précoces vont être transcrits, les ARN messagers transportés dans le cytoplasme et traduits. Les protéines précoces se répartissent alors entre le noyau et la membrane plasmique et leur présence continue dans cette cellule permissive y induit des caractéristiques tumorales nouvelles. Il est noté que l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN chromosomique des cellules hôtes n'est pas nécessaire pour la formation des tumeurs et que l'ADN épisomal

peut se trouver seul ou en association avec le génome viral intégré dans les cellules transformées (Lednicky et Butel, 2001).

I.2.4. Pouvoir transformant du virus SV40

Le virus SV40 est un virus oncogène capable de transformer les cellules humaines. En effet, le virus SV40 est l'un des premiers virus ayant permis de transformer *in vitro* une cellule normale en cellule tumorale.

Son rôle précis dans l'étiologie des tumeurs humaines est encore en cours de recherche (Shah, 1990). Le génome de ce polyomavirus encode 6 protéines virales: 3 protéines structurelles de la capsid (VP1, VP2 et VP3) et 3 protéines régulatrices (antigène grand T, antigène petit t et agnoprotéine). Étant donné que le génome des polyomavirus ne code pas pour des protéines de la réplication, ces virus doivent conduire les cellules hôtes en phase S où les protéines cellulaires de la réplication de l'ADN sont produites. Un des principaux mécanismes par lesquels se déroule l'oncogenèse est fonction des protéines précoces : l'antigène grand T et petit t.

L'Antigène grand T est une protéine phospho-nucléaire (Martini *et al.*, 2004), multifonctionnelle codée par la région précoce du génome viral (Shah, 1990). Tout d'abord, cette protéine induit la synthèse d'enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ADN et des ARN (synthèse des bases, polymérases...), elle provoque également la stimulation de la réplication de l'ADN cellulaire et active le passage de la cellule en phase S. Cette accumulation et le passage par un cycle de division, qui permet en cycle lytique la réplication conjointe des ADN cellulaires et viraux, pourraient, dans des cellules non-permissives, accroître les probabilités de recombinaisons illégitimes et favoriser ainsi l'intégration de l'ADN viral.

On sait depuis longtemps que l'antigène grand T interfère avec deux protéines suppresseurs de tumeurs qui régulent la progression du cycle cellulaire, p53 et pRb. Cette stimulation aberrante du cycle cellulaire induit la transformation oncogénique. En se fixant sur la protéine pRb, les antigènes grand T favorisent la libération des facteurs de transcription E2F et la prolifération cellulaire anarchique caractéristique des transformations oncogéniques (DeCaprio *et al.*, 1988 ; Dyson *et al.*, 1990). Toutefois, l'antigène grand T fixe et inactive la protéine p53, favorisant ainsi la progression du cycle cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Les antigènes T empêchent aussi l'action de p53 en réponse aux altérations de l'ADN ou à la production de la protéine p14^{ARF}.

L'antigène petit t est la deuxième protéine codée par la région précoce du génome viral. Le rôle de l'antigène petit t dans le cycle cellulaire des polyomavirus n'est pas bien élucidé (Martini *et al.*, 2004). L'antigène petit t de ce virus a un rôle mitogénique dans la transformation cellulaire par liaison et inhibition de la protéine phosphatase 2A (Pagano *et al.*, 2004). L'antigène t coopère avec l'antigène T dans la transformation des cellules par le virus SV40 et augmente la production du virus dans le cas de l'infection des cellules permissives (Martini *et al.*, 2004).

I.2.5. Pathologies associées au virus SV40

Le virus SV40 est associé à plusieurs tumeurs chez l'homme. Ceci est résumé dans le **Tableau I-2**.

Tableau I-2 : Pathologies humaines associées à la présence du virus SV40.

Pathologies	Sous types	Prévalence du virus SV40	Références
Lymphomes	- hodgkiniens - non hodgkiniens - B à grandes cellules	9 -14,5% 10,5 – 43% 50%	Martini et al. 1998, Shivapurkar et al. 2002 Martini et al. 1998, Vilchez et al. 2002 Amara et al., 2007
Tumeurs cérébrales	Carcinomes du plexus choroïde Ependymomes Astrocytomes Meningiomes Glioblastomes Médulloblastomes	37,5 – 100% 63,5 - 100% 44 – 73% 28 – 90% 33,3 – 100% 21,8 – 33%	Bergsagel et al. 1992 Krieg et al. 1981; Jasani et al. 2001 Krieg et al. 1981; Jasani et al. 2001 Krieg et al. 1981; Jasani et al. 2001 Krieg et al. 1981; Jasani et al. 2001 Krieg et al. 1981; Jasani et al. 2001
Tumeurs osseuses	Ostéosarcomes	11,9 – 50%	Lednický et al. 1997 ; Yamamoto et al. 2000
Tumeurs thyroïdiennes	Carcinomes papillaires Carcinomes anaplasiques Carcinomes médullaires Tumeurs bénignes	25 -68% 75 – 100% 83 – 90% 0 – 10%	Ozdarendeli et al. 2004; Vivaldi et al. 2003
Tumeurs pleurales	Mésothéliome	39 – 100%	Testa et al. 2001 ; Carbone et al. 1994

I.3. Le Virus MMTV-like

I.3.1. Introduction et caractéristiques du virus MMTV

En 1936, Bittner prouvait que des tumeurs mammaires spontanées de souris de laboratoire étaient dues à la présence d'un virus transmis à la descendance par le lait des mères atteintes de cancer du sein, il le nomma le « Mouse Mammary Tumor Virus » (MMTV) (Bittner, 1936). Ce virus a été largement incriminé dans la pathogénie des tumeurs mammaires chez la souris, sa transmission se fait soit par voie endogène dans les lignées germinales comme provirus ; soit par voie exogène à travers le lait maternel comme virion infectieux.

Des séquences d'ADN montrant une homologie avec celles du virus MMTV ont été détectées dans le cancer du sein humain ce qui suggère que ce virus nommé MMTV-like pourrait être la forme humaine du virus de la tumeur mammaire de souris (Black *et al.*, 1975 ; Etkind *et al.*, 2000 ; Melana *et al.*, 2001 ; Ford *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 1995, 1998). D'autres appellations ont été décernées à ce virus dont HMTV pour Human Mammary Tumor Virus (Melana *et al.*, 2002) et HHMMTV pour Human Homologue of the Mouse Mammary Tumor Virus (Lawson *et al.*, 2000).

Le virus MMTV appartient à la famille des β -rétrovirus, et comme tous les rétrovirus le génome du virus MMTV sera rétro-transcrit en ADN proviral qui s'intègre d'une façon aléatoire dans le génome des cellules infectées de souris à proximité d'un proto-oncogène cellulaire appartenant à la famille des *Wnt*. Le génome de ce virus a une taille d'environ 9 kb. Au moins cinq des transcrits sont générés à partir du génome viral par épissage alternatif, dont quatre sont initiés dans les régions LTR (long terminal repeat) en 5' et se terminent dans la région LTR en 3'. Les régions LTR codent également pour des sites de liaison de facteurs de transcription qui déterminent la spécificité tissulaire de la transcription (l'épithélium mammaires et les cellules lymphoïdes), ainsi que les éléments de réponse aux hormones glucocorticoïdes et à la progestérone qui entraînent une augmentation de la transcription virale au cours de la grossesse et de la lactation. Ces deux facteurs sont nécessaires pour une production optimale in vivo de l'infection virale (Mink *et al.*, 1992 ; Mok *et al.*, 1992 ; Reuss *et al.*, 1995 ; Zhu *et al.*, 2004 ; Vicent *et al.*, 2006).

Comme tous les rétrovirus, la totalité de la longueur de l'ARN non épissé du virus MMTV soutient deux fonctions. Tout d'abord, deux exemplaires sont enveloppés dans les virions et fournissent ainsi le génome viral. Par la suite, la totalité de la longueur de l'ARN transcrit sert d'ARNm pour la production des protéines virales codées par les gènes *gag*, *gag-pro* et *pol* (Coffin *et al.*, 1997). Le gène *pol* code pour la transcriptase reverse, nécessaires pour

générer l'ADN proviral double-brin, et l'intégrase, qui est requise pour l'intégration de l'ADN proviral dans les chromosomes des cellules hôte.

En ce qui concerne le gène de l'enveloppe, un seul ARNm sera traduit et par la suite clivé par les enzymes de l'hôte en deux polypeptides : une protéine de surfaces et une protéine transmembranaires qui sont nécessaires à la fixation des virions à la surface cellulaire et à la médiation de leurs pénétration à l'intérieur des cellules mammaires (Coffin *et al.*, 1997). Le virus MMTV commence par l'infection et l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes B induisant l'expression d'un super-antigène. Par la suite il y aura production de lymphocytes B ayant une longue vie qui peuvent transmettre ce virus aux cellules épithéliales mammaires. Plus tard, il peut induire la transformation de la glande mammaire par son intégration à proximité des proto-oncogènes menant à leur surexpression (Acha-Orbea *et al.*, 2007).

I.3.2. MMTV et cancer du sein chez la femme

De nombreuses découvertes virologiques et immunologiques ont lié le virus MMTV au cancer du sein humain (Axel *et al.*, 1972 ; Mesa-Tejada *et al.*, 1978 ; Crepin *et al.*, 1984).

En 1971, Moore et ses collaborateurs ont démontré, par microscopie électronique, que le lait maternel de femmes à haut risque pour le cancer du sein contenait des particules virales qui sont morphologiquement semblables au MMTV (Moore *et al.*, 1971). Ces particules ont la forme d'un champignon avec des pointes sur l'enveloppe virale. Scholm et ses collaborateurs ont prouvé que de telles particules avaient une activité transcriptase inverse comme celle des rétrovirus oncogènes (Scholm *et al.*, 1971). Depuis, des évidences ce sont accumulées indiquant la présence de particules virales semblables au MMTV dans le tissu tumoral de femmes atteintes de cancer du sein (Axel *et al.*, 1972 ; Das *et al.*, 1972) et dans des cultures cellulaires établies à partir de tissu mammaire de femmes saines (Furmanski *et al.*, 1974; Mc Grath, 1971 ; Keydar *et al.*, 1984).

Dans la même période, Charney et ses collaborateurs ont montré que le sérum de femmes atteintes de cancer du sein serait capable d'atténuer la virulence du MMTV suggérant que des anticorps dirigés contre les antigènes de ce virus sont peut-être présents chez l'espèce humaine (Charney et Moore, 1971). Les anticorps réagissant avec le virus MMTV ont été détectés à des taux beaucoup plus élevés dans le sérum de femmes atteintes de cancer du sein que dans le sérum de femmes saines. La fréquence de détection des anticorps anti-MMTV chez la femme ayant un cancer du sein varie de 5% en Chine à 60% en Afrique de l'Est (Day *et al.*, 1981).

Une étude immunohistochimique réalisée sur prélèvements tissulaires de cancers du sein humain et utilisant des anticorps dirigés contre les antigènes gp52 du MMTV a montré une positivité dans une proportion significative de cas, suggérant la présence d'antigènes viraux semblables à ceux du MMTV dans le tissu cancéreux humain (Day *et al.*, 1981).

I.3.3. MMTV-like et cancer du sein chez la femme

Des séquences d'ADN viral homologues à celles du MMTV ont été mises en évidence au sein de tissu tumoral provenant de femmes atteintes de cancer du sein (Callahan *et al.*, 1982). Cette détection s'est avérée difficile à cause de la présence de séquences rétrovirales endogènes constituant environ 0,6% du génome humain appelé (HERV) qui ont une certaine homologie avec les séquences du génome du virus MMTV (May *et al.*, 1983). Les HERVs sont aléatoirement distribués dans tous les chromosomes et sont souvent incapables d'assurer une réplication productive. Le développement des techniques de biologie moléculaire et surtout la PCR, a permis de résoudre ce problème en grande partie par Wang et ses collaborateurs (Wang *et al.*, 1995), et ceci en visant la détection de séquences d'ADN qui sont homologues aux séquences du MMTV mais qui ont une faible homologie avec les rétrovirus endogènes humains. Utilisant cette approche Wang et ses collaborateurs ont détecté des séquences du gène *env* du virus MMTV dans 30-40% des cancers du sein chez des femmes dans diverses populations (Wang *et al.*, 1995).

C'est en travaillant sur des biopsies de tumeurs du sein de femmes originaires de différents pays tels que l'Australie, l'Argentine, les Etats-Unis et l'Italie, que les chercheurs ont découvert chez certaines d'entre elles la présence de fragments d'ADN du gène *env* dont les séquences étaient très proches du génome du virus MMTV (Wang *et al.*, 1995 ; Pogo *et al.*, 1999 ; Melana *et al.*, 2001 ; Ford *et al.*, 2003). Les séquences du MMTV-like étaient présentes dans le tissu tumoral, mais elles étaient absentes dans les échantillons mammaires normaux ainsi que dans d'autres organes (Wang *et al.*, 1995). Le clonage et le séquençage des séquences virales détectées dans ces tumeurs humaines ont montré une homologie de 90-98% avec celles du MMTV, mais une très faible homologie avec les séquences des rétrovirus endogènes humains et en particulier avec le HERV-K10 (Wang *et al.*, 1995, 2001).

La séquence provirale du virus MMTV-like formée de 9,9 Kb a été mise en évidence par des techniques PCR dans deux cas de cancer du sein humain (Liu *et al.*, 2001). Cet ADN proviral a une homologie de 95% avec le virus MMTV et partage une homologie de 57% seulement, avec l'HERV-K10. Une séquence de 2,7 kb de la région *env*-LTR (Long

Terminal Repeat) a été visualisée par hybridation in situ fluorescente (FISH) dans plusieurs chromosomes de cellules de cancer du sein humain en culture (Liu *et al.*, 2001). Très récemment, Melana et ses collaborateurs ont isolé la totalité du génome viral du MMTV-like à partir de tissu mammaire humain frais (Melana *et al.*, 2004).

Peu de données sont connues concernant la biologie et l'épidémiologie du virus MMTV-like. Ce virus semble être d'origine exogène puisque l'ADN proviral a été détecté dans le tissu tumoral, mais pas dans le tissu histologiquement normal (Melana *et al.*, 2001). Stewart et ses collaborateurs ont collecté des données épidémiologiques indiquant que la variation géographique de l'incidence du cancer du sein chez les êtres humains est en corrélation avec la répartition géographique de la souris domestique commune (*Mus domesticus*,) qui diffère des autres espèces (*Mus musculus*, *Mus castaneus*) par l'abondance des séquences du virus MMTV dans son génome et par la forte incidence du cancer du sein. En effet, *Mus domesticus* est fréquente en Europe occidentale, en Afrique du nord et en Asie. Cette étude a suggéré que le MMTV-like pouvait dériver du MMTV (Stewart *et al.*, 2000). Chez la souris, les produits des gènes du MMTV sont présents à des concentrations 1000 à 10000 fois plus importantes dans les cellules malignes que dans les cellules normales (Mc Grath *et al.*, 1978). Peu de données sont fournies pour déduire si ce phénomène se produit aussi chez l'homme avec le MMTV-like. Ceci pourrait expliquer la difficulté à détecter le virus MMTV-like dans le tissu normal chez l'espèce humaine (Wang *et al.*, 1998). Ces constatations ont suggéré la présence d'un authentique rétrovirus ayant une certaine homologie avec le virus MMTV et qui serait impliqué dans la pathogénie du cancer du sein chez la femme.

En revanche, d'autres études n'ont pas réussi à mettre en évidence la présence des particules virales du MMTV-like ni à détecter des séquences d'ADN viral par PCR dans des larges séries de cancer du sein (Witt *et al.*, 2003, Zanghen *et al.*, 2002). En effet, la présence de séquences rétrovirales dans le génome humain ayant une certaine homologie avec le MMTV et le risque non négligeable de contamination par les produits d'amplification caractérisant les techniques PCR ont contribué avec le manque de données épidémiologiques, à affaiblir les évidences favorisant l'existence du virus MMTV-like.

I.4. Les papillomavirus humains (HPV)

I.4.1. Introduction et classification des papillomavirus humains

Les papillomavirus ont été regroupés avec les polyomavirus pour former la famille de papoviridae. Le terme papillomavirus vient du latin papilla, qui signifie bouton et du suffixe ome pour signifier le caractère tumoral.

Les papillomavirus sont classés en fonction de l'hôte qu'ils infectent, animal ou humain. Ainsi se distinguent les papillomavirus du bovin (BPV), des cervidés (DPV), du lapin (CRPV) et de l'Homme (HPV). Grâce à des techniques d'hybridation plus de 120 types de HPV sont actuellement caractérisés et leur nombre ne cesse de croître (Bonnez, 1993).

Les papillomavirus se caractérisent par une spécificité élevée de l'espèce de l'hôte et un tropisme particulier pour la peau et les muqueuses. En effet pour le groupe des HPV, les types viraux sont associés à des sites anatomiques spécifiques et à des lésions tumorales caractéristiques. Ainsi les HPV types 6, 11, 16, 18 ont un tropisme pour les muqueuses orales et génitales, alors que d'autres types viraux ont un tropisme pour la peau. Ce tropisme tissulaire pourrait être lié à des récepteurs cellulaires de surface spécifiques ou à des facteurs nucléaires intervenant dans la réplication virale (Douvier, 1993).

L'association entre le type de HPV et les lésions cervicales a été établie, amenant à subdiviser les HPV en trois groupes à potentiels oncogènes différents. Le premier groupe comporte les HPV à haut risque 16 et 18 qui sont rencontrés dans les dysplasies et les cancers épidermoïdes ; le second comporte les HPV à risque intermédiaire 31 et 33 qui sont détectés dans les lésions dysplasiques mais exceptionnellement dans les cancers; et le dernier regroupe ceux à bas risque HPV 6 et 11 retrouvés dans les lésions bénignes (condylomes acuminés) (Lorincz et al., 1992).

4.2. Structure du virus et organisation génomique

Les papillomavirus sont de petits virus non enveloppés, à capsidie icosaédrique. Les particules virales ont un diamètre de 52 à 55 nm. La capsidie est composée de 72 capsomères constitués d'une protéine majeure L1 et d'une protéine mineure L2, et elle renferme un ADN bicaténaire circulaire de 8 kb.

L'organisation génomique des différents papillomavirus est très proche. Tous les cadres de lecture ouverts (ORFs) sont situés sur un même brin de l'ADN viral (Chen et al., 1982). Ils sont classés en ORFs précoces (E: early) et tardifs (L: late) selon leur expression précoce

ou tardive durant le cycle de réplication virale et ils sont localisés sur deux régions génomiques différentes du même brin codant séparées par une séquence génomique non codante de taille variable appelée longue région de contrôle, LCR (Long Control Region), ou région non codante.

4.2.1. Cadre précoce de lecture: Région E

Ce cadre représente environ 45% du brin codant et renferme 8 régions précoces (E1 à E8) codant pour des protéines non structurales intervenant dans la réplication virale ainsi que dans le processus de transformation cellulaire.

4.2.2. Cadre tardif de lecture: Région L

Ce cadre représente environ 40% du brin codant et possède 2 régions tardives (L1 et L2) codant pour les protéines structurales, la protéine majeure L1 et la protéine mineure L2.

4.2.3. Longue région de contrôle: LCR

Elle représente les 15% restants du brin codant. Elle est localisée entre les 2 classes des ORFs précoces et tardives, plus précisément entre l'ORF L1 et l'ORF E6. Cette région contient une séquence de régulation, l'origine de la réplication et des éléments enhancers intervenant pour moduler l'activité des promoteurs qui sont responsables de la spécificité tissulaire et cellulaire des papillomavirus.

4.3. Physiopathologie de l'infection à papillomavirus

Les papillomavirus sont très spécifiques de l'espèce qu'ils infectent et induisent des tumeurs épithéliales squameuses et/ou des tumeurs fibro-épithéliales chez leur hôte naturel. Ils présentent un tropisme pour les épithéliums malpighiens cutanéomuqueux et leur multiplication est étroitement corrélée à la différenciation cellulaire. Au moment de l'infection, la particule complète constituée de l'ADN et de la capsid, adhère à la membrane cytoplasmique et pénètre dans les cellules basales de l'épithélium à la suite d'une lésion tissulaire ou d'un microtraumatisme (Evander *et al.*, 1997). Le génome viral se maintient sous forme épisomique dans la cellule (20 à 100 copies) et se réplique en même temps que le génome cellulaire dans les cellules différenciées. Lors de la migration de ces cellules vers les couches les plus différenciées de l'épiderme, la réplication cellulaire cesse alors que la réplication virale continue jusqu'à plusieurs milliers de copies par cellules (Lambert, 1991). L'expression des gènes viraux est également liée à la différenciation cellulaire. En effet, les gènes précoces qui codent pour des protéines non structurales sont exprimés dans les cellules basales, alors que les gènes tardifs codant les protéines

structurales de la capsid (L1 et L2) sont exprimés tardivement dans les cellules superficielles les plus différenciées. L'effet cytopathogène est caractérisé par la formation des koilocytes. Il s'agit d'une cellule, décrite en 1956 par Koss (Koss et Durfee, 1956), des couches intermédiaires avec un noyau œdémateux, une chromatine irrégulière et surtout l'existence d'une vacuole intracytoplasmique périnucléaire refoulant le cytoplasme en périphérie. Dans certains cas, le virus peut rester à l'état latent dans l'épithélium, son génome persiste soit sous forme épisomique, soit intégré au génome cellulaire et aucune lésion n'est alors observable (De Villiers et *al.*, 1997). Lors de la transformation cellulaire, on constate une perturbation de la croissance et de la différenciation cellulaire: ce sont les cellules basales qui prolifèrent et on voit disparaître la différenciation cellulaire au fur et à mesure de l'évolution vers les couches externes. Dans ce cas, il n'y a plus de réplication virale, plus de synthèse de protéines de la capsid mais intégration de l'ADN viral avec apparition d'une aneuploïdie (De Villiers et *al.*, 1997).

4.4. Pouvoir oncogène des HPV

De nombreux arguments se sont accumulés sur le rôle du HPV dans la genèse des néoplasies anogénitales. Les techniques de biologie moléculaire ont démontré non seulement la présence des HPV dans les cellules d'un grand nombre de ces tumeurs et leurs précurseurs, mais également la mise en jeu de mécanismes viraux spécifiques durant la progression tumorale.

Le génome des HPV, dans la plupart des lésions malignes, est intégré au sein du génome de la cellule hôte, alors qu'il est sous forme épisomique dans les lésions bénignes (Howley, 1991). Ce fait amène à penser que l'intégration virale joue un rôle important dans la transformation cellulaire. En effet, l'intégration virale au sein du génome cellulaire a parfois lieu dans des régions chromosomiques à proximité des proto-oncogènes dont l'altération suite à l'intégration pourrait aboutir à la transformation cellulaire maligne. Ces altérations peuvent toucher directement la structure de ces gènes mais aussi leur régulation (Lehn, 1988). L'intégration du HPV16 dans des cellules dérivées d'un cancer du col utérin a été décrite à proximité du gène *C-myc* (Durst, 1987) aboutissant probablement à une surexpression ou amplification de ce gène. D'un autre côté, l'intégration du génome viral par recombinaison des séquences virales avec celles cellulaires induit l'activation de l'expression des protéines E6 et E7. Ces deux protéines interagissent d'une manière spécifique avec les deux gènes suppresseurs de tumeur p53 et pRb. Cette interaction pourrait être à l'origine du processus de transformation maligne. Néanmoins, il faut bien

souligner que l'intégration n'est pas obligatoire pour la transformation maligne. La corrélation entre cancer et intégration est variable selon le type de HPV impliqué.

4.5. Pathologies associées aux HPV

Les papillomavirus humains provoquent des proliférations cutanéomuqueuses le plus souvent bénignes mais parfois malignes. Par des techniques d'hybridation, plus de 120 génotypes ont été identifiés. Une vingtaine de génotypes sont à tropisme ano-génital. Parmi eux, certains sont détectés dans les dysplasies et les cancers épidermoïdes, ils sont considérés comme des virus à haut risque comme les HPV 16 et 18. Les HPV 6 et 11 sont détectés dans les lésions bénignes et presque jamais dans les cancers; ces virus sont nommés à bas risque. D'autres types viraux dits à risque intermédiaire (HPV 31 et 33) sont retrouvés dans les lésions dysplasiques mais exceptionnellement dans les cancers (Lorincz et al., 1992).

Tableau I-3 : Pathologies associées aux papillomavirus humains (d'après (Howley, 1991)).

Site anatomique	Type de lésions	Génotypes impliqués
Peau	Verrues plantaires, vulgaires, planes	1, 2, 3, 4, 26, 27, 28, 29, 38, 41, 57, 63, 65
	Verrues de boucher	2, 7
	Epidermodysplasie verruciforme	2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19 à 25, 37, 41, 47, 50
	Cancer épidermoïde	5, 8, 14, 17, 20, 41, 47
Muqueuses respiratoires	Papillome laryngé, nasopharyngé	6, 11
	Cancer	16, 18, 30, 31, 33, 40
Muqueuses Digestives	Verrues vulgaires	1, 2, 4, 7, 20, 41, 47
	Condylomes acuminés	6, 11
	Hyperplasie focale épithéliale	13, 32
	Cancer et leucoplasie orale	16, 18
Muqueuses de l'œil	Papillome bénin	6, 11
	Cancer	16
Muqueuses Urinaires	Condylome acuminé	6, 11
	Cancer	6, 18
Muqueuses Génitales	Condylome acuminé, néoplasie intra-épithéliales de bas grade	6, 11, 16, 18, 39, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 58, 59, 67
	Condylome plan	6, 11, 42
	Néoplasie intra-épithéliale de haut grade	16, 18, 31, 33, 39, 42, 44, 45, 59, 61, 62, 64
	Cancer invasif	6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 66

L'implication des HPV dans les carcinomes mammaires reste encore un sujet de grande investigation. En effet, certaines études ont rapporté la détection de l'ADN des HPV dans des tumeurs mammaires, particulièrement les types 16, 18 et 33 (Di Lonardo *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002 ; Damin *et al.*, 2004 ; Widschwendter *et al.*, 2004 ; Kan *et al.*, 2005 ; de Villiers *et al.*, 2005 ; Kroupis *et al.*, 2006 ; Choi *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2008 ; Akil *et al.*, 2008 ; Mendizabal-Ruiz *et al.*, 2009 ; Cantu de Leon *et al.*, 2009). Mais d'autres études n'ont pas retrouvé ces virus dans le cancer du sein (Wrede *et al.*, 1992 ; Gopalkrishna *et al.*, 1996 ; Bratthauer *et al.*, 1992 ; Lindel *et al.*, 2007 ; de Cremoux *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que le HPV pourrait être un cofacteur dans l'étiologie de certains cas de cancers du sein.

5. Les herpesvirus humains

5.1. Introduction et classification des herpesvirus humains

Les virus appartenant à la famille des *herpesviridae* sont largement disséminés dans la nature et plus de 130 membres ont été identifiés jusqu'à maintenant (Roizman et Whitley, 2001). En effet, la majorité des espèces animales sont infectées par au moins l'un de ces virus. Une des particularités de ces virus est qu'ils sont responsables d'infections dites latentes et persistent tout au long de la vie dans l'organisme de l'individu infecté. Après une primo-infection, ces virus herpétiques restent tapis dans l'organisme sous une forme latente ce qui les soustrait au système immunitaire ainsi qu'aux antiviraux. Dans certaines conditions et notamment au cours d'une immunodéficience, l'infection latente peut se réactiver, donnant alors une réinfection endogène, ce qu'on appelle une récurrence. Si les primo-infections sont souvent asymptomatiques, les infections par les herpesvirus se signalent par leur forte morbidité voire leur mortalité dans différents groupes de patients : aux âges extrêmes de la vie, au cours des grossesses, chez les patients immunodéprimés (maladies hématologiques, sujets transplantés ou atteints par le SIDA).

Actuellement, huit herpesvirus humains (HHV1 à HHV8) sont identifiés et associés à différentes pathologies, et certaines particularités de leurs propriétés biologiques ont mené à leur subdivision en trois sous-familles; les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae*, et les *Gammaherpesvirinae*.

Les genres *Simplexvirus* (HSV1 et 2), et *Varicellovirus* (HHV3 ou varicella-zoster virus (VZV)) sont compris dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Ces virus ont été initialement regroupés en raison de la variété des cellules qu'ils peuvent infecter, leur rapidité de propagation en culture cellulaire, leur efficacité à détruire les cellules qu'ils infectent (cycle lytique) et leur capacité à établir une latence, principalement dans les ganglions sensitifs (Roizman et Whitley, 2001).

Les *Betaherpesvirinae* comprennent les genres *Cytomegalovirus* (HHV5 ou CMV) et *Roseolovirus* (HHV6 et HHV7) qui sont principalement caractérisés par le nombre restreint de cellules qu'ils peuvent infecter. Leur cycle répliatif est plus long, et ceux-ci se propagent plus lentement en culture cellulaire. Ces virus et particulièrement le CMV entraînent typiquement un élargissement des cellules infectées (cytomégalie). Les sites de latence de ces virus ne sont pas encore tous connus, mais il semble que ceux-ci peuvent

s'établir dans les glandes salivaires, les cellules lymphoréticulaires, les cellules rénales, et d'autres tissus (Roizman et Whitley, 2001).

Finalement, les *Gammaherpesvirinae* incluent deux genres : les *Lymphocryptovirus* (HHV4, ou virus Epstein-Bar (EBV)) et les *Rhadinovirus* (HHV8, ou virus associé au sarcome de Kaposi). Ceux-ci se distinguent par leur capacité à se répliquer *in vitro* dans des cellules lymphoblastiques, et certains peuvent mener à une infection lytique dans des cellules de type épithélial et fibroblastique. Les virus de cette sous-famille infectent préférentiellement les lymphocytes B et les sites de latence semblent se situer majoritairement dans les tissus lymphoïdes (Roizman et Whitley, 2001). Ces virus possèdent également un pouvoir de transformation des cellules (oncogénicité).

5.2. Structure et organisation du génome des herpesvirus

La particule virale est constituée d'un ADN double brin linéaire entouré d'une capsidie icosaédrique. De plus, il possède une enveloppe dans laquelle on retrouve un amas organisé de protéines qui correspond au tégument, ces protéines servant lors de la primo infection car elles apportent dans un premier temps tout ce dont le virus a besoin pour se répliquer. La taille de ce tégument varie en fonction du virus étudié. L'enveloppe est de type tri-lamellaire, acquise lors de la sortie des virions après le cycle lytique (membrane provenant de la membrane cellulaire). Les spicules exprimées à la surface de l'enveloppe virale sont des glycoprotéines courtes codées par le virus et servant lors de la reconnaissance de l'hôte. Il en existe 11 différentes sauf chez l'EBV qui ne possède qu'un seul type de spicules.

Tous les herpesvirus humains partagent des propriétés communes. Une d'entre elles est l'organisation du génome viral. En effet, tous les herpesvirus sont composés d'un génome relativement important à ADN linéaire double brin codant 100 à 200 gènes. On retrouve des Unités Codantes (UL ou US) qui servent à la re-circularisation du génome viral lorsque celui-ci entre dans la cellule. De plus, ces séquences contiennent une séquence d'encapsidation qui permet à une seule copie du génome d'entrer dans la capsidie en formation. Le génome code pour 80 à 200 protéines virales selon le type de virus. Les séquences promotrices (50-200pb) sont situées en amont du site d'initiation de la transcription. Il n'existe qu'un seul cadre de lecture car le génome est très grand, mais certains gènes sont dits « chevauchants » car l'extrémité 5' d'un gène est contenue dans l'extrémité 3' d'un autre. Les brins d'ADN sont codants ce qui donne ensuite un ARN anti-

sens et comme il n'y a pas d'épissage, un gène correspond à un ARNm. La transcription s'effectue par l'ARN polymérase II cellulaire.

5.3. Le cycle de réplication virale

5.3.1. Les gènes intervenants dans le cycle de réplication des herpesvirus humains

Le génome de ces virus est organisé en trois grandes régions codantes et interagit avec les protéines TIF (VP16) et VHS (Host Shut-off). Ce sont des protéines du tégument provoquant la transcription de gènes viraux et l'arrêt complet de la synthèse des protéines propres à la cellule hôte. La première région est celle des Gènes alpha appelée également « Immediate Early » (IE) qui codent pour des protéines de contrôle qui ont un rôle sur le cycle cellulaire et son fonctionnement ainsi que sur l'expression virale. En effet, ces gènes forcent la cellule à passer en phase de synthèse pour apporter au virus tout ce qui lui est nécessaire pour pouvoir se répliquer et activer les gènes suivants. Les Gènes bêta sont activés par les protéines des gènes alpha, et sont appelés « Early » (E). Ces gènes codent pour les protéines de réplication virale telles que : la thymidine kinase (qui phosphoryle des nucléosides spécifiques au virus) l'ADN polymérase indispensable au virus, des protéines de reconnaissance, l'origine de réplication (ORI) et des protéines de liaison. Grâce à tout cela, le virus peut se répliquer et activer les gènes de structure. Les Gènes gamma appelés également « Later » (L) codent pour des protéines tardives c'est-à-dire des protéines de structure comme la capside et l'enveloppe.

La régulation de ces gènes se fait en cascade, car dès lors qu'un groupe de gènes est activé il va à son tour activer le groupe suivant de façon coordonnée et avec un rétrocontrôle négatif sur le groupe précédant.

5.3.2. Le cycle viral latent

Le concept de latence est différent des points de vue biologique et clinique. Biologiquement, une infection latente est la phase du cycle biologique où le génome viral présent n'exprime aucune des protéines de la phase productive menant à la destruction cellulaire (ou phase lytique). Cliniquement, l'infection latente traduit l'absence de signes (cliniques ou biologiques) d'infection active. Elle n'exclut donc pas la possibilité de foyers de réplication virale et recouvre en particulier la notion de porteurs sains potentiellement contaminants. D'autre part, comme dans le cas du virus EBV, les acides nucléiques viraux

synthétisés n'aboutissent pas à un stade productif mais peuvent permettre l'émergence de processus oncogènes.

Pour l'EBV, la phase de latence est caractérisée par une forme épisomale du génome viral. Cette phase est un processus actif au cours duquel le virus produit ses propres protéines de latence qui sont au nombre de neuf : Trois protéines membranaires (Latent Membrane Protein) LMP-1, LMP-2A et LMP-2B, six protéines nucléaires, (Epstein-Barr nuclear antigen) (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C et EBNA-5) ainsi que deux ARN transcrits en grande quantité non traduits en protéines appelés Epstein-Barr early RNAs : EBER-1 et EBER-2 (Café, 1998).

Quel que soit le type de latence, les ARNs, EBER-1 et 2 spécifiques de la phase de latence sont détectés dans les cellules infectées.

5.3.3. Le cycle viral lytique

Après une phase de latence plus ou moins longue et au détour d'une baisse de l'immunité de l'organisme les herpesvirus entrent dans une nouvelle phase active lytique qui se fait en plusieurs étapes. Ce cycle lytique débute par une fixation des particules virales sur la membrane des cellules hôtes, ce qui induit la fusion des membranes cellulaires et virales. Une fois dans le cytoplasme, le génome viral va être libéré pour traverser la membrane nucléaire. Une fois à l'intérieur du noyau, il va se produire l'expression de plus de 80 gènes viraux. Ces protéines virales vont servir à la réplication de l'ADN viral et on obtient au final une réplication complète du brin interne. Il n'y a jamais arrêt de la réplication car le brin néo-synthétisé sert de matrice pour le brin complémentaire. De même, la synthèse du brin externe se fait de façon discontinue et il va y avoir formation de concaténaires, c'est-à-dire plusieurs copies du génome à la suite (au lieu d'une molécule de 200 Kb, on aura une molécule d'environ 2000 Kb par exemple). Afin d'accueillir ce génome viral, il va se produire un auto-assemblage de la capsid virale (capsid mature).

5.4. Pathologies associées aux herpesvirus humains

Des études épidémiologiques ont prouvé que les virus HSV1, CMV, EBV et HHV6 sont des herpesvirus lymphotropes infectant 70-90% des adultes à travers le monde. Après une primo-infection durant l'enfance, ces virus produisent habituellement une infection latente. Mais ces virus peuvent causer des infections primaires ou des réactivations représentant un danger imminent pour la vie des individus souffrant d'un déficit immunitaire.

De façon typique, le HSV1 entraîne des infections oro-labiales. Le CMV est associé à plusieurs syndromes cliniques, notamment chez les individus immunodéprimés. Encore aucune évidence n'associe le HHV6A à une maladie spécifique, mais celui-ci est souvent isolé chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Roizman et Whitley, 2001). D'un autre côté, l'éventail de syndromes reliés au HHV6B est en continuelle expansion, et il est entre autre relié à la roséole chez l'enfant et à des encéphalites chez les transplantés (Yamanishi *et al.*, 1988).

L'infection par l'EBV peut se manifester par une mononucléose et ce virus est également impliqué dans plusieurs néoplasies telles que le lymphome de Burkitt, le carcinome nasopharyngé, et le syndrome lymphoprolifératif en post-transplantation. La signification pathogénique de la présence de l'EBV dans ces cancers est encore discutée. De plus, les mécanismes d'action de l'EBV dans la cancérisation sont mal élucidés. Le virus EBV est également fréquemment isolé chez les patients atteints du SIDA (Menke *et al.*, 2000 ; Roizman et Whitley, 2001). Les différentes études menées sur l'implication éventuelle de l'EBV dans le cancer du sein sont contradictoires. Certaines études ont montré la présence du virus dans certaines tumeurs du sein, mais n'ont pas permis cependant de préciser le rôle exact de celui-ci dans la genèse de ce cancer ou dans sa virulence (Fina *et al.*, 2001 ; Bonnet *et al.*, 1999).

Le HHV8 est le virus herpétique le plus récemment identifié et il est maintenant reconnu comme étant l'agent étiologique du sarcome de Kaposi. Il a également un rôle à jouer dans le syndrome de Castelman, ainsi que dans certains types rares de lymphomes (Cannon et Cesarman 2000 ; Roizman et Whitley 2001 ; Schulz *et al.*, 2000). La répartition géographique du HHV8 n'est pas ubiquitaire et la présence de ce virus est principalement limitée aux zones de forte endémicité pour les formes classiques ou endémiques du sarcome de Kaposi.

I.6. Epigénétique et cancer

Le terme épigénétique regroupe «l'ensemble des modifications de l'expression d'un gène, héréditaires lors de la division cellulaire (mitose ou méiose), mais ne résultant pas d'altérations de la séquence d'ADN» (Russo *et al.*, 1996 ; Wachsman, 1997 ; Bird, 2002 ; Torrisoni, 2003; Santos-Rosa, 2005). Les mécanismes épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN et les modifications covalentes des histones (acétylation, méthylation) impliqués dans de nombreux processus cellulaires et responsables des variations de l'expression génique en situations normales et pathologiques (Momparker et Bovenzi, 2000 ; Bird, 2002 ; Henikoff, 2004). L'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN sont des événements intimement liés et ils interviennent dans le contrôle de l'expression génique.

Dans le processus de cancérogenèse, les modifications génétiques et épigénétiques sont intriquées, non seulement au stade pré-néoplasique, mais également au stade tumoral du plus précoce au plus tardif (Russo *et al.*, 1996 ; Momparker et Bovenzi, 2000 ; Bird, 2002). La mise en place du programme épigénétique est cruciale au cours du développement et sa stabilité est essentielle pour le maintien des fonctions des cellules au cours de la vie d'un organisme. Le contrôle de la machinerie épigénétique permet en effet de moduler l'accessibilité de l'ADN aux divers processus biologiques nucléaires comme la transcription de gènes spécifiques et de maintenir cet état d'activité (soit actif soit silencieux) d'une génération cellulaire à l'autre (Wachsman, 1997 ; Bird, 2002 ; Torrisoni, 2003).

I.6.1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le mieux caractérisé, associé surtout à la répression transcriptionnelle. Il résulte de réactions chimiques réversibles catalysées par les ADN méthyltransférases (DNMTs, DNA méthyltransférase), dans lesquelles un groupement méthyl (-CH₃) est presque invariablement ajouté sur le carbone 5 du cycle pyrimidique des cytosines dans le contexte dinucléotidique particulier CpG, selon un profil spécifique établi au cours du développement par les DNA méthyltransférases DNMT3a et DNMT3b et maintenu au cours des divisions cellulaires succédées par la DNMT1 (Kass *et al.*, 1997; Wachsman, 1997 ; Fuks, 2003; Herman et Baylin, 2003; Jaenisch et Bird., 2003 ; Esteller, 2005 ; Esteller, 2007) (**Figure I-1**). Chaque cellule aurait donc un profil de méthylation spécifique qui déterminerait l'état d'expression

des différents gènes. Ce profil sera transmis aux cellules filles après division cellulaire (Bird, 2002 ; Miyamoto et Ushijima, 2005).

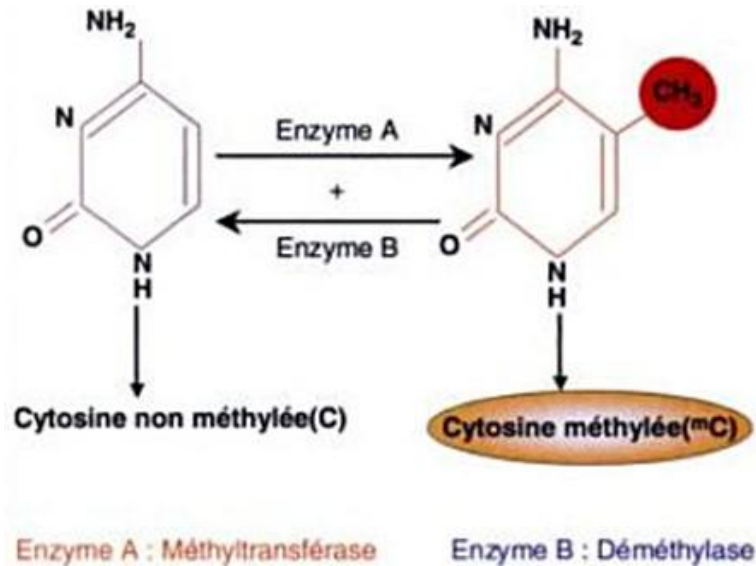


Figure I-1: Mécanisme de méthylation de la cytosine au niveau de l'ADN (d'après Baylin *et al.*, 2003).

Chez les humains et autres mammifères, cette modification n'affecte que les cytosines suivies d'une guanine dans la séquence d'ADN (les sites ou dinucléotides CpG). La fréquence des dinucléotides CpG dans le génome humain est considérablement inférieure à la fréquence théorique. Ces dinucléotides sont toutefois retrouvés concentrés dans des régions du génome, d'une longueur de 1 à 2 Kb, appelés îlots CpG (Gardiner-Garden et Frommer 1987 ; Bird 2002 ; Herman et Baylin, 2003 ; Esteller, 2007). Ils sont localisés au niveau des promoteurs et des premiers exons des gènes et leur non méthylation est corrélée avec l'expression des gènes (Issa, 1999; Singal et Ginder, 1999 ; Baylin et Herman, 2000 ; Robertson *et al.*, 2000 ; Bird, 2002 ; Herman et Baylin, 2003 ; Jaenisch et Bird, 2003). Une grande partie des CpG méthylés se retrouvent au sein de séquences répétées (satellites, SINE, LINE) et parasites (transposons, rétrovirus) de l'ADN conduisant à l'imposition d'un état silencieux de ces séquences (Kajikawa et Okada, 2002 ; Robertson et Wolffe, 2000).

Au sein des cellules normales, la plupart des sites CpG isolés sont méthylés. Ils sont situés dans les régions intergéniques constituées de séquences répétées, d'éléments

transposables et de rétrovirus endogènes. Au contraire, les îlots CpG, associés à la région 5' et au premier exon de 50 à 60% des gènes de mammifères transcrits par l'ARN polymérase II, ne sont pas méthylés. Le génome d'une cellule tumorale subit une perte massive et globale de méthylation et présente 20 à 60% moins de cytosines méthylées qu'une cellule normale (Costello et Plass, 2001 ; Esteller *et al.*, 2007).

L'hypométhylation est un processus croissant et affecte principalement les régions intergéniques (Wilson *et al.*, 2007). Paradoxalement, cette hypométhylation globale est souvent accompagnée d'une hyperméthylation locale et spécifique de certains promoteurs de gènes particulièrement au sein des îlots CpG. Elle entraîne la répression d'une grande variété de gènes aux fonctions anti-prolifératives appartenant à une nouvelle génération de gènes suppresseurs de tumeurs (Esteller, 2006).

I.6.2. Méthylation de l'ADN et cancers

Actuellement, on se rend compte, que la méthylation de l'ADN constitue une voie alternative aux mutations dans le développement de cancers. Aujourd'hui, on sait que la méthylation de l'ADN est impliquée dans plus de 65% des cancers humains (Jones, 1996; Jones et Larid 1999; Esteller *et al.*, 2001 ; Esteller et Herman, 2002 ; Jones et Baylin, 2002 ; Herman et Baylin 2003). Les deux types d'aberrations de la méthylation de l'ADN les plus connues sont l'hyperméthylation des îlots CpG au niveau de certains promoteurs de gènes suppresseur de tumeurs et l'hypométhylation globale du génome conduisant à une instabilité chromosomique ou à l'expression d'oncogènes (Jones, 1996 ; Issa, 1999 ; Jones, 1999; Robertson *et al.*, 2001; Jones et Baylin, 2002 ; Ehrlich, 2002; Torrisani *et al.*, 2003 ; Egger *et al.*, 2004; Digel et Lubert, 2005).

I.6.2.1. Hypométhylation globale

Il est connu depuis longtemps que le matériel génétique des cellules tumorales présente une hypométhylation globale (Feinberg et Vogelstein, 1983; Goelz *et al.*, 1985 ; Feinberg *et al.*, 1988). L'hypométhylation est utilisée pour décrire aussi bien une réduction globale de la méthylation dans le génome entier (hypométhylation globale) ou une déméthylation relative localisée dans différentes régions du génome, comme les régions promotrices des proto-oncogènes ou les séquences répétées normalement hautement méthylées (Feinberg et Vogelstein, 1983).

Elle se caractérise par une baisse de 20 à 60 % de la teneur en 5-méthylcytosines (Gama-Sosa, 1983; Feinberg *et al.*, 1988; Kim, 1994). L'hypométhylation globale est observée

dans deux situations importantes : le vieillissement et les cancers (Dunn, 2003). Dans la majorité des cas le terme «hypométhylation» se réfère à un état relatif qui représente un changement par rapport au taux «normal» de méthylation (Feinberg *et al.*, 1988).

L'hypométhylation globale peut contribuer à la tumorigenèse à travers trois mécanismes : la réactivation des transposons, l'instabilité des chromosomes et la perte d'empreinte parentale (Gaudet *et al.*, 2003). Cette diminution des îlots CpG méthylés au niveau de régions non régulatrices et d'éléments structuraux comme l'ADN centimétrique augmente l'instabilité chromosomique favorisant les réarrangements (Eden *et al.*, 2003). Cette hypothèse est soutenue par l'augmentation du taux de délétions dans les cellules embryonnaires invalidées pour l'expression de la DNMT1 et le lien établit entre l'hypométhylation et l'instabilité génomique dans les cancers du sein (Tsuda *et al.*, 2002) ou de la prostate (Schulz *et al.*, 2002). L'hypométhylation influence également l'expression de certains oncogènes (Ghazi *et al.*, 1992). Elle peut également agir en stabilisant le génome, en inhibant la recombinaison homologue entre les séquences répétées (Colot et Rossignal, 1999). Différentes études ont démontré que les éléments répétitifs sont hypométhylés dans les tumeurs et que le degré d'hypométhylation est corrélé avec l'instabilité du génome et la progression de la maladie (Narayan *et al.*, 1998; Qu, 1999). L'hypométhylation des différentes séquences satellites a été fréquemment observée (40-90%) dans plusieurs types de tumeurs (Narayan *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2001 ; Ehrlich, 2003).

L'hypométhylation peut aussi, dans les cancers, avoir lieu dans une région promotrice CpG d'un gène spécifique, par exemple un proto-oncogène, entraînant sa surexpression induisant l'augmentation de la prolifération cellulaire (Ghazi *et al.*, 1992 ; Yoder *et al.*, 1997). L'hypométhylation semble donc, être corrélée à la progression tumorale et offre des mécanismes potentiels pour expliquer la carcinogenèse (Robertson, 2000a; Dunn, 2003).

I.6.2.2. Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs

Dans les cancers, l'hyperméthylation des régions promotrices est l'altération épigénétique la plus souvent décrite; elle est retrouvée dans presque tous les types de néoplasies et est associée à l'inhibition de la transcription de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs conférant ainsi un avantage aux cellules néoplasiques (Esteller and Herman, 2002 ; Jones and Baylin, 2002 ; Herman and Baylin 2003). De façon générale, l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs s'inscrit de façon paradoxale dans un contexte d'hypométhylation globale du génome de ces cellules. L'hyperméthylation des îlots CpG

est responsable de l'extinction transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs impliquées dans certaines fonctions essentielles pour la cellule comme la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'adhésion cellulaire, l'apoptose et plusieurs autres fonctions (Deltour *et al.*, 2005; Esteller *et al.*, 2000). Dans chaque type de cancer les gènes méthylés appartiennent à des voies différentes et peuvent être des marqueurs de détection très sensibles dans pratiquement tous les types de tumeurs (Herman *et al.*, 1996; Esteller, 2001; Torrisani *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les gènes impliqués diffèrent en fonction des cancers, avec pour chaque gène, une fréquence de méthylation différente en fonctions des tumeurs. De plus, des anomalies de la méthylation sont détectées non seulement au niveau des tumeurs, mais également dans les lésions précancéreuses, indiquant qu'il s'agit d'un événement précoce dans la cascade d'événements entraînant la transformation maligne (Esteller, 2001 ; Belinsky, 2004 ; Deltour *et al.*, 2005; Esteller *et al.*, 2000). Pendant très longtemps, il a été admis que les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur devaient être altérés simultanément, soit par une mutation, soit par une délétion, pour qu'il soit inactivé. Or, il est actuellement admis qu'un gène peut perdre sa fonction en l'absence de toute modification génétique, suggérant un nouveau modèle d'inactivation des deux allèles, par le biais d'une hyperméthylation du promoteur de chaque allèle (Esteller *et al.*, 2000 ; Momparler et Bovenzi, 2000 ; Herman et Baylin, 2003).

Une observation importante dans le cancer est l'augmentation de l'expression des DNMTs. En effet, une élévation du taux des DNMTs a été détectée dans différents types de tumeurs (Xie *et al.*, 1999 ; Robertson *et al.*, 1999 ; Girault *et al.*, 2003). DNMT1 a été montré comme nécessaire et suffisant pour la transformation induite par l'oncoprotéine Fos (Bakin et Curran, 1999). DNMT3a semble tenir un rôle important dans la survie des cellules tumorales (Beaulieu *et al.*, 2002) et DNMT3b paraît requis pour la transformation par l'antigène T de SV40 et l'oncogène *Ras* (Soejima *et al.*, 2003). Une hypothèse qui vient directement à l'esprit est que cette augmentation pourrait être responsable de l'hyperméthylation de promoteurs observée régulièrement dans les tumeurs. Pourtant aujourd'hui, il n'existe encore aucune corrélation claire entre ces deux constatations car cette surexpression ne paraît pas exister dans tous les cancers. Il semble donc que l'accroissement de l'expression des DNMTs peut être nécessaire mais n'est pas suffisante pour causer les défauts de méthylation observés dans les tumeurs (Esteller *et al.*, 2001 ; Esteller, 2003b ; Soejima *et al.*, 2003 ; Deltour *et al.*, 2005).

I.6.3. Méthylation de l'ADN et virus

L'infection virale, en particulier l'infection par les virus à ADN et les rétrovirus, peut induire l'insertion de séquences d'ADN viral dans le génome des cellules hôtes. Cette infection déclenche souvent le mécanisme de défense de l'hôte, en particulier, les mécanismes de la méthylation de l'ADN, induisant la méthylation du génome viral. La méthylation de l'ADN viral est une méthode efficace pour inhiber l'expression des gènes viraux. D'un autre côté, l'infection virale est l'un des nombreux facteurs qui ont été liés au développement de différents cancers humains. En effet, le génome du virus peut induire une dérégulation du génome des cellules hôtes infectées par des mutations, des insertions et des réarrangements chromosomiques. Outre l'introduction de modifications génétiques, la présence du génome viral est corrélée à un profil aberrant de méthylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs. Toutefois, les bases moléculaires de la méthylation associée aux virus sont encore peu connues, mais pourrait être la résultante de la surexpression des enzymes clés de méthylation DNMTs. En effet, L'activation accrue de la méthylation de l'ADN et la diminution de l'acétylation des histones ne sont pas des caractéristiques spécifiques à un virus donné mais sont partagées par plusieurs virus oncogènes. L'oncoprotéine LMP1 de l'EBV est la protéine virale clef induisant l'oncogène de ce virus et il a été prouvé que cette oncoprotéine virale induit l'activation de l'expression des méthyltransferases (Tsai *et al.*, 2002). D'un autre côté, la protéine HBx du virus de l'hépatite B, l'antigène grand T du polyomavirus BK et l'oncogène E1A des adénovirus ont été impliqués dans l'activation de la DNMT1 (Lee *et al.*, 2005 ; McCabe *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été prouvé que dans les cancers du poumon, la présence du virus HPV semble augmenter l'expression de la DNMT3b (Lin *et al.*, 2005). Bien qu'aucune oncoprotéine virale n'a été identifiée comme inductrice de la surexpression de la DNMT3b, une étude récente a maintenant prouvée que la protéine E7 du HPV induit l'augmentation de l'activité méthyltransferase de l'ADN (burgers *et al.*, 2007). D'un autre côté, il a été prouvé que l'antigène grand T du virus SV40 permet l'activation de la méthylation de l'ADN par la surexpression de la DNMT3b (Soejima *et al.*, 2003).

Objectifs du travail

Le cancer du sein est le principal cancer chez la femme dans le monde. Il représente la première cause de décès par néoplasie chez la femme dans le monde avec 500 000 décès par cancer du sein en l'an 2000.

De nos jours, plusieurs facteurs de risque de développement du cancer du sein sont reconnus, tels que les antécédents familiaux de cancer du sein, l'âge avancé, la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité et l'obésité. Mais, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition, en particulier les gènes BRCA1 et 2, impliqués dans 5-10% des cas de cancer du sein. Néanmoins, certains facteurs étiologiques sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement du cancer du sein et les virus restent à l'heure actuelle les pathogènes associés aux cancers les plus étudiés. En effet, l'implication de nombreux virus est aujourd'hui reconnue dans le développement de différents cancers tels que les associations HPV et cancer du col utérin, HHV8 et sarcome de Kaposi, EBV et lymphome de Burkitt ou cancer indifférencié du cavum.

De nombreux virus ont été soupçonnés dans l'étiologie des cancers du sein, et cela depuis la découverte par Bittner en 1936 que l'induction des tumeurs mammaires chez la souris est causé par un virus appelé MMTV pour « Mouse Mammary Tumor Virus ». Des séquences homologues au gène *env* du MMTV ont récemment été mises en évidence dans une proportion importante de cancers du sein sporadiques chez l'Homme, indiquant une étiologie virale possible du cancer du sein. D'autres équipes ont aussi signalé que le virus d'Epstein-Barr pourrait être associé à la pathogénèse de cas sporadiques de cancer du sein chez l'Homme, mais cette association reste à ce jour un sujet de large controverse. Au cours des dernières années, différents laboratoires ont signalé la présence du polyomavirus SV40 dans plusieurs types de tumeurs humaines.

L'objectif de ce travail de thèse est donc d'évaluer l'implication d'un large spectre de virus (SV40, MMTV-like, papillomavirus et herpesvirus) dans le cancer du sein chez la femme Tunisienne. Nous nous sommes également intéressé à l'évaluation du profil de méthylation de 15 gènes suppresseurs de tumeurs (*RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RARβ2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2* et *hMLH1*) et rechercher la relation entre ces altérations épigénétiques et la présence des différents virus analysés.

Le chapitre II sera consacré à la description de la population étudiée et des différentes techniques utilisées pour l'évaluation de l'implication des virus dans le cancer du sein.

Le chapitre III sera consacré à la recherche de la présence du virus SV40 dans 109 cas de carcinomes canaux infiltrants du sein par plusieurs techniques de PCR ; de vérifier l'expression des oncoprotéines virales t/Tag dans les cellules tumorales par immunohistochimie ; et de préciser les caractéristiques clinico-pathologiques et pronostiques des cas de cancers du sein associés à ce virus.

Le chapitre IV sera consacré à l'analyse du statut de méthylation de la région promotrice de 15 gènes suppresseurs de tumeurs (*RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RARβ2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2* et *hMLH1*) par technique de PCR spécifique à la méthylation (MSP), afin de définir le profil de méthylation dans le cancer du sein chez la femme en Tunisie, de déterminer la relation entre la présence du virus SV40 dans ce cancer et le profil de méthylation des gènes analysés afin de mieux caractériser la signification biologique de la présence de ce virus dans le cancer du sein.

Le chapitre V sera consacré à l'évaluation de la prévalence actuelle du virus MMTV-like dans les cancers du sein chez la femme Tunisienne utilisant une technique de PCR semi-nichée visant la détection de la séquence *env* de ce virus dans une série de 122 cas. L'authenticité des séquences amplifiées sera vérifiée par séquençage. Nous allons par la suite évaluer les caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés à ce virus. Enfin, une évaluation de l'impact de la présence de ce virus sur la survie des patientes sera effectuée.

Le chapitre VI sera dédié à l'évaluation de l'implication des papillomavirus humains dans le cancer du sein en Tunisie à travers l'étude d'une série de 122 cas de cancer du sein par plusieurs techniques de PCR visant la détection d'un large spectre de HPV ano-génitaux. La présence de ces virus sera aussi évaluée par une technique d'hybridation in situ utilisant plusieurs sondes. Nous allons aussi explorer la relation entre ces virus et les caractéristiques clinico-pathologiques et pronostiques des patientes.

Le chapitre VII sera focalisé sur l'évaluation de la prévalence des herpesvirus humains suivants : HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8 dans le cancer du sein en Tunisie en utilisant des techniques de PCR, d'hybridation in situ et d'immunohistochimie. Les résultats seront corrélés aux données clinico-pathologiques et aux données de survie des patientes afin de préciser les caractéristiques clinico-pathologiques et évolutives des cas de cancer du sein associés à ces virus.

A la fin de notre mémoire, nous discuterons l'ensemble des résultats de notre étude, de leurs significations et de leurs perspectives avec une synthèse rapprochée de la littérature.

Chapitre II

Techniques générales

II.1. Population d'étude

Cette étude, réalisée au laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached de Sousse a porté sur une série de 123 cas de cancer du sein chez des femmes tunisiennes diagnostiqués entre 1995 et 2006, correspondant à 112 cas de carcinomes canaux infiltrants, 5 cas de carcinomes lobulaires infiltrants et 6 cas de carcinomes médullaires.

Tous les cas étudiés dans ce travail ont été sélectionnés sur la base de la disponibilité conjointe d'un tissu tumoral et d'un tissu normal mammaires congelés à -80°C au moment du diagnostic anatomopathologique.

Pour la confirmation du diagnostic, toutes les coupes histologiques ont été relues par deux pathologistes. Pour chaque cas a été également choisi un bloc de paraffine représentatif de la lésion tumorale qui servira pour les explorations morphologiques (immunohistochimie et hybridation in situ).

Les données concernant l'âge des patientes, la date de naissance, le statut ménopausique, la taille tumorale, les métastases ganglionnaires et le grade histopronostique de Scraff, Bloom et Richardson (SBR) ont été recueillies par consultation des rapports anatomopathologiques, des dossiers du Registre du Cancer du Centre et par la relecture des dossiers cliniques des patientes.

Ces dossiers cliniques et ces rapports anatomopathologiques ont été également revus afin de recueillir les données concernant la survie des patientes à savoir la date du diagnostic, la durée de survie globale et survie sans rechute. La survie globale étant définie par l'intervalle de temps entre le diagnostic initial et la date de la dernière consultation ou la date du décès. La survie sans rechute est définie par l'intervalle de temps entre le diagnostic initial et la date de l'apparition d'une récurrence loco-régionale ou d'une métastase à distance. Ces données n'ont été accessibles que pour 86 patientes de notre série.

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction de l'ADN à partir des tissus congelés

II.2.1.1. Principe

La majorité des techniques d'extraction d'ADN à partir du tissu congelé se basent sur deux étapes essentielles : La digestion enzymatique par la protéinase K et la purification des acides nucléiques. Pour extraire l'ADN, nous avons adopté la procédure standard d'extraction de l'ADN à partir de tissus congelés: la technique d'extraction au phénol-chloroforme de Ausubel et ses collaborateurs (Ausubel *et al.*, 1999). Le principe de cette technique consiste à traiter le lysat tissulaire (obtenu après digestion enzymatique par la protéinase K) par un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Le phénol est un agent déprotéinisant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles. Le chloroforme est capable de provoquer des dénaturations des protéines. L'activité anti-moussante de l'alcool isoamylique favorisera la séparation de la phase aqueuse déprotéinisée. La récupération de l'ADN génomique est atteinte suite à des étapes de précipitation par de l'éthanol et à des étapes de centrifugation.

II.2.1.2. Protocole

La technique commence par la réalisation de 10 à 20 coupes, ayant une épaisseur de 10 μm , à partir des échantillons tissulaires congelés en utilisant un cryostat à une température de -30°C . Le nombre de coupes à utiliser varie en fonction de la surface tissulaire et de l'abondance du tissu adipeux au niveau du fragment tissulaire.

Ces coupes sont mises, de façon stérile, dans un tube Eppendorf de 1,5 ml dans lequel on ajoute 400 μl de tampon de lyse cellulaire (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) ainsi que 8 μl de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 10%. Le SDS est un détergent puissant qui va intervenir dans la fragilisation de la membrane cellulaire. La solution est soumise à une agitation douce, puis 16 μl de protéinase K (Sigma, P2308) à 10 mg/ml (concentration finale 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont ajoutés à la solution. Les échantillons sont par la suite incubés à 56°C pendant une nuit, temps nécessaire pour une lyse totale des cellules.

Après digestion enzymatique, et pour 1 ml d'échantillon, la dénaturation et la précipitation des protéines sont effectuées en ajoutant le phénol, le chloroforme et l'alcool isoamylique

avec les proportions respectives [25:24:1]. Après agitation douce par inversion, on effectue une étape de centrifugation à 8000 rotations par minute pendant 8 minutes à 4°C. Suite à cette étape il y aura formation d'une phase aqueuse contenant l'ADN et d'une phase organique contenant tous les contaminants protéiques et débris cellulaires.

On récupère ainsi la phase aqueuse de volume V dans un nouveau tube Eppendorf et on ajoute une solution de NaCl 5 M avec un volume correspondant au 1/10 du volume récupéré, et de l'éthanol absolu avec un volume correspondant au double du volume récupéré. Après des agitations douces par inversions répétées, il y aura apparition de la méduse d'ADN. On incube alors les échantillons à -80°C pendant une heure. Cette étape d'incubation est suivie par une centrifugation à 12000 rotations par minute pendant 10 minutes à 4°C. Par la suite on élimine le surnageant tout doucement et on ajoute 1ml d'éthanol à 70% ce qui va permettre le lavage du culot et sa réhydratation. On effectue après une étape de centrifugation à 12000 rotations par minute pendant 15 minutes à 4°C. On décante alors le culot avec précaution et on le sèche soit à température ambiante soit dans une étuve à 37°C. Il est très important de bien sécher le culot d'ADN car les résidus d'éthanol restants peuvent par la suite inhiber la réaction de la PCR.

Après évaporation totale de l'éthanol on resuspend l'ADN dans 250 µl d'eau bi-distillée ou dans du tampon Tris-EDTA 1x (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,5). Par la suite on doit laisser les tubes reposer pendant environ 3 heures pour pouvoir dissoudre l'ADN. Après dissolution totale, les extraits d'ADN sont stockés à -20°C.

II.2.1.3. Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait

Les concentrations des différents extraits d'ADN sont déterminées par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm et aussi de 280 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg, Allemagne). Une densité optique de 1 à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN double brin. Le degré de pureté de l'échantillon est défini par le rapport des densités optiques 260 nm/280 nm qui doit être compris entre 1,6 et 1,8.

II.2.2. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

II.2.2.1. Principe

La technique d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour polymerase chain reaction) permet d'amplifier, selon un mode exponentiel, un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucléotidiques, capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence cible à amplifier, l'une avec le brin sens et l'autre avec le brin anti-sens. La taille des oligonucléotides utilisés comme amorces est généralement comprise entre 18 et 25 bases. La température utilisée pour l'hybridation des amorces sur la matrice d'ADN est égale à la température de dissociation des brins complémentaires diminuée de 5°C. La température de dissociation est la température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont dénaturées par rupture des liaisons hydrogène entre les 2 brins.

La réaction de PCR « classique » est réalisée en trois étapes : La première étape implique une dénaturation à température élevée (90 à 96°C) de l'ADN double-brin en simples brins qui serviront de matrice pour la procédure d'amplification. Ensuite, des oligonucléotides enjambant la séquence à amplifier, chacun complémentaire d'un des deux brins d'ADN, sont hybridés à l'ADN matrice à une température qui dépend de la séquence de ces oligonucléotides (37 à 65°C). Synthétisés artificiellement, ces amorces confèrent à la réaction sa spécificité. Leur nature et leur position conditionnent la longueur du segment amplifié et son identité. La troisième étape est une étape d'élongation de l'ADN à 72°C.

Ces cycles thermiques sont réalisés à l'aide d'un thermocycleur qui permet de programmer les différentes températures, la durée de chaque étape et le nombre de cycle (n). Il en résulte à la fin de l'amplification un dédoublement par un facteur de 2^n de la quantité de l'ADN cible.

A la fin de la série des cycles thermiques, un aliquote du produit amplifié est chargé sur un gel d'agarose et soumis à une électrophorèse. Une réaction positive se traduit par la présence d'une bande colorée au bromure d'éthidium dont la taille est estimée grâce à un marqueur de poids moléculaire ayant migré simultanément.

II.2.2.2. Conditions expérimentales

II.2.2.2.1. Vérification de la qualité de l'ADN obtenu après extraction

L'intégrité des extraits d'ADN a été appréciée par l'amplification d'une séquence de 407 paires de bases (pb) appartenant au gène codant pour la β -globine (Saiki *et al.*, 1988). L'ADN a été considéré de bonne qualité quand on a obtenu un résultat PCR β -globine positif. Pour réaliser cette réaction: 400 ng d'ADN de chaque échantillon sont placés dans un volume final d'amplification de 25 μ l contenant 200 μ M de chaque dNTPs (dATP, dCTP, dTTP et dGTP), 0,2 μ M de chaque amorce oligonucléotidique (**Tableau II-1**), 1 Unité de *Taq* DNA polymérase (Promega, Madison, Etats-Unis) et du tampon PCR 1x (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; pH 8,4). L'amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur PTC 200™ DNA engine thermocycler (MJ Research, Watertown, Etats-Unis). Pour chaque série de cas testé, il est nécessaire de réaliser en parallèle un témoin négatif ne contenant pas d'ADN matrice afin de vérifier l'absence de contamination éventuelle des réactifs utilisés. Un témoin positif est également testé parallèlement avec chaque série de cas.

La réaction commence par une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes. Après cette première étape de dénaturation de la matrice d'ADN, 35 cycles d'amplifications sont effectués comportant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes. Après les 35 cycles d'amplification, la réaction se termine par une étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes permettant d'achever l'élongation de tous les brins d'ADN néo-synthétisés.

Dix microlitres de chaque produit amplifié sont analysés dans un gel d'agarose à 2% dans le tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 0,5x (Tris base 45 mM, Acide Borique 25 mM, EDTA 12,5 mM, pH 8) coloré au bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml) selon la technique décrite par Sambrook et ses collaborateurs (Sambrook *et al.*, 1989). L'électrophorèse est réalisée pendant une heure à 100 volts dans une cuve à électrophorèse raccordée à un générateur électrique (Bio-Rad Laboratoires, Marnes-la-Coquette, France). L'ADN est visualisé sous illuminations ultraviolettes (302 nm) et les gels sont numérisés en utilisant le système Gel-Doc 2000 de Bio-Rad. Un marqueur de poids moléculaire (50 pb ou 100 pb, Promega) a été utilisé pour permettre la détermination de la taille des fragments d'ADN amplifiés.

Nous avons considéré comme positifs pour la β -globine, les échantillons de suffisamment bonne qualité pour permettre une analyse convenable par PCR.

Tableau II-1 : Amorces utilisées pour l'amplification d'une séquence du gène de la β -globine.

Amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Référence
Globine R	CAACTTCATCCACG TTCACC	Saiki et al, 1988
Globine S	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	

II.2.2.2.2. Mise en évidence de l'ADN du virus SV40 par PCR

Pour détecter l'ADN du virus SV40, nous avons utilisé différents protocoles de PCR pour amplifier trois régions différentes du génome de ce virus (la région de transcription précoce, celle de transcription tardive et la région de régulation de la transcription.)

a. Détection d'une séquence spécifique de la région de transcription précoce

La détection d'une séquence spécifique à la région de transcription précoce du génome du virus SV40 a été effectuée par PCR en utilisant un couple d'amorces, visant l'amplification d'une séquence de 126 pb codant l'antigène grand T du virus (Bergsagel *et al.*, 1992) (**Tableau II-2**). Cette technique de PCR a été testée 3 fois pour chaque cas. La positivité d'un cas a été retenue en cas de signal positif retrouvé dans au moins deux tests.

Le milieu réactionnel de la PCR contient pour chaque tube de réaction : 400 ng d'ADN extrait de chaque échantillon dans un volume final de 25 μ l contenant du tampon PCR 1x, 200 μ M de chaque dNTPs, 0,2 μ M des amorces oligonucléotidiques SVTAGP1 et SVTAGP3 décrites dans le **Tableau II-2**, et 1 Unité de *Taq* DNA polymérase (Promega). Les réactions PCR démarrent par une étape de dénaturation à 92°C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles d'amplification comportants : une étape de dénaturation à 92°C pendant 45 secondes, suivie d'une étape d'hybridation pendant 45 secondes à la température de 53°C et enfin une étape d'extension à 72°C pendant 45 secondes. Une dernière étape de 10 minutes à 72°C a été aussi

incluse, elle permettra à la *Taq* DNA polymérase d'arriver au terme de la synthèse des fragments d'ADN double brin.

Pour chaque série d'amplification, un contrôle négatif qui contient de l'eau distillée au lieu de l'ADN a été inclus. Le témoin SV40 positif utilisé au cours de cette technique est le plasmide pSVSph21-N contenant une copie du génome du virus SV40 gracieusement offert par le Dr R. Vilchez (Baylor College of Medicine, Section of Infectious Diseases, Houston, Etats-Unis).

L'électrophorèse des produits d'amplification est réalisée dans les mêmes conditions utilisées pour le gène de la β -globine.

Afin de confirmer la spécificité de l'amplification obtenue par cette technique, les produits de PCR ont été hybridés par Southern blot, utilisant une sonde oligonucléotidique interne SVTAGP2, spécifique à la région précoce de transcription du virus SV40 (**Tableau II-2**) suivant le protocole décrit ci-dessous.

Tableau II-2 : Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence spécifique de la région de transcription précoce du virus SV40 et la sonde interne utilisée dans la technique de Southern blot.

Amorces	Localisation génomique	Séquences des amorces (5'-3')	Références
SVTAGP1	4,388-4,413	TTAGCAATTCTGAAGGAAAGTCCTTG	Bergsagel <i>et al.</i> , 1992
SVTAGP3	4,496-4,513	ACCTGTTTTGCTCAGAAG	
SVTAGP2	4,458-4,479	ATGTTGAGAGTCAGCAGTAGCC	

b-Vérification de la spécificité des produits d'amplification de la région de transcription précoce par Southern Blot

Afin de confirmer la spécificité des séquences d'ADN viral détectées par PCR visant l'amplification de la région de transcription précoce dans les échantillons cliniques analysés, nous avons hybridé les produits d'amplification obtenus avec une sonde oligonucléotidique

interne SVTAGP2, spécifique de la région amplifiée du virus (**Tableau II-2**) en utilisant une technique d'hybridation moléculaire par Southern Blot.

Pour cela les produits d'amplification obtenus par la technique de PCR utilisant le couple d'amorces SVTAGP1/ SVTAGP3 sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE 0,5x. Une fois la migration terminée, le gel est plongé dans 400 ml d'une solution de dépurination (HCl 250 mM) sous agitation environ 30 min. Après rinçage avec de l'eau distillée le gel est transféré dans 500 ml d'une solution de dénaturation (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) pendant 30 minutes sous agitation. Le gel est à nouveau rincé avec de l'eau distillée puis est transféré dans 500 ml d'une solution de neutralisation (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5) pendant 30 minutes.

Le gel est par la suite trempé pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution SSC 20x (NaCl 3 M ; Tri-sodium citrate 0,3 M). Durant cette étape, le dispositif de transfert par capillarité consiste à déposer le gel à transférer sur un pont de papier Whatman 3 MM préalablement imbibé de tampon de transfert et dont les extrémités baignent dans ce même tampon (SSC 20x). Sur ce gel, on dépose la membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences) découpée selon les dimensions exactes du gel. Sur la membrane, on dépose deux morceaux de papier Whatman 3 MM imbibés de tampon puis 5 morceaux secs. Des piles de papier absorbant sont déposées sur le haut de ce montage puis un poids est appliqué facilitant le transfert des acides nucléiques sur la membrane. Ainsi, le tampon SSC 20x monte par capillarité et entraîne avec lui l'ADN qui est alors transféré sur la membrane nylon pendant une nuit. Une fois le transfert achevé, le dispositif est démonté et la membrane est rincée dans une solution SSC 6x pendant 1 minute pour retirer les restes d'agarose et est séchée sur du papier Whatman 3 MM pendant 20 minutes. La membrane est par la suite placée dans un four à 80°C pendant deux heures pour fixer l'ADN. Pendant ce temps on marque la sonde nucléique SVTAGP2 à la dioxigénine utilisant un kit de marquage commercialisé par Roche (DIG DNA Labeling Kit, Roche) conformément au protocole décrit par le fournisseur.

La membrane est par la suite humidifiée dans une solution SSC 2x puis incubée pendant 1 h à 65°C dans 40 ml de tampon d'hybridation (SSC 2x, SDS 0,2%, formamide 40%, 0,1% réactif bloquant). Cette première étape est importante pour diminuer le bruit de fond lors de l'hybridation. Environ 100 à 200 ng de sonde marquée sont dénaturés pendant 10 minutes par chauffage à 95°C puis incorporés au tampon d'hybridation (5 ml pour une membrane de 100 cm²). La membrane est mise à incuber dans ce milieu à 42°C pendant une nuit dans un four à hybridation sous agitation rotative (50 rotations par minute). Le lendemain, la membrane est

lavée deux fois pendant 5 minutes à température ambiante dans une solution peu stringente (SSC 2x; SDS 0,1%), permettant l'élimination de l'excès de sonde non fixé. Elle est ensuite lavée deux fois pendant 15 minutes à 65°C, sous agitation douce, dans une solution fortement stringente (SSC 0,5x; SDS 0,1%) qui élimine la sonde fixée non spécifiquement. La membrane est ensuite placée dans un grand pétri et rincée 5 minutes à la température ambiante avec un tampon de lavage à base d'acide maléique (100 mM acide maléique, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20; pH 7,5). Par la suite, on bloque la membrane pendant 30 minutes utilisant une solution de blocage (réactif bloquant à 1% dilué dans du tampon d'acide maléique).

Avant la révélation du marquage la membrane est équilibrée pendant 1 minute dans du tampon de lavage (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM), puis incubée durant 30 minutes dans un tampon de saturation (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150mM ; Réactif bloquant à 5%) permettant de saturer les sites aspécifiques aux anticorps anti-DIG. La membrane est par la suite placée dans un milieu de tampon de saturation (20 ml pour une membrane de 100 cm²) additionné d'anticorps anti-DIG dont le fragment Fab est couplé à la phosphatase alcaline (150 mU/ml final) pendant 30 minutes à température ambiante pour ensuite subir deux lavages de 15 minutes avec la solution de lavage. Elle est ensuite équilibrée 5 min dans la solution de révélation (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 50 mM). Elle est finalement placée dans un sachet de plastique scellé à l'obscurité dans 20 ml de cette même solution additionnée de NBT/BCIP (nitroblue-tetrazolium, 5-bromo 4-chloro 3-indolylphosphate), jusqu'à apparition de la coloration bleu violet (en général au bout de 2 à 16 heures).

c. Détection des séquences de la région de transcription tardive

La détection des séquences de la région de transcription tardive du génome SV40 a été effectuée par PCR en utilisant un couple d'amorces visant l'amplification d'une séquence de 294 pb du gène codant la protéine de capsid VP1 du SV40 (Bergsagel *et al.*, 1992) (**Tableau II-3**). Cette région est bien conservée et spécifique au virus SV40. La technique de PCR a été testée 3 fois pour chaque cas. La positivité d'un cas a été retenue s'il y a une reproductibilité du signal dans au moins deux tests.

Le milieu réactionnel de la PCR contient pour chaque tube de réaction : 400 ng d'ADN extrait de chaque échantillon dans un volume final de 25 µl contenant du tampon PCR 1x, 200 µM de chaque dNTPs, 0,2 µM des amorces oligonucléotidiques LA1 et LA2 décrites

dans le **Tableau II-3**, et 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Promega). Les réactions PCR démarrent par une étape de dénaturation à 92°C pendant 5 minutes, suivies de 40 cycles d'amplification comportant : une étape de dénaturation à 92°C pendant 45 secondes, suivie d'une étape d'hybridation pendant 45 secondes à 58°C et enfin une étape d'extension à 72°C pendant 45 secondes. Une dernière étape de 10 minutes à 72°C a été également incluse.

Pour chaque série d'amplification, un contrôle négatif qui contient de l'eau distillée au lieu de l'ADN a été inclus. Le même témoin SV40 positif déjà cité précédemment a été utilisé dans nos techniques (correspondant au plasmide pSVSph21).

L'électrophorèse des produits d'amplification est réalisée dans les mêmes conditions utilisées pour le gène de la β -globine.

Tableau II-3 : Amorces utilisées pour l'amplification des séquences de la région de transcription tardive ainsi que la région régulatrice de la transcription appartenant au génome du virus SV40.

Amorces	Localisation génomique	Séquences des amorces (5'-3')	Références
LA1	2,251–2,274	GGGTGTTGGGCCCTTGTGCAAAGC	Weggen <i>et al</i> , 2000
LA2	2,545–2,522	CATGTCTGGATCCCCAGGAAGCTC	
RA1	266–245	AATGTGTGTCAGTTAGGGTGTG	
RA2	5195–5218	TCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTT	

d. Détection de séquences de la région régulatrice de la transcription

La détection de la région régulatrice de la transcription promotrice a été effectuée par PCR, en utilisant un couple d'amorces visant l'amplification d'une séquence d'ADN, située dans une région non codante d'environ 400 pb, localisée entre les gènes précoces et tardifs du génome du virus SV40 (**Tableau II-3**). Cette région peut être divisée en trois parties, la région promotrice elle-même qui contient une boîte TATA et quatre sites d'initiation de la transcription, trois éléments répétés de 21 pb (riches en G/C), et deux éléments parfaitement répétés de 72 pb (Wildeman *et al.*, 1988).

Le milieu réactionnel de la PCR contient les mêmes réactifs pour chaque tube de réaction : 400 ng d'ADN extrait de chaque échantillon dans un volume final de 25 µl contenant du tampon PCR 1x, 200 µM de chaque dNTPs, 0,2 µM des amorces RA1 et RA2 décrites dans le **Tableau II-3**, et 1 U de *Taq* DNA polymérase (Promega). Les réactions PCR démarrent par une étape de dénaturation à 92°C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles d'amplification comportant : une étape de dénaturation à 92°C pendant 45 secondes, suivie d'une étape d'hybridation pendant 45 secondes à 60°C et enfin une étape d'extension à 72°C pendant 45 secondes. Une dernière étape de 10 minutes à 72°C a été aussi incluse. Pour chaque série d'amplification, un contrôle négatif qui contient de l'eau distillée au lieu de l'ADN et un contrôle positif qui contient le plasmide pSVSph21-N ont été inclus.

L'électrophorèse des produits d'amplification est réalisée dans les mêmes conditions utilisées pour le gène de la β -globine.

Par cette méthode, l'amplification d'une séquence de 242 pb indique la présence d'une souche virale primitive (archétype) alors que l'amplification d'une séquence de 317 pb indique la présence d'une souche de laboratoire (couramment utilisée dans les plasmides de laboratoire). La PCR a été testée 3 fois pour chaque cas. La positivité d'un cas a été retenue s'il y a eu une reproductibilité du signal dans au moins deux tests.

e. Vérification de l'authenticité de la détection du virus SV40

Pour s'assurer de l'absence d'une éventuelle contamination de nos échantillons d'ADN par le plasmide contenant le génome du virus SV40, tous les cas SV40 positifs ont été testés par une technique de PCR utilisant des amorces spécifiques publiées par Carbone et ses

collaborateurs (Carbone *et al.*, 2005), visant l'amplification d'une séquence d'ADN de 241 pb située dans l'origine de réplication des plasmides utilisés dans la plupart des laboratoires.

Le milieu réactionnel de la PCR contient pour chaque tube de réaction : 400 ng d'ADN extrait à partir des échantillons testés positifs pour le virus SV40 dans un volume final de 25 µl contenant du tampon PCR 1x, 200 µM de chaque dNTPs, 0,2 µM des amorces oligonucléotidiques sens (3'-GCTCACGCTGTAGGTATCTC-5') et anti-sens (3'-TCTAGTGTAGCCGTAGTTAG-5') et 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Promega). Les réactions PCR démarrent par une étape de dénaturation à 92°C pendant 5 minutes, suivies de 40 cycles d'amplification comportant : une étape de dénaturation à 92°C pendant 45 secondes, suivie d'une étape d'hybridation pendant 45 secondes à 60°C et enfin une étape d'extension à 72°C pendant 45 secondes. Une dernière étape de 10 minutes à 72°C a été aussi incluse, elle permettra à la *Taq* DNA polymérase d'arriver au terme de la synthèse des fragments d'ADN double brin.

L'électrophorèse des produits d'amplification est réalisée dans les mêmes conditions utilisées pour le gène de la β -globine.

La présence d'une bande sur le gel d'électrophorèse de même taille que la bande du témoin positif indique une contamination de l'échantillon testé par ce plasmide, alors que son absence confirme l'authenticité des signaux retrouvés par les autres techniques de PCR utilisés pour la recherche du virus SV40.

II.2.2.2.3. Mise en évidence du virus MMTV-like par PCR

La détection du virus MMTV-like a été effectuée par une technique de PCR semi-nichée utilisant trois amorces spécifiques (1X, 2NR, 5F) visant l'amplification d'une séquence de 190 bp appartenant à la séquence *env* de ce virus, elle-même appartenant à une séquence du génome viral codant pour des protéines d'enveloppe publié par l'équipe de Ford (Ford *et al.*, 2004) (**Tableau II-4**).

Le milieu réactionnel du 1^{er} tour de la PCR contient pour chaque tube de réaction : 400 ng d'ADN extrait de chaque échantillon dans un volume final de 25 µl contenant du tampon PCR 1x, 200 µM de chaque dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce oligonucléotidique (1X, 2NR), et 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Promega). Pour le 2^{ème} tour de la PCR, 2µl du produit du premier tour d'amplification sont utilisés comme cible matrice en utilisant le couple

d'amorces 2NR et 5F. Les 2 réactions PCR démarrent par une étape de dénaturation à 92°C pendant 5 minutes, suivies de 40 cycles d'amplification comportant : une étape de dénaturation à 92°C pendant 45 secondes, suivie d'une étape d'hybridation pendant 45 secondes à 59°C et enfin une étape d'extension à 72°C pendant 45 secondes.

Pour chaque série d'amplification, sont réalisés : un contrôle négatif (blanc) contenant le même mélange réactionnel mais où l'ADN matrice est remplacé par de l'eau distillée stérile ainsi qu'un contrôle positif correspondant à un fragment d'ADN de 2,7 kb de la région *env*-LTR du virus MMTV-like gracieusement offert par le Dr Beatriz G.T.Pogo et le Dr Stella Melana (Département de Médecine et de Microbiologie, Mount Sinai School of Médecine, New York, Etats-Unis).

L'électrophorèse des produits d'amplification est réalisée dans les mêmes conditions utilisées pour le gène de la β -globine.

Afin de confirmer la spécificité de l'amplification obtenue par cette technique, les produits de PCR ont été analysés par séquençage suivant le protocole qui sera décrit plus loin dans ce chapitre (page 57).

Tableau II-4 : Amorces utilisées pour l'amplification de la région *env* du génome du virus MMTV-like.

Amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Références
1X	TGCGCCTTCCCTGACCAAGGG	Ford <i>et al</i> , 2004
2NR	GTAACACAGGCAGATGTAGG	
5F	GTATGAAGCAGGATGGGTAGA	

II.2.2.2.4. Mise en évidence de l'ADN des papillomavirus humains par PCR

La démarche que nous avons adoptée pour l'amplification génique des HPV, consiste en premier lieu à l'utilisation de deux couples d'amorces E1-547R/E1-350L et GP5+/GP6+ (Josefsson *et al.*, 1999 ; de Roda *et al.*, 1995) visant l'amplification respectivement des séquences situées au niveau des régions E1 et L1 conservées pour un large spectre de HPV ano-génitaux. En deuxième lieu, le groupe auquel appartient le virus HPV est déterminé en utilisant 2 couples d'amorces, le 1^{er} couple d'amorces PU-1M/PU-2R est spécifique des types à haut risque oncogène (HPV 16, 18, 31, 33, 52b et 58) et pour lequel la taille du produit d'amplification varie de 231-268 pb, et le 2^{ème} couple d'amorces PU-2R/PU-31B spécifique de type à bas risque oncogène (HPV 6 et 11) et qui génère un amplifiât de 228 pb (Fujinaga *et al.*, 1991). La particularité de ces deux couples d'amorces est qu'ils ont en commun un même oligonucléotide antisens situé dans la région E7 du génome viral. La région E6 représente la région génomique où se localisent les oligonucléotides utilisés pour le typage du HPV. Les deux régions E6 et E7 sont perpétuellement présentes même après intégration du génome viral dans le génome de l'hôte. A la fin, la détection des HPV a été complétée par l'utilisation de couples d'amorces types spécifiques visant l'amplification d'une région du génome viral appartenant à la région E6 permettant la détection d'une manière spécifique et individuelle des HPV 16, 18, 31 et 33 (Baay *et al.*, 1996).

Les différentes réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µl pour chaque tube contenant : le tampon de PCR 1x, 200 µM de chaque dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce oligonucléotidique, 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Promega), et environ 400 ng d'ADN extrait de chaque échantillon.

La réaction de PCR démarre par une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes suivie de 40 cycles comportant chacun : une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à la température spécifique pour chaque couple d'amorces utilisés pendant 30 secondes et une étape de polymérisation à 72°C pendant 1 minute 30 secondes. Enfin, une étape de 10 minutes à 72°C permettant à la *Taq* DNA polymérase d'arriver au terme de la synthèse des fragments polymérisés. La température et la durée de chacune des étapes des cycles d'amplification spécifiques pour chaque couple d'amorces utilisé pour la détection des HPV par PCR sont précisées dans le **Tableau II-5**.

Pour la détection des HPV, un contrôle négatif (blanc) contenant le mélange de l'amplification où l'ADN matrice est remplacé par l'eau distillée ainsi qu'un contrôle positif

correspondant à de l'ADN extrait à partir de différents cas cliniques testés ultérieurement positifs pour les différents types de HPV analysés dans ce travail, ont été réalisés.

L'électrophorèse des produits d'amplification est réalisée dans les mêmes conditions utilisées pour le gène de la β -globine.

Tableau II-5 : Amorces utilisées pour la détection et le typage des papillomavirus humains.

Virus ou région virale	Séquence des amorces (5'-3')	Taille des produits d'amplification	T° d'hybridation	Références
Région E1 des HPV anogénitaux	E1-547R : TTCCA ^T TCAGWAYWGCCATA E1-350L : TRYRKGY ^Y Y ^T AAAAACGAAAGT	180 pb	47°C	Josefsson <i>et al</i> , 1999
Région L1 des HPV anogénitaux	GP5+ : TTTGTTACTGTGGTAGATAC GP6+ : ACTAAATGTCAAATAAAAAG	150 pb	54°C	de Roda <i>et al</i> , 1995
HPVs bas risques (6 and 11)	PU-1M : TGTCAAAAACCGTTGTGTCC PU-2R : GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	231-268 pb	52°C	Fujinaga <i>et al</i> , 1991
HPVs hauts risques (16, 18, 31, 33, 52b, and 58)	PU-2R : GAGCTGTCGCTTAATTGCTC PU-31B : TGCTAATTCGGTGCTACCTG	228 pb	52°C	Fujinaga <i>et al</i> , 1991
HPV-16	HPV16NT-S : GGTCGGTGGACCGGTGCGATG HPV16NT-R : GCAATGTAGGTGTATCTCCA	96 pb	56°C	Baay <i>et al.</i> , 1996
HPV-18	HPV18NT-S : CCTTGGACGTAAATTTTTGG HPV18NT-R : CACGCACACGCTTGGCAGGT	115 pb	58°C	Baay <i>et al.</i> , 1996
HPV-31	HPV31NT-S : GGGATTGTTACAAAGCTACC HPV31NT-R : CGCTTAGTAGACGTCGTCGC	110 pb	56°C	Baay <i>et al.</i> , 1996
HPV-33	HPV33NT-S : CCACCACTGCTTCTTACCTC HPV33NT-R : ACCATTTTCATCAAATGGGA	114pb	56°C	Baay <i>et al.</i> , 1996

II.2.2.2.5. Mise en évidence de l'ADN des herpesvirus humains par PCR

Pour la détection des herpesvirus humains suivants : HSV-1, CMV, EBV, HHV-6 et HHV-8, nous avons utilisé différentes techniques de PCR visant l'amplification de régions spécifiques pour chaque virus analysé.

Pour le HSV1 l'amplification vise une séquence de 138 pb (Li *et al.*, 2003) située au niveau de la région de l'ADN polymérase viral. Pour l'EBV l'amplification vise une séquence de 175 pb (Gopal *et al.*, 1990) située au niveau de la région BamH1 G du génome viral. Pour le CMV l'amplification vise une séquence de 167 pb (Tsai *et al.*, 2005) située au niveau de la région IE2 du génome viral. Pour le HHV6, l'amplification vise une séquence de 223 pb (Zhang *et al.*, 1993) située au niveau de la région de l'ADN polymérase viral. Pour détecter le HHV8 nous avons utilisé une technique de PCR visant l'amplification d'une séquence de 233 pb (Chang *et al.*, 1994) située au niveau de la région de la capsid du génome viral. Les séquences des différentes amorces utilisées ainsi que les détails techniques sont rapportés dans le **Tableau II-6**.

Toutes les étapes de PCR ont été effectuées dans des conditions très exigeantes de stérilité. La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µl pour chaque tube contenant : le tampon de PCR 1x, 200 µM de chaque dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce oligonucléotidique, 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Promega), et environ 400 ng d'ADN extrait de chaque échantillon.

La réaction démarre par une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles comportant chacun : une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à la température spécifique pour chaque couple d'amorces pendant 30 secondes et une étape de polymérisation à 72°C pendant 1 minute et 30 secondes. Enfin, est réalisée une étape de 10 minutes à 72°C permettant à la *Taq* DNA polymérase d'arriver au terme de la synthèse des fragments polymérisés. La température et la durée de chacune des étapes des cycles d'amplification spécifiques pour chaque couple d'amorces utilisé pour la détection des HPV par PCR sont précisées dans le **Tableau II-6**.

Pour la détection de chaque virus, un contrôle négatif (blanc) contenant le mélange de l'amplification sans ADN ainsi qu'un contrôle positif correspondant à de l'ADN extrait à partir de différents cas cliniques testés ultérieurement positifs pour ces virus sont réalisés.

Dix microlitres de chaque produit amplifié ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% dans les mêmes conditions que celle utilisées pour l'analyse des autres virus.

Tableau II-6 : Amorces utilisées pour la détection des herpesvirus humains.

Virus	Séquence des amorces (5'-3')	Taille des produits d'amplification	T° d'hybridation	Références
HSV1	HSV1-3: CCATACCGACCACACCGACGA HSV1-4: GGTAGTTGGTCGTTTCGCGCTGAA	138 pb	54°C	Li <i>et al</i> , 2003
EBV	EBV-S: AACATGCTGTATGCCTCGCAGCG EBV-R: AATTACTGGCGTGAATTGTGCCCA	176 pb	57°C	Gopal <i>et al</i> , 1990
CMV	IE2-1: TCCTCCTGCAGTTCGGCTTC IE2-2: TTTCATGATATTGCGCACCT	240 pb	56°C	Zang <i>et al</i> , 1993
HHV6	HHV6-F: AAGCTTGCACAATGCCAAAAAACAG HHV6-R: CTCGAGTATGCCGAGACCCCTAATC	223 pb	56°C	Chang <i>et al</i> , 1994
HHV8	KS-1: AGCCGAAAGGATTCCACCAT KS-2: TCCGTGTTGTCTACGTCCAG	233 pb	55°C	Tsai <i>et al</i> , 2005

II.2.3. Séquençage de l'ADN

II.2.3.1. Principe

Le séquençage est réalisé selon la méthode des didésoxyribonucléotides de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) par un séquenceur automatique (Système ABI Prism 310, Applied Biosystems). Des didésoxyribonucléotides marqués (isotope radioactif, fluorescent, chémiluminescent...) sont incorporés dans les fragments d'ADN synthétisés par l'AmpliTaq DNA polymérase, adaptée au séquençage en présence de désoxyribonucléotides non marqués, au cours de cycles d'amplification PCR, réalisés dans un thermocycleur. Le protocole de la réaction est celui du kit de séquençage « ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit » (Applied Biosystems). Une amorce, complémentaire d'une région située en 5' ou 3' du fragment d'ADN résultant de l'amplification par PCR, est hybridée à l'ADN matrice rendu simple brin à la suite d'un traitement par la chaleur. En présence des 4 dNTPs, l'ADN polymérase initie l'élongation à partir de l'extrémité 3'-OH libre de l'amorce

hybridée. L'incorporation d'un des quatre didésoxyribonucléotides, chacun marqué avec une molécule fluorescente différente, (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) entraîne l'arrêt de l'élongation et ceci de façon aléatoire.

II.2.3.2. Application du séquençage pour l'analyse de la séquence *env* du virus MMTV-like amplifiée par PCR

Lors de cette étude, le séquençage a été réalisé pour pouvoir vérifier si la séquence *env* du virus MMTV-like amplifié par PCR semi-nichée correspond bien à la séquence attendue de la région *env* de ce virus, ainsi que pour s'assurer de l'origine exogène des séquences amplifiées et pour éliminer une éventuelle contamination.

La réaction de séquence est réalisée par PCR unidirectionnelle avec l'AmpliTaq DNA polymérase. Une solution contenant 10 à 20 ng de produit de la PCR semi-nichée purifiée par le kit de purification Wizard SV Gel and PCR Clean-Up, suivant les recommandations du fabricant (Promega) après migration sur gel d'agarose, est tout d'abord dénaturée par chauffage à 100°C pendant 5 minutes puis immédiatement déposée sur glace pendant 5 minutes. Dans un tube PCR sont mélangés l'ADN dénaturé et 3 µl de mix Big Dye Terminator contenant les dNTPs, les ddNTPs, du MgCl₂, 5 pmoles d'amorce 5F, 0.5 Unité de l'ADN polymérase (AmpliTaq, Applied Biosystems) et 1 µl de tampon 5x (Tris-HCl 400 mM pH 9,0, MgCl₂ 10 mM) dans un volume final de 20 µl.

Les réactions de séquence sont alors réalisées avec un thermocycleur GeneAmpPCR System 9600 (Applied Biosystems). Les réactions de PCR sont constituées par 25 cycles d'amplification comportant des étapes : de dénaturation pendant 10 secondes à 95°C, d'hybridation de l'amorce pendant 5 secondes à 55°C et d'élongation par l'ADN *Taq* polymérase pendant 4 minutes à 60°C. Cette réaction peut être précédée par une étape supplémentaire de dénaturation durant 3 minutes à une température de 95°C.

Le milieu réactionnel est ensuite précipité par 4 volumes d'isopropanol à 75% pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot obtenu après une première centrifugation de 25 min à 13000 rotations par minute et à 4°C est lavé avec 250 µl d'isopropanol à 75% et resuspendu. Après une deuxième centrifugation de 15 minutes à 13000 rotations par minute le culot est séché à température ambiante, repris dans 20 µl de solution dénaturante (Template Suppressor Reagent) et dénaturé 3 minutes à 96°C avant d'être placé dans la glace. Les séquences sont

ensuite chargées et analysées à l'aide d'un système automatique composé d'un appareil d'électrophorèse capillaire contenant un gel d'acrylamide couplé à un système de détection de fluorescence (ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems) et d'un logiciel d'acquisition et d'analyse de données (ABI PRISM™ GeneScan Analysis, Applied Biosystems) opérant sur un ordinateur. Les marqueurs sont excités par un rayon laser, et des filtres virtuels de détection de la fluorescence permettent de détecter chaque marqueur dans sa zone de longueur d'onde d'émission maximale. L'appareil détecte des couleurs dans l'ordre des longueurs d'ondes croissantes (bleu, vert, jaune et noire).

La comparaison des séquences d'ADN analysées avec les séquences des virus MMTV et MMTV-like publiées dans les banques de données, GenBank, EMBL et Swiss-prot, a été réalisée avec le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fonctionnant sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Par la suite, l'alignement multiple des séquences nucléiques a été effectué avec le programme CLUSTALW disponible sur le site www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl.

II.2.4. Immunohistochimie

II.2.4.1. Principe

L'immunohistochimie est une technique de détection morphologique directe permettant la recherche de l'expression des protéines intra-tissulaires par des antisérums spécifiques souvent de lapin ou de souris (anticorps primaires). Ces anticorps peuvent être conjugués directement avec des enzymes (peroxydase, phosphatase alcaline) ou des marqueurs de fluorescence, ou reconnus par des anticorps secondaires (anticorps universels) conjugués avec des marqueurs de fluorescence ou avec des enzymes de révélation (peroxydase, phosphatase alcaline) capables de transformer un chromogène incolore (DAB, AEC...) et de créer une coloration révélée sous microscope optique. Elle se réalise sur des coupes tissulaires congelées ou déparaffinées.

Nous avons utilisé pour cette technique un kit de détection de l'immunomarquage EnVision (DakoCytomation, K4061) ayant une sensibilité très élevée utilisant un polymère de dextran sur lequel est fixé d'une part, l'anticorps secondaire capable de reconnaître l'anticorps primaire et d'autre part, plusieurs molécules de l'enzyme de révélation (peroxydase).

II.2.4.2. Protocole

Pour appliquer la technique d'immunohistochimie, des témoins positifs et négatifs ont été utilisés dans ce travail. Pour cela, des bloc de paraffine de cas cliniques déjà testés positifs pour l'expression des antigènes étudiés dans notre laboratoire, ainsi qu'un bloc en paraffine contenant du tissu tumoral d'un adénocarcinome prostatique d'une souris transgénique (TRAMP) SV40 positif, gracieusement offert par le Professeur P. Wikström (Department of Medical Bioscience and Pathology, Umea University, Umea, Suède), ont été utilisés comme des témoins positifs.

Brièvement, 5 µm de tissu en paraffine ont été coupés, étalés sur des lames déparaffinés, et réhydratés. Ensuite, un démasquage antigénique a été réalisé pendant 40 minutes avec un tampon spécifique à chaque anticorps. L'activité des peroxydases endogènes a été neutralisée en utilisant le peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 5 minutes. Les lames ont été par la suite lavées à l'eau distillée puis dans un tampon tris salin (TBS) 0,05 M pH 7,4. Ensuite les anticorps primaires spécifiques des antigènes à rechercher ont été appliqués à leurs dilutions adéquates et pendant une durée optimale comme indiqué dans le **Tableau II-7**.

La révélation des anticorps primaires fixés aux antigènes est réalisée par incubation avec le polymère de dextran conjugué à des anticorps secondaires et à l'enzyme peroxydase pendant 30 minutes suivie d'un lavage à l'eau distillée.

Le substrat utilisé pour la révélation de l'activité peroxydase est l' amino-3-éthyl-9-carbazole (DAB) appliqué pendant 5 à 15 minutes. Enfin, les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline déshydratée dans de l'éthanol à concentration croissante (50%, 75%, 90% et alcool absolu) puis dans du toluène et finalement montées. Vue au microscope optique, la positivité consiste en une coloration brunâtre et granulaire, nucléaire, cytoplasmique ou membranaire.

Tableau II-7 : Liste des anticorps utilisés dans l'étude immunohistochimique.

Anticorps	Clone	Provenance	Dilution	Conditions	Type de démasquage
Anti-Tag du SV40	Pab 108	Santa Cruz Biotechnology	1/100	Pendant une nuit, 4°C	Citrate, pH 9.0
Anti-LMP-1 de l'EBV	CS1-4	DakoCytomation	1/25	30 min, température ambiante	Citrate, pH 6.0
Anti-ZEBRA de l'EBV	BZ1	DakoCytomation	1/50	30 min, température ambiante	Citrate, pH 6.0
Anti-récepteurs à l'œstrogène	1D5	DakoCytomation	1/40	30 min, température ambiante	Citrate, pH 9.0
Anti-récepteurs à la progestérone	PgR636	DakoCytomation	1/40	30 min, température ambiante	Citrate, pH 9.0
Anti-HER2	Poly-clonale	DakoCytomation	1/1000	30 min, température ambiante	Citrate, pH 6.0
Anti-P53	DO-7	DakoCytomation	1/100	30 min, température ambiante	Citrate, pH 6.0

II.2.5. Hybridation in situ

La technique d'hybridation *in situ* est une méthode de détection morphologique directe qui se base sur l'utilisation de sondes à ADN ou ARN pour mettre en évidence une séquence d'acide nucléique cible tel que le génome d'un virus. Les sondes peuvent être marquées par des isotopes radioactifs (P32, S35, H3 ...) ou des groupements chimiques (biotine, digoxygénine, fluorescéine,...) permettant la révélation du marquage par méthodes immunoenzymatiques.

Cette technique permet de préciser la nature exacte de la cellule infectée au sein d'une population cellulaire polymorphe. C'est une technique très sensible et très spécifique, de réalisation rapide et simple sur des coupes de tissus fixées dans des conditions de diagnostic de routine.

II.2.5.1. Détection de l'EBV

Afin de pouvoir déterminer et localiser les cellules infectées par l'EBV, nous avons appliqué la technique d'hybridation in situ utilisant des sondes PNA (Peptides d'acides nucléiques de synthèse) complémentaires aux deux transcrits primaires nucléaires EBER-1 et 2 de l'EBV, conjuguées à la fluorescéine (DakoCytomation, Y5200). Ces sondes sont très stables car les bases sont portées par des peptides (non dégradables par les RNases), contrairement aux sondes ARN/ADN classiques. Cette technique a été appliquée sur les cas EBV-positifs détectés par PCR.

Pour appliquer la technique d'hybridation in situ, on introduit deux témoins, un positif qui correspond à un carcinome du nasopharynx EBV+ et un négatif qui correspond à un lymphome B EBV- testé précédemment dans notre laboratoire. Cette technique de diagnostic morphologique comprend cinq étapes qui sont les suivantes :

▪ Préparation des coupes

Des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome, à partir des blocs de tissus fixés au formol et enrobés en paraffine. Ces coupes sont étalées avec de l'eau distillée sur des lames placées sur une plaque chauffante et préalablement traitées au Silane (le Silane empêche le décollement des coupes). L'adhésion des coupes sur les lames est augmentée par un traitement au micro-onde pendant 5 minutes. Enfin, une incubation des lames pendant une

nuit à 37°C, permet une meilleure adhésion des coupes tissulaires sur la lame ainsi que la fusion de la paraffine.

▪ **Pré-traitement des coupes**

Le déparaffinage des coupes est effectué dans le toluène (2 bains de 5 minutes). Pour éliminer le toluène résiduel et réhydrater les tissus, les coupes subissent deux passages successifs dans deux bains d'éthanol absolu, suivis de 3 bains d'éthanol à 95% et deux lavages à l'eau distillée.

Une digestion protéolytique est assurée par la protéinase K de concentration 1 µg/ml diluée dans du tampon salin Tris-Borate (TBS) pH 7,5 à température ambiante pendant 30 minutes pour rendre l'ADN accessible à la sonde, suivie d'un lavage dans deux bains d'eau distillée. Enfin, les lames sont passées successivement dans des bains d'éthanol à 70°, 90° et 100° puis séchées à température ambiante pendant 2 heures (pour éviter la dilution des sondes dans les alcools).

▪ **Hybridation**

Après avoir entouré les coupes tissulaires par le DAKO-PEN (DakoCytomation, S 2000), 25 µl de la solution d'hybridation (contenant la sonde PNA) sont appliqués sur les lames et elles sont recouvertes par des lamelles pour être incubées dans une chambre humide à 55°C pendant une nuit.

▪ **Lavage de stringence**

Le lavage de stringence consiste en un traitement des coupes tissulaires avec deux types de tampons de lavage. En effet, le premier lavage consiste à faire immerger les lames dans du tampon de lavage de stringence diluée au 1/60 (prêt-à-l'emploi) et préchauffé à 55°C. Ensuite une incubation des lames est effectuée à 55°C pendant 25 minutes. Le deuxième lavage est réalisé par passage des lames dans du tampon TBS.

▪ **Révélation**

La révélation de l'hybride de la sonde PNA sur l'ARN cible se fait par méthode colorimétrique basée sur l'interaction de la phosphatase alcaline couplée à un anticorps anti isothiocyanate de fluorescéine et qui a pour substrat le BCIP/NBT. Le kit utilisé est de type Dako (DakoCytomation, K5201). 100 µl d'anticorps anti-isothiocyanate de fluorescéine sont additionnés sur chaque lame suivie d'une incubation à température ambiante dans une chambre humide pendant 30 minutes. L'élimination de l'excès d'anticorps anti isothiocyanate de fluorescéine est assurée par lavage des lames : deux premiers lavages dans du tampon TBS à pH 7,5 pendant 3 minutes chacun, puis deux autres lavages de 15 minutes dans du tampon

STMT pH 7,5, suivis d'un autre lavage de 5 minutes dans du tampon STM pH 9,5 1M. Enfin un lavage pendant 5 minutes dans du tampon STM pH 9,5 0,1 M est pratiqué.

Après avoir ajouté le substrat de la phosphatase alcaline sur les lames, le BCIP/NBT, une incubation dans une chambre humide pendant 30 à 60 minutes est effectuée. Un dernier lavage des lames est réalisé dans l'eau stérile pendant 5 minutes, suivi d'une contre coloration à l'hématoxyline et d'un montage dans le Faramount (DakoCytomation, S3025).

A la microscopie optique, les cas obtenus EBV positifs par hybridation in situ se manifestent par une coloration noirâtre intranucléaire.

II.2.5.2. Détection du virus HPV

En vue de repérer la présence probable des virus HPV dans les cellules cancéreuses du sein, nous avons appliqué la technique suivante sur tous les cas testés positifs par PCR.

Les sondes que nous avons utilisées sont de type ADN double brin biotinylées (incorporant la thymidine biotinylée). Elles sont réparties en deux classes :

➤ Un cocktail de Sondes (HPV PAN) dirigé contre un large spectre d'HPV anogénitaux (HPV6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 51 et 52) (DakoCytomation, Y2016).

➤ Des sondes spécifiques aux types:

* 6/11 qui visent les gènes E5, E6, L2, URR (DakoCytomation, Y1411).

* 16/18 qui ciblent les gènes E1, E2, E4, E5, E7 et URR du HPV16 et E2, E5, E6, E7, L2 et URR du HPV 18 (DakoCytomation, Y1412).

* 31/33 qui visent les gènes E5, E2, L2 et URR du HPV 31 et E2, E5, E6, L2 et URR du HPV 33 (DakoCytomation, Y1413).

Pour cette technique, on dispose de trois témoins : deux positifs et un troisième négatif. Les deux témoins positifs permettent de contrôler le bon déroulement et la réussite de la technique alors que le témoin négatif sert pour l'interprétation des réactions faussement positives et l'évaluation du bruit de fond. Les deux témoins positifs correspondent à des biopsies de carcinomes épidermoïdes du col utérin HPV PAN+, HPV16/18+, HPV31/33+ et une biopsie de condylome acuminé HPV6/11+. Le témoin négatif correspond à des prélèvements cutanés HPV négatifs qui ont été testés auparavant dans notre laboratoire.

La technique d'hybridation in situ se déroule en cinq étapes qui sont les suivantes :

▪ **Préparation des coupes**

Cette étape est la même que nous avons pratiqué pour l'EBV.

▪ **Prétraitement des coupes**

Le déparaffinage et la réhydratation des coupes sont réalisés convenablement comme pour le HPV. Une digestion protéolytique est ensuite effectuée afin de rendre l'ADN cible accessible à la sonde et ceci en utilisant 200 µl de la solution de digestion à 37°C contenant la pepsine à 0,4% dans l'acide chlorhydrique pendant 20 minutes dans une chambre humide. Ensuite les lames sont lavées dans deux bains d'eau distillée de 5 minutes chacun. La déshydratation est réalisée par passage dans un bain d'éthanol.

▪ **Dénaturation et hybridation**

Après avoir entouré les coupes tissulaires par DAKO-PEN (Dako S 2000), 15 µl de la solution d'hybridation sont appliqués et elles sont ensuite couvertes par une lamelle acétonée pour éviter l'étalement et l'évaporation de la sonde. Ensuite la dénaturation thermique de l'ADN cible et de la sonde est réalisée sur plaque chauffante pendant 7 minutes à 94°C. Enfin l'hybridation est effectuée par incubation dans une chambre humide pendant une nuit à 37°C.

▪ **Lavage de stringence**

Après incubation, les lames sont lavées dans deux bains de tampon TBS pH 7,5 (Tris Buffered Saline) de 5 minutes chacun afin de détacher les lamelles. Elles sont ensuite incubées dans la solution de lavage de stringence, fournie par le kit, préchauffée 30 minutes à 48°C.

▪ **Révélation**

C'est grâce à une réaction colorimétrique que la révélation des hybrides ADN/sonde est effectuée. En effet, cette réaction met en jeu la streptavidine qui est une protéine tetramérique possédant 4 sites de liaison de haute affinité pour la biotine. Cette protéine est conjuguée à la phosphatase alcaline qui a comme substrat le BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate avec le nitrobleu tétrazolium), dissout dans le lévamisole qui est un inhibiteur des phosphatases alcalines endogènes.

Après addition de 50 µl, sur chaque lame, de la solution streptavidine-phosphatase alcaline (SPA) fourni par le kit (DakoCytomation, K0601), une incubation dans une chambre humide à température ambiante pendant 20 minutes est effectuée.

L'élimination de la solution SPA, s'effectue par lavage au TBS pH 7,5, suivi d'un autre lavage dans une solution de STM. Ce dernier lavage élimine la fixation non spécifique de la SPA sur les protéines cellulaires.

Après avoir appliqué le substrat de la phosphatase alcaline qui est le BCIP/NBT, les lames sont incubées à l'abri de la lumière pendant une heure. Un dernier lavage à l'eau distillée est réalisé avant la contre coloration à l'hématoxyline et le montage aqueux au Faramount (DakoCytomation, S3025).

Enfin, la lecture des lames s'effectue au microscope optique. La présence de l'ADN du HPV dans le tissu apparaît sous forme de dépôt bleu noirâtre dans les noyaux des cellules épithéliales infectées. Une coloration cytoplasmique en l'absence de coloration nucléaire ne doit pas être interprétée comme positive.

II.2.6. Analyse de la méthylation de l'ADN

II.2.6.1. Principe

La PCR spécifique de la méthylation (MSP) est une technique rapide et très sensible pour analyser la méthylation des cytosines d'une façon qualitative. Elle est basée sur l'utilisation de deux paires distinctes d'amorces au niveau de la région d'intérêt, destinées à amplifier les brins méthylés (amorces M) ou non méthylés (amorces U) après transformation de l'ADN par le bisulfite de sodium (**Figure II-1**). En effet, ce dernier convertit les cytosines non méthylées en uraciles (**Figure II-1**), lesquelles sont reconnues comme des thymines au cours de l'amplification de l'ADN par PCR, alors que les cytosines méthylées ne sont pas modifiées par le bisulfite de sodium et sont donc détectées comme des cytosines (Derks *et al.*, 2004).

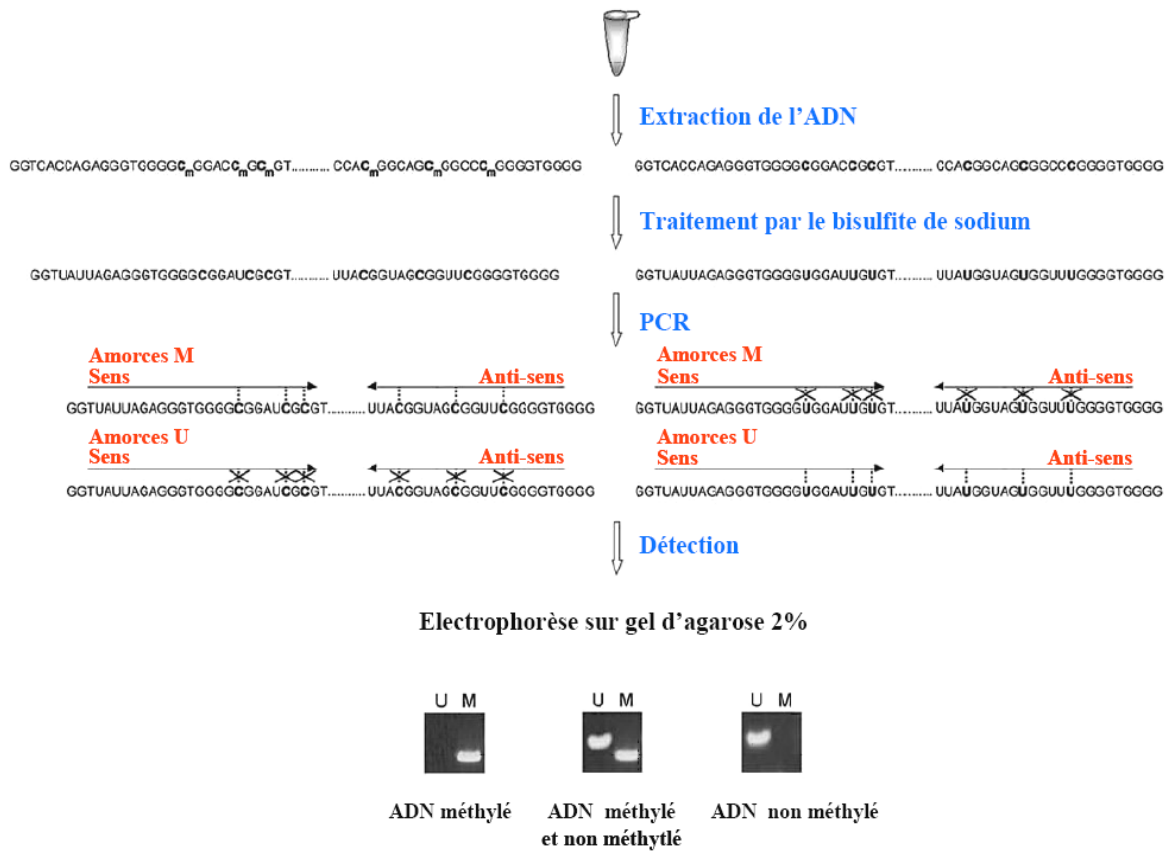


Figure II-1 : Schéma représentatif des différentes étapes de la PCR spécifique à la méthylation (Derks *et al*, 2004)

II.2.6.2. Les gènes étudiés

L'ensemble des gènes auxquels nous nous sommes particulièrement intéressés sont rapportés dans le **Tableau II-8**. Ces gènes sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, l'adhésion cellulaire, l'angiogénèse, la différenciation cellulaire, et la détoxification des carcinogènes. Au total nous avons analysé dans cette étude 15 gènes.

Tableau II-8 : Récapitulatif des gènes analysés au cours de ce travail.

Gènes	Localisations Chromosomique	Fonctions	Références
<i>RASSFA1</i>	3p21.3	Apoptose et régulation du cycle cellulaire	Wong <i>et al.</i> , 2002
<i>BLU</i>	3p21.3	Inhibition de la croissance cellulaire	Agathangelou <i>et al.</i> , 2003
<i>hMLH1</i>	3p21.3	Réparation de l'ADN	Murata <i>et al.</i> , 2005
<i>RAR-β2</i>	3p24	Réponse hormonale	Widschwendter <i>et al.</i> , 2000
<i>APC</i>	5q21-22	Transduction du signal	Esteller <i>et al.</i> , 2000
<i>ER</i>	6q25.1	Réponse hormonale	Ottawiano <i>et al.</i> , 1994
<i>P16</i>	9p21	Régulation du cycle cellulaire	Herman <i>et al.</i> , 1996
<i>DAPK</i>	9q34	Apoptose	Katzenellenbogen <i>et al.</i> , 1999
<i>GSTP1</i>	11q13.3	Détoxification cellulaire	Esteller <i>et al.</i> , 1998
<i>SHP1</i>	12p13	Différenciation cellulaire	Oka <i>et al.</i> , 2002
<i>Cyclin D2</i>	12p13	Régulation du cycle cellulaire	Evron <i>et al.</i> , 2001
<i>HINI</i>	12p13.32	Cytokine de signalisation	Krop <i>et al.</i> , 2001
<i>CDH1</i>	16q22.1	Adhésion cellulaire	Herman <i>et al.</i> , 1996
<i>BRCA1</i>	17q21	Réparation de l'ADN	Esteller <i>et al.</i> , 2000
<i>TIMP3</i>	22q13.1	Invasion cellulaire et métastase	Bachman <i>et al.</i> , 1999

II.2.6.3. Conditions expérimentales

II.2.6.3.1. Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium

a- Principe

L'analyse du profil de méthylation de l'ADN a été transformée suite à la découverte des conséquences du traitement par le bisulfite de sodium sur l'ADN. En présence de ce composé, il se produit une sulfonation et une désamination des cytosines qui se transforment en uraciles sulfonates. La désulfonation dans un milieu à pH basique complète la conversion des cytosines en uraciles (**Figure II-2**). Cependant, cette désamination est beaucoup plus rapide quand les cytosines sont déméthylées que quand elles sont méthylées. En pratique, dans les conditions expérimentales choisies, seules les cytosines déméthylées seront transformées en uracile mais les cytosines méthylées restent inchangées.

Après ce traitement, on obtient donc une séquence d'ADN modifiée dans laquelle les seules cytosines qui persistent sont celles qui étaient méthylées à l'origine. Les autres sont transformées en uracile (remplacée par une thymine lors des amplifications au cours des réactions de polymérisation en chaîne par une *Taq* DNA polymérase).

b- Protocole

La procédure adoptée au cours de cette étude a été décrite en 1992 par Frommer et ses collaborateurs (Frommer *et al.*, 1992). Pour réaliser cette transformation, 1 à 2 µg d'ADN génomique sont dilués avec de l'eau distillée stérile dans un volume final de 50 µl. L'ADN est ensuite dénaturé en présence de 0,2M NaOH (la solution de NaOH doit être préparée extemporanément) à 37°C pendant 15 min, puis aussitôt mis dans de la glace. Le mélange est ensuite additionné de 30 µl d'une solution d'hydroquinone 10 mM et 520 µl d'une solution de bisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 3M (Sigma), pH 5, préparées extemporanément et à l'abri de la lumière. Les échantillons sont homogénéisés délicatement puis incubés sous l'huile minérale pendant 16 heures à 50°C. A ce stade, les résidus cytosines de départ sont transformés, par sulfonation, en cytosine-6-sulfonate puis, par désamination, en uracile-6-sulfonate (**Figure II-2**).

Les sels de bisulfite sont éliminés par purification de l'ADN sur des résines de silice à l'aide du kit Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, France) selon les recommandations du

fabricant. L'ADN ainsi purifié est repris dans 150 µl d'eau distillée. La désulfonation de l'uracile-6-sulfonate en uracile est favorisée par un pH basique. Ainsi, 20 µl d'une solution de NaOH 3 M préparée extemporanément et 30 µl de H₂O (concentration finale 0,3 M) sont ajoutés à l'ADN puis incubés pendant 5 minutes à température ambiante. L'ADN est ensuite précipité par le chlorure de sodium 5 M (NaCl) avec un volume correspondant au 1/10 du volume récupéré et de l'éthanol absolu avec un volume correspondant au double du volume récupéré. Après des agitations douces par inversions répétées, on incube les échantillons pendant une heure à -80°C. L'ADN est récupéré par une centrifugation à 12.000 rotations par minute pendant 10 min à 4 °C. Après décantation, on additionne 1 mL d'éthanol à 70 % permettant de laver le culot d'ADN. Par la suite on effectue une étape de centrifugation à 12.000 rotations par minute pendant 15 min. Finalement, on laisse les échantillons sécher pour éliminer tous les résidus d'éthanol. Après évaporation totale de l'éthanol, l'ADN est dissout dans 150 µl d'eau distillée et gardé à -20°C pendant 3 mois maximum.

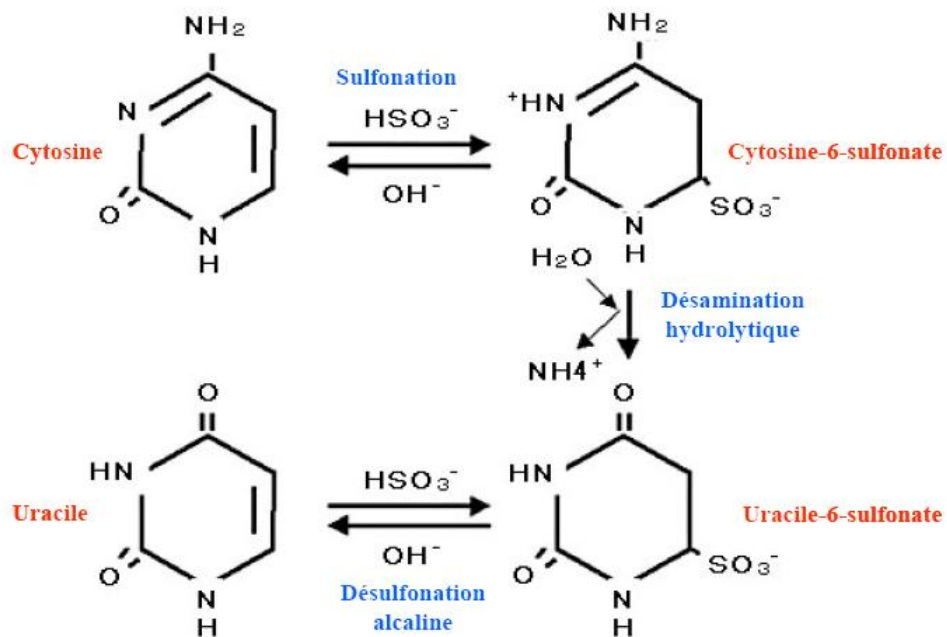


Figure II-2 : Etapes de la réaction de conversion par le bisulfite de sodium

II.2.6.3.2. Contrôle de la qualité de l'ADN après traitement au bisulfite de sodium

Le traitement de l'ADN par le bisulfite de sodium est une étape agressive pour les acides nucléiques. Afin de contrôler la qualité de l'ADN obtenu après ce traitement, nous avons réalisé une réaction PCR visant l'amplification d'une séquence de 133 pb appartenant au gène de la β -actine (Singal *et al.*, 2004). Les amorces utilisées au cours de cette réaction sont destinées à s'hybrider au niveau d'une région riche en cytosines non méthylées qui sont transformées en uraciles après traitement (**Tableau II-9**). Un résultat positif témoigne de la bonne qualité de l'ADN et de la réussite de la réaction de conversion par le bisulfite de sodium.

Tableau II-9 : Amorces utilisées pour contrôler la qualité de l'ADN après traitement.

Amorces	Séquence des amorces (5'-3')	Taille des produits d'amplification	T° d'hybridation	Référence
β -actin 5M	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	133 pb	60°C	Singal <i>et al.</i> , 2004
β -actin 3M	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA			

II.2.6.3.3. Analyse de l'ADN traité par PCR spécifique à la méthylation (MSP)

a- Principe

La MSP est une technique qui a été décrite pour la première fois en 1996 par Herman et ses collaborateurs (Herman *et al.*, 1996). Pour réaliser cette réaction, trois facteurs doivent être considérés dans le choix des amorces. En premier lieu, l'ADN transformé par le bisulfite de sodium n'est plus auto-complémentaire. Les amorces choisies pour l'amplification de brins sens d'une partie définie de l'ADN seront donc différentes de celles qui sont utilisées pour les brins anti-sens. Deuxièmement, les amorces doivent contenir plusieurs cytosines qui ne font pas partie de dinucléotides CpG dans la séquence originale, et qui sont, donc, transformées en uraciles après le traitement. L'inclusion de ces bases dans les amorces aide à éviter l'amplification de l'ADN résiduel non transformé, et, donc, d'éviter les faux positifs. Troisièmement, les amorces doivent être choisies dans une région contenant plusieurs CpG dont une en 3' pour garantir la spécificité méthylé/non méthylé.

b- Protocole

Après plusieurs essais de mise au point, les conditions des réactions PCR sont les suivantes : la PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 2 µl d'ADN traité, du tampon PCR 1x (10 mM Tris-HCl ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; pH 8,3), 2,5 à 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce, 1 unité de Taq DNA polymérase (Promega, France) et 5% de diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'amplification PCR a été réalisée dans un PTC 200™ DNA engine thermocycler (MJ Research, Watertown, USA). Les réactions d'amplifications ont été réalisées selon le programme suivant : une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes suivie de 35 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à la température spécifique pour chaque gène analysé, une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C, suivie d'une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes. Les séquences des amorces utilisées dans ce travail avec les températures d'hybridation et la taille du produit PCR obtenu pour chaque gène sont résumées dans le **Tableau II-10**.

Pour chaque série d'amplification, de l'ADN universellement modifié/méthylé (CpG universal methylated 274 DNA ; Qbiogene, CA, USA) a été utilisé comme contrôle positif pour l'amplification des brins méthylés. Egalement, un contrôle négatif qui contient de l'eau distillée au lieu de l'ADN a été inclus afin de s'assurer de l'absence de contamination.

Tableau II-10 : Amorces utilisées pour l'analyse du statut de méthylation de 15 gènes suppresseurs de tumeurs.

Gènes	Statut de méthylation	Amorces		Taille des produits d'amplification (pb)	T° d'hybridation	Références
		Sens (5'-3')	Anti-sens (5'-3')			
RASSFA1	M	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCCGCGAACTAAAAACGA	94	56°C	Burbee <i>et al.</i> , 2001
	U	TTTGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCACAAACTAAAAACAA	108	58°C	
hMLH1	M	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC	CCTCATCGTAACTACCCGCG	124	58°C	Xu <i>et al.</i> , 2004
	U	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	118	60°C	
BLU	M	TTCGTGGGTTATAGTTCGAGAAAGCG	AACGAATTAACCGCGCTACGC	156	60°C	Agathangelou <i>et al.</i> , 2003
	U	TTTGTGGGTTATAGTTTGAGAAAGTG	AACAAATTAACCACACCTACAC	156	60°C	
RAR-β	M	TCGAGAACGCGAGCGATTCTG	GACCAATCCAACCGAAAACGA	146	57°C	Widschwendter <i>et al.</i> , 2000
	U	TTGAGAATGTGAGTGATTGA	AACCAATCCAACCAAAACAA	158	59°C	
APC	M	TATTGCGGAGTGC GGTC	TCGACGAACTCCCGACGA	98	58°C	Esteller <i>et al.</i> , 2000
	U	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	CCAATCAACAAACTCCCAACAA	151	60°C	
ER	M	GTGTATTTGGATAGTAGTAAGTTCGTC	CGTAAAAAAAACCGATCTAACCG	118	57°C	Ottaviano <i>et al.</i> , 1994
	U	GGTGTATTTGGATAGTAGTAAGTTTGT	CCATAAAAAAACCAATCTAACCA	120	58°C	
P16	M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA	150	60°C	Herman <i>et al.</i> , 1995
	U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	151	58°C	
DAPK	M	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGCGGA	106	60°C	Toyooka <i>et al.</i> , 2003
	U	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	106	60°C	
GSTP1	M	TTCGGGGTGTAGCGTTCGTC	GCCCAATACTAAATCACGACG	91	59°C	Cairns <i>et al.</i> , 2001
	U	GATGTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	CCACCCCAATACTAAATCACAACA	97	59°C	
SHP1	M	GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC	TCACGCATACGAACCCAAACG	159	56°C	Oka <i>et al.</i> , 2002
	U	GTGAATGTTATTATAGTATAGTGTGG	TTCACACATACAAACCCAAACAAT	159	59°C	
Cyclin D2	M	GGGTCGATCGTGTGGCG	ACATAAAACCTCCACGCTCG	124	59°C	Evron <i>et al.</i> , 2001
	U	GAAATATATTAAGGGTGTG	CCTAACCCAAACAACCAACC	147	59°C	
HIN1	M	GGTACGGGTTTTTACGGTTCGTC	AACTTCTTATACCCGATCCTCG	136	60°C	Krop <i>et al.</i> , 2005

	U	GGTATGGGTTTTTATGGTTTGTT	CAAACTTCTTATACCCAATCCTCA	136	60°C	
<i>CDH1</i>	M	TGTAGTTACGTATTTATTTTAGTGGCGTC	CGAATACGATCGAATCGAACCG	112	56°C	Graff <i>et al.</i> , 1995
	U	TGGTTGTAGTTATGTATTTATTTTAGTGGTGTT	ACACCAAATACAATCAAATCAAACCAAA	120	58°C	
<i>BRCA1</i>	M	GGTTAATTTAGAGTTTCGAGAGACG	TCAACGAACTCACGCCGCAATCG	86	59°C	Esteller <i>et al.</i> , 2000
	U	GGTTAATTTAGAGTTTGAGAGATG	TCAACAAACTCACACCACACAATCA	75	59°C	
<i>TIMP3</i>	M	CGTTTCGTTATTTTTGTTTTCGGTTTC	CCGAAAACCCCGCCTCG	116	58°C	Xu <i>et al.</i> , 2004
	U	TTTTGTTTTGTTATTTTTGTTTTGGTTTT	CCCCAAAAACCCACCTCA	119	59°C	

II.2.7. Analyses statistiques

La saisie des données clinico-pathologiques des patientes et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS version 13.0.

II.2.7.1. Association entre deux variables catégorielles

La recherche d'une association entre deux variables catégorielles, ce qui revient à comparer des proportions, a été évaluée au moyen du test du Chi-carré (χ^2), ou du test exact de Fisher quand le nombre d'observations est trop petit (Schwartz, 1969 ; Falissard, 1996). Le seuil de signification statistique est fixé à la valeur de 5%. Donc, si la valeur de p est inférieure ou égale à la valeur de 0,05 choisie, cela signifie qu'il existe une corrélation statistiquement significative entre les deux variables.

II.2.7.2. Analyse d'association entre une variable catégorielle et une variable continue

Les variables continues, suivant une distribution non normale dite non paramétrique ou non gaussienne, ont été comparées à l'aide du test de Mann-Whitney-Wilcoxon quand deux groupes distincts (indépendants ou non pairés) sont concernés et par l'analyse de variance selon Kruskal-Wallis lorsque plus de deux groupes sont considérés (Schwartz, 1969 ; Daurès, 1993). L'hypothèse nulle est l'absence de différence de distribution (médiane) entre les groupes alors que l'hypothèse alternative consiste en l'existence d'une différence de distribution (médiane) entre les groupes. Les variables continues, suivant une distribution normale dite paramétrique ou gaussienne, ont été comparées à l'aide du test t de Student pairé quand le même groupe est comparé à deux moments différents.

II.2.7.3. Analyse de la survie

Pour l'analyse des données de survie, la méthode de Kaplan-Meier est utilisée. Cette méthode de calcul permet d'établir des tables et des courbes de survie. Son objectif est d'estimer la probabilité de survie d'un groupe défini pour un intervalle de temps donné (Kaplan et Meier, 1958). La survie signifie que l'évènement observé (exemple décès ou rechute) n'est pas survenu au cours de l'intervalle de temps "t". La durée de survie représente le laps de temps qui s'écoule jusqu'au moment où survient l'évènement ; en d'autres termes, le temps écoulé entre la date du début de l'étude et la date de survenue de l'évènement. La comparaison des durées de survie a été réalisée avec le test de log-rank (Peto *et al.*, 1979).

Chapitre III

**Mise en évidence du virus SV40 dans le
cancer du sein et caractéristiques clinico-
pathologiques des cas positifs**

III.1. Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, avec plus de 800.000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde (Parkin *et al.*, 2003). Il représente un important problème de santé publique et constitue l'une des principales causes de mortalité par cancer chez les femmes dans le monde (Yost *et al.*, 2001 ; Ries *et al.*, 2002).

A nos jours, plusieurs facteurs de risque pour le développement du cancer du sein sont connus, tels que l'âge, la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité et l'obésité (Hankinson *et al.*, 2004). Néanmoins, aucun facteur étiologique n'a été clairement identifié, à l'exception de la transmission héréditaire de mutations dans certains gènes de prédisposition, en particulier les gènes BRCA1 et 2, retrouvés dans environ 5% des cancers du sein (King *et al.*, 2003).

Par ailleurs, la relation éventuelle entre les virus et le cancer du sein a pendant des décennies fasciné la communauté scientifique, et cela depuis la découverte par Bittner en 1936 que les tumeurs mammaires chez la souris sont dus à un virus appelé MMTV pour « Mouse Mammary Tumor Virus » (Medina, 1976 ; Dickson, 1990). Des particules semblables à ce virus de souris appelées MMTV-like ont été également retrouvées dans le cancer du sein sporadique chez l'Homme, indiquant une étiologie virale possible de ce cancer (Holland and Pogo, 1999).

Le virus SV40 (pour Simian Virus 40), est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des polyomavirus. Injecté par voie intraveineuse, ce virus est capable d'induire divers types de tumeurs chez les hamsters ainsi que chez d'autres rongeurs. Il est aussi capable d'induire *in vitro* la transformation de cellules provenant de différentes espèces, y compris des cellules humaines (Topp *et al.*, 1981). Au cours des dernières années, différents laboratoires ont signalé la présence du virus SV40 dans plusieurs types de tumeurs humaines, y compris les tumeurs gliales du cerveau (Bergsagel *et al.*, 1992), les mésothéliomes (Carbone *et al.*, 1994), les ostéosarcomes (Yamamoto *et al.*, 2000), les lymphomes (Vilchez *et al.*, 2002 ; Amara *et al.*, 2007), les hépato-carcinomes (Wong *et al.*, 2003), et les cancers de la thyroïde (Pacini *et al.*, 1998).

Le pouvoir oncogénique du virus SV40 est en grande partie dû à l'expression d'une oncoprotéine virale appelée antigène grand T (Tag). Selon plusieurs études, l'oncoprotéine Tag induit la transformation néoplasique cellulaire par le biais de l'interaction et de

l'inactivation fonctionnelle des produits d'expression de deux gènes suppresseurs de tumeur p53 (Mietz *et al.*, 1992) et pRb (Dyson *et al.*, 1989), induisant ainsi des anomalies dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

Deux études récentes indiquent la capacité du virus SV40 à transformer des cellules mammaires normales en cellules tumorales. La première étude a porté sur un modèle de souris transgénique exprimant l'oncoprotéine Tag du virus SV40 et conçue pour l'étude du cancer du sein. Dans ce modèle il a été mis en évidence une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs P53 et Rb. Suite à cette inactivation, se produit un développement anarchique et incontrôlé d'un clone cellulaire mammaire aboutissant à l'apparition chez ces souris d'un carcinome mammaire ressemblant fortement aux cancers du sein chez l'Homme (Green *et al.*, 2000). La deuxième étude a été réalisée sur des cultures de cellules mammaires humaines normales visant à déterminer les événements minimums nécessaires à la transformation maligne des cellules; il a été prouvé que l'introduction de trois gènes codants respectivement pour l'oncoprotéine Tag du virus SV40, la sous-unité catalytique de la télomérase et l'oncoprotéine H-RAS, aboutit à une transformation maligne de ces cellules épithéliales mammaires (Elenbaas *et al.*, 2001).

Mais curieusement à ce jour, aucune étude n'a tenté de vérifier si ce virus est impliqué dans le développement du cancer du sein chez l'Homme.

Les objectifs de ce chapitre sont de rechercher la présence du virus SV40 dans le cancer du sein chez la femme Tunisienne par plusieurs techniques de PCR ; de vérifier l'expression des oncoprotéines virales dans les cellules tumorales par immunohistochimie ; et de préciser les caractéristiques clinico-pathologiques des cancers du sein associés à ce virus.

III.2. Méthodologie

III.2.1. Population d'étude

Cette partie du travail a concerné 109 cas de cancer du sein, tous du type histologique carcinome canalaire infiltrant. Les caractéristiques anatomo-pathologiques et cliniques sont résumées dans le **Tableau III-1**. La recherche du virus SV40 par PCR a été réalisée sur des extraits d'ADN obtenus à partir des tissus tumoraux et normaux mammaires congelés conjointement disponibles pour chaque cas. Un bloc de tissu tumoral fixé au formol et inclus

en paraffine a été utilisé pour l'exploration morphologique de la présence du virus SV40 par immunohistochimie.

III.2.2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN à partir des tissus frais congelés a été effectuée selon le protocole décrit dans le chapitre II. La qualité de l'ADN a été évaluée par l'amplification d'une séquence de 407 pb située dans le gène codant pour la β -globine.

III.2.3. Recherche de l'ADN du virus SV40 par PCR

Pour détecter le virus SV40, nous avons utilisé différentes techniques PCR visant l'amplification de séquences d'ADN situées dans trois régions différentes du génome viral.

III.2.3.1. Détection de la région de transcription précoce du virus

La recherche de la région de transcription précoce du génome du virus SV40 codant l'antigène grand T a été effectuée par PCR en utilisant le couple d'amorces SVTAGP1/SVTAP3 visant l'amplification d'une séquence de 126 pb selon le protocole décrit dans le chapitre II. Chaque cas a été testé 3 fois et la positivité d'un cas n'a été retenue qu'en cas de positivité dans, au moins, deux tests après électrophorèse sur gel d'agarose. Afin de confirmer la spécificité de l'amplification obtenue par cette technique, les produits de PCR ont été hybridés par Southern blot utilisant une sonde oligonucléotidique interne (SVTAGP2), spécifique à la région amplifiée selon le protocole décrit dans le chapitre II.

III.2.3.2. Détection de la région de transcription tardive du virus

Cette technique se base sur l'amplification par PCR d'une séquence d'ADN viral de 294 pb située dans le gène codant la protéine VP1 de la capsid du virus SV40 selon le protocole décrit dans le chapitre II. Tous les cas ont été testés 3 fois, et la positivité d'un cas a été considérée seulement s'il y a une reproductibilité du signal dans au moins deux tests.

III.2.3.3. Détection de la région régulatrice de la transcription virale

Cette technique se base sur l'utilisation d'un couple d'amorces visant l'amplification d'une séquence d'ADN de 242 pb située dans une région non codante localisée entre les gènes précoces et tardifs du virus SV40 selon le protocole décrit dans le chapitre II. Tous les cas ont

été testés 3 fois, et la positivité d'un cas a été considérée seulement s'il y a une reproductibilité du signal dans au moins deux tests.

III.2.3.4. Contrôles positifs et négatifs de la PCR

Pour la recherche du virus SV40 par PCR des témoins positifs et négatifs ont été conjointement introduits dans chaque expérience permettant le contrôle du bon déroulement de la technique et de l'absence de contamination. Le témoin positif utilisé est le plasmide pSVSph21-N contenant le génome du virus SV40. Le témoin négatif consiste à remplacer l'ADN matrice par de l'eau bi-distillée stérile.

De plus, pour s'assurer de l'absence d'une contamination de nos échantillons d'ADN par le plasmide contenant le génome du virus SV40, une technique de PCR visant l'amplification d'une séquence de 241 pb située au niveau de l'origine de répllication du plasmide utilisé dans notre laboratoire a été réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre II.

III.2.4. Détection des oncoprotéines virales par immunohistochimie

L'analyse de l'expression des protéines oncogènes du virus SV40 a été effectuée par immunohistochimie en utilisant l'anticorps Pab108 (Santa Cruz Biotechnology) qui permet la détection simultanée de l'antigène grand T et l'antigène petit t du virus SV40. Cet anticorps est spécifique au virus SV40 et ne donne pas de réaction croisée avec les virus JC et BK. Cette exploration a été effectuée pour tous les cas inclus dans l'étude. La technique d'immunohistochimie a été effectuée sur des coupes tissulaires déparaffinées selon le protocole décrit dans le chapitre II.

Des coupes tissulaires provenant d'un bloc de paraffine contenant du tissu tumoral d'un adénocarcinome prostatique d'une souris transgénique (TRAMP) SV40 positif, gracieusement offert par le Professeur P. Wikström (Department of Medical Bioscience and Pathology, Umea University, Suède), ont été utilisées comme témoin positif. La lecture des coupes a été réalisée au microscope optique. Un cas est considéré SV40 t/Tag+ quand un marquage nucléaire et/ou cytoplasmique est observé dans les cellules tumorales.

III.2.5. Analyse statistique

Des tests Chi-carré et exact de Fisher ont été utilisés pour rechercher une association entre la présence du virus SV40 d'une part et les paramètres clinico-pathologiques des patientes d'autre part.

L'impact de la présence du virus SV40 sur la survie globale et la survie sans rechute des patientes a été évalué par la méthode de Kaplan-Meier et les comparaisons de distribution des survies entre différents groupes de patientes ont été réalisées par le test du log-rank bilatéral.

Pour tous les tests statistiques utilisés dans ce travail, une valeur bilatérale de $p \leq 0,05$ a été considérée comme significative.

III.3. Résultats

III.3.1. Contrôle de la qualité d'ADN après extraction

Notre première préoccupation dans ce travail était de vérifier la qualité de l'ADN obtenu après l'extraction. Ceci a été réalisé grâce à une réaction PCR visant l'amplification d'une séquence de 407 pb située dans le gène de la β -globine. Tous les cas ont montré une amplification de ce gène témoignant de la présence d'ADN de bonne qualité pouvant servir à notre étude (**Figure III-1**).

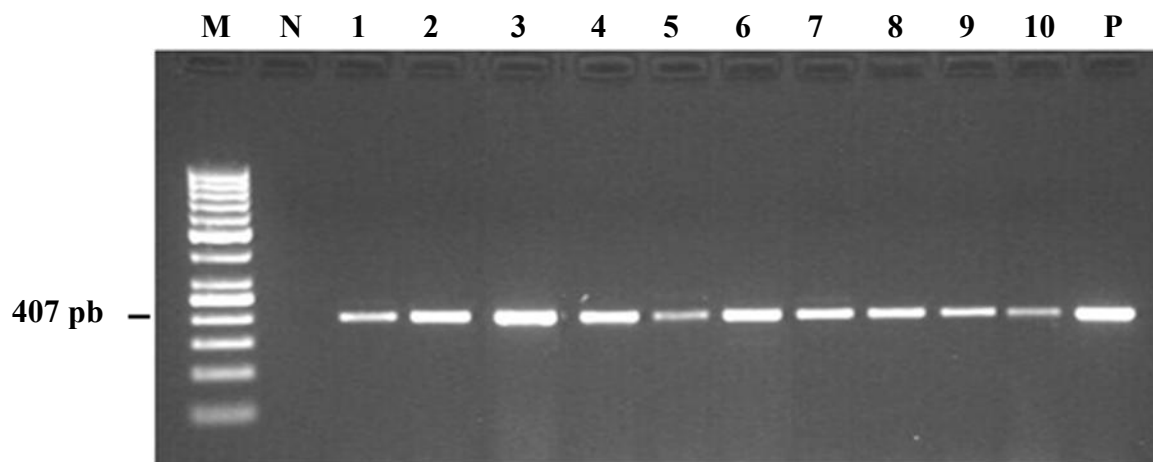


Figure III-1: Exemples représentatifs de l'amplification d'une séquence de 407 pb du gène de la β -globine par PCR dans les cas de carcinome canalaire infiltrant.

La piste **M** indique le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 100 pb). Les pistes **1 à 10** correspondent à des cas de cancer du sein β -globine positifs, la piste **P** correspond au témoin positif pour le gène de la β -globine et la piste **N** correspond au témoin négatif de la réaction PCR (contenant de l'eau distillée au lieu de l'ADN).

III.3.2. Détection du virus SV40 par PCR

La recherche du virus SV40 dans les échantillons mammaires tumoraux et normaux a été réalisée par trois techniques PCR visant l'amplification de trois régions différentes du génome du viral.

En premier lieu, nous avons testé la présence du virus SV40 par le couple d'amorces SVTAGP1/SVTAP3 qui permet d'amplifier une séquence d'ADN de 126 pb située au niveau de la région précoce du génome viral du SV40 qui code pour l'antigène grand T du virus. En utilisant cette technique, nous avons détecté une positivité dans 24 (22%) parmi les 109 cas de cancer du sein (**Figure III-2a**). En revanche, aucun échantillon mammaire normal n'a montré de positivité.

La spécificité de l'amplification obtenue dans cette technique a été confirmée dans tous les cas par Southern blot en utilisant une sonde oligonucléotidique interne spécifique (**Figure III-2b**). D'autre part, nous n'avons noté aucun cas positif supplémentaire suite à l'analyse par Southern blot.

Afin de confirmer la présence du virus SV40 dans nos échantillons mammaires, nous avons également utilisé deux techniques PCR supplémentaires visant l'amplification d'une séquence d'ADN de 292 pb localisée au niveau de la région codant pour la protéine de la capsid VP1 et d'une séquence d'ADN de 242 pb localisée dans la région régulatrice de la transcription du virus utilisant respectivement les couples d'amorces LA1/LA2 et RA1/RA2 (**Figure III-3**). Ces deux techniques nous ont permis de confirmer la présence du virus SV40 dans les 24 cas de carcinomes canaux infiltrants déjà positifs pour la présence de la région codant l'antigène grand T.

L'utilisation d'une technique PCR qui amplifie une séquence de 241 pb, au niveau de l'origine de répllication du plasmide pSVSph21-N a permis d'éliminer toute éventuelle contamination de nos extraits d'ADN par le plasmide contenant le génome du virus SV40 utilisé comme témoin positif dans notre étude (**Figure III-4**).

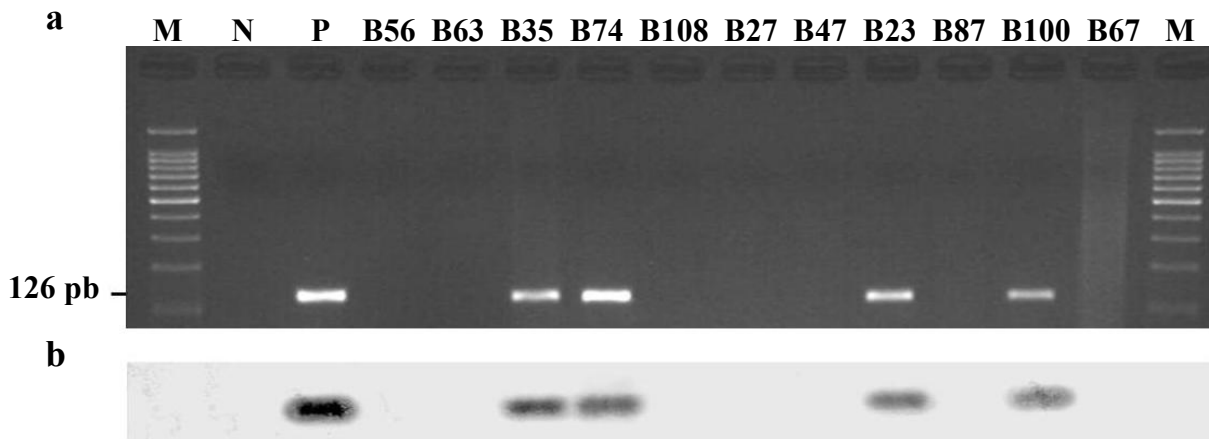


Figure III-2: Exemples représentatifs de la détection de la région précoce du génome du virus SV40 par PCR dans les cas de carcinomes canaux infiltrants.

Panel a : Electrophorèse, sur gel d'agarose à 2% coloré par le bromure d'éthidium, des produits d'amplification obtenus par PCR en utilisant le couple d'amorces SVTAGP1/SVTAG3 qui permet d'amplifier une séquence de 126 paires de base (pb) dans la région précoce du virus SV40. **Panel b :** un blot représentant l'hybridation des produits amplifiés par une sonde interne (SVTAG2) spécifique. Les pistes B35, B74, B23 et B100 représentent des cas de cancer du sein SV40-positifs. Les pistes B56, B63, B108, B27, B47, B87 et B67 représentent des cas de cancer du sein SV40-négatifs. Les pistes **M** indiquent le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 100 pb), la piste **P** correspond au contrôle positif (plasmide pSVSph21-N contenant le génome du virus SV40) et la piste **N** correspond au contrôle négatif (eau).

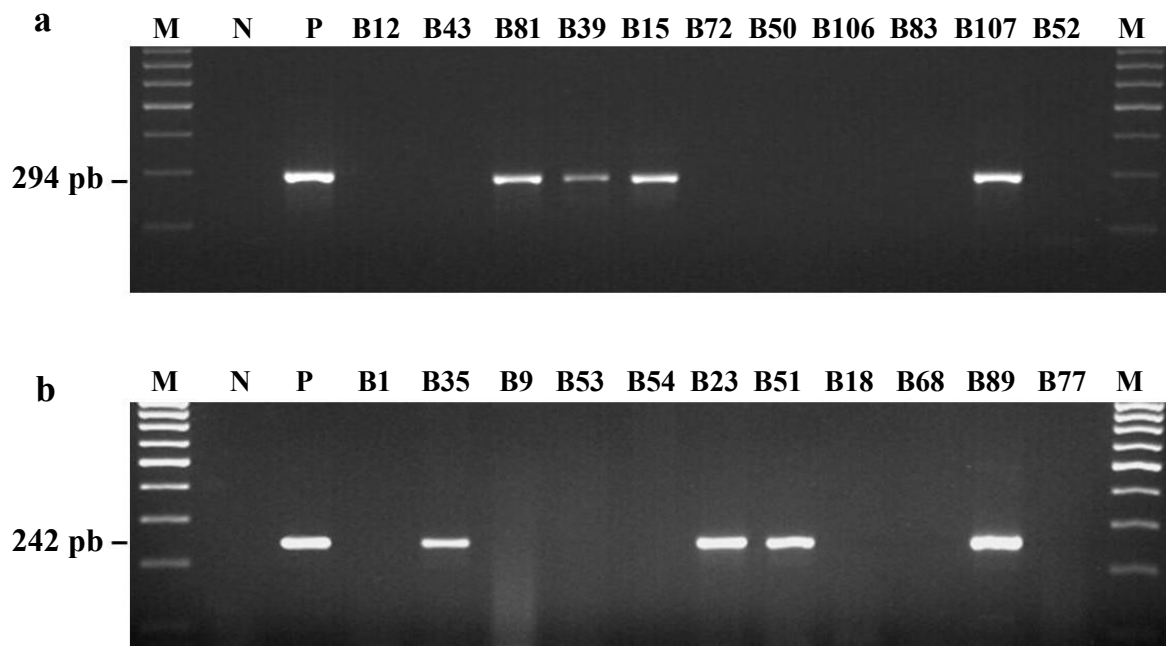


Figure III-3: Exemples représentatifs de la détection de la région codant pour la protéine VP1 de la capsidie et de la région régulatrice de la transcription du virus SV40 par PCR dans les cas de carcinomes canauxaires infiltrants.

Panel a : Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% coloré par le bromure d'éthidium pour la détection du virus SV40 utilisant le couple d'amorces LA1/LA2 qui permet d'amplifier une séquence de 294 pb du gène codant pour la protéine de la capsidie VP1. Les pistes B81, B39, B15 et B107 représentent des cas de cancer du sein SV40-positifs ; Les pistes B12, B43, B72, B50, B106, B83 et B52 représentent des cas de cancer du sein SV40-négatifs.

Panel b : Eléctrophorèse sur gel d'agarose à 2% coloré par le bromure d'éthidium pour la détection du virus SV40 utilisant le couple d'amorces RA1/RA2 qui permet d'amplifier une séquence de 242 pb de la région régulatrice de la transcription. Les pistes B35, B23, B51 et B89 représentent des cas de cancer du sein SV40-positifs ; Les pistes B1, B9, B53, B54, B18, B68 et B77 représentent des cas de cancer du sein SV40-négatifs.

Les pistes **M** indiquent le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 100 pb), les pistes **P** correspondent au contrôle positif (plasmide pSVSph21-N contenant le génome du virus SV40) et les pistes **N** correspondent au contrôle négatif (eau).

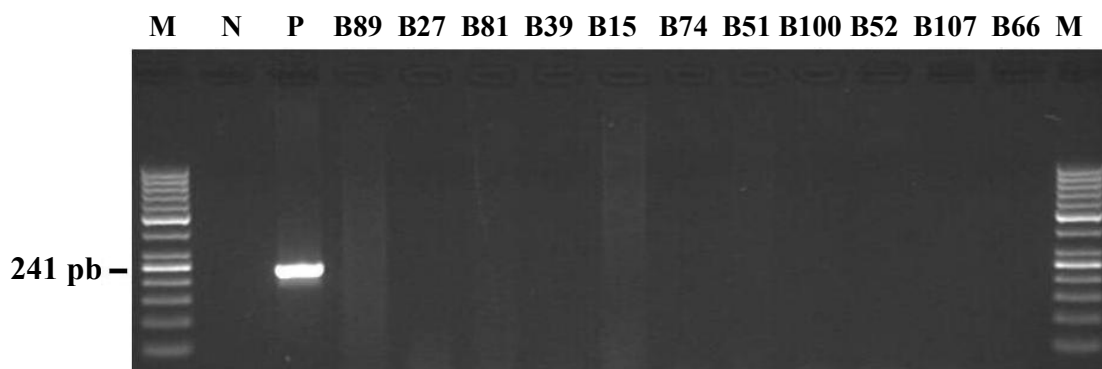


Figure III-4: Gel représentatif de la recherche d'une contamination des extraits d'ADN des tumeurs mammaires par le témoin positif.

Gel d'agarose à 2% coloré par le bromure d'éthidium pour la détection d'une séquence de 241 pb appartenant au plasmide pSVSph21-N utilisé comme témoin positif pour la détection du virus SV40 par PCR. Les pistes B89, B27, B81, B39, B15, B74, B51, B100, B52, B107 et B66 correspondent à des cas de cancer du sein montrant l'absence d'une positivité, témoignant de l'absence d'une contamination des échantillons mammaires étudiés par le plasmide. La piste **M** indique le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 50 pb), la piste **P** correspond au contrôle positif (plasmide pSVSph21-N) et la piste **N** correspond au contrôle négatif (eau).

III.3.3. Expression des oncoprotéines t/Tag du virus SV40

L'analyse de l'expression des oncoprotéines t/T du virus SV40 a été réalisée par immunohistochimie en utilisant l'anticorps Pab108. Cette analyse a montré que ces oncoprotéines sont détectables dans les cellules tumorales des 24 cas de cancer du sein SV40-positifs par PCR. Le marquage a concerné les noyaux des cellules tumorales (correspondant à l'oncoprotéine Tag). Quelques cas ont de plus montré un marquage faible au niveau du cytoplasme (correspondant à l'oncoprotéine tag) (**Figure III-5**). Par ailleurs, outre le marquage observé dans les cellules tumorales, un marquage a été aussi observé dans de rares lymphocytes du stroma tumoral et dans quelques cellules épithéliales non tumorales. Notons que le nombre des cellules positives aussi bien que l'intensité du marquage étaient variables d'un cas à un autre.

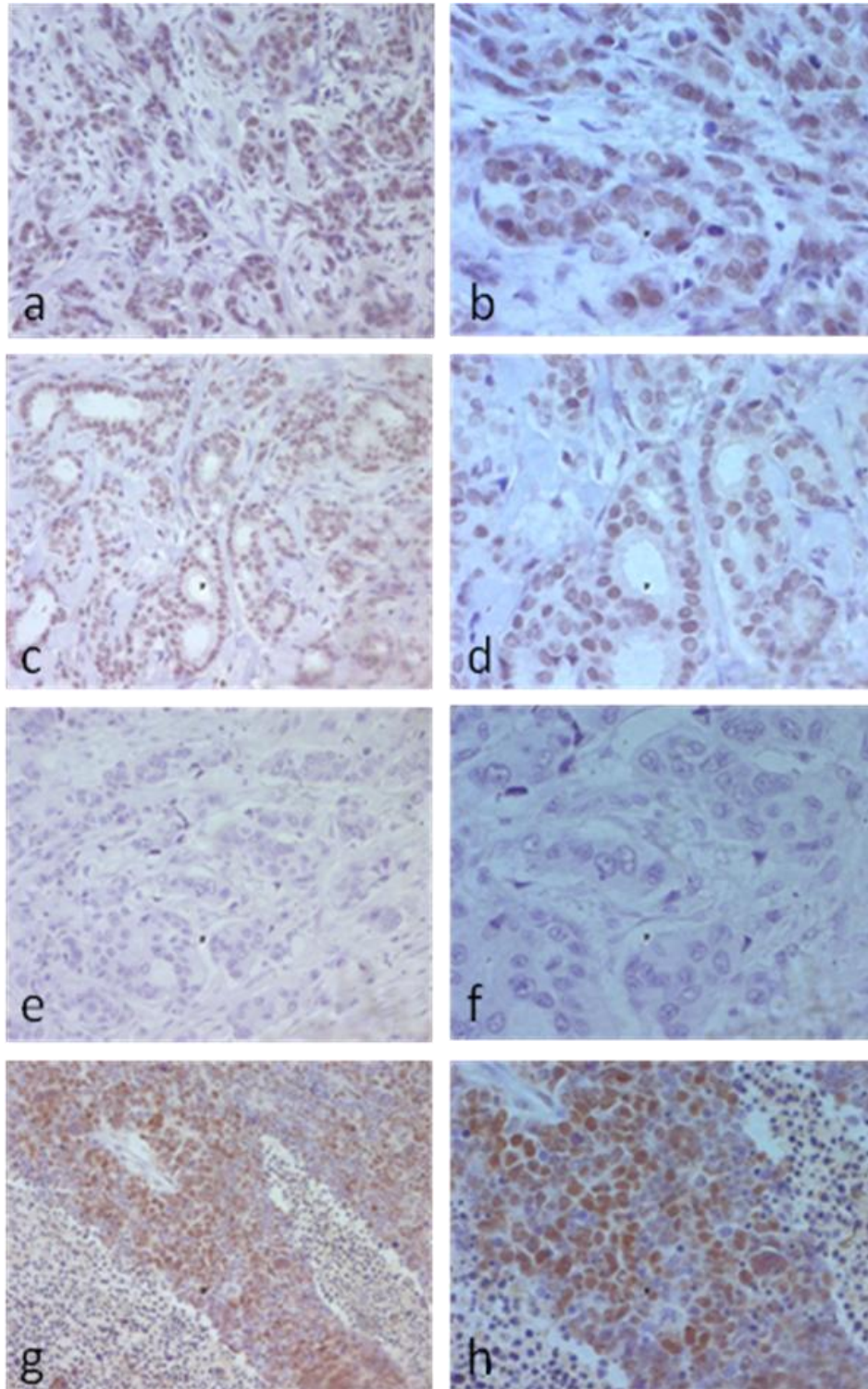


Figure III-5: Exemples de détection des oncoprotéines t/Tag du virus SV40 par immunohistochimie en utilisant l'anticorps Pab 108 sur coupes tissulaires déparaffinées.

a, b et c, d : Deux cas de cancer du sein montrant un marquage diffus témoignant de la présence du virus SV40.

e, f : Cas de cancer du sein SV40 négatif, g, h : Témoin positif (TRAMP).

a, c, e, g : grossissement x200. b, d, f, h : grossissement x400.

III.3.4. Caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés au virus SV40

L'étude de la répartition des cas de cancer du sein SV40+ et des cas SV40- en fonction des paramètres clinico-pathologiques est résumée dans le **Tableau III-1**.

Une corrélation significative a été trouvée entre la présence du virus SV40 et l'âge des patientes ($p=0,006$). En effet, les tumeurs SV40 positives sont plus fréquentes chez les patientes de plus de 50 ans en les comparant aux jeunes patientes (34,7% *versus* 12,7%; $p=0,006$). Dans le même contexte une corrélation significative a été notée entre la présence de ce virus et l'année de naissance des patientes ($p=0,004$), indiquant que la majorité de ces femmes sont nées avant 1955.

En plus, une corrélation significative a été retrouvée entre la présence du virus SV40 et l'accumulation de la protéine p53 (32,7% *versus* 13,3%; $p=0,015$), ainsi qu'une corrélation inverse avec la surexpression de l'oncoprotéine HER2 (3,7% *versus* 28%; $p=0,008$).

Tableau III-1 : Analyse comparative des caractéristiques clinico-pathologiques entre les cas de cancer du sein SV40-positifs et les cas SV40-négatifs.

Variables	Nombre de cas testés	Nombre des cas SV40-négatifs	Nombre des cas SV40-positifs	Valeur de P^a
Total	109	85	24	
Age (ans)				0,006
≤ 50	63	55	8	
> 50	46	30	16	
Date de naissance				0,004
< 1955	54	35	19	
1955-1963	34	32	2	
> 1963	21	18	3	
Grade histopronostique				0,775
Grade I	24	20	4	
Grade II	41	32	9	
Grade III	44	33	11	
Taille tumorale (mm)				0,481
≤ 20	24	17	7	
> 20	85	68	17	
Métastases ganglionnaires				0,163
-	69	52	17	
+	20	18	2	
Récepteurs à l'œstrogène				0,442
-	62	50	12	
+	47	35	12	
Récepteurs à la progestérone				0,833
-	57	44	13	
+	52	41	11	
HER2				0,008
Absence de surexpression	82	60	23	
Présence de surexpression	27	25	1	
p53				0,015
Absence d'accumulation	60	50	8	
Présence d'accumulation	49	35	16	

^a les valeurs de P sont calculées par le test chi-2 ou le test exact de Fisher et sont considérés statistiquement significatives lorsque $P \leq 0,05$; les valeurs en gras indique les corrélations significatives.

III.3.5. Valeur pronostic de la détection du SV40

Dans notre série, le statut du virus SV40 n'influence pas le pronostic. En effet, la différence statistique de la survie globale (**Figure III-6a**) et la survie sans rechute (**Figure III-6b**) des patientes n'est pas significative entre le groupe SV40+ et le groupe SV40- ($p=0,293$ et $p=0,283$ respectivement).

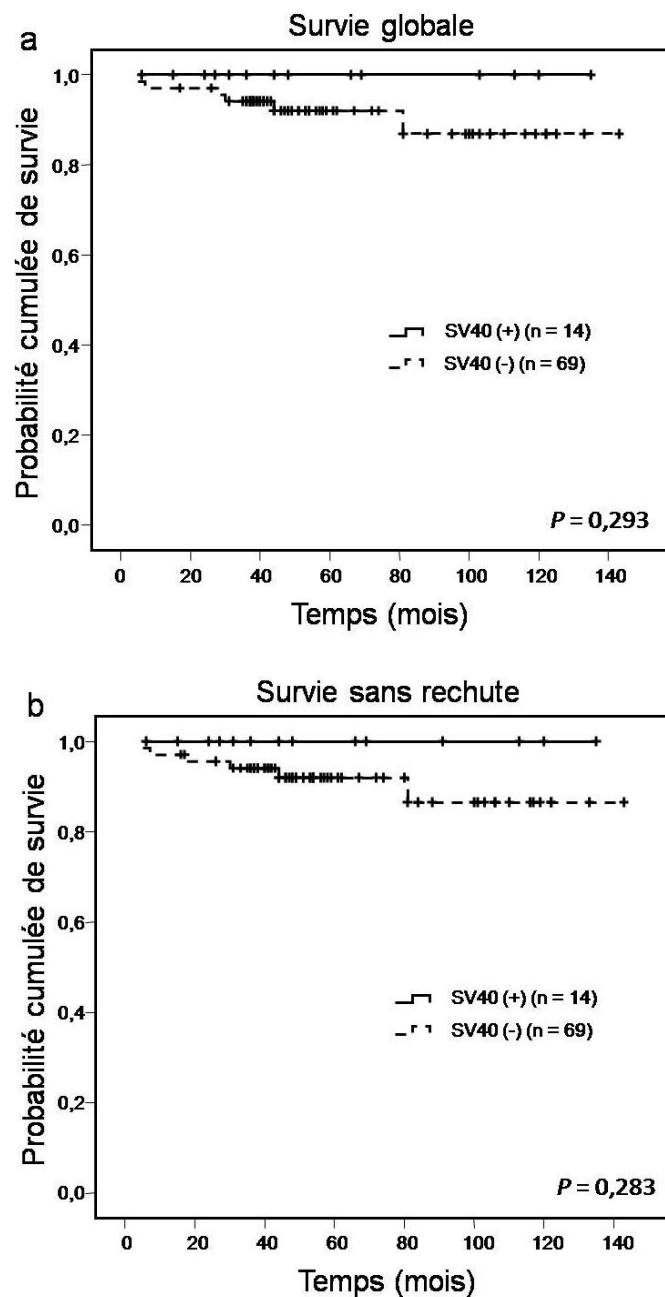


Figure III-6: Courbes de survie globale (a) et de survie sans rechute (b) des patientes atteintes de cancer du sein en Tunisie en fonction du statut du virus SV40 dans les tumeurs.

Dans ce chapitre nous avons évalué la prévalence du virus SV40 dans une large série de cas de cancer du sein, tous de type histologique carcinome canalaire infiltrant. Dans ces cas, nous avons démontré pour la première fois la présence du virus SV40 par PCR dans 22% des cas de cancer du sein. Par la suite, nous avons confirmé la présence de ce virus par une analyse immunohistochimique de l'expression des oncoprotéines t/T du virus SV40 dans tous les cas positifs par PCR (Hachana et *al.*, 2009 ; **Annexe 1**).

Dans ce travail, nous avons suivi toutes les précautions nécessaires afin d'éviter tout risque de contamination et cela a été confirmé par l'introduction simultanée de contrôles positifs et des négatifs dans chaque série de réactions de PCR. En plus de l'utilisation de salles et de réactifs distincts entre l'extraction de l'ADN et les différentes techniques de PCR, toutes les réactions de PCR ont été répétées trois fois pour confirmer la reproductibilité des résultats retrouvés pour chaque cas.

L'analyse par PCR a concerné trois régions différentes du génome du virus SV40 utilisant trois couples d'amorces spécifiques SVTAGP1/3, RA1/2, et LA1/2. Ces différentes techniques ont permis d'avoir des résultats identiques confirmant que les séquences retrouvées ne peuvent qu'appartenir au virus SV40 dans les différents cas analysés.

De ce fait notre étude se distingue de plusieurs études concernant d'autres types de cancer par l'exploration de séquences d'ADN du génome viral situées en dehors de la région précoce codant pour l'antigène grand T.

En plus, pour exclure une éventuelle contamination de nos échantillons par le plasmide contenant le génome du virus SV40, tous les cas de cancer du sein SV40 positifs ont été testés par une technique de PCR visant l'amplification d'une séquence appartenant à l'origine de répllication de ce plasmide. Les résultats de cette technique révèlent la négativité de tous les échantillons testés, confirmant ainsi l'authenticité des séquences virales détectées dans nos cas de cancer du sein.

A toutes ces vérifications s'ajoute le fait que tous les résultats de la PCR ont été entièrement confirmés par immunohistochimie analysant l'expression des oncoprotéines virales t/Tag.

Notre étude est la première ayant comme but principal l'analyse de la présence du virus SV40 dans une large série de cas de cancer du sein. Nos résultats indiquent que le cancer du sein est un nouveau type de tumeur humaine montrant la présence du virus SV40. En effet, plusieurs

études ont rapporté la présence du virus SV40 dans plusieurs types de proliférations malignes telles que les tumeurs du système nerveux central, les tumeurs des os, et les lymphomes non Hodgkiniens (Barbanti-Brodano *et al.*, 1998 ; Butel *et al.*, 1999 ; Jasani *et al.*, 2001 ; Amara *et al.*, 2007).

Deux études antérieures, une américaine et une autre australienne, évaluant la présence du virus SV40 dans des cas de lymphomes ont inclus un faible nombre de cas de cancer du sein en tant que témoin négatif (28 cas et 9 cas, respectivement). Ces études ont indiqué l'absence de ce virus dans ces cas de cancer du sein, mais aucune indication sur les données cliniques et pathologiques de ces cas n'a été donnée (Vilchez *et al.*, 2002 ; Sui *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter que les Etats-Unis d'Amérique et l'Australie appartiennent à une zone de forte incidence du cancer du sein (101 et 83 pour 100000 femmes, respectivement (Ferlay *et al.*, 2004) (et probablement à une zone de faible prévalence du virus SV40 dans le cancer du sein). Cette forte incidence de cancer du sein dans ces pays est forcément en relation avec la présence d'autres facteurs de risque tels que le mode de vie, les habitudes alimentaires et les expositions environnementales. Par ailleurs, il faut signaler que la Tunisie appartient à une zone de faible incidence du cancer du sein (20 pour 100000 femmes/an), et par conséquent, une différence dans la fréquence de détection du virus SV40 entre les pays pourrait refléter des différences géographiques de l'incidence des cancers du sein associés au virus SV40 plutôt que des différences dans les techniques utilisées. D'autres études intéressant un nombre important de tumeurs mammaires sont nécessaires pour évaluer la prévalence réelle de cancer du sein associés au virus SV40 dans ces pays.

La source principale la plus connue pour l'exposition humaine au virus SV40 semble être la contamination de nombreux lots de vaccins antipoliomyélitiques par le virus SV40 au cours de la période située entre 1955 et 1963, (Butel et Lednicky, 1999 ; Butel, 2000 ; Stratton *et al.*, 2003 ; Vanchiere *et al.*, 2005 ; Shah, 2007). En effet, Durant cette période un grand nombre de personnes à travers le monde ont été accidentellement contaminées par ce virus. Cependant, il n'a jamais été clairement établi, si cette transmission avait eu lieu avant l'utilisation des vaccins antipoliomyélitiques contaminés ou si elle résulte de son utilisation (Shah, 1976 ; De Rienzo *et al.*, 2002 ; Gazdar *et al.*, 2002 ; Vilchez *et al.*, 2004 ; Engels, 2005 ; Shah, 2007).

Dans ce présent travail nous avons trouvé que la plupart des tumeurs mammaires SV40 positives concernent des patientes nées avant 1955. Cela indique que ce virus était bien présent dans la population humaine avant la production et l'administration des vaccins contaminés par le virus SV40. En effet, les campagnes de vaccination antipoliomyélite ont été lancées en Tunisie au début des années 1960, mais nous ne savons pas si les lots de vaccins antipoliomyélites utilisés étaient contaminés par ce virus.

Nos résultats supportent l'hypothèse que la présence du virus SV40 dans la population générale est endémique et que ce virus peut être transmis d'une manière horizontale ou bien transversale entre les humains. La transmission de ce virus peut se faire aussi par des voies autres que le vaccin antipolyomélite contaminé par le SV40 (Butel et Lednicky, 1999). En effet, aucune étude n'a confirmé de manière significative si le virus SV40 que l'on trouve dans la population humaine provient d'un vaccin antipoliomyélique contaminé ou d'une autre source de transmission (Engels *et al.*, 2003a ; Engels *et al.*, 2003b ; Engels *et al.*, 2005). Par ailleurs une ancienne étude a rapporté la présence du virus SV40 dans une culture cellulaire (HBL-100) réalisée à partir du lait d'une femme saine qui ne présente aucun signe d'une prolifération maligne du sein (Caron de Fromental *et al.*, 1985). Ces observations sont en faveur du fait que ce virus peut avoir comme cible le sein et supporte l'hypothèse que le virus SV40 peut être transmis entre les humains par l'allaitement maternel.

La détection des séquences d'ADN du virus SV40 par PCR dans les cas de cancer du sein n'est pas nécessairement signe d'un rôle causal de ce virus dans le développement de ce cancer. Toutefois, la détection de l'expression des oncoprotéines virales t/Tag dans les cellules tumorales suggère que ce virus n'est pas un virus passager. En effet, le pouvoir oncogénique et transformant du virus SV40 dépend essentiellement de l'expression de l'oncoprotéine Tag qui interagit avec deux protéines suppresseurs de tumeurs de la cellule (p53 et pRb) induisant l'inactivation de leurs fonctions.

Dans notre présent travail, nous avons mis évidence une corrélation statistiquement significative entre la présence du virus SV40 et l'accumulation de p53 ($p=0,05$). Ce résultat supporte le rôle du virus SV40 dans l'inactivation de p53 dans le cancer du sein. Ce résultat est en accord avec des études antérieures ayant analysées la relation entre la présence du SV40 et l'accumulation de p53 dans d'autres cancers : tels que les tumeurs du cerveau, des lymphomes et des mésothéliomes (Carbone *et al.*, 1997a ; Zhen *et al.*, 1999 ; Amara *et al.*, 2007).

Nous avons aussi noté que la présence du SV40 est inversement corrélée à la surexpression de l'oncoprotéine HER2 ($p=0,008$). HER2 est un proto-oncogène qui est surexprimé dans 20 à 50% des cas de cancer du sein (Slamon *et al.*, 2004). La surexpression de HER2 joue un rôle important dans le développement du cancer du sein ainsi que dans la propagation des métastases. Il représente aussi une nouvelle cible thérapeutique (Yu et Hung, 2000). De plus, une étude récente a montré que l'antigène grand T du virus SV40 peut inhiber l'expression de HER2 dans les lignées cellulaires établies à partir de cancer du sein humain (Chuang *et al.*, 2002).

Il est intéressant de noter que, dans notre série le virus SV40 a également été détecté dans des cellules épithéliales normales ainsi que des cellules lymphoïdes à proximité de la tumeur. Des observations similaires ont été signalés dans les études analysant des adénomes pléomorphes des glandes salivaires et les tumeurs de la thyroïde (Martinelli *et al.*, 2002 ; Vivaldi *et al.*, 2003). Il est possible que l'infection virale puisse progresser à partir des cellules transformées vers des cellules normales entourant la tumeur. Il est également possible que les cellules transformées du sein représentent un environnement favorable pour le virus SV40, tandis que les tissus normaux ne permettent pas facilement la multiplication de ce virus. Cependant, la détection de l'expression de l'oncoprotéine Tag suggère que le virus SV40 n'est pas un virus passager. En fait, avec son oncoprotéine Tag, le virus SV40 peut exercer son potentiel transformant sur les cellules mammaires. En outre, la présence d'une corrélation significative entre la présence du virus SV40 et l'accumulation de P53 permet de dire que ce virus pourrait avoir un rôle important dans la pathogenèse mammaire.

En conclusion, le travail présenté dans ce chapitre constitue la première étude qui s'intéresse à la recherche du virus SV40 dans le cancer du sein et qui définit le profil clinico-pathologique des cancers du sein associés à ce virus.

Nous avons recherché le virus SV40 en visant l'amplification par PCR de trois régions différentes du génome viral dans une série de 109 cas de carcinomes canauxaires infiltrants du sein. Nous avons mis en évidence pour la première fois des séquences d'ADN situées au niveau de trois régions différentes du génome virale (la région codante pour l'antigène grand T, la région codante pour la protéine VP1 de la capsid et la région régulatrice) dans 22% des cas de cancer du sein. Par ailleurs, nous avons démontré l'expression des oncoprotéines virales, l'antigène grand T et l'antigène petit t du virus SV40, par immunohistochimie dans les cellules tumorales dans tous les cas positifs par PCR, témoignant que ce virus est capable de s'exprimer dans les cellules tumorales.

En tenant compte des données clinicopathologiques, nous avons noté une corrélation statistiquement significative entre la présence du virus SV40 et l'accumulation de la protéine p53 ($p=0,015$). De plus, nous avons noté que la présence du virus SV40 est inversement corrélée à la surexpression de l'oncoprotéine HER2 ($p=0,008$). D'un autre côté, l'analyse des données de survie selon le statut du virus SV40 n'a permis d'identifier aucune différence entre la survie des patientes ayant un cancer du sein SV40-négatif comparativement aux patientes ayant une tumeur SV40-positif.

Les résultats de ce chapitre indiquent que le virus SV40 est présent dans 22% des cas de carcinome canalaire du sein, s'exprime dans les cellules tumorales et interfère avec l'accumulation de la protéine p53 qui est impliquée dans l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire. De plus, les carcinomes mammaires associés à ce virus semblent appartenir à un groupe particulier de cancers n'exprimant pas HER2 et survenant chez des femmes âgées de plus de 50 ans.

Chapitre IV

**Corrélation entre la présence du virus SV40
dans le cancer du sein et l'hyperméthylation des
promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs**

IV.1. Introduction

Dans le chapitre III, nous avons démontré pour la première fois la présence du virus SV40 dans le cancer du sein avec une prévalence de 22%. Cependant, la simple détection de ce virus ne permet pas de l'impliquer dans la pathogénie du cancer du sein. En effet, les mécanismes moléculaires par lesquels le virus SV40 contribue vraisemblablement au développement des cancers humains ne sont pas encore bien élucidés. Plusieurs observations ont indiqué que le pouvoir oncogénique du virus serait dû en partie à son oncoprotéine grand T en raison de sa capacité à transformer *in vitro* des cellules humaines normales en cellules cancéreuses et ceci à travers l'inactivation des produits des gènes suppresseurs de tumeurs notamment P53 et RB (Butel et Lednicky, 1999 ; White et Khalili, 2004). D'ailleurs, les résultats décrits dans le chapitre précédant retrouvent une corrélation statistiquement significative entre la présence du virus SV40 et l'accumulation de la protéine P53.

D'autre part, il a été rapporté, récemment, que la présence du virus SV40 dans les mésothéliomes humains était associée à l'hyperméthylation aberrante de la région promotrice de certains gènes suppresseurs de tumeurs (Toyooka *et al.*, 2001 ; Toyooka *et al.*, 2002), suggérant que le virus SV40 pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'hyperméthylation dans ce type de cancer.

Actuellement, il semble de plus en plus clair que l'hyperméthylation aberrante de l'ADN joue un rôle primordial dans le processus de la cancérogenèse (Baylin *et al.*, 1998; Herman, 1999; Esteller, 2003a). Dans les cancers, l'hyperméthylation des régions promotrices des gènes est l'altération épigénétique la plus souvent décrite ; elle est retrouvée dans presque tous les types de néoplasies et associée à l'inactivation transcriptionnelle de certains gènes, en particulier les gènes suppresseurs de tumeurs conférant ainsi un avantage aux cellules néoplasiques (Mompalmer et Bovenzi, 2000 ; Das et Singal, 2004 ; Esteller *et al.*, 2001 ; Esteller et Herman, 2002 ; Herman et Baylin 2003 ; Jones, 1996 ; Jones et Larid 1999 ; Jones et Baylin, 2002).

Les objectifs de cette partie du travail sont d'analyser le statut de méthylation de la région promotrice de 15 gènes suppresseurs de tumeurs par technique de PCR spécifique à la méthylation (MSP), et ceci afin de préciser le profil de méthylation dans le cancer du sein chez la femme en Tunisie et de déterminer la relation entre la présence du virus SV40 dans ce cancer et le statut de méthylation des gènes analysés afin de mieux caractériser la signification biologique de la présence de ce virus dans le cancer du sein.

IV.2. Méthodologie

IV.2.1. Population d'étude

Cette partie du travail a concerné les 109 cas de cancer du sein qui ont déjà fait l'objet d'étude dans le chapitre III pour la recherche du virus SV40.

IV.2.2. Traitement de l'ADN génomique au bisulfite de sodium

Le traitement de l'ADN extrait au bisulfite de sodium a été effectué selon le protocole décrit dans le chapitre II consacré aux techniques générales. La réaction de conversion a été réalisée en présence d'une solution d'hydroquinone 10 mM et d'une solution de bisulfite de sodium 3 M à pH 5. Après une incubation pendant 16 heures à 50°C, les sels de bisulfite ont été éliminés par purification de l'ADN sur une résine de silice à l'aide du kit Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant.

IV.2.3. Contrôle de la qualité de l'ADN après traitement au bisulfite de sodium

Le contrôle de la qualité de l'ADN obtenu après ce traitement a été effectué selon le protocole décrit dans le chapitre II en utilisant une réaction de PCR visant l'amplification d'une séquence de 133 pb appartenant au gène de la β -actine. Il s'agit d'une séquence d'ADN non méthylée, donc la réaction devrait être forcément positive si l'ADN obtenu après conversion par le bisulfite est de bonne qualité. Ainsi, les amorces utilisées sont destinées à s'hybrider spécifiquement à l'ADN matrice au niveau de régions riches en cytosines non méthylées transformées en uraciles après le traitement au bisulfite de sodium. Un résultat positif témoigne de la bonne qualité de l'ADN et de la réussite de la réaction de conversion par le bisulfite de sodium.

IV.2.4. Amplification de l'ADN par PCR spécifique de la méthylation (MSP)

L'analyse du statut de méthylation des promoteurs des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RAR β 2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2* et *hMLH1* a été effectuée par MSP selon le protocole décrit dans le chapitre II.

Pour chaque série d'amplification, de l'ADN provenant de lymphocytes circulants prélevés chez des donneurs sains a été utilisé comme contrôle positif pour l'amplification des brins non méthylés. De l'ADN artificiellement méthylé (CpG universal methylated DNA ; Q-biogene, CA, USA) a été utilisé comme contrôle positif pour l'amplification des brins méthylés. Également, un contrôle négatif qui contient de l'eau distillée au lieu de l'ADN a été inclus afin de s'assurer de l'absence de contamination.

IV.2.5. Analyse statistique

Les tests Chi-carré et exact de Fisher ont été utilisés pour l'étude de l'association entre l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs et le statut du virus SV40 dans le cancer du sein.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la distribution ainsi que les moyennes des index de méthylation entre les cas de cancer du sein SV40+ et SV40- et ceci afin d'évaluer l'impact de la présence du virus SV40 sur la méthylation globale. L'index de méthylation consiste à diviser, pour chaque cas, le nombre de gènes méthylés par le nombre total de gènes analysés.

Pour tous les tests statistiques utilisés dans ce chapitre, une valeur bilatérale de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

IV.3. Résultats

IV.3.1. Contrôle de la qualité d'ADN après traitement par le bisulfite

Afin d'apprécier la qualité d'ADN obtenu après traitement par le bisulfite de sodium, nous avons réalisé une réaction PCR visant la détection d'une séquence de 133 pb appartenant au gène de la β -actine. Il s'agit d'un gène qui ne peut être méthylé donc la réaction doit être forcément positive si l'ADN obtenu après conversion par le bisulfite est de bonne qualité. Cette réaction a été positive dans la totalité des cas témoignant de la présence d'ADN transformé de bonne qualité pouvant servir à notre étude (**Figure IV-1**).

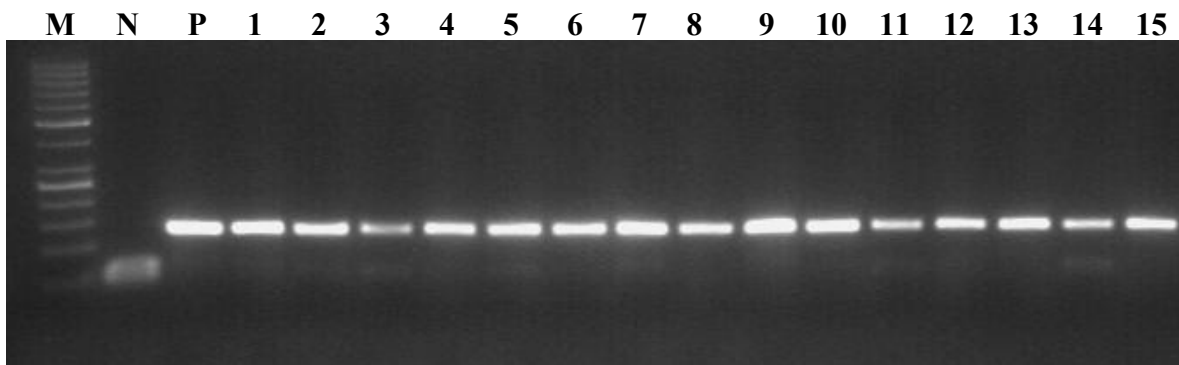


Figure IV-1: Exemple représentatif d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par PCR visant la détection d'un fragment d'ADN de 133 pb appartenant au gène de la β -actine après traitement de l'ADN par le bisulfite de sodium. La piste **M** correspond au marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 50 pb) ; la piste **N** correspond au contrôle négatif (sans ADN matrice); la piste **P** correspond au témoin positif de la β -actine ; les pistes **1 à 15** correspondent à des cas de carcinomes canauxaires infiltrants analysés.

V.3.2. Profil de méthylation de l'ADN

Dans ce chapitre, nous avons analysé l'état de méthylation des promoteurs de 15 gènes suppresseurs de tumeurs par la méthode MSP. La fréquence de méthylation des gènes étudiés varie entre 8 et 76%. Le **Tableau IV-1** résume le pourcentage des cas méthylés pour chaque gène analysé.

D'autre part, nous avons constaté que dans notre série le nombre de gènes méthylés était variable d'un cas à un autre. En effet, tous les cas de cancer du sein analysés avaient au moins un gène méthylé, et une méthylation simultanée de multiples gènes (3 gènes ou plus) a été observée dans 90% des cas. La **Figure IV-2** expose la répartition de la fréquence des cas de cancer du sein méthylés en fonction du nombre de gènes méthylés.

Tableau IV-1: Récapitulatif des résultats de la fréquence de méthylation des gènes étudiés par PCR spécifique à la méthylation dans ce travail.

Gènes	Nombre de cas méthylés	Pourcentage de méthylation
<i>RASSFA1</i>	83	76
<i>SHP1</i>	72	66
<i>HIN1</i>	67	61
<i>BRCA1</i>	66	60
<i>P16</i>	51	47
<i>ER</i>	51	47
<i>CDH1</i>	46	42
<i>APC</i>	46	42
<i>BLU</i>	44	40
<i>DAPK</i>	38	35
<i>RARβ2</i>	38	35
<i>GSTP1</i>	30	27
<i>TIMP3</i>	19	17
<i>CCND2</i>	15	14
<i>hMLH1</i>	9	8

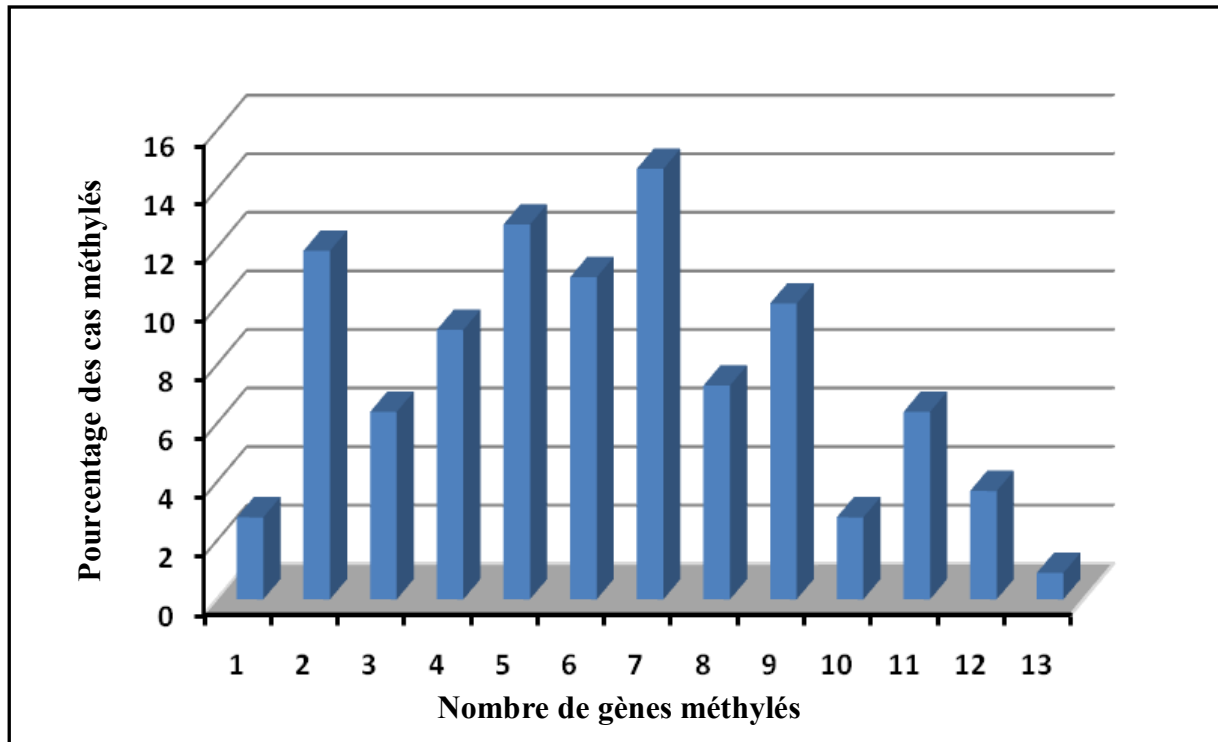


Figure IV-2 : Histogramme représentant la répartition des cas de carcinomes canauxaux infiltrants méthylés en fonction du nombre de gènes méthylés.

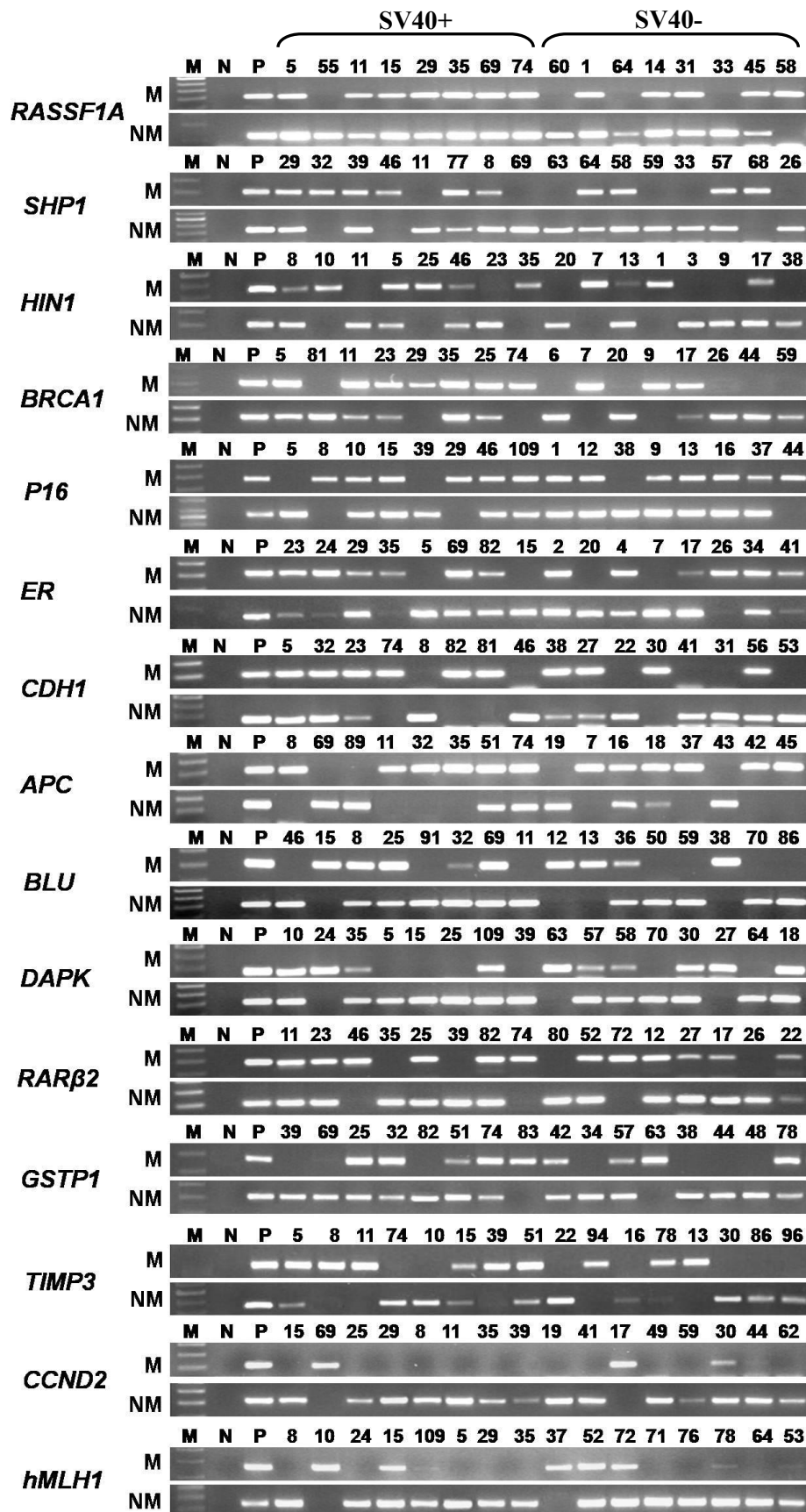


Figure IV-3 : Exemples représentatifs d'électrophorèses sur gels d'agarose à 2% montrant les produits d'amplification par PCR spécifique à la méthylation des allèles méthylés (M) et non méthylés (NM) des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RARβ2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2* et *hMLH1* dans les cas de cancer du sein SV40-positifs et SV40-négatifs. Les pistes M correspondent au marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 50 pb); les pistes N correspondent aux témoins négatifs (sans ADN matrice); les pistes P correspondent aux témoins positifs.

IV.3.3. Relation entre l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs et la présence du virus SV40

L'analyse du statut de méthylation de chacun des 15 gènes étudiés en fonction du statut du virus SV40 nous a permis de montrer que la fréquence de méthylation des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *BRCA1*, et *TIMP3* est significativement élevée dans le groupe de cas de cancer du sein SV40+ comparativement au groupe de cas SV40- ($p=0,034$; $p=0,043$; $p=0,035$ et $p=0,003$ respectivement) (**Figure V-4a**). De plus, nous avons constaté que la moyenne des index de méthylation (MI) dans le groupe des cas de cancer du sein SV40+ est significativement supérieure à celle du groupe des cas de cancer du sein SV40- ($0,55 \pm 0,025$ versus $0,37 \pm 0,021$; $p=0,009$) (**Figure V-4b**).

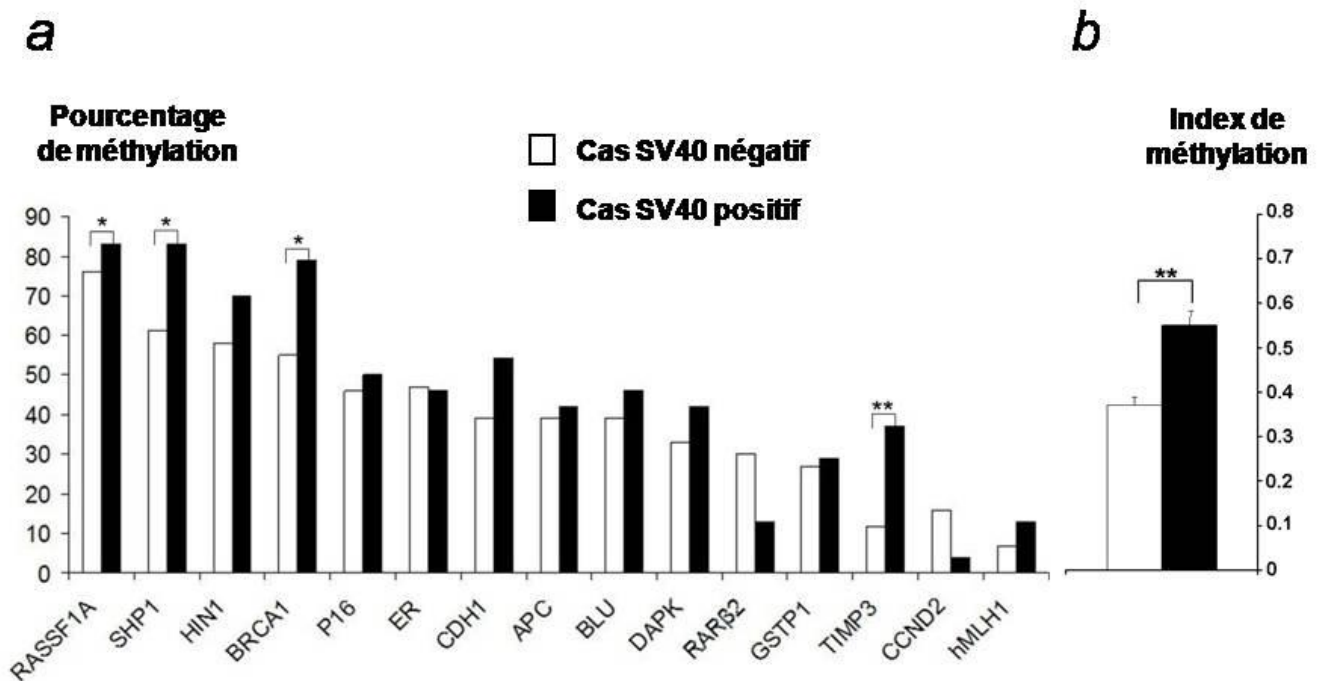


Figure IV-4: Histogramme représentant les fréquences d'hyperméthylation des 15 gènes analysés et de l'index de méthylation dans les cas de cancer du sein SV40-positifs (n = 24 ; barres pleines) et les cas SV40-négatifs (n = 85 ; barres vides). (a) La fréquence de méthylation des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *BRCA1* et *TIMP3* est significativement plus élevée dans les cas de cancer du sein SV40-positifs comparativement à ceux SV40-négatifs. (b) La moyenne des index de méthylation calculés dans les cas de cancer du sein SV40-positifs est significativement supérieure à celle dans les cas SV40-négatifs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

IV.4. Discussion

Il est actuellement admis que la perte de fonction d'un gène peut être induite suite à des modifications épigénétiques dont le mécanisme d'hyperméthylation des promoteurs de ces gènes (Herman *et al.*, 1996 ; Esteller et Harman, 2002). En effet, plusieurs études ont démontré que dans divers types de cancers, l'hyperméthylation des îlots CpG de certains gènes suppresseurs de tumeurs est responsable de la perte d'expression de ces gènes (Baylin *et al.*, 1998 ; Herman, 1999 ; Esteller et Herman, 2002 ; Esteller, 2003a). Des études récentes exposant l'implication du virus SV40 dans les mésothéliomes ont rapporté une corrélation significative entre la présence du génome du virus SV40 et l'hyperméthylation aberrante de la région promotrice de certains gènes suppresseurs de tumeurs (Toyooka *et al.*, 2001 ; Toyooka *et al.*, 2002 ; Suzuki *et al.*, 2005), suggérant que le virus SV40 pourrait avoir un rôle dans l'hyperméthylation et l'induction de ce type de cancer. Dans notre laboratoire, nous avons récemment démontré une association significative entre la présence du virus SV40 et l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs dans les lymphomes B à grandes cellules (Amara *et al.*, 2007).

Dans le chapitre III nous avons démontré la présence du virus SV40 dans 22% des cas de cancer du sein de la femme en Tunisie. Dans le présent chapitre, une analyse du statut de méthylation de la région promotrice des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RARβ2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2* et *hMLH1* a été réalisée et ceci par la technique de PCR spécifique à la méthylation. Nous avons alors étudié la relation entre la présence du virus SV40 dans ce cancer et le statut de méthylation des gènes analysés afin de mieux caractériser la signification biologique de la présence de ce virus dans le cancer du sein (Hachana *et al.*, 2008 ; **Annexe 1**).

Tous les gènes étudiés dans ce chapitre sont des anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs. Ces gènes inhibent à l'état normal la croissance incontrôlée et la transformation maligne. Certains événements moléculaires tels que la méthylation conduisent à une inactivation de ces gènes et donc à une altération du fonctionnement cellulaire.

Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs analysés, le gène *RASSF1A*, situé sur le chromosome 3p21.3, encode une protéine qui présente un domaine de liaison à la protéine Ras (Dammann *et al.*, 2000 ; Dammann *et al.*, 2001 ; Burbee *et al.*, 2001 ; Kuzmin *et al.*, 2002). Le gène *RASSF1A* est impliqué dans le processus d'induction apoptotique via Ras ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire (Vos *et al.*, 2000 ; Shivakumar *et al.*, 2002 ; Song, 2004). Le

gène *RASSF1A* intervient également dans le maintien de l'intégrité cellulaire et la progression mitotique à travers son interaction avec les microtubules et CDC20 (Vos *et al.*, 2003). Il intervient aussi dans l'inhibition de l'accumulation de la protéine cycline D1 et dans l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S. Il semble donc que ce gène joue le rôle d'un pont entre plusieurs voies de signalisation cellulaires critiques (Vos *et al.*, 2003 ; Fenton, 2004). La perte d'expression de *RASSF1A* est un événement fréquent dans les cancers humains (Dammann *et al.*, 2000 ; Agathangelou *et al.*, 2001 ; Dammann *et al.*, 2001 ; Harada, 2002). De plus, il a été démontré que la réexpression du gène *RASSF1A* dans les lignées cellulaires humaines diminue significativement la progression tumorale (Dammann *et al.*, 2000 ; Kuzmin *et al.*, 2002 ; Tommasi *et al.*, 2005). L'hyperméthylation du promoteur du gène *RASSF1A* a été fréquemment retrouvée dans les mésothéliomes, dans les cancers de l'estomac, de la prostate, de l'ovaire, du rein, du poumon, de la vésicule biliaire, dans les neuroblastomes, les mélanomes, les leucémies et les lymphomes (Dammann *et al.*, 2000 ; Byun *et al.*, 2001 ; Dammann *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2001 ; Harada *et al.*, 2002a ; Horiguchi *et al.*, 2003 ; Murray *et al.*, 2004 ; Agathangelou *et al.*, 2005 ; Johan *et al.*, 2005 ; Yeo *et al.*, 2005 ; Fischer *et al.*, 2006 ; Inda et Castresana, 2007 ; Amara *et al.*, 2007 ; Lai *et al.*, 2007 ; Merhavi *et al.*, 2007 ; Yanagawa *et al.*, 2007).

L'hyperméthylation du gène *RASSF1A* a été également rapportée dans les cancers du sein avec des fréquences, allant de 58 à 86% (Shinozki *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2007). Dans notre travail, nous avons trouvé une hyperméthylation du promoteur du gène *RASSF1A* dans 76% des cas de cancer du sein analysés. De plus, nous avons constaté une corrélation statistiquement significative entre la présence du virus SV40 dans ces cancers du sein et l'hyperméthylation du gène *RASSF1A* suggérant que les agents infectieux et plus précisément le virus SV40 constitue l'un des facteurs responsables de l'hyperméthylation de ce gène dans le cancer du sein. Une corrélation semblable a été également rapportée dans les mésothéliomes (Suzuki *et al.*, 2005 ; Toyooka *et al.*, 2002).

Le gène *hMLH1* est localisé au niveau de la région chromosomique 3p21.3. Ce gène est l'analogue humain du gène *MLH1* de la levure et qui a un rôle central dans la réparation des mésappariement de l'ADN. Le gène *hMLH1* a été initialement identifié en raison de son implication dans une forme héréditaire du carcinome colorectal où la transmission génétique d'une forme mutée de ce gène entraîne une prédisposition au cancer colorectal ainsi qu'à un certain nombre de tumeurs, y compris les adénocarcinomes de l'endomètre, de l'estomac et de l'ovaire (Lynch, 1993). Dans la majorité des cas de cancers sporadiques colorectaux et de

l'endomètre, le gène *hMLH1* semble être inactivé par hyperméthylation de son promoteur (Cunningham *et al.*, 1998 ; Esteller *et al.*, 1998 ; Gurin *et al.*, 1999 ; Kuismanen *et al.*, 2000 ; Thibodeau *et al.*, 1996).

L'hyperméthylation du promoteur du gène *hMLH1* a été fréquemment retrouvée dans les mésothéliomes malins, dans les cancers de l'estomac, de la prostate, de l'ovaire, du rein, du poumon, de la vésicule biliaire, dans les neuroblastomes, les mélanomes, les leucémies et les lymphomes (Dammann *et al.*, 2000 ; Byun *et al.*, 2001 ; Dammann *et al.*, 2001 ; Horiguchi *et al.*, 2003 ; Hesson *et al.*, 2004 ; Murray *et al.*, 2004 ; Agathangelou *et al.*, 2005 ; Johan *et al.*, 2005 ; Fischer *et al.*, 2006 ; Merhavi *et al.*, 2007 ; Yanagawa *et al.*, 2007). L'hyperméthylation du gène *hMLH1* a été également décrite dans le cancer du sein avec des fréquences allant de 0 à 43% (Murata *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2007). Dans notre travail, nous avons trouvé une faible fréquence d'hyperméthylation du promoteur du gène *hMLH1* (8% des cas de cancer du sein analysés). Cette faible fréquence indique que ce gène est rarement altéré dans le cancer du sein dans la population Tunisienne. Par ailleurs, la méthylation de ce gène ne semble pas être influencée par la présence du virus SV40 dans notre série.

Le gène *BLU* est localisé au niveau de la région chromosomique 3p21.3. Il existe deux isoformes homologues à 94% qui contiennent le domaine MYND (un domaine conservé de liaison de l'ADN) (Yi *et al.*, 2006 ; Qiu *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2003). L'analyse de la méthylation du promoteur du gène *BLU* dans les lignées cellulaires a été corrélée à une diminution de son expression (Agathangelou *et al.*, 2003). Le gène *BLU* est localisé au niveau d'un locus dont la délétion est une altération génétique fréquente dans plusieurs types de cancer (du poumon, du rein, de l'ovaire, du sein...)

L'hyperméthylation du promoteur du gène *BLU* a été détectée dans les cancers du poumon, les tumeurs cérébrales, le carcinome du nasopharynx, le cancer du col de l'utérus, le cancer de la vésicule biliaire et dans les lymphomes (Liu *et al.*, 2003 ; Hesson *et al.*, 2004 ; Qiu *et al.*, 2004 ; Ito *et al.*, 2005 ; Lai *et al.*, 2007 ; Marsit *et al.*, 2005 ; Hsu *et al.*, 2007 ; Riquelme *et al.*, 2007). Le statut de méthylation du gène *BLU* dans le cancer du sein a été exploré par une seule étude antérieure réalisée au Etats-Unis et rapportant une fréquence de méthylation de ce gène de 40% (Agathangelou *et al.*, 2003). Dans notre travail, nous avons trouvé une hyperméthylation du promoteur du gène *BLU* dans 40% des cas de cancer du sein analysés. Aucune étude antérieure n'a exploré la relation entre l'hyperméthylation du gène *BLU* et la présence du virus SV40 dans le cancer du sein ou autres cancers. Dans notre étude, nous

n'avons pas trouvé de corrélation entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40.

Le gène *RARβ2* est localisé au niveau de la région chromosomique 3p24. Ce gène code pour des récepteurs nucléaires qui sont responsable de la transmission des signaux rétinoïdes. Des évidences croissantes supportent l'hypothèse que le gène *RARβ2* est un gène suppresseur de tumeurs et que les effets chimio-préventifs des rétinoïdes sont liés à l'induction de *RARβ2*. La perte de *RARβ2* a été observée dans les tumeurs solides, comme le cancer du poumon et le cancer du sein (Cote *et al.*, 1998 ; Sirchia *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que la perte de l'expression de *RARβ2* peut être un événement important dans la tumorigenèse. Cette hypothèse est appuyée par l'observation que l'introduction du gène *RARβ* dans une lignée de cancer du sein non sensible aux acides rétinoïques restaure la réponse à ces éléments avec une inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose (Sirchia, 2000 ; Widschwendter, 2000; Arapshian, 2000). Yang et ses collaborateurs ont également démontré que l'inhibition transcriptionnelle de la région promotrice de *RARβ2* était fortement liée à la méthylation de son promoteur, et que ce mécanisme est suffisant pour entraîner une inactivation bi allélique du gène *RARβ2* (Kao *et al.*, 2002).

L'hyperméthylation du gène *RARβ2* a été rapportée dans le cancer du sein avec une fréquence allant de 10 à 69% (Sirchia *et al.*, 2000 ; Fackler *et al.*, 2003 ; Jeronimo *et al.*, 2003 ; Shinozaki *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous avons détecté une hyperméthylation du promoteur du gène *RARβ2* dans 35% des cas de cancer du sein analysés. Mais, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40.

Le gène *APC* est localisé dans la région chromosomique 5q21-22. Il code pour une protéine nucléo-cytoplasmique de 300 kDa qui régule les activités de la β -caténine et l'adhérence cellulaire E-cadherine dépendante, l'organisation du cytosquelette, l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire lors du passage de la phase G1 en phase S (Ikeda *et al.*, 2000 ; Sieber *et al.*, 2000). L'hyperméthylation du promoteur du gène *APC* a été décrite dans les cancers de l'estomac et du colon (Esteller *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003), les cancers de la prostate (Banno *et al.*, 2006 ; Henrique *et al.*, 2007), les cancers du poumon (Yanagawa *et al.*, 2003 ; Maruyama *et al.*, 2004), les cancers du tractus urinaire (Takahashi *et al.*, 2004), les cancers de l'œsophage (Kawakami *et al.*, 2000 ; Brock *et al.*, 2003 ; Clément *et al.*, 2006), les cancers de l'ovaire (Makarla *et al.*, 2005) et les cancers du rein (Dulaimi *et al.*, 2004).

L'hyperméthylation du gène *APC* a été également rapportée dans 40 à 52% des cancers du sein (Virmani *et al.*, 2001 ; Parrella *et al.*, 2004 ; Dulaimi *et al.*, 2004 ; Shinozaki *et al.*, 2005 ; Lewis *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons trouvé une hyperméthylation du promoteur de ce gène dans 42% des cas de cancer du sein analysés. Mais, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40 dans ces cancers du sein (**Figure IV-4**).

Le gène du récepteur oestrogénique $ER\alpha$ est localisé dans la région 6q25.1. Ce gène code pour une protéine de 595 aminoacides présentant 3 domaines essentiels : un domaine N terminal de modulation représentant le site de liaison du co-activateur ainsi que l'inhibiteur, un domaine central ou domaine de liaison à l'ADN et un domaine C terminal qui comporte le site de liaison des hormones ainsi qu'un deuxième domaine de modulation. Ce récepteur est le modulateur d'un large spectre d'activités biologiques cellulaires au sein de tissus spécifiques, son activité est sexe et âge dépendante. Ce récepteur n'interagit qu'avec les œstrogènes. En l'absence d'estrogènes, il est séquestré dans le noyau et maintenu dans une conformation inactive associé à des protéines du choc thermique (Sheridan *et al.*, 1979 ; Edward *et al.*, 1980 ; Sheridan *et al.*, 1981 ; Martin *et al.*, 1982).

L'hyperméthylation du promoteur du gène *ERα* a été décrite dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre (Wiley *et al.*, 2006), les cancers colorectaux (Issa *et al.*, 1994 ; Ahuja *et al.*, 1998), les cancers gastriques (House *et al.*, 2003), les cancers de la prostate (Yao *et al.*, 2006), les leucémies myéloïdes aiguës (Agrawal *et al.*, 2007) et les mélanomes (Moriey *et al.*, 2006).

L'hyperméthylation du gène *ERα* a été également rapportée dans une fréquence 40 à 52% des cancers du sein (Piva *et al.*, 1990 ; Ottaviano *et al.*, 1994 ; Nass *et al.*, 2000). Dans notre travail, nous avons détecté une hyperméthylation du promoteur du gène *ERα* dans 42% des cas de cancer du sein analysés. Mais, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40.

Le gène *P16* est localisé dans le locus 9p21, il constitue le gène le plus communément altéré dans les tumeurs humaines. *P16* est aussi connu sous les dénominations suivantes : *INK4*, *INK4A*, *CDK4I*, *MTS1* et *CDKN2*. Le gène *P16* est un membre de la famille des inhibiteurs des kinases cycline dépendantes. Il inhibe les complexes cyclines D-CDK4/6 et donc prévient la phosphorylation de Rb pendant la phase G1 du cycle cellulaire (Serrano *et al.*, 1993 ; Hirama et Koeffler, 1995 ; Sherr, 1996 ; Sherr, 2000). Le gène *P16* est un important gène

suppresseur de tumeurs qui induit le blocage de la prolifération cellulaire anarchique. La diminution de l'expression du gène *P16*, se fait soit par mutation génique soit par hyperméthylation de son promoteur, cela constitue une étape cruciale dans le développement et la progression tumorale. L'hyperméthylation du promoteur du gène *P16* a été notée dans les cancers du colon, de la vessie, de la prostate, de l'estomac et du poumon, dans les gliomes, les mélanomes et les leucémies (Pinyol *et al.*, 1998 ; Baur *et al.*, 1999 ; Nakamura *et al.*, 1999 ; Nakamura *et al.*, 2001 ; Konishi *et al.*, 2002 ; Sakuma *et al.*, 2004 ; Takahashi *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005 ; Takino *et al.*, 2005 ; Shiozawa *et al.*, 2006 ; Chim *et al.*, 2007).

L'hyperméthylation du gène *P16* a été également rapportée dans les cancers du sein avec des fréquences allant de 27 à 40% des cas (Herman *et al.*, 1995 ; Nielsoen *et al.*, 2001 ; Krassenstein *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2007). Dans notre travail, nous avons trouvé une hyperméthylation du promoteur du gène *P16* dans 47% des cas de cancer du sein analysés. Ce pendant, nous n'avons pas trouvé de corrélation statistiquement significative entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40.

Le gène *DAPK* est localisé dans la région chromosomique 9q34. Il code pour une serine/thréonine protéine kinase calcium/calmoduline dépendante de 160 kDa. La protéine *DAPK* joue un rôle important dans les voies de l'apoptose induites par l'IFN γ , le TNF- α , le TGF- β , et Fas (Deiss et Kimchi, 1991 ; Deiss *et al.*, 1995 ; Cohen *et al.*, 1999 ; Cohen et Kimchi, 2001). Il a été démontré, *in vivo*, que la perte d'expression de la protéine *DAPK* peut induire une progression tumorale et l'apparition de métastases (Nakatsuka *et al.*, 2000).

L'hyperméthylation du promoteur du gène *DAPK* a été observée dans les tumeurs cérébrales, les mésothéliomes, les cancers gastriques et colorectaux, les cancers du poumon, de l'œsophage, du cou et de la tête, de la prostate, de la vessie, de l'estomac et dans divers types de lymphomes (Kim *et al.*, 2001 ; Ng *et al.*, 2001 ; Rosas *et al.*, 2001 ; Kwong *et al.*, 2002 ; Wong *et al.*, 2002 ; Reddy *et al.*, 2003 ; Nakatsuka *et al.*, 2003 ; Shivapurkar *et al.*, 2004 ; Kawaguchi *et al.*, 2006 ; Mittag *et al.*, 2006 ; Chim *et al.*, 2006 ; Voso *et al.*, 2006). L'hyperméthylation du gène *DAPK* a été également rapportée dans les cancers du sein avec des fréquences allant de 13 à 50% (Lehmann *et al.*, 2002 ; Dulaimi *et al.*, 2004 ; Krassentein *et al.*, 2004). Dans notre étude, nous avons trouvé une hyperméthylation du promoteur du gène *DAPK* dans 35% des cas de cancer du sein analysés. Mais, nous n'avons pas trouvé de corrélation statistiquement significative entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40. Dans une étude précédente réalisée dans notre laboratoire, une

corrélation statistiquement significative a été trouvée entre la présence de ce virus et l'hyperméthylation de ce gène dans les lymphomes B (Amara *et al.*, 2007).

Le gène *GSTP1* est localisé en 11q13.3. Il code pour la glutathion S-transférase P1 (GSTP1) qui est une enzyme importante dans la détoxification des agents mutagènes et qui catalyse la conjugaison d'une grande variété d'électrophiles et de xénobiotiques avec la GSH (forme réduite du glutathion) (Cowell *et al.*, 1988 ; Morrow *et al.*, 1989 ; Coles et Kadlubar, 2003 ; Townsend et Tew, 2003). Différents polymorphismes au niveau du gène *GSTP1* ont été décrits. Un certain nombre de ces polymorphismes ont été associés au développement de cancers, suggérant que le gène *GSTP1* pourrait être un important facteur dans le développement et/ou la progression de certains types de cancers chez l'Homme (Townsend et Tew, 2003 ; Ramos-Gomez *et al.*, 2001 ; Sarmanova *et al.*, 2001). L'hyperméthylation du gène *GSTP1* a été décrite dans les cancers de la prostate, les cancers du tractus urinaire, les cancers du poumon, les cancers du nasopharynx et dans les lymphomes (Esteller *et al.*, 1998 ; Millar *et al.*, 1999 ; Tchou *et al.*, 2000 ; Maruyama *et al.*, 2001 ; Konishi *et al.*, 2002 ; Kwong *et al.*, 2002 ; Bastian *et al.*, 2004 ; Rossi *et al.*, 2004 ; Nakamichi *et al.*, 2007 ; Amara *et al.*, 2007). L'hyperméthylation du gène *GSTP1* a été également rapportée dans 20 à 39% des cancers du sein (Esteller *et al.*, 1998 ; Jeronimo *et al.*, 2003 ; Shinozaki *et al.*, 2005 ; Arai *et al.*, 2006). Dans notre étude, nous avons retrouvé une hyperméthylation du gène *GSTP1* dans 27% des cas de cancer du sein analysés. Mais, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40.

Le gène *SHP1* est localisé en 12p13. Il code pour une phosphotyrosine phosphatase retrouvée principalement dans les cellules hématopoïétiques, mais également dans les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales (Yang *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2003). La protéine SHP1 contient deux domaines SH2 (Src Homology 2 domain) dans sa portion N-terminale, un domaine phosphatase conservé en position centrale et une queue C-terminale. Les domaines SH2 de la protéine SHP1 interviennent dans la reconnaissance des substrats et l'autorégulation de l'activité protéine tyrosine phosphatase (Yang *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2003). La protéine SHP1 joue un rôle important dans la régulation de la différenciation cellulaire et dans la régulation de plusieurs voies de signalisation dans tous les types de cellules hématopoïétiques (Pani *et al.*, 1995 ; Yang *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2003 ; Honorat *et al.*, 2006).

L'hyperméthylation du gène *SHPI* a été démontrée dans les cancers de la vésicule biliaire, et les myélomes ainsi que dans les lymphomes (Cyster *et al.*, 1995 ; Pani *et al.*, 1995 ; Chim *et al.*, 2002 ; Oka *et al.*, 2002 ; Chim *et al.*, 2004 ; Khoury *et al.*, 2004 ; Shivapurkar *et al.*, 2004 ; Takahashi *et al.*, 2004 ; Johan *et al.*, 2005 ; Reddy *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Chim *et al.*, 2007 ; Amara *et al.*, 2007 ; Chim *et al.*, 2002 ; Chim *et al.*, 2004). A notre connaissance aucune étude n'a exploré le statut de méthylation du gène *SHPI* dans le cancer du sein. Dans notre travail, ce gène est hyperméthylé dans 66% des cas de cancer du sein. De plus, nous avons constaté une corrélation statistiquement significative entre la présence du virus SV40 dans ces cancers et l'hyperméthylation du gène *SHPI*. Ce résultat suggère que le virus SV40 contribue à l'inactivation du gène *SHPI* dans le cancer du sein. Ce résultat est en accord avec une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire et qui a démontré une corrélation entre l'hyperméthylation du gène *SHPI* et la présence du virus SV40 dans les lymphomes B à grandes cellules (Amara *et al.*, 2007). Cela suggère que ce virus interviendrait dans le développement tumoral.

Le gène *CyclinD2/CCND2* est localisé dans la région q13 du chromosome 12. La cycline D2 appartient à la famille des cyclines du type D (*Cyclins D1, D2, and D3*). Les cyclines du type D sont impliquées dans la régulation de la transition du cycle cellulaire vers la phase S. Ce gène a été initialement considéré comme un proto-oncogène. En effet, la surexpression de la cycline D2 a été signalée dans les tumeurs testiculaires (Sicinski *et al.*, 1996), les tumeurs de l'ovaire (Dhillon *et al.*, 2004), les cancers du colon (Mermelshtein *et al.*, 2005), et les cancers de l'estomac. Cependant, le rôle des cyclines D2 comme proto-oncogène a été largement contestée par plusieurs études décrivant la perte de son expression dans les cancers du sein (Fackler *et al.*, 2003 ; Virmani *et al.*, 2003), du poumon (Virmani *et al.*, 2003), du pancréas (Matsubayashi *et al.*, 2003), et de l'estomac. Il est aussi intéressant de noter que dans la plupart des types de tumeurs analysées, l'inhibition de l'expression de ce gène se fait par méthylation de son promoteur (Fackler *et al.*, 2003 ; Virmani *et al.*, 2003 ; Matsubayashi *et al.*, 2003).

L'hyperméthylation du gène *Cyclin D2* a été décrite dans les cancers de la vésicule biliaire, les cancers des poumons et les myélomes ainsi que les lymphomes (Chim *et al.*, 2002 ; Koyama *et al.*, 2003 ; Chim *et al.*, 2004c). L'hyperméthylation du gène *Cyclin D2* a été également rapportée dans les cancers du sein (11 à 42%) (Fackler *et al.*, 2003 ; Parrella *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2005 ; Lewis *et al.*, 2005). Dans notre travail, nous avons trouvé une hyperméthylation du gène *Cyclin D2* dans 14% des cas de cancer du sein analysés.

Cependant, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'hyperméthylation du promoteur de ce gène et la présence du virus SV40.

Le gène *HIN-1* (high in normal-1) est localisé sur le chromosome 5q35 (Krop *et al.*, 2001). *HIN-1* a été récemment identifié comme un gène suppresseur de tumeur fortement exprimé dans les cellules épithéliales mammaires normales. Ce gène code pour une protéine qui régule négativement la croissance cellulaire de manière autocrine (Krop *et al.*, 2001).

La protéine HIN-1 est un puissant inhibiteur de la croissance, la migration et l'invasion cellulaires (Krop *et al.*, 2001 ; Porter *et al.*, 2002). Au cours du développement embryonnaire des souris, l'expression de *HIN-1* a été associée à la différenciation terminale des cellules épithéliales trachéobronchique (Porter *et al.*, 2002).

En plus de la forte expression de *HIN-1* dans les cellules luminales normales de l'épithélium mammaire, ce gène est abondamment exprimé dans les cellules épithéliales normales du poumon, de la prostate, des glandes salivaires et du pancréas (Krop *et al.*, 2001 ; Porter *et al.*, 2002). Dans la majorité des cas, la diminution de l'expression du gène *HIN-1* dans les cancers est induite par méthylation de son promoteur (Wong *et al.*, 2003 ; Marchetti *et al.*, 2004 ; Krop *et al.*, 2004).

Dans notre travail, nous avons détecté l'hyperméthylation du gène *HIN-1* dans 61% des cas de cancer du sein analysés cette fréquence est proche de celles rapportées dans les études antérieures (74 à 88%) (Sirchia *et al.*, 2000 ; Widschwendter *et al.*, 2002 ; Fackler *et al.*, 2003).

Le gène *CDHI* localisé en 16q22.1 est considéré comme un gène suppresseur de tumeurs (Mansouri *et al.*, 1988). Il y a été démontré que sa perte promouvait l'invasion tumorale et les métastases dans plusieurs modèles de cancers (Christofori et Semb, 1999). Le gène *CDHI* code pour l'E-cadhérine qui est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion intercellulaire. Cette protéine joue également un rôle important dans l'embryogenèse, la polarisation, la différenciation et la migration cellulaire (Takeichi, 1991 ; Wijnhoven *et al.*, 2000). Les premières études menées sur des carcinomes hépatocellulaires et des cancers du sein ont montré que la délétion de ce gène est associée à un fort potentiel métastatique. De nombreuses études ont montré une corrélation entre la survenue de la perte d'hétérozygotie dans la région 16q et la perte de l'expression de l'E-cadhérine dans les cancers du sein et de l'estomac (Bukholm *et al.*, 1997 ; Berx *et al.*, 1998 ; Berx et Van Doy, 2001).

A coté des mécanismes d'inactivation génétique, des mécanismes de répression transcriptionnelle ont été proposés pour expliquer la perte d'expression de l'E-cadhérine dans les cancers humains. En effet, il a été démontré que l'hyperméthylation du gène *CDHI* est associée à la diminution de l'expression de l'E-cadhérine dans différentes lignées cellulaires tumorales (Graff *et al.*, 1995). De nombreuses études ont rapporté également l'hyperméthylation du gène *CDHI* dans les cancers gastriques, les cancers colorectaux, les cancers de la vessie, les cancers du rein, les hépatocarcinomes et les mésothéliomes malins (Maruyama *et al.*, 2001 ; Dulaimi *et al.*, 2004 ; Shivapurkar *et al.*, 2004 ; Sudo *et al.*, 2004 ; Takahashi *et al.*, 2004 ; Reddy *et al.*, 2005). Plusieurs études ont exploré le statut de méthylation du gène *CDHI* dans les cancers du sein et ont détecté une hyperméthylation dans 40 à 80% des cas (Graff *et al.*, 1995 ; Nass *et al.*, 2000 ; Asgeirsson *et al.*, 2000 ; Shinozaki *et al.*, 2005). Dans notre travail, nous avons détecté une hyperméthylation du gène *CDHI* dans 42% des cas de cancer du sein analysés. Mais nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'hyperméthylation de ce gène et la présence du virus SV40.

Le gène *BRCA1* est localisé sur la région q21 du chromosome 17. Il code pour une phosphoprotéine composée de 1863 résidus d'acides aminés. La protéine BRCA1 possède un domaine en doigts de zinc dans sa partie amino-terminale qui lui confère le pouvoir de se lier à l'ADN. Il a été démontré que la protéine BRCA1 est impliquée dans la détection et la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Cette protéine peut aussi induire l'apoptose des cellules en réponse aux altérations de l'ADN. Cette protéine intervient également au niveau de différents points de contrôle pour la régulation du cycle cellulaire. Les mutations du gène *BRCA1* sont responsables de près de 50% des cancers du sein familiaux ou héréditaires. Par ailleurs, des études récentes suggèrent que ce gène joue également un rôle dans les cancers du sein sporadiques, qui sont les plus fréquents (90% des cas). En effet, la perte d'hétérozygotie du locus *BRCA1* est retrouvée dans une proportion importante des tumeurs sporadiques. En outre, les résultats de plusieurs études révèlent que les régulations épigénétiques contribuent à la réduction de l'expression de *BRCA1*. Notre étude démontre pour la première fois que l'altération de ce gène dans le cancer du sein

L'hyperméthylation du promoteur du gène *BRCA1* a été décrite dans les carcinomes gastriques, les cancers colorectaux, les cancers du poumon et des ovaires. De nombreuses études ont rapporté également l'hyperméthylation du gène *BRCA1* dans les cancers du sein dans des proportions allant de 11 à 32% (Dobrovic et Simpfendorfer, 1997 ; Rice *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2005). Dans notre présent travail, nous avons détecté une hyperméthylation du

promoteur du gène *BRCA1* dans 60% des cas de cancer du sein analysés. De plus, nous avons trouvé une corrélation statistiquement significative entre l'hyperméthylation de ce gène et la présence du virus SV40 dans les cancers du sein. Notre étude démontre pour la première fois que l'altération de ce gène dans le cancer du sein pourrait être en relation avec ce virus.

Le gène *TIMP3* est localisé dans la région 22q13.1 (Jones et Baylin, 2002). Il code pour un inhibiteur des métalloprotéases impliquées dans les phénomènes de métastases et d'angiogénèse (Anand-Apte *et al.*, 1996 ; Baylin *et al.*, 1998 ; Bachman *et al.*, 1999 ; Nakamura *et al.*, 2005). Les métalloprotéases sont des enzymes protéiques dépendantes du zinc qui sont capables de digérer la membrane basale et la plus grande partie des composants de la matrice extracellulaire. L'expression des métalloprotéases est physiologiquement régulée pour empêcher la destruction incontrôlée des tissus, mais cette régulation est modifiée ou lésée dans les processus pathologiques comme les cancers (Anand-Apte *et al.*, 1996). La faible fréquence de la perte allélique dans la région génomique où se situe le gène *TIMP3* signifie que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'inactivation de ce gène (Nakamura *et al.*, 2005 ; Clément *et al.*, 2006).

L'hyperméthylation du promoteur du gène *TIMP3* a été décrite dans les carcinomes de l'œsophage, les adénocarcinomes du pancréas, les ostéosarcomes, les médulloblastomes, les cancers colorectaux, les cancers du poumon et les lymphomes (Bachman *et al.*, 1999 ; Takahashi *et al.*, 2004 ; Darnton *et al.*, 2005 ; Fendrich *et al.*, 2005 ; Clément *et al.*, 2006 ; Hou *et al.*, 2006 ; Gu *et al.*, 2006 ; Amara *et al.*, 2007 ; Mühlisch *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2008). À nos connaissances, une seule étude antérieure a exploré le statut de méthylation du gène *TIMP3* dans les cancers du sein. Dans cette étude l'hyperméthylation de ce gène a été notée dans 21% des cas analysés (Liu *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons détecté une hyperméthylation du promoteur du gène *TIMP3* dans seulement 17% des cas de cancer du sein analysés. Par ailleurs, nous avons trouvé une corrélation statistiquement significative entre l'hyperméthylation de ce gène et la présence du virus SV40 dans les cancers du sein. Une corrélation semblable a été trouvée dans une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire sur les lymphomes B (Amara *et al.*, 2007).

Dans notre présent travail, nous avons aussi constaté une corrélation statistiquement significative entre le statut du virus SV40 dans le cancer du sein et l'index de méthylation (proportion des gènes méthylés par rapport à ceux testés). En effet, la moyenne des index de méthylation était significativement plus élevée dans les cancers du sein SV40 positifs

comparativement aux cancers du sein SV40 négatifs ($0,55 \pm 0,025$ versus $0,37 \pm 0,021$; $p=0,009$). Ce résultat renforce également l'hypothèse de l'implication du virus SV40 dans le cancer du sein.

En conclusion, dans ce chapitre nous avons analysé le statut de méthylation des promoteurs d'un large panel de gènes suppresseurs de tumeurs (*RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RARβ2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2* et *hMLH1*) par la méthode de PCR spécifique à la méthylation (MSP) dans une large série de cancer du sein (n=109). Par la suite, nous avons comparé le profil de méthylation de ces gènes entre les cas de cancers du sein SV40+ et SV40-.

Nous avons observé des fréquences variables de méthylation entre les différents gènes étudiés *RASSF1A* (78%), *SHP1* (66%), *HIN1* et *BRCA1* (61%), *P16* et *ER* (47%), *CDH1* et *APC* (42%), *BLU* (40%), *DAPK* (35%), *RARβ2* (34%), *GSTP1* (27%), *TIMP3* (17%), *CCND2* (14%) et *hMLH1* (8%) dans les cancers du sein en Tunisie.

En tenant compte du statut du virus SV40 dans les cancers du sein, nous avons trouvé une corrélation statistiquement significative entre l'hyperméthylation des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *BRCA1* et *TIMP3* et la présence du virus SV40 dans les cancers du sein (respectivement $p=0,034$, $p=0,043$, $p=0,035$ et $p=0,003$). De plus, nous avons constaté que la moyenne des index de méthylation dans le groupe des cancers du sein SV40+ est significativement supérieure à celle du groupe des cancers du sein SV40- ($0,55 \pm 0,025$ versus $0,37 \pm 0,021$; $p=0,009$).

Ce travail représente la première étude explorant les altérations épigénétiques dans les cancers du sein chez la femme Arabe. Il ressort des résultats de ce chapitre que l'hyperméthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur est une altération fréquente chez la femme Tunisienne et que le virus SV40 contribue vraisemblablement dans l'induction de cette altération épigénétique dans les cancers du sein, ce qui représente un argument supplémentaire en faveur d'un rôle de ce virus dans la carcinogenèse du sein.

Chapitre V

Prévalence et caractéristiques clinico- pathologiques des cancers du sein associés au MMTV-like en Tunisie

V.1. Introduction

Une étude faite en 1936 par Bittner a permis de conclure que les tumeurs mammaires spontanées de souris de laboratoire, étaient dues à la présence de particules virales transmissibles à la descendance par le lait des femelles atteintes de ces tumeurs. Ce virus fut nommé MMTV pour « Mouse Mammary Tumor Virus ». Ce virus MMTV a été largement incriminé comme étant l'agent étiologique des tumeurs mammaires chez la souris, pouvant ainsi les induire expérimentalement chez ces mammifères (Medina, 1976 ; Dickson, 1990). Par la suite, il a été démontré que ce virus peut être transmis chez la souris, soit par voie endogène dans la lignée germinale comme provirus; soit par voie exogène à travers le lait maternel comme virion infectieux.

Le virus MMTV appartient à la famille des β -rétrovirus, et comme tous les rétrovirus le génome du virus MMTV (ARN) sera transcrit en ADN proviral qui s'intègre de façon aléatoire dans le génome des cellules infectées de souris. Si l'intégration du virus MMTV a eu lieu à proximité d'un proto-oncogène cellulaire, ce proto-oncogène peut être alors surexprimé. L'analyse d'un grand nombre de tumeurs mammaires chez la souris a révélé que, dans presque tous les cas, l'intégration du génome du MMTV peut être trouvée soit en amont ou bien en aval d'un proto-oncogène cellulaire appartenant à la famille *int* (Nuse *et al.*, 1984). Les proto-oncogènes cellulaires sont alors surexprimés sous l'influence du puissant enhancer de transcription du virus MMTV. De ce fait l'oncogenèse mammaire de souris survient en raison de l'intégration du génome du virus MMTV dans le génome de la souris hôte. Ainsi, c'est l'intégration du génome viral, qui par son enhancer, favorise l'expression de certains proto-oncogènes cellulaires, induisant l'oncogenèse mammaire. Ces tumeurs mammaires de souris n'apparaissent qu'après une longue période de latence.

Bien que le virus MMTV ait été découvert il y a plus d'un demi-siècle (Bittner, 1936), la physiopathologie de l'infection par ce virus n'est pas encore complètement élucidée. Ceci est principalement dû à l'incapacité d'obtenir en culture cellulaire des titres viraux élevés et de son faible potentiel d'infection par rapport à celui des γ -rétrovirus avec l'absence de méthodes de dosage *in vitro* simples et sensibles pour évaluer le potentiel d'infection et de transformation de ce virus (Indik *et al.*, 2005).

Depuis de nombreuses années, l'hypothèse selon laquelle un rétrovirus homologue au virus MMTV soit impliqué dans l'étiologie du cancer du sein chez l'Homme a fasciné les scientifiques, mais cela n'a jamais pu être démontré de manière convaincante.

L'intérêt pour cette hypothèse s'est largement amplifié avec le développement des techniques de la biologie moléculaire et surtout de la PCR, qui ont permis à Wang (Wang *et al.*, 1995) de développer une technique visant la détection de séquences d'ADN homologues aux séquences du virus MMTV. Utilisant cette approche Wang et ses collaborateurs ont détecté des séquences du gène *env* du virus MMTV dans 30-40% des cas de cancer du sein chez des femmes dans diverses populations (Wang *et al.*, 1995).

Ce nouveau virus, analogue à celui de la souris et retrouvé chez l'Homme, a été nommé MMTV-like. D'autres appellations ont été décernées à ce virus dont HMTV pour « Human Mammary Tumor Virus » et HHMMTV pour « Human Homologue of the Mouse Mammary Tumor Virus ». Plusieurs études faites ultérieurement ont confirmé ou infirmé ces résultats. Les principales raisons de cette discordance ont été attribuées aux variations de sensibilité et aux détails techniques des approches moléculaires utilisées pour la détection de ces séquences virales (Zammarchi *et al.*, 2006).

Concernant ce chapitre, les principaux objectifs fixés ont été : l'évaluation de la prévalence du virus MMTV-like dans les cancers du sein chez la femme tunisienne par une technique de PCR semi-nichée ; la vérification de l'authenticité des séquences amplifiées par séquençage des produits PCR; et la précision des caractéristiques clinico-pathologiques des cancers du sein associés à la présence du virus MMTV-like.

V.2. Méthodologie

V.2.1. Population d'étude

Cette partie du travail a concerné 122 cas de cancer du sein dont les caractéristiques anatomo-pathologiques et cliniques sont résumées dans le **Tableau V-1**. La recherche du virus MMTV-like a été réalisée sur des extraits d'ADN obtenus à partir des tissus tumoraux et normaux mammaires disponibles conjointement pour chaque patiente.

V.2.2. Recherche de l'ADN du virus MMTV-like par PCR

La détection du virus MMTV-like a été effectuée par PCR semi-nichée visant la région *env* selon la technique publiée par Ford et ses collaborateurs (Ford *et al.*, 2004). Cette technique se base sur l'utilisation dans le premier tour de PCR le couple d'amorces 1X/2NR amplifiant une séquence de 356 pb et dans le deuxième tour le couple d'amorces 5F/2NR visant l'amplification d'une séquence de 190 pb. Le protocole détaillé de la technique est décrit dans le chapitre II. Chaque cas a été testé 3 fois et la positivité d'un cas n'a été retenue qu'en présence d'une positivité dans au moins deux tests après électrophorèse sur gel d'agarose du produit du deuxième tour de la PCR.

V.2.3. Analyse des séquences du virus MMTV-like détectées par séquençage

Afin de confirmer la spécificité des fragments d'ADN amplifiés par la technique de PCR semi-nichée visant la détection de la région *env* du génome du virus MMTV-like, les produits de PCR de dix cas de cancer du sein choisis au hasard parmi les cas positifs, ont été soumis à un séquençage automatique, et ceci après purification des séquences à l'aide du kit de purification Wizard SVGel and PCR Clean-Up (Promega, France). Les séquences obtenues ont été alors comparées aux séquences prototypes des virus MMTV et MMTV-like ainsi qu'aux séquences des rétrovirus endogènes publiées dans la base de données internationale EMBL.

V.2.3. Analyse statistique

Les tests Chi-carré et exact de Fisher ont été utilisés pour la recherche d'une éventuelle association entre la présence de la séquence *env* du virus MMTV-like et les paramètres clinico-pathologiques des patientes.

L'impact de la présence du virus MMTV-like sur la survie globale et la survie sans rechute des patientes a été évalué par la méthode de Kaplan-Meier et la comparaison de la survie entre les différents groupes a été réalisée par le test du log-rank bilatéral.

Pour tous les tests statistiques utilisés dans ce travail, une valeur bilatérale de $p \leq 0,05$ a été considérée comme significative.

V.3. Résultats

V.3.1. Détection du virus MMTV-like par PCR

La recherche de l'ADN du virus MMTV-like dans les tissus tumoraux et normaux mammaires analysés a été réalisée par PCR semi-nichée visant l'amplification d'une partie de la séquence *env* de ce virus. En utilisant cette technique, nous avons détecté une séquence d'ADN de 190 pb appartenant à la région *env* du virus MMTV-like dans 17 (13,9%) des 122 cas de cancer du sein analysés. En revanche, aucun des tissus mammaires normaux n'a montré la présence de cette séquence (**Figure VI-1**).

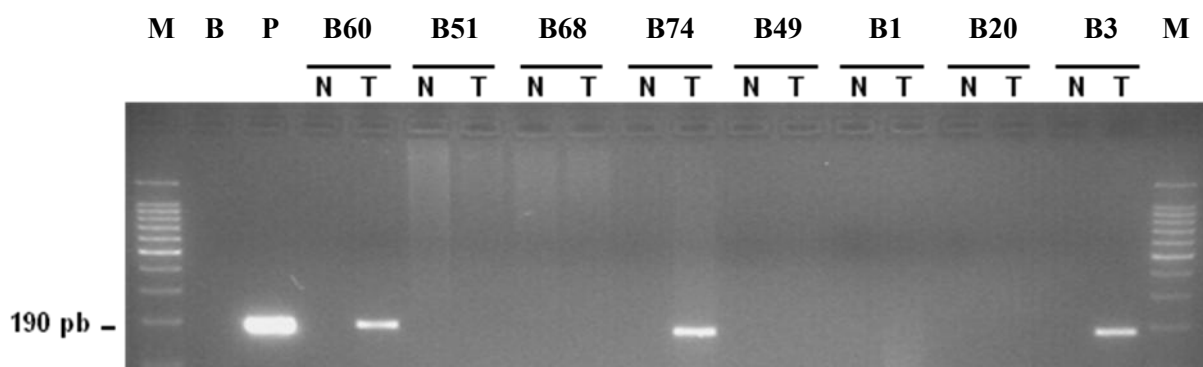


Figure V-1 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% coloré par le bromure d'éthidium représentatif de la détection par PCR semi-nichée du virus MMTV-like utilisant les amorces 1X/2NR/5F qui permettent d'amplifier une séquence de 190 paires de bases (pb) appartenant à la région *env* du virus MMTV-like dans le tissu tumoral (T) et normal (N) du sein. Les cas B60, B74 et B3 montrent la présence d'un signal positif dans le tissu tumoral et non dans le tissu normal. Les cas B51, B68, B49, B1 et B20 montrent l'absence d'un signal positif dans les tissus tumoraux et normaux. Les pistes **M** indiquent les marqueurs de poids moléculaire (échelle d'ADN à 100 pb), la piste **P** correspond au contrôle positif (séquence *env*-LTR de 2,7 kb) et la piste **B** correspond au contrôle négatif (sans ADN matrice).

V.3.2. Analyse des séquences du virus MMTV-like par séquençage

Afin de vérifier la nature des fragments d'ADN amplifiés par la technique PCR semi-nichée visant la détection de la région *env* du génome du virus MMTV-like, les produits de PCR de dix cas de cancer du sein à signal positif ont été soumis à un séquençage automatique.

Les différentes séquences obtenues après séquençage ont été alignées avec des séquences prototypes appartenant à la région correspondante du virus MMTV et MMTV-like (numéros des gènes AY152721 et AF243039, respectivement) ainsi qu'avec des séquences des rétrovirus endogènes humains. L'analyse comparative avec le logiciel CLUSTAL W de nos séquences avec les séquences *env* prototypes des virus MMTV et MMTV-like publiés dans la base de données internationale GenBank, a démontré la présence d'une homologie allant de 95 à 97% (**Figure V-2**). En revanche, aucune homologie significative n'a été trouvée entre nos séquences et les séquences du génome humain disponibles dans la même base de données, ce qui indique que les séquences amplifiées au cours de cette étude ne peuvent avoir comme origine ni le génome humain ni le génome des rétrovirus endogènes.

D'autre part cette analyse a permis de révéler des différences minimales, de quelques paires de bases, entre nos séquences virales et la séquence du témoin positif utilisé dans notre étude, témoignant de l'absence de contamination entre les différents échantillons mammaires ainsi qu'avec ce témoin positif.

```

MMTV AY152721      GAAAATTCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
HMTV AF243039     GAAAATTCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #7             GGAAATTCTCCTAA-GATCCCA-TGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #67           GGAAATTCTCCTAA-GATCCCA-TGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #15           GGAAATTCTCCTAA-GATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #60           GGGAAATTCTCCTAA-GATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #10           GGAAATTCTCCTAA-GATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #74           GGAAATTCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #83           GGAAATTCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #79           GGAAATTCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #108          GGAAATTCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
BC #82           GGAAATTCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCGCCATACAGAA 60
                 *  *****  *****  *****  *****  *****  *****

MMTV AY152721      TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGATATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
HMTV AF243039     TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #7             TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #67           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #15           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #60           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #10           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #74           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #83           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #79           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #108          TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #82           TTGTTTCGCCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
                 *****

MMTV AY152721      CATGAGATGATTCCTACATCTG--CCTGTGTACT 156
HMTV AF243039     CGTGAGATGATTCCTACATCTG--CCTGTGTACT 156
BC #7             CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGGGTGTACA 156
BC #67           CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTGTACA 156
BC #15           CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCGGCCCTGTG 156
BC #60           CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTGTACA 156
BC #10           CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTGTACA 156
BC #74           CATGAGATGATTCCTACTTCTGGCCCTGGGTTAAA 156
BC #83           CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTGTACA 156
BC #79           CGTGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTGTACA 156
BC #108          CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGGGTGTACA 156
BC #82           CGTGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTGTACA 156
                 *  **  *****  **  *  *****
    
```

Figure V-2: Alignements nucléotidiques des séquences *env* du virus MMTV-like obtenus à partir des cas de cancer du sein (indiqués par leurs numéros respectifs) avec les séquences références du *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) et *Human Mammary Tumor like Virus* (HMTV) publiés dans la base de données GenBank (numéros d'accès AF243039 et AY152721, respectivement). Les séquences sont alignées à l'aide du logiciel CLUSTAL W sous sa version 1.83. Les étoiles représentent les sites conservés.

V.3.3. Caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés au virus MMTV-like

L'analyse comparative des données clinico-pathologiques entre le groupe de cas de cancer du sein MMTV-like positif et le groupe MMTV-like négatif est présentée dans le **Tableau V-1**.

En analysant ces données, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la présence des séquences *env* du virus MMTV-like d'une part et les groupes d'âges, le type histologique, la taille tumorale, le grade histopronostique SBR et l'atteinte ganglionnaire métastatique d'autre part. De plus aucune différence significative dans l'expression des récepteurs à l'œstrogène et l'accumulation de p53 n'a été observée entre les cas MMTV-like positifs et négatifs. En revanche, une corrélation significative entre la présence des séquences *env* du virus MMTV-like et l'expression des récepteurs à la progestérone ($p=0,03$) ainsi que l'absence d'expression du proto-oncogène HER2 ($p=0,04$) a été retrouvée.

Tableau V-1 : Analyse comparative des caractéristiques clinico-pathologiques entre les cancers du sein MMTV-like positifs et les cas MMTV-like négatifs.

Variabes	Nombre de cas testés	Nombre de cas MMTV-like négatifs	Nombre de cas MMTV-like positifs	Valeur de P^a
Age				0,20
< 35 ans	15	12	3	
35-50 ans	58	51	7	
> 50 ans	49	42	7	
Type histologique				0,57
Carcinome canalaire infiltrant	109	94	15	
Carcinome lobulaire infiltrant	5	5	0	
Carcinome médullaire	6	4	2	
Carcinome inflammatoire du sein	2	2	0	
Grade histopronostique				0,49
Grade I	23	19	4	
Grade II	43	36	7	
Grade III	44	41	4	
Taille tumorale (mm)				0,75
≤ 20	39	33	6	
21-50	80	69	11	
> 50	3	3	0	
Métastases ganglionnaires				0,11
-	81	69	12	
+	21	20	1	
Récepteurs à l'œstrogène				0,80
-	68	59	9	
+	54	46	8	
Récepteurs à la progestérone				0,03
-	64	51	13	
+	58	54	4	
HER2				0,04
Absence de surexpression	90	74	16	
Présence de surexpression	32	31	1	
p53				0,80
Absence d'accumulation	75	65	10	
Présence d'accumulation	57	50	7	

^a les valeurs de P sont calculées par le test chi-2 ou le test exact de Fisher et sont considérées statistiquement significatives lorsque $P < 0,05$.

V.3.4. Valeur pronostic de la détection du virus MMTV-like

L'évaluation de l'impact de la présence des séquences *env* du virus MMTV-like sur la survie globale et la survie sans rechute des patientes, n'a révélé aucune différence statistiquement significative entre les patientes MMTV-like positifs et négatifs (**Figure V-3**).

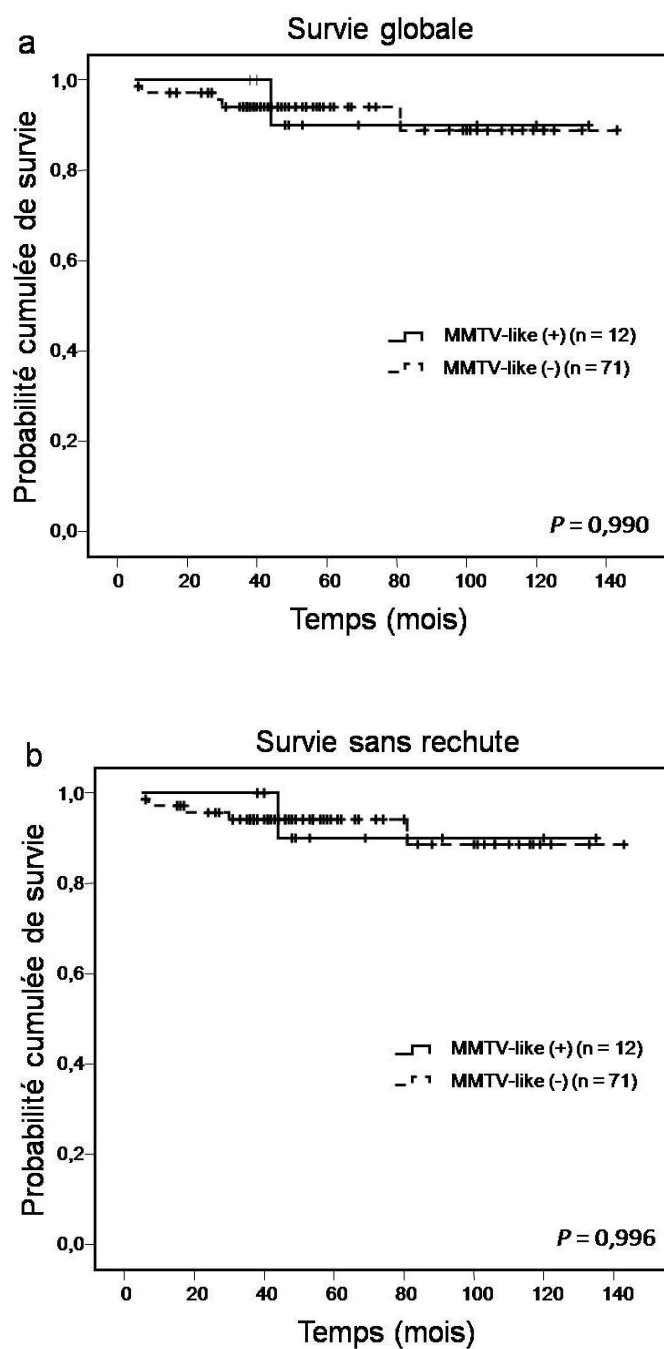


Figure V-3: Courbes de survie globale (a) et de survie sans rechute (b) des patientes atteintes de cancer du sein en Tunisie en fonction du statut du virus MMTV-like dans les tumeurs.

V.4. Discussion

Dans ce présent chapitre nous avons évalué la prévalence du virus MMTV-like dans une série de 122 cas de cancer du sein diagnostiqués chez des femmes Tunisiennes. Nous avons démontré la présence de séquences d'ADN de la région *env* du virus MMTV-like par PCR semi-nichée dans 14% des cas analysés (Hachana et al., 2008 ; **Annexe 2**). Par la suite, nous avons confirmé l'authenticité des séquences amplifiées par séquençage automatique. Les séquences retrouvées ont alors été comparées aux séquences prototypes du virus MMTV et MMTV-like publiées dans les bases de données internationales. Enfin nous avons précisé les caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés à la présence du virus MMTV-like.

Nos résultats rejoignent les résultats des études réalisées dans les pays à faible incidence de cancer du sein, tel que la Chine où 16,8% des cas de cancers du sein ont été retrouvés positifs pour le virus MMTV-like (Luo *et al.*, 2006). En revanche, la prévalence actuelle du virus MMTV-like dans le cancer du sein en Tunisie est inférieure à celle dans les pays à forte incidence de cancer du sein, en particulier les États-Unis, où les séquences du virus MMTV-like ont été identifiées dans 30 à 40% des cas de cancer du sein (Wang *et al.*, 1995 ; Melana *et al.*, 2001 ; Etkind *et al.*, 2000).

De même, des études concernant l'Italie, l'Argentine et l'Australie ont montré la présence du virus MMTV-like respectivement dans 37,7%, 31,7% et 42,2% des cas de cancer du sein analysés (Pogo *et al.*, 1999 ; Melana *et al.*, 2002 ; Ford *et al.*, 2003). Mais d'autres études indépendantes effectuées en Italie, en Autriche et en Angleterre n'ont pas réussi à détecter ces séquences virales dans les cas de cancer du sein étudiés (Zanghen *et al.*, 2002 ; Mant *et al.*, 2004 ; Witt *et al.*, 2003).

D'autre part, La prévalence du virus MMTV-like retrouvée dans notre travail est nettement inférieure au taux de 74% rapporté dans une étude précédente réalisée par Levine et ses collaborateurs (Levine *et al.*, 2004) sur une petite série (n=38) de cancer du sein diagnostiqués chez des femmes Tunisienne entre 1978 et 1979. Durant cette période, la fréquence de la forme inflammatoire du cancer du sein en Tunisie était beaucoup plus importante qu'elle ne l'est actuellement, ceci a été souligné par une étude épidémiologique réalisée récemment à l'Institut Salah Azaiz (10% dans la période 1999 versus 49% pendant la période 1974-1978) (Maalej *et al.*, 1999).

Il est important aussi de noter que, parmi ces 38 échantillons de cancer du sein examinés dans l'étude de Levine, 81,6% ont été classés comme des tumeurs évolutives (PEV-positif) sur la base du système de classement décrivant la poussée évolutive (PEV), dont 71% indiquant des signes objectifs du cancer du sein inflammatoire classés PEV3 (rougeur, chaleur, et œdème). Toujours dans cette étude, au sein de cette majorité de tumeurs PEV-positives une proportion élevée de tumeurs agressives a révélé la présence des séquences du virus MMTV-like, cela suggère la présence d'une relation possible entre ce virus et la forme inflammatoire du cancer du sein. Par conséquent, la fréquence élevée de la forme inflammatoire du cancer du sein dans l'étude de Levine par rapport à notre présente étude pourrait expliquer la différence de prévalence du virus MMTV-like entre les deux études. Mais cette différence pourrait aussi être attribuée en partie, à certaines variations dans les techniques utilisées et/ou à l'hétérogénéité des cas inclus dans les deux études.

Mais il est important de préciser que, d'une part nous avons utilisé une technique PCR semi-nichée hautement sensible ainsi que des échantillons d'ADN de très bonne qualité obtenus à partir de tissus mammaires congelés. Et que d'autre part, la faible fréquence des séquences du virus MMTV-like obtenue dans notre étude ne peut pas être due à des biais de sélection. En effet, notre étude a porté sur une large série de cas de cancer du sein choisis au hasard et obtenu à partir de patientes vivant dans une large superficie, pouvant être considérées comme représentatives de la population tunisienne.

Une autre hypothèse nous paraît intéressante et pourrait expliquer la réduction importante de la prévalence des séquences du virus MMTV-like dans les cancers du sein en Tunisie par rapport à la précédente étude. Cela pourrait surtout être dû à une modification de l'exposition à ce virus et/ou à la disparition de son hôte. Ceci est probablement en relation avec l'amélioration des conditions de vie ainsi que l'augmentation du niveau socio-économique de la population Tunisienne. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs données épidémiologiques indiquant, une réduction de la prévalence de la forme inflammatoire du cancer du sein en Tunisie, forme retrouvée surtout en cas de mauvaises conditions socio-économiques (jusqu'à 55% au cours des années soixante-dix et quatre-vingt contre moins de 10% à l'heure actuelle) et une augmentation de la prévalence générale du type histologique commun du cancer du sein (Maalej *et al.*, 1999 ; Ben Ahmed *et al.*, 2002).

Mais, une autre hypothèse, moins probable, pourrait aussi expliquer la faible fréquence du cancer du sein associé au virus MMTV-like dans notre série : cela tiendrait au fait que des

changements pourraient avoir eu lieu dans les séquences virales (mutations, réarrangements...) conduisant à des souches virales moins oncogéniques ou plus difficiles à détecter avec les amorces utilisées.

Chez la souris, il est connu que le virus MMTV est transmis soit d'une manière exogène par le biais du lait maternel soit d'une manière endogène par l'intermédiaire des cellules germinales. Il existe plusieurs souches différentes du virus MMTV et les premières études ont montré que la capacité de ces différentes souches à provoquer un cancer mammaire chez la souris était différente et dépendait aussi de la souche de souris infectée par le virus.

Les particules virales du MMTV ont été aussi observées dans le lait de femmes atteintes de cancer du sein ainsi que dans le tissu mammaire de femmes ayant des antécédents familiaux de cancer du sein (Etkind *et al.*, 2008). Mais ces observations n'ont pas été confirmées ou reproduites et restent un sujet de controverse. Cependant, l'utilisation de la PCR, a permis à Ford et ses collaborateurs (Ford *et al.*, 2003) de retrouver les séquences *env* du virus MMTV-like dans certains échantillons de lait maternel chez des femmes Australiennes saines. Mais, il n'existe actuellement aucune preuve que les nouveau-nés nourris au sein ont un risque ultérieur plus élevé de développer un cancer du sein que ceux non allaités, même si la transmission du virus MMTV-like par le lait maternel vers les nouveau-nés reste possible.

Encouragé par les résultats de Wang et ses collègues, l'équipe de Stewart a évalué l'implication éventuelle du virus MMTV dans le cancer du sein chez l'homme. Cette équipe a suggéré que la distribution mondiale des séquences du virus MMTV-like dans le cancer du sein dans les populations humaines est en relation avec la distribution de l'hôte naturel de ce virus qui est la souris domestique, *Mus domesticus* (Stewart *et al.*, 2000 ; Faedo *et al.*, 2007). Cette équipe a constaté que l'incidence la plus élevée de cancer du sein dans le monde se trouve dans les pays où *Mus domesticus* est l'espèce prédominante de souris domestiques et que chez 50% de ces souris domestiques du sud de la Californie des séquences exogènes du virus MMTV ont été détecté. Ces observations ont permis à Stewart de suggérer qu'une forte concentration de *Mus domesticus* peut être liée à une augmentation de l'incidence du virus MMTV.

Vingt cinq ans avant l'étude de Stewart, l'étude de la distribution géographique du virus MMTV dans les souris sauvages faite par Rongey et ces collègues avait déjà montré un intérêt particulier. En effet, seul un groupe de ces souris appartenant à une zone reculée du sud de la

Californie, présentait une forte incidence des particules du virus MMTV ainsi qu'une augmentation de l'incidence des carcinomes mammaires spontanés. Ceci supporte l'hypothèse de l'existence de zones géographiques spécifiques où il y aurait une forte prévalence du virus MMTV-like.

La transmission zoonotique (de l'animal à l'homme) du MMTV est possible. Les particules en suspension dans les matériaux de la souris sont des allergènes domestiques, et sont donc sources théoriques de transmission du MMTV de la souris à l'homme. La transmission du MMTV à l'homme suite à l'ingestion de céréales et d'autres aliments contaminés par des matières fécales de souris est aussi possible. Des études récentes sont en faveur de la transmission de ce virus par les chiens, cela pourrait expliquer l'importance de sa détection des les pays occidentaux où le chien est l'animal domestique le plus fréquent (Laumbacher *et al.*, 2006).

Dans notre étude, les séquences virales n'ont pas été détectées dans les tissus mammaires normaux. En outre, des études antérieures ont montré que les séquences *env* du virus MMTV-like sont soit absentes, soit présentes dans une très faible proportion dans les tissus mammaires normaux (de 0 à 1,8%), y compris ceux anatomiquement liés aux tissus tumoraux (Wang *et al.*, 1995 ; Ford *et al.*, 2003 ; Melana *et al.*, 2001). L'origine endogène ou exogène des séquences *env* du virus MMTV-like dans les cancers du sein humains a été largement discutée. Parce qu'ils ont été retrouvés presque exclusivement dans les tissus tumoraux et non tumoraux du sein, il a été suggéré que ces séquences auraient une origine exogène.

De plus, les séquences du virus MMTV-like détectées dans nos échantillons présentent une forte homologie (allant de 95 à 97%) avec les séquences rapportées précédemment des virus MMTV et MMTV-like, mais présentent une faible homologie avec les virus endogènes spécialement HERV-K10 et HERV-K-T47D (moins de 5%).

Dans notre présente étude, l'analyse des paramètres clinico-pathologiques n'a pas montré de corrélation significative entre la présence du virus MMTV-like et les groupes d'âge, les types histologiques, le grade histopronostique SBR, les métastases ganglionnaires, ou la taille de la tumeur. Ça indique que la présence du virus MMTV-like ne se limite pas à l'un des sous-groupes examinés de cancer du sein. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes (Pogo *et al.*, 1999 ; Lawson *et al.*, 2004).

De plus, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la présence du virus MMTV-like et l'expression des récepteurs à l'œstrogène ou l'accumulation de la protéine p53. Ces résultats sont en accord avec les études antérieures montrant l'absence de corrélation significative entre la présence des séquences *env* du virus MMTV-like et l'accumulation de p53 (Pogo *et al.*, 1999 ; Levine *et al.*, 2004 ; Faedo *et al.*, 2004 ; Lawson *et al.*, 2004). En revanche, nous avons trouvé une corrélation significative entre la présence des séquences du virus MMTV-like et la négativité des récepteurs à la progestérone ($p=0,03$). La plupart des études antérieures n'ont pas trouvé une telle corrélation (Pogo *et al.*, 1999 ; Lawson *et al.*, 2004). Mais, une étude a rapporté une corrélation entre la présence des séquences du virus MMTV-like et la positivité des récepteurs à la progestérone (Faedo *et al.*, 2004). La corrélation entre la présence des séquences du virus MMTV-like et la négativité des récepteurs à la progestérone dans notre étude suggère un phénotype agressif des tumeurs associées au virus MMTV-like. Cette observation est en accord avec une étude antérieure rapportant une corrélation entre la présence du virus MMTV-like dans les cancers du sein et la surexpression du récepteur à la laminine, un marqueur d'invasion tumorale (Pogo *et al.*, 1999). Ceci est aussi en accord avec les études précédentes indiquant une relation entre la présence des séquences *env* du virus MMTV-like et certaines formes agressives du cancer de sein telle que le cancer du sein de la femme enceinte (Wang *et al.*, 2003) et la forme inflammatoire du cancer du sein (Levine *et al.*, 2004).

En ce qui concerne HER2, une corrélation inverse a été constatée entre la présence des séquences du virus MMTV-like et la surexpression de HER2 ($p=0,04$). Seules deux études antérieures ont étudié la relation entre la présence du virus MMTV-like dans le cancer du sein et le statut d'expression de HER2 (Pogo *et al.*, 1999 ; Lawson *et al.*, 2004), mais ils n'ont pas trouvé de corrélation significative. HER2 est un proto-oncogène surexprimé dans environ 30 à 50% des cancers du sein (Slamon *et al.*, 1989 ; Biéche et Lidereau, 1995). La surexpression de HER2 joue un rôle important dans le cancer du sein et le développement des métastases. La surexpression de HER2 est également associée à la résistance à la chimiothérapie, et constitue un indicateur péjoratif pour le pronostic. Il représenterait aussi une cible importante pour des récentes thérapies du cancer.

Il a été démontré *in vitro* que plusieurs produits oncogènes, tels que la protéine 5E1A de l'adénovirus, la protéine EBNA1 du virus d'Epstein-Barr, l'antigène grand T du virus simien 40, les produits des gènes *c-Myc*, *c-Cbl*, et *PEA3*, peuvent agir comme des inhibiteurs de

l'expression du gène HER2 (Nakatsuka *et al.*, 2003 ; Lednicky *et al.*, 1997 ; Reuther *et al.*, 2001, Carbone *et al.*, 2005 ; Singal *et al.*, 2004). La signification de cette corrélation inverse entre la présence du virus MMTV-like et la surexpression du proto-oncogène HER2 reste à être clarifiée. En effet, le génome du virus MMTV-like ne contient aucun oncogène spécifique, mais en s'insérant à proximité d'un proto-oncogène cellulaire, ce virus induit son impact de transformation. Néanmoins, notre étude montre une contribution possible du virus MMTV-like dans la carcinogénèse mammaire impliquant des mécanismes autres que ceux mettant en jeu le proto-oncogène HER2.

La signification biologique de la présence des séquences *env* du virus MMTV-like dans les cancers du sein chez l'Homme est encore mal connue, et la possibilité que ces séquences ne contribuent pas à l'étiologie du cancer du sein et sont plutôt un épiphénomène ne peut être exclue. Mais la détection de l'ADN viral uniquement dans les tissus tumoraux du sein et non pas dans les tissus mammaires normaux, suggère fortement que le virus MMTV-like peut être un facteur contributif dans la cancérogenèse mammaire. En outre, les résultats de notre étude suggèrent que des liens existent entre la présence des séquences du virus MMTV-like et les hormones, ce qui soutient également l'hypothèse ci-dessus.

En conclusion, les résultats de ce chapitre confirment la présence de séquences env du virus MMTV-like dans des cas de cancer du sein chez la femme Tunisienne. En revanche, ils révèlent une forte diminution de la prévalence de ces séquences dans le cancer du sein en Tunisie (14%) par rapport à des séries anciennes (74%).

Cette diminution pourrait être due à des modifications dans l'exposition au virus ou à son hôte vraisemblablement en rapport avec le changement dans le style de vie et l'amélioration du niveau d'hygiène qu'a connu la population Tunisienne.

De plus, notre étude révèle une corrélation significative entre la présence du virus MMTV-like et la négativité des récepteurs à la progestérone, ainsi qu'une corrélation inverse avec la surexpression de HER2. Cela suggère que le virus MMTV-like peut être un facteur contributif dans la carcinogenèse du sein. Cependant, l'analyse comparative des données de survie de nos patientes n'a pas montrée de différences dans la survie globale ou la survie sans rechute des patientes ayant une tumeur MMTV-like positive comparativement aux patientes ayant une tumeur MMTV-like négative.

D'autres études sont nécessaires pour préciser les caractéristiques virologiques et épidémiologiques de ce virus et pour élucider le rôle exact de ce virus dans la carcinogenèse chez les humains.

Chapitre VI

Papillomavirus humains et cancer du sein en Tunisie

VI.1. Introduction

Les papillomavirus humains (HPV) sont des petits virus à ADN qui infectent les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses. Ces virus sont reconnus comme des agents étiologiques dans le développement de certains cancers du tractus génital particulièrement le cancer du col utérin. A ce jour plus de 200 génotypes différents de HPV ont été identifiés, dont approximativement 40 sont des HPV à tropisme génito-anal. Selon leur rôle potentiel dans le développement des cancers, ces virus ont été subdivisés en virus à haut risque oncogène (tels que les HPV16 et 18), et en virus à faible risque oncogène (tels que les HPV6 et 11) (Jacobs *et al.*, 1995 ; Munoz *et al.*, 2003 ; Schiffman *et al.*, 2000). Le pouvoir oncogène des HPV à haut risque a été essentiellement attribué à l'activité des produits des gènes précoces 6 et 7 (E6 et E7, E pour *early*). Les protéines codées par ces gènes se lient et inhibent les produits d'anti-oncogènes pro-apoptotiques que sont la protéine p53 pour la protéine E6 (Thomas *et al.*, 1999) et la protéine Rb pour la protéine E7 (Munger *et al.*, 2001).

Il a été démontré, *in vitro*, que la transfection de cellules épithéliales mammaires humaines par les virus HPV16 ou 18 pouvait entraîner leur transformation en cellules cancéreuses (Band *et al.*, 1990 ; Wazer *et al.*, 1995). Ceci a soulevé l'hypothèse que les HPV pourraient être étiologiquement liés à certains cas de cancer du sein. Cependant, à la différence du carcinome du col utérin, qui est presque toujours associé aux HPV, le rôle de ces virus dans le développement du cancer du sein demeure un sujet de discussion. En effet, certaines études ont rapporté la détection de l'ADN des HPV dans des tumeurs mammaires, particulièrement les types 16, 18 et 33 (Di Lonardo *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002 ; Damini *et al.*, 2004 ; Widschwendter *et al.*, 2004 ; Kan *et al.*, 2005 ; de Villiers *et al.*, 2005 ; Kroupis *et al.*, 2006 ; Choi *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2008 ; Akil *et al.*, 2008 ; Mendizabal-Ruiz *et al.*, 2009 ; Cantu de Leon *et al.*, 2009). Mais d'autres études n'ont pas retrouvé ces virus dans le cancer du sein (Wrede *et al.*, 1992 ; Gopalkrishna *et al.*, 1996 ; Bratthauer *et al.*, 1992 ; Lindel *et al.*, 2007 ; de Cremoux *et al.*, 2008).

Dans les chapitres III et V, nous avons démontré la présence du virus SV40 et du virus MMTV-like dans respectivement 22% (Hachana *et al.*, 2009) et 14% (Hachana *et al.*, 2008) des cas de cancer du sein en Tunisie. L'objectif du présent chapitre est d'évaluer la prévalence des HPV ano-génitaux dans le cancer du sein dans notre pays. Pour cela nous avons recherché la présence de ces virus dans 122 cas de cancer du sein en utilisant des techniques de PCR et d'hybridation *in situ*.

VI.2. Méthodologie

VI.2.1. Population d'étude

Cette partie du travail a concerné les 122 cas de cancer du sein étudiés dans le chapitre précédent. Des extraits d'ADN obtenus à partir des tissus tumoraux congelés ont été utilisés pour la recherche des papillomavirus par PCR. Des coupes histologiques obtenues à partir des blocs de tissus tumoraux inclus en paraffine ont été utilisés pour l'exploration morphologique de la présence des papillomavirus par hybridation in situ.

VI.2.2. Recherche des papillomavirus humains par PCR

La recherche des HPV par PCR a été effectuée sur les extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons tumoraux congelés. Plusieurs couples d'amorces ont été testés. Initialement la détection des HPV a été réalisée en utilisant le couple d'amorces E1-350L/E1-547R visant l'amplification d'une séquence conservée de 180 pb appartenant à la région E1 du génome viral et commune aux principaux types de HPV ano-génitaux (HPV6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 57, et 58) (Josefsson *et al.*, 1999). Par ailleurs, ces échantillons ont été également testés par PCR utilisant le couple d'amorces GP5+/GP6+ amplifiant une séquence de 150 pb appartenant à la région L1 du génome viral d'un large spectre de HPV ano-génitaux (HPV6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 61 et 66) (de Roda *et al.*, 1995). Pour différencier le groupe auquel appartient le virus, deux couples d'amorces différents ont été utilisés. Le 1^{er} couple d'amorces PU-1M/PU-2R est spécifique aux HPV à haut risque et à risque intermédiaire (HPV16, 18, 31, 33, 52b et 58) et pour lequel la taille du produit d'amplification varie de 231 à 268 pb, et le 2^{ème} couple d'amorces PU-2R/PU-31B est spécifique aux HPV à bas risque oncogène (HPV6 et 11) et qui génère un amplicon de 228 pb (Fujinaga *et al.*, 1991). Puis, à toutes ces techniques s'ajoute l'utilisation de PCR utilisant des couples d'amorces type spécifique permettant de détecter d'une manière spécifique et individuelle les HPV16, 18, 31 et 33 (Baay *et al.*, 1996).

Les conditions expérimentales appropriées à chaque couple d'amorces utilisé pour la recherche des papillomavirus ont été détaillées dans le chapitre II consacré aux techniques générales.

VI.2.3. Recherche des HPV par hybridation in situ

En vue de détecter le génome des HPV dans les cellules tumorales mammaires, nous avons appliqué la technique morphologique d'hybridation in situ en utilisant des sondes à ADN double brin biotinylées commercialisées par la société DakoCytomation. Ces sondes se répartissent en deux classes : un cocktail de sondes nommé HPV-PAN dirigé contre un large spectre de HPV ano-génitaux (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 et 52) et des sondes spécifiques aux types 6/11, 16/18 et 31/33. Cette technique a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur selon le protocole détaillé dans le chapitre techniques générales.

Ces différentes techniques d'hybridation in situ ont été réalisées sur des coupes tissulaires obtenues à partir des blocs de tissus tumoraux enrobés en paraffine. L'utilisation de tissus fixés au formol par l'hybridation in situ permet de mettre en évidence les séquences génomiques des HPV d'une manière spécifique et sensible, avec un meilleur contrôle morphologique des cellules marquées que les tissus congelés.

VI.3. Résultats

VI.3.1. Recherche des papillomavirus humains par PCR

Aucun des 122 échantillons de cancer du sein testés n'a été positif pour les HPV utilisant respectivement les amorces consensus E1-350L/E1-547R (**Figure VI-1a**) et GP5+/GP6+ (**Figure VI-1b**). D'autre part, ni les HPV à haut risque oncogène (HPV 16, 18 et 31, 33, 52b, et 58) (**Figure VI-1c**), ni les HPV à faible risque oncogène (HPV 6 et 11) (**Figure VI-1d**) n'ont été détectés dans aucun des cas. En outre, en utilisant les amorces spécifiques pour les HPV 16, 18, 31 et 33 aucun des cas n'a été testé positif (**Figure VI-2**).

Donc, en dépit de l'utilisation de ces différentes techniques de PCR, aucun des 122 cas de cancer du sein étudiés n'a été testé positif pour les HPV. Par contre, tous les témoins utilisés ont été testés positifs et ceci dans toutes les expériences.

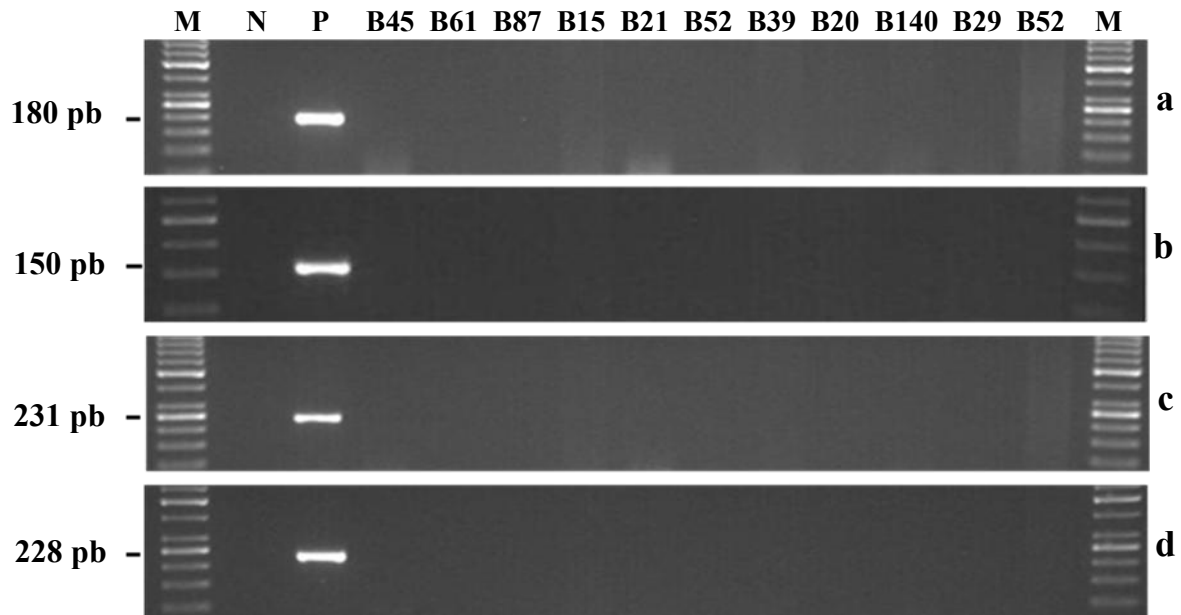


Figure VI-1 : Exemples représentatifs de gel d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium après électrophorèse des produits d'amplification par PCR pour la détection des papillomavirus humains dans des cas de cancer du sein, **a** : amplification de la région E1 commune à un large spectre de HPV, **b** : amplification de la région L1 commune à un large spectre de HPV, **c** : amplification de la région E6/E7 appartenant aux HPV à haut risque oncogène (HPV16, 18, 31, 33, 52b et 58), **d** : amplification de la région E6/E7 appartenant aux HPV à bas risque oncogène (HPV16 et 18). Les pistes **M** indiquent le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 50 pb), les pistes **P** correspondent aux contrôles positifs respectifs pour chaque séquence cible des HPV et les pistes **N** correspondent aux contrôles négatifs des réactions PCR contenant de l'eau distillée au lieu de l'ADN matrice.

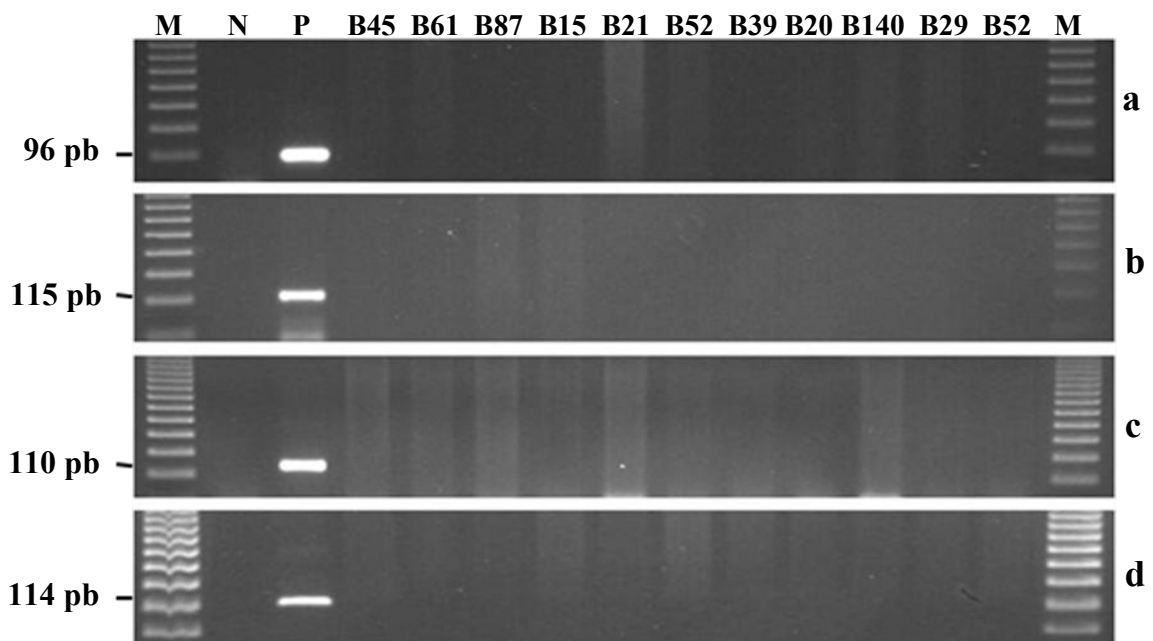


Figure VI-2 : Exemples représentatifs de gel d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium après électrophorèse des produits d'amplification par PCR spécifique pour la détection des papillomavirus humains suivants : **a** : HPV16, **b** : HPV18, **c** : HPV31, **d** : HPV33. Les pistes **M** indiquent le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 50 pb), les pistes **P** correspondent aux contrôles positifs respectifs des HPV16, 18, 31 et 33, et les pistes **N** correspondent aux contrôles négatifs des réactions PCR contenant de l'eau distillée au lieu de l'ADN.

VI.3.2. Détection des papillomavirus humains par hybridation in situ

Aucun des cas de cancer du sein analysés par la technique d'hybridation in situ n'a montré de positivité et ceci quelque soit le type de sonde utilisé. En revanche, tous les échantillons tissulaires inclus en tant que témoins positifs pour cette technique ont donné des résultats positifs avec les sondes utilisées.

VI.4. Discussion

A ce jour, plus de 200 types de HPV ont été caractérisés (McGlennen, 2000) et environ 40 d'entre eux sont associés aux tumeurs ano-génitales (Bergeron *et al.*, 1992). L'infection par les HPV à faible risque oncogène (HPV6, 11, 42, 43, 44...) est responsable de lésions bénignes (condylomes). Les virus à haut risque oncogène (HPV31, 33, 35, 51, 52 et 58...) sont détectés plus fréquemment dans les lésions intra-épithéliales squameuses (dysplasie), tandis que les HPV16 et 18 sont principalement associés aux cancers ano-génitaux particulièrement celui du col de l'utérus (Brestovac *et al.*, 2005 ; Hopman *et al.*, 2004).

Les HPV ano-génitaux sont associés à des infections et à des cancers humains avec des fréquences considérablement différentes et des variations inter-régionales significatives (Clifford *et al.*, 2003). En Tunisie, les données disponibles sur la prévalence des génotypes de HPV, que ce soit chez les femmes atteintes de cancer du col de l'utérus ou chez les femmes en bonne santé, sont rares. Dans une précédente étude réalisée dans notre laboratoire sur 32 cas de condylomes acuminés, nous avons pu mettre en évidence la présence des HPV à bas risque oncogène (HPV6 et 11) dans 85% des cas analysés (Nabi *et al.*, 2006). D'autre part dans une autre étude Tunisienne, l'analyse de la présence des HPV au niveau du col utérin chez 51 prostituées légales et 106 femmes mariées a montré une prédominance respective du HPV16 et du HPV6 dans ces deux groupes de femmes (Hassen *et al.*, 2003). Dans une autre étude réalisée dans le cadre de l'examen régulier des prostituées, l'évaluation des types de HPV retrouvés chez 64 de ces femmes a montré une prédominance du HPV16 suivi par les HPV58 et 82. Par contre les HPV du type 31, 33 et 35 étaient rares (de Marco *et al.*, 2006).

Bien que le cancer du sein soit une pathologie fréquente en Tunisie, ni la littérature nationale ni internationale n'a rapporté d'études concernant l'évaluation de la présence des HPV dans le cancer du sein dans notre pays. Dans notre présent travail, nous avons évalué la prévalence de ces virus dans une série de 122 cas de cancer du sein. Pour cela, nous avons analysé par PCR

la présence de séquences d'ADN appartenant aux régions L1, E1, E6 et E7 de ces virus utilisant différents couples d'amorces. La présence des HPV a été également évaluée par la méthode morphologique d'hybridation in situ utilisant respectivement un cocktail de sondes nommé HPV-PAN visant un large spectre de HPV anogénitaux ainsi que des sondes type spécifique visant certains génotypes de HPV.

Mais, en dépit de l'utilisation d'extraits d'ADN de bonne qualité obtenus à partir de tissus frais congelés, ainsi que l'utilisation de techniques précédemment validées par plusieurs études à travers le monde (Di Lonardo *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2001 ; Damin *et al.*, 2004 ; Kan *et al.*, 2005), ayant une bonne sensibilité et visant la détection de séquences d'ADN appartenant à différents génotypes de HPV ano-génitaux, nous n'avons détecté ces séquences dans aucun des cas analysés (**Annexe 3**).

Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont également rapporté des résultats négatifs (**Tableau VI-1**). Parmi ces études, celle de Wrede et ses collaborateurs, qui ont analysé 80 cas de cancer du sein à la recherche du HPV16 et 18, mais aucun échantillon n'a montré de positivité ni par PCR ni par Southern blot (wrede *et al.*, 1992). Dans une étude analogue réalisée par Brautthauer sur une série de 43 cas à la recherche des HPV6, 11, 16 et 18, aucun de ces types n'a été détecté par PCR (Brautthauer *et al.*, 1992). L'hypothèse de l'absence des HPV dans le cancer du sein a été renforcée par plusieurs autres études portant respectivement sur des biopsies de cancer du sein, de maladie de Paget du mamelon ainsi que des tumeurs bénignes mammaires (Gopalkrishna *et al.*, 1996 ; Czerwanka *et al.*, 1996 ; Manavi *et al.*, 2001). Plus récemment deux études européennes, une Suisse et l'autre Française ont rapporté l'absence des HPV dans respectivement 81 et 50 cas de cancer du sein analysés par PCR (Lindel *et al.*, 2007 ; de Cremoux *et al.*, 2008). Toutes ces études se rejoignent sur l'absence des HPV et suggèrent que ces virus ne seraient pas impliqués dans le développement du cancer du sein.

En revanche, d'autres études ont rapporté la présence des HPV dans le cancer du sein. Ces travaux sont résumés dans le **Tableau VI-1**. Dans ces études le taux de positivité de ces virus dans le cancer du sein varie de 4,4 à 86% des cas selon les séries. Une des premières études réalisées dans ce domaine est celle de Di Lonardo qui a réussi à détecter par PCR le HPV16 dans 29,4% des tumeurs du sein étudiées, mais l'utilisation de l'hybridation in situ n'a pas permis de mettre en évidence le virus dans ces cas (Di Lonardo *et al.*, 1992). Dans une étude norvégienne (Hennig *et al.*, 1999), réalisée sur une série de 41 patientes ayant en plus d'un

cancer du sein, une néoplasie cervicale intra-épithéliale de haut grade, le HPV16 a été détecté par PCR dans 46% des cas mais seulement un cas s'est révélé être positif par hybridation in situ. Cet auteur a suggéré que la présence de l'ADN du HPV16 dans le tissu mammaire pourrait être due à une « migration » du virus de son site initial d'infection (col utérin) vers d'autres organes via le sang ou la lymphe (Hennig *et al.*, 1999). Une étude réalisée en 2001 par Liu et ses collaborateurs aux Etats-Unis a retrouvé les HPV16 et 18 dans 35% des cas (Liu *et al.*, 2001). Une étude chinoise (Yu *et al.*, 2000) a retrouvé le HPV33 dans 43,8% de cas de cancer du sein, mais n'a pas détecté les HPV 16 et 18. Il est important de noter que le HPV33 a été détecté par plusieurs équipes seulement chez des femmes asiatiques (Yu *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2002), suggérant ainsi une éventuelle différence dans la répartition géographique des différents types de HPV dans le cancer du sein. Dans une étude brésilienne plus récente réalisée sur 101 cas de cancer du sein, 21 lésions mammaires bénignes (fibroadénomes) et 20 prélèvements tissulaires mammaires non tumoraux (réduction mammaire), les HPV16 et 18 ont été détectés dans 24,7% des cas de cancer du sein (Damin *et al.*, 2004). Ce taux rejoint celui de Li et ses collaborateurs en Chine avec un pourcentage de 23,1% (Li *et al.*, 2002). Une récente étude a indiqué que le HPV16 serait le seul type présent chez les femmes canadiennes atteintes de cancer du sein (Yasmeen *et al.*, 2007). Au Moyen-Orient, des études évaluant la présence des HPV à haut risque oncogène ont rapporté des résultats surprenants. Les HPV18, 33 et 35 ont été détectés dans le cancer du sein de femmes turques dans 74% des cas analysés (Gumus *et al.*, 2006). Les HPV33 et 35 ont été trouvés dans 60% des cas de cancer du sein chez les femmes Syriennes et ceci dans une étude par PCR réalisée sur 113 cas de cancer du sein (Akil *et al.*, 2008).

L'absence de séquences de HPV dans notre étude ne peut être due à un biais de sélection étant donné que nous avons étudié une large série de cas (n=122) de cancer du sein aléatoirement choisis et obtenus à partir de patientes vivant dans une zone vaste de notre pays représentative de la population tunisienne. En outre, en se basant sur les données cliniques, aucune des patientes incluses dans cette étude n'a été auparavant traitée pour lésion bénigne ou maligne induite par le HPV telle que le cancer du col de l'utérus.

Toutefois, il est probable que contrairement aux cancers du col de l'utérus, il serait difficile de détecter les HPV dans les échantillons de cancer du sein (Kan *et al.*, 2005). Cette difficulté pourrait être due au nombre faible des particules virales dans les cas positifs de carcinome du sein. Seule une étude a tenté d'évaluer la charge virale de HPV dans des cas de cancer du sein

en utilisant la technique de PCR quantitative en temps réel, elle a indiqué que la charge virale était inférieure à une copie par cellule infectée (Khan *et al.*, 2008). Cette faible charge virale suggère que les HPV seraient probablement non impliqués dans le développement des carcinomes mammaires et que leur présence pourrait être accidentelle.

Ainsi, un récapitulatif de toutes les études publiées pourrait indiquer que des facteurs épidémiologiques, comme le pays d'origine et les antécédents de maladies HPV induites, pourraient jouer un rôle important dans la distribution des HPV dans le cancer du sein (Drain *et al.*, 2002). Il est également important de prendre en compte que l'incidence des infections par les HPV chez la femme Tunisienne, qui appartient au monde arabo-islamique caractérisé par un style de vie conservateur, est inférieure à celle décrite dans les pays latino-américains et asiatiques, et les pays occidentaux. En outre, plusieurs caractéristiques démographiques telles que la malnutrition, la multiparité, et le manque d'accès aux soins pourraient expliquer certaines différences des taux d'infection par les HPV aussi bien dans le cancer du sein que dans le cancer du col de l'utérus.

Tableau VI-1 : Récapitulatif des travaux concernant la recherche des HPV dans le cancer du sein à travers le monde.

Régions du monde	Auteurs, années	Pays	Nature des échantillons	Nombres de cas analysés	Techniques ^a	Pourcentage des cas HPV+	Génotypes de HPV détectés
Amérique du Nord	Bratthauer, 1992	Etats-Unis	Tissus fixés	13	PCR type spécifique (HPV 6/11, 16, 18)	0,0	-
	Liu, 2001	Etats-Unis	Tissus frais congelés	17	PCR HPV large spectre	35,3	16, 11, 18
Amérique du sud	Damin, 2004	Brésil	Tissus fixés	101	PCR type spécifique (HPV 16, 18)	24,7	16,18
	Mendizabal-Ruiz, 2008	Mexique	Tissus fixés	67	PCR HPV large spectre + RFLP	4,47	16, 18, 33
	de Leon, 2009	Mexique	Tissus fixés	65	PCR HPV large spectre	29,4	16, 18
Europe	Di Lonardo, 1992	Italie	Tissus fixés	17	PCR type spécifique (HPV 16) HIS	29,4	16
	Wrede, 1992	Royaume-Unis	Tissus fixés	80	PCR type spécifique (HPV 16, 18)	0,0	-
	Czerwenka, 1996	Autriche	Tissus fixés	20	PCR HPV large spectre + type spécifique (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35)	0,0	-
	Henning, 1999	Norvège	Tissus fixés	41	PCR type spécifique (HPV11, 16, 18, 33) HIS	46,3	16
	Widschwendter, 2004	Autriche	Tissus fixés	11	PCR HPV large spectre + ELISA	63,6	16
	de Villiers, 2005	Allemagne	Tissus fixés	29	PCR HPV large spectre HIS	86,0	6, 11
	Kroupis, 2006	Grèce	Tissus frais congelés	107	PCR HPV large spectre + type spécifique (HPV6, 11, 16)	15,9	16, 58, 59, 73, 82
	Lindel, 2007	Suisse	Tissus fixés	81	PCR HPV large spectre	0,0	-
de Cremoux, 2008	France	Tissus frais congelés	50	PCR HPV large spectre + type spécifique (HPV16, 18, 33, 45)	0,0	-	

Australie	Kan, 2005	Australie	Tissus fixés	50	PCR type spécifique (HPV 16, 18, 33)	48,0	18
Asie	Gopalkrishna, 1996	Inde	Tissus frais congelés	30	PCR type spécifique (HPV 16, 18)	0,0	-
	Yu, 1999	Chine et Japon	Tissus fixés	72	PCR type spécifique (HPV 16, 18, 33)	41,6 11,1	33
	Li, 2002	Chine	Tissus fixés	28	PCR HPV large spectre	23,2	
	Tsai, 2005	Taiwan	Tissus frais congelés	69	PCR HPV large spectre	12,9	
	Choi, 2007	Corée	Tissus fixés	123	PCR HPV large spectre	6,5	16, 18
	Khan, 2008	Japon	Tissus fixés	124	PCR HPV large spectre + type spécifique (HPV 16, 18, 33) + Q-PCR	19,0	16, 6, 18, 33
Moyen-Orient	Gumus, 2006	Turquie	Tissus frais congelés	50	-	74,0	16, 33
	Akil, 2008	Syrie	Tissus fixés	113	PCR HPV large spectre + type spécifique (HPV 16, 18, 31, 33, 35)	61,0	33, 35, 18, 16, 31
Afrique	Présente étude	Tunisie	Tissus frais congelés et tissus fixés	122	PCR HPV large spectre + type spécifique (HPV 16, 18, 31, 33) HIS	0,0	-

^a : PCR : polymerase chain reaction ; HIS : hybridation in situ ; RFLP: restriction fragment length polymorphism ; Q-PCR: quantitative PCR.

En conclusion, le travail présenté dans ce chapitre constitue la première étude qui s'intéresse à la recherche des papillomavirus humains dans le cancer du sein chez la femme tunisienne.

Nous avons recherché ces virus par plusieurs techniques PCR visant l'amplification de différentes séquences génomiques appartenant aux régions L1, E1, E6 et E7 d'un large spectre de HPV ano-génitaux HPV6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 61 et 66.

De plus, nous avons utilisé une technique morphologique d'hybridation in situ utilisant des sondes permettant la détection d'un large spectre de HPV ano-génitaux (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 et 52) et des sondes types spécifique permettant la détection sélective des HPV à haut risque (HPV16 et 18), des HPV à risque intermédiaire (HPV31 et 33) et des HPV à faible risque (HPV6 et 11).

En dépit de l'utilisation de ces différentes techniques de PCR et d'hybridation in situ, aucun des 122 cas de cancer du sein étudiés n'a été testé positif pour les différents types de HPV analysés.

Les résultats de ce chapitre suggèrent que les papillomavirus ano-génitaux (HPV6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 61 et 66) ne sont pas impliqués dans le développement du cancer du sein chez la femme en Tunisie. Cependant, la possibilité que d'autres génotypes de HPV contribuent à la carcinogenèse du sein ne peut être éliminée.

Chapitre VII

Herpesvirus humains et cancer du sein en Tunisie

VII.1. Introduction

Dans les chapitres précédents nous avons étudié la prévalence de trois types de virus dans le cancer du sein chez la femme tunisienne : le virus SV40, le virus MMTV-like et les papillomavirus. Nous avons démontré une présence significative des virus SV40 et MMTV-like dans le tissu mammaire tumoral dans respectivement 22 et 14 % des cas analysés (Hachana *et al.*, 2008 ; Hachana *et al.*, 2009). Mais aucun des cas testé n'a montré de positivité pour les papillomavirus. Dans le présent chapitre-nous nous intéressant à un autre groupe de virus les herpesvirus humains. Parmi ces derniers, le virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV4) et l'herpesvirus-8 humain (HHV8) sont maintenant largement reconnus en tant qu'oncogènes et sont spécifiquement associés à certains types de tumeurs humaines telle que le lymphome de Burkitt et le carcinome du nasopharynx pour l'EBV, et le sarcome de Kaposi pour le virus HHV8. En dehors de l'EBV et du HHV8, d'autres virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*, tels que les virus de l'herpès simplex (HSV1), le cytomégalo virus (CMV) et le HHV6 ont été détectés dans différentes pathologies et tumeurs humaines mais leur implication dans le déclenchement du mécanisme pathogénique n'est toujours pas confirmé (Berneman *et al.*, 1998).

L'objectif de ce chapitre est d'étudier une éventuelle association entre les herpesvirus humains et le cancer du sein en Tunisie. En premier lieu, nous avons évalué la prévalence des herpesvirus suivants HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8 dans 122 cas de cancer du sein en utilisant des techniques de PCR, d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. Puis, nous avons étudié la relation entre la présence de ces virus et plusieurs paramètres clinico-pathologiques afin de préciser le profil clinico-pathologique des tumeurs associées à ces virus.

VII.2. Méthodologie

VII.2.1. Population d'étude

Cette partie du travail a porté sur les 122 cas de cancer du sein déjà analysés dans les chapitres précédant V et VI. L'ADN extrait à partir des tissus tumoraux congelés a été utilisé pour la recherche des herpesvirus humains par PCR. Des blocs de tissus tumoraux inclus en paraffine sélectionnés auparavant ont été utilisés pour l'exploration morphologique des ces virus par immunohistochimie et hybridation in situ.

VII.2.2. Recherche de l'ADN génomique des herpesvirus par PCR

La présence des herpesvirus humains dans les tumeurs mammaires a été explorée par PCR utilisant des couples d'amorces spécifiques pour la détection des herpesvirus suivant : HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8 comme décrit précédemment dans le chapitre II consacré aux techniques générales. La recherche de ces herpesvirus par PCR a été réalisée sur l'ADN extrait à partir des tissus tumoraux congelés disponibles pour chaque patiente.

VII.2.3. Immunohistochimie

L'étude immunohistochimique a été effectuée pour l'analyse de l'expression des protéines de la phase de latence (LMP-1) et de la phase de lyse (ZEBRA) de l'infection par le virus EBV à l'aide d'anticorps spécifiques anti-LMP-1 et anti-ZEBRA. Cette technique a été réalisée sur des coupes tissulaires déparaffinées selon le protocole précédemment détaillé dans le chapitre II consacré aux techniques générales.

VII.2.4. Hybridation in situ

La recherche et la localisation cellulaire du virus EBV a été effectuée en utilisant la technique morphologique d'hybridation in situ visant la détection des ARNs EBER1 et 2. Cette technique a été également appliquée sur des coupes tissulaires déparaffinées selon le protocole précédemment détaillé dans le chapitre consacré aux techniques générales.

VII.2.5. Analyse statistique

Les tests Chi-carré et exact de Fisher ont été utilisés pour rechercher une association entre la présence des herpesvirus d'une part et les paramètres cliniques et pathologiques, le statut de

l'expression des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone, la surexpression de HER2, l'accumulation de P53 et le statut de méthylation de certains gènes suppresseurs de tumeur d'autre part.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la distribution ainsi que les moyennes des index de méthylation entre les cas de cancer du sein virus-positifs et virus-négatifs afin d'évaluer l'impact de la présence des herpesvirus sur la méthylation globale de l'ADN.

L'impact de la présence des herpesvirus sur la survie globale et la survie sans rechute des patientes a été évalué par la méthode de Kaplan-Meier et la comparaison de la survie entre les différents groupes a été réalisée par le test du log-rank bilatéral.

Pour tous les tests statistiques utilisés dans ce travail, une valeur bilatérale de $p \leq 0,05$ a été considérée comme significative.

VII.3. Résultats

VII.3.1. Détection des herpesvirus par PCR

Tous les cas inclus dans ce travail ont été analysés par PCR en vue d'une évaluation de la présence de l'ADN des herpesvirus humains suivant HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8. Aucun des échantillons tumoraux examinés n'a révélé la présence de l'ADN génomique viral des herpesvirus suivants : HSV1, CMV, HHV6 ou HHV8 (**Figure VII-1a, c, d et e**). En revanche, l'ADN de l'EBV a été retrouvé dans 27% (33/122) des cas (**Figure VII-1b**).

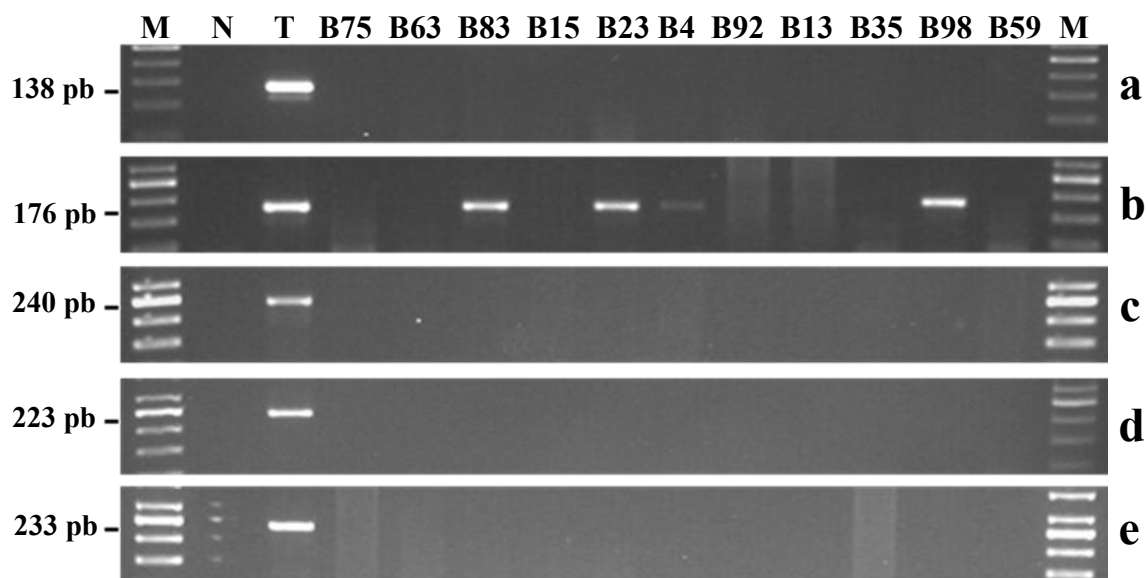


Figure VII-1: Exemples représentatifs de gels d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium après électrophorèse des produits d'amplification par PCR pour la détection des herpesvirus humains dans des cas de cancer du sein : **a** : herpesvirus simplex 1 (HSV1), **b** : virus d'Epstein-Barr (EBV), **c** : cytomegalovirus (CMV), **d** : herpesvirus humain 6 (HHV6), **e** : herpesvirus humain 8 (HHV8). Les pistes M indiquent le marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN à 50 pb, Promega), les pistes P correspondent aux témoins positifs et les pistes N correspondent au contrôle négatif (eau bi-distillée à la place de l'ADN matrice).

VII.3.2. Détection des protéines virales LMP-1 et ZEBRA par immunohistochimie

L'analyse par immunohistochimie de l'expression des protéines de la phase de latence (LMP-1) et de la phase de lyse (ZEBRA) de l'infection par l'EBV utilisant les anticorps spécifiques anti-LMP-1 et anti-ZEBRA n'a révélé aucun cas de cancer du sein positif même parmi les cas de cancers du sein testés positifs par PCR.

VII.3.3. Détection du génome de l'EBV par hybridation in situ

Aucun des cas analysés par la technique d'hybridation in situ n'a montré de positivité au niveau des cellules mammaires tumorales. Par contre, quelques cas ont montré une positivité dans de rares lymphocytes infiltrant le stroma tumoral.

VII.3.4. Caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein associés à la présence de l'ADN génomique de l'EBV

La répartition des cas de cancer du sein EBV+ et des cas EBV- en fonction des paramètres cliniques et pathologiques est présentée dans le **Tableau VII-1**. En analysant ces données, seule une corrélation significative entre la négativité de l'expression des récepteurs à l'œstrogène et la présence de l'ADN de l'EBV a été retrouvée ($p=0,008$).

D'autre part, le statut de méthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs rapporté dans le chapitre IV pour les 109 cas de carcinome canalaire infiltrant a été aussi déterminé pour les autres types de cancer du sein (carcinome lobulaire infiltrant (n=5), carcinome médullaire (n=6) et cancer du sein inflammatoire (n=2)). L'évaluation d'une éventuelle association entre le statut de méthylation de ces gènes et la présence de l'EBV dans le cancer du sein n'a révélée aucune corrélation statistiquement significative (**Figure VII-4a**). De plus, la moyenne des index de méthylation, varie d'une manière non significative entre les groupes EBV-positifs et EBV-négatifs ($0,426 \pm 0,022$ versus $0,407 \pm 0,031$; $p=0,589$) (**Figure VII-4b**).

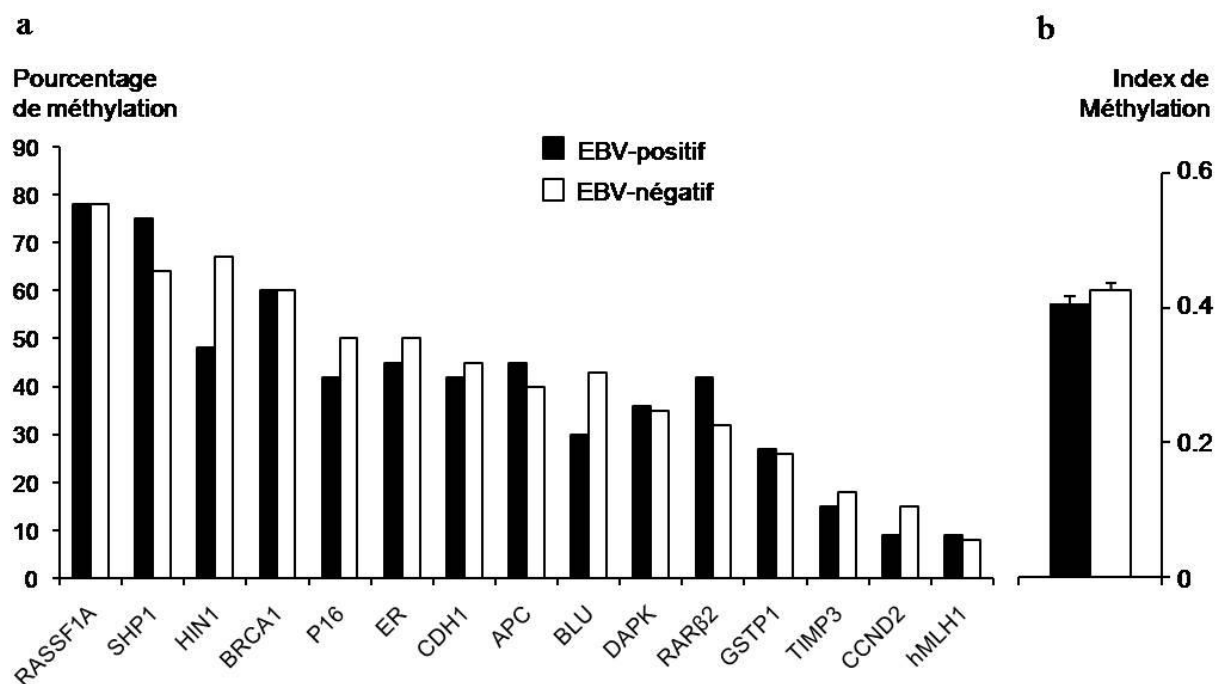


Figure VII-2 : Histogramme représentant la fréquence de l'hyperméthylation des 15 gènes analysés (a) et l'index de méthylation (b) dans les cancers du sein EBV-positifs (barres pleines) et les cancers du sein EBV-négatifs (barres vides). Les fréquences de méthylation dans les cas EBV-positifs et EBV-négatifs ont été comparées utilisant les tests Chi-2 et exacts de Fisher. Les moyennes de l'index de méthylation entre ces deux groupes ont été comparées par le test non paramétrique de Mann-Whitney U. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes comparés.

Tableau VII-1 : Analyse comparative des caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer du sein EBV-positifs et EBV-négatifs.

Variable	Nombre de cas EBV-positifs	Nombre de cas EBV-négatifs	Valeur de P^a
Age (ans)			0,253
≤ 50	16	54	
>50	17	35	
Grade histopronostique			0,281
Grade I	6	17	
Grade II	10	33	
Grade III	16	29	
Taille tumorale (mm)			0,415
≤ 20	6	20	
>20	27	70	
Métastases ganglionnaires			0,582
-	21	60	
+	7	14	
Récepteurs à l'œstrogène			0,008
-	25	43	
+	8	46	
Récepteurs à la progestérone			0,063
-	22	42	
+	11	47	
HER2			0,780
Absence de surexpression	25	65	
Présence de surexpression	8	24	
P53			0,920
Absence d'accumulation	17	49	
Présence d'accumulation	16	40	

^a les valeurs de P sont calculées par le test chi-2 ou le test exact de Fisher et sont considérées statistiquement significatives lorsque $P \leq 0,05$; les valeurs en gras indique des corrélations significatives.

VII.3.5. Valeur pronostic de la détection des herpesvirus humains

L'analyse des données de survie selon le statut de l'EBV a permis d'identifier une survie globale (**Figure VII-5a**) et une survie sans rechute (**Figure VII-5b**) plus importante pour les patientes ayant un cancer du sein EBV négatif comparativement aux patientes ayant un cancer du sein EBV positif, mais la différence n'atteint pas le seuil de signification statistique ($p=0,193$ et $p=0,202$ respectivement).

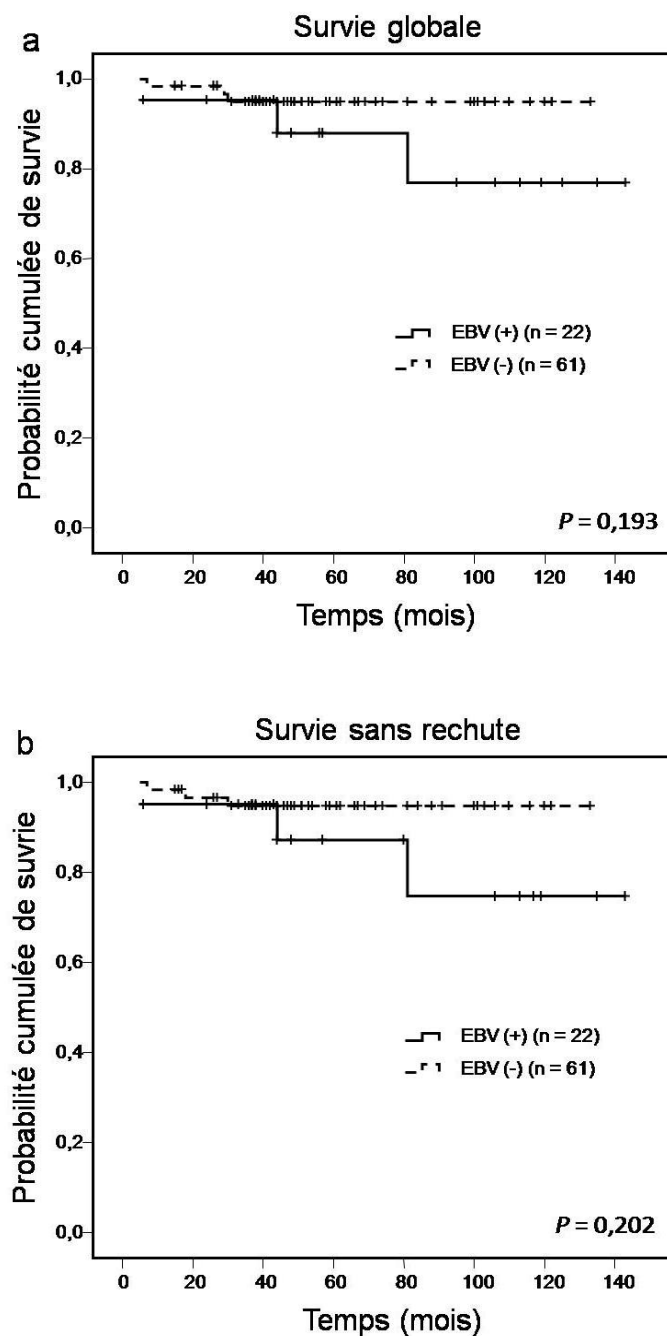


Figure VII-3: Courbes de survie globale (a) et de survie sans rechute (b) des patientes atteintes de cancer du sein en Tunisie en fonction de la présence et l'absence du virus EBV dans les tumeurs.

VII.4. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons évalué la prévalence des herpesvirus humains (HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8) dans le cancer du sein en Tunisie en utilisant des techniques de PCR, d'immunohistochimie et d'hybridation in situ.

En utilisant la technique de PCR nous avons mis en évidence la présence de l'ADN génomique de l'EBV dans 33 cas de cancer du sein (27%). Durant ces dernières années, plusieurs laboratoires ont étudié l'implication du virus EBV dans le cancer du sein, utilisant différentes techniques de PCR, d'hybridation in situ et d'immunohistochimie. Parmi les études utilisant la PCR, le génome de l'EBV a été retrouvé dans 2 à 66% de cas de cancer du sein (Gaffey *et al.*, 1993 ; Bonnet *et al.*, 1999 ; Lespagnard *et al.*, 1995 ; McCall *et al.*, 2001 ; Serraino *et al.*, 2001 ; Preciado *et al.*, 2005 ; Perkins *et al.*, 2006) (**Tableau VII-2**). La PCR est potentiellement la méthode la plus sensible et la plus spécifique pour la détection de l'ADN génomique viral. Mais elle ne permet pas la détermination de l'origine cellulaire des ADNs viraux détectés (Glaser *et al.*, 1997). En effet, il est largement admis que des lymphocytes infectés par l'EBV existent dans le stroma tumoral, ce qui pourrait expliquer la détection de l'EBV dans le tissu tumoral mammaire par PCR (Herrmann *et al.*, 2003).

La localisation du génome viral au niveau cellulaire n'est possible que par l'application de techniques morphologiques comme l'hybridation in situ ou l'immunohistochimie. Dans le présent travail nous n'avons pas détecté par immunohistochimie l'expression au niveau des cellules tumorales des protéines virales LMP1 et ZEBRA. L'analyse par immunohistochimie de l'expression de l'oncoprotéine virale LMP1 est une approche sensible mais limitée par le fait que LMP1 ne s'exprime pas dans certains types de tumeurs associées à l'EBV tel que le lymphome de Burkitt. En accord avec nos résultats, plusieurs études analysant l'expression de la protéine LMP1 par immunohistochimie dans le cancer du sein ont rapporté des résultats négatifs (Lespagnard *et al.*, 1995 ; Chu *et al.*, 1998 ; McCall *et al.*, 2001 ; Chu *et al.*, 2001 ; Deshpande *et al.*, 2002).

Également, nous n'avons pas détecté le virus EBV au niveau des cellules tumorales en utilisant la technique d'hybridation in situ EBERs. Mais, quelques cas ont montré une positivité par hybridation in situ dans de rares lymphocytes du stroma. Ce résultat nous permet de déduire que l'ADN viral détecté par PCR dans les cas de cancer du sein analysés pourrait avoir comme origine des lymphocytes infectés par l'EBV et infiltrant le stroma

tumoral. En outre, en analysant les paramètres clinico-pathologiques nous avons trouvé une corrélation significative entre la présence de l'EBV et la négativité des récepteurs à l'œstrogène ($p=0,008$). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes qui ont noté une forte association entre la présence de l'EBV et des éléments qui reflètent le phénotype agressif des tumeurs du sein telles que le grade histopronostic SBR élevé, la présence de ganglions métastatiques et la négativité des récepteurs hormonaux (Bonnet *et al.*, 1999 ; Chu *et al.*, 2001 ; Fina *et al.*, 2001). Or il est bien connu que les tumeurs mammaires agressives présentent souvent un stroma inflammatoire, abondant, riche en lymphocytes. Ce qui renforce également l'hypothèse que le signal de positivité de l'EBV par PCR pourrait provenir de ces lymphocytes.

Parmi toutes les études précédentes concernant l'évaluation de la présence de l'EBV dans les cancers du sein par hybridation in situ (Bonnet *et al.*, 1999 ; McCall *et al.*, 2001 ; Glaser *et al.*, 1997 ; Chu *et al.*, 2001 ; Deshpande *et al.*, 2002 ; Labrecque *et al.*, 1995 ; Brink *et al.*, 2000 ; Dadmansh *et al.*, 2001 ; Fina *et al.*, 2001 ; Kijima *et al.*, 2001 ; Grinstein *et al.*, 2002 ; Xue *et al.*, 2003), seulement trois d'entre elles ont montré des résultats positifs (McCall *et al.*, 2001 ; Labrecque *et al.*, 1995 ; Fina *et al.*, 2001). Dans ces trois études, la détection des ARN EBERs n'a concerné qu'une faible proportion de cellules tumorales (Fina *et al.*, 2001). De ce fait, il est possible que les cellules tumorales du sein n'expriment pas EBERs ou bien qu'elles l'expriment à de faibles quantités, indiquant ainsi que le cancer du sein n'appartient pas aux tumeurs traditionnellement associées à l'EBV et qui expriment fortement EBERs dans la presque totalité des cellules tumorales (Bonnet *et al.*, 1999). Mais cette hypothèse reste à démontrer et elle est contestée par plusieurs auteurs.

Récemment, Arbach et ses collaborateurs (Arbach *et al.*, 2006) ont constaté que l'infection des lignées cellulaires carcinomateuses mammaires MCF7 et BT474 par l'EBV leur confère une résistance accrue aux drogues chimiothérapeutiques en facilitant l'expression du gène MRD-1 (multidrug-résistance gene-1). En outre, Lin et ses collaborateurs (Lin *et al.*, 2007) ont rapporté que l'infection de certaines lignées cellulaires carcinomateuses mammaires par l'EBV induit l'activation des voies de signalisation HER2/HER3. Ces données sont compatibles avec les résultats d'une étude in vitro plus ancienne indiquant que la surexpression de HER2 ou du gène MRD-1 rend les cellules tumorales du sein hautement résistantes aux drogues chimiothérapeutiques, en particulier le Paclitaxel® (Yu *et al.*, 1998).

Curieusement, dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la présence de l'ADN du génome de l'EBV et la surexpression de l'oncoprotéine HER2.

L'hyperméthylation des îlots CpG au niveau du promoteur des gènes constitue un mécanisme important dans la régulation et la suppression de la transcription des gènes suppresseurs de tumeurs. Le profil de méthylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs constitue une signature spécifique pour plusieurs types de tumeurs humaines. Des études récentes, effectuées sur les carcinomes gastriques associés à l'EBV, ont décrit une corrélation entre la présence de l'EBV et l'hyperméthylation globale de l'ADN génomique de la tumeur, induisant la suppression de l'expression de nombreux gènes suppresseurs de tumeur dans ce type de cancer (Osawa *et al.*, 2002 ; Chang *et al.*, 2003 ; Sudo *et al.*, 2004 ; Sakuma *et al.*, 2004). Notre travail représente la première étude qui a exploré la relation entre la présence de l'EBV et l'hyperméthylation de certains gènes suppresseurs de tumeur dans le cancer du sein. Aucune association entre la présence de l'EBV et l'hyperméthylation de ces gènes n'a été retrouvée dans notre étude.

D'un autre côté, l'analyse des données de survie de nos patientes selon le statut de l'EBV a montré une survie plus longue des patientes EBV-positifs comparativement aux cas EBV-négatifs, mais la différence n'atteint pas le seuil de signification statistique. En analysant les données de la littérature, nous n'avons pas trouvé d'études publiées qui ont tenté d'explorer l'impact pronostique de la présence de l'EBV dans le cancer du sein. D'autres études incluant un nombre plus important de cas sont nécessaire pour évaluer la signification pronostique de la présence de l'EBV dans le cancer du sein.

Dans ce chapitre nous avons aussi utilisé la technique de PCR utilisant des amorces spécifiques visant l'amplification de séquences d'ADN appartenant respectivement aux herpesvirus humains suivants HSV1, CMV, HHV6 et HHV8. Utilisant cette technique nous n'avons pas trouvé de séquences d'ADN appartenant à ces virus dans les 122 cas de cancer du sein analysés. Dans une étude Taïwanaise analysant la présence des herpesvirus humains suivants HSV1, CMV, HHV6 et HHV8 dans une série de 62 cas de cancer du sein, les virus CMV et HHV8 ont été détectés par PCR respectivement dans 76 et 45% des cas (Tsai *et al.*, 2005). Mais aucune technique morphologique permettant de vérifier l'origine cellulaire des génomes viraux n'a été utilisée par ces auteurs, rendant ainsi difficile d'évaluer la signification biologique de leurs résultats. En effet, les herpesvirus infectent 70-90% des individus à travers le monde. Après la primo-infection durant l'enfance, ces virus persistent à

l'état latent dans l'organisme surtout dans les lymphocytes. Par conséquent, la simple détection de ces virus par PCR dans les tissus tumoraux ne permet pas de fournir une évidence sur la présence de ces virus dans les cellules néoplasiques.

L'analyse de l'impact du virus HSV1 sur les animaux de laboratoire et les cultures cellulaires *in vitro* a permis de démontrer qu'il est capable d'induire des transformations malignes, par induction d'aberrations chromosomiques, de mutations et d'amplifications géniques en présence de lumière ultraviolette ainsi que d'autres carcinogènes, comme les nitrosamines et les extraits de tabac (Lusso et Gallo, 1994 ; Dockrell, 2003). Une étude antérieure a suggéré que le virus HSV1 pourrait être un cofacteur dans l'oncogenèse des tumeurs de la sphère orale (Yang *et al.*, 2004). Cependant, le potentiel oncogène direct de ce virus n'a pas été encore clairement mis en évidence.

Quant au cytomégalo virus humain (CMV), il infecte divers types de cellules humaines, y compris les cellules gliales, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (Hummel *et al.*, 2002). En tant qu'herpesvirus, le CMV infecte presque 80% de la population humaine adulte et persiste dans les cellules réservoirs durant toute la vie. Ce virus interfère avec les voies cellulaires intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose agissant sur les protéines p53 ou p73, favorisant la multiplication cellulaire anarchique (Michaelis *et al.*, 2004). Néanmoins, ce virus n'est pas encore identifié comme un oncogène parfait, en particulier *in vivo* (Hsu *et al.*, 2004). Cependant, des études récentes ont impliqué le CMV dans la pathogénie des gliomes, des cancers de la prostate et du colon (Cobbs *et al.*, 2002 ; Samanta *et al.*, 2003 ; Harkins *et al.*, 2002). En outre une étude a suggéré que l'exposition à ce virus à un âge avancé pourrait représenter un facteur de risque pour le développement du cancer du sein (Richardson *et al.*, 1997). La négativité de la détection de ce virus dans notre série indique qu'il n'est pas impliqué dans la pathogénie du cancer du sein chez la femme tunisienne.

Le virus HHV6 a été détecté dans des carcinomes oraux, des carcinomes cervicaux, des lymphomes Hodgkiniens et non Hodgkiniens ainsi que d'autres types de tumeurs (Levy, 1997 ; Kosuge, 2000). Ce virus produit, chez les hôtes immunodéprimés, une protéine oncogène ORF-1 qui se fixe sur la protéine p53 sauvage empêchant la régulation du cycle cellulaire (Flaitz, 1998). Malgré cette constatation, le pouvoir oncogène de ce virus n'a pas encore été établi. Dans notre étude ce virus n'a pas été trouvé dans le cancer du sein chez la femme tunisienne.

Dans la population adulte, la séroprévalence du HHV8 varie de moins de 5% dans la majorité des pays occidentaux (Etats-Unis, l'Europe du Nord) et en Asie du Sud-est, à 10-30% dans les pays du Moyen-Orient et méditerranéens, et à jusqu'à 50% dans l'Afrique centrale et méridionale (Chatlynne *et al.*, 1999). Ce virus a été détecté pour la première fois dans le sarcome de Kaposi de patients infectés par le HIV ou chez des greffés (Chang *et al.*, 1994). En effet, la répartition géographique du virus HHV8 n'est pas ubiquitaire comme les autres herpesvirus mais elle est principalement liée aux zones de forte endémicité pour le sarcome de Kaposi (de-The *et al.*, 1999 ; Gessain *et al.*, 1999). En outre, le HHV8 a été clairement associé à une forme particulière de lymphome, le lymphome des séreuses (Cesarman *et al.*, 1995 ; Nador *et al.*, 1996), aussi qu'à d'autres types rares de lymphomes (Chadburn *et al.*, 2004) et à certaines formes agressives de la maladie de Castleman multicentrique (Gessain *et al.*, 1996 ; Soulier *et al.*, 1995). En dépit de l'utilisation d'une technique PCR semblable à celle utilisée par l'étude taiwanaise, nos résultats diffèrent de ceux indiqués par cette étude qui montre la présence de ce virus dans 45% des cas. En effet, dans notre étude, nous n'avons pas détecté HHV8 dans nos échantillons de carcinome du sein. Par conséquent, il est peu probable que ce virus joue un rôle dans la pathogénie du cancer du sein chez les femmes tunisiennes. D'autres études examinant des populations différentes seraient nécessaires pour évaluer la participation possible du HHV8 dans le cancer du sein.

Tableau VII-2 : Récapitulatif des travaux concernant la recherche de l'EBV dans le cancer du sein à travers le monde.

Régions du monde	Auteurs, années	Pays	Nature des échantillons	Nombres de cas analysés	Techniques utilisées	Pourcentage des cas EBV+
Amérique du Nord	Gaffey et al. (1993)	Etats-Unis	Tissus fixés	35	PCR	0
	Glaser et al. (1998)	Etats-Unis	Tissus fixés	107	HIS (sondes EBERs)	0
	Chu et al. (2001)	Etats-Unis	Tissus frais congelés et Tissus fixés	48	PCR HIS (sondes EBERs) IHC (LMP1)	10,5
	McCall et al. (2001)	Etats-Unis	Tissus frais congelés	115	PCR HIS (sondes EBERs) IHC (LMP1)	2 50
	Grinstein et al. (2002)	Etats-Unis	Tissus fixés	33	PCR	42
	Deshpande et al. (2002)	Etats-Unis	Tissus fixés	43	PCR, HIS (sondes EBERs) IHC (EBNA1, LMP1 et LMP2)	0
	Thorne et al. (2005)	Etats-Unis	Tissus fixés	55	Q-PCR	7
	Perrigoue et al. (2005)	Etats-Unis	Tissus fixés	45	PCR, HIS (sondes EBERs)	0
	Perkins et al. (2006)	Etats-Unis	Tissus frais congelés	24	Q-PCR	45,8
Amérique du sud	Preciado et al. (2005)	Argentine	Tissus frais congelés	39	PCR IHC	31 35
Europe	Labrecque et al. (1995)	Royaume-Unis	Tissus frais congelés	91	PCR HIS (sondes EBERs)	21 32
	Lespagnard et al. (1995)	Belgique	Tissus fixés	10	PCR, HIS, IHC(LMP1)	0
	Luqmani and Shousha (1995)	Royaume-Unis	Tissus fixés	28	Nested PCR HIS (sondes EBERs)	54 0
	Bonnet et al. (1999)	France	Tissus frais congelés	10	PCR HIS (sondes EBERs) IHC	51 0 0
	Brink et al. (2000)	Pays-Bas	Tissus frais congelés	24	PCR HIS (sondes EBERs)	21 0

	Fina et al. (2001)	France	Tissus frais congelés et Tissus fixés	509	PCR	31,8
	Murray et al. (2003)	Royaume-Unis	Tissus fixés	92	PCR IHC (EBNA1)	21
	Herrmann and Niedobitek (2003)	Allemagne	Tissus fixés	59	PCR HIS (sondes EBERs)	6,8 0
	Xue et al. (2003)	Royaume-Unis	Tissus frais congelés	15	PCR	40
	Arbach et al. (2006)	France	Tissus frais congelés	95	Q-PCR	46
	Chu et al. (1998)	Taiwan	Tissus fixés	60	HIS (sondes EBERs)	0
	Kijima et al. (2001)	Japon	Tissus fixés	61	HIS (sondes EBERs)	0
	Tsai et al. (2005)	Taiwan	Tissus frais congelés	62	PCR	45,2
Moyen-Orient	Kalkan et al. (2005)	Turquie	Tissus fixés	57	PCR HIS (sondes EBERs)	22,8 0
Afrique	Fawzy et al. (2008)	Egypte	Tissus fixés	40	PCR IHC (EBNA1)	25,0
	Présente étude	Tunisie	Tissus frais congelés et tissus fixés	122	PCR, IHC (LMP1et ZEBRA) HIS(sondes EBERs)	27,0 0 0

^a : PCR : polymerase chain reaction ; HIS : hybridation in situ ; IHC : immunohistochimie ; Q-PCR: quantitative PCR

En conclusion, Dans ce chapitre nous avons analysé la présence des herpesvirus humains dans le cancer du sein, et nous avons essayé de préciser le profil clinicopathologique des cancers mammaires associés à ces virus.

Nous avons recherché les herpesvirus humains suivants HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8 en utilisant les techniques de PCR, d'hybridation in situ et d'immunohistochimie.

En utilisant la technique PCR, les virus HSV1, CMV, HHV6 et HHV8 n'ont pas été détectés dans aucun des 122 cancers du sein inclus dans cette étude ; ce résultat suggère que ces virus ne sont pas impliqués dans le cancer du sein dans notre pays.

En revanche, nous avons détecté par PCR la présence de séquences d'ADN appartenant au génome du virus EBV dans 27% des cas de cancer du sein. Cependant, en utilisant les techniques morphologiques d'hybridation in situ et d'immunohistochimie, ce virus n'a pas été retrouvé dans les cellules tumorales. Par contre une positivité par hybridation in situ dans de rares lymphocytes du stroma tumoral a été notée, suggérant que le signal détecté par PCR provenait de ces lymphocytes.

En tenant compte des données cliniques et pathologiques, seule une corrélation significative entre la présence de l'ADN du génome de l'EBV et la négativité des récepteurs à l'œstrogène a été mise en évidence. Aucun impact de la présence de ce virus sur la méthylation aberrante des gènes suppresseurs de tumeurs n'a été trouvé. D'un autre côté, l'analyse des données de la survie selon le statut de l'EBV a permis d'identifier une survie plus large des patientes ayant un cancer du sein EBV négatif comparativement aux patientes ayant un cancer du sein EBV positif, mais la différence n'atteint pas le seuil de signification statistique ($p=0,193$).

Les résultats de ce chapitre indiquent la présence de l'ADN de l'EBV par PCR dans 27% des cas de cancer du sein, mais l'absence de ce virus au niveau des cellules tumorales suggère que ce virus n'est pas impliqué dans la pathogénie du cancer du sein dans notre pays.

Chapitre VIII

Discussion générale

La cancérogenèse est une prolifération maligne complexe qui se fait en plusieurs étapes. Au cours des 30 dernières années, plusieurs investigations ont permis de mettre en évidence que différents virus joueraient un rôle important dans la genèse de plusieurs types de cancers chez l'Homme (Yost *et al.*, 2001 ; Ries *et al.*, 2002). Par exemple, le virus HTLV-1 (T-cell leukemia virus), le virus d'Epstein-Barr (EBV), l'herpesvirus humain (HHV)-8 et les papillomavirus humains sont reconnus actuellement comme des virus oncogènes associés à différents types de cancers chez l'Homme (Matsuoka, 2003 ; Macsween et Crawford, 2003 ; Ganem, 1997 ; Zur Hausen, 2000).

Le cancer du sein est une tumeur maligne très fréquente et représente l'une des principales causes de décès chez la femme dans le monde. En dehors de facteurs génétiques héréditaires influençant le développement du cancer du sein et l'existence de facteurs augmentant le risque de développer ce cancer, son étiologie reste largement inconnue. Par ailleurs la relation entre les virus et le cancer du sein a pendant des décennies fasciné la communauté scientifique, et cela depuis la découverte par Bittner en 1936 que le développement des tumeurs mammaires chez la souris est causé par un virus appelé MMTV. Des particules semblables à ce virus de souris, appelées MMTV-like, ont été également identifiées dans le cancer du sein sporadique chez l'Homme, suggérant une étiologie virale possible du cancer du sein (Holland et Pogo, 1999).

L'objectif de notre présent travail a été l'étude de la prévalence et l'implication du polyomavirus SV40, du rétrovirus MMTV-like, des herpesvirus et des papillomavirus humains dans le cancer du sein chez la femme tunisienne. Notre but a été également d'évaluer l'impact de la présence de ces virus sur la méthylation de certains gènes suppresseurs de tumeur et d'évaluer l'impact pronostique de la présence de ces virus dans le cancer du sein.

Ce travail regroupe ainsi, pour la première fois, l'analyse de la présence d'un large groupe de virus dans le cancer du sein dans une population donnée.

VIII.1. Validité des résultats de l'étude

Au cours de ce travail nous avons analysé une large série de cas de cancer du sein choisis sur la base de la présence conjointe d'un tissu tumoral et d'un tissu normal adjacent à la tumeur et ceci pour chaque patiente. Nos patientes sont originaires d'une vaste zone de notre pays, couvrant les gouvernorats de Sousse, Monastir, Mahdia, Kairouan, Sidi-Bouزيد, Kasserine et Gabès, et peuvent donc être considérées comme représentatives de la population féminine Tunisienne.

L'évaluation de la présence du polyomavirus simien SV40, du rétrovirus MMTV-like, des papillomavirus humains et des herpesvirus humains a été réalisée par diverses techniques de PCR, d'hybridation in situ et d'immunohistochimie ayant une sensibilité élevée, une reproductibilité satisfaisante et validées précédemment par plusieurs études à travers le monde. De plus la recherche de ces agents infectieux a été réalisée sur des échantillons tissulaires de bonne qualité. En effet, toutes les techniques PCR ont été réalisées sur des extraits d'ADN obtenus à partir de tissus frais congelés à -80°C immédiatement après la résection chirurgicale de la tumeur. De plus, un contrôle microscopique de ces échantillons tissulaires a été effectué pour s'assurer de la présence de cellules tumorales dans ces prélèvements. Un contrôle microscopique des échantillons tissulaires fixés au formol et conservés en paraffine, utilisés au préalable par le pathologiste pour le diagnostic anatomopathologique, a été effectué afin de sélectionner des blocs convenables pour les techniques d'hybridation in situ et d'immunohistochimie.

De plus, pour s'assurer de l'authenticité des résultats obtenus par les différentes techniques utilisées, lors de l'exploration de la présence de ces virus dans le cancer du sein, nous avons inclus conjointement des témoins positifs et négatifs appropriés à chaque technique et à chaque virus.

Ainsi pour la recherche du virus SV40 par PCR nous avons utilisé comme témoin positif le plasmide pSVSph21-N contenant une copie du génome de la souche de référence 776 du virus SV40, offert par le Dr R. Vilchez (Baylor College of Medicine, Etats-Unis). Pour l'étude de l'expression des oncoprotéines t/Tag de ce virus, par immunohistochimie, nous avons utilisé un échantillon tissulaire d'un adénocarcinome prostatique d'une souris transgénique SV40 positif, gracieusement offert par le Pr P. Wikström (Department of Medical Bioscience and pathology, Umea, Suède). Quant au témoin positif utilisé pour la détection du virus MMTV-like par PCR on a eu recours à un fragment d'ADN de 2,7 kb de la région *env*-LTR de ce

virus, gracieusement offert par le Dr Beatriz G.T.Pogo (Faculté de Médecine de New York, Etats-Unis). Par ailleurs, pour l'exploration de la présence des herpesvirus humains (HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8) et des papillomavirus humains, des témoins positifs appropriés à chaque virus ont été utilisés dans les techniques de PCR, d'hybridation in situ et d'immunohistochimie. Pour toutes les réactions PCR, a été également inclus un témoin négatif où l'ADN matrice a été remplacé par de l'eau distillée stérile. Par ailleurs, afin de minimiser au maximum les problèmes de contamination, plusieurs précautions standards ont été prises. Pour cela une séparation physique entre les techniques d'extraction de l'ADN, la préparation des différentes réactions PCR et les étapes post-amplification a été rigoureusement respectée. Par ailleurs, toutes les réactions PCR ont été préparées sous une hotte à flux laminaire utilisant des micropipettes surmontées par des embouts avec filtres. De plus cette hotte est équipée d'une lampe UV permettant la décontamination de l'atmosphère du travail après chaque manipulation.

Toutefois, la détection des séquences d'ADN appartenant au virus SV40 dans les tissus humains a été largement discutée par certains auteurs, proposant que la présence de ce virus est probablement le résultat d'une contamination des échantillons testés par les plasmides contenant le génome du virus SV40 utilisés dans plusieurs approches expérimentales dans certains laboratoires de recherche (Lopez-Rios *et al.*, 2004 ; Manfredi *et al.*, 2005). Mais cette source de contamination ne semble pas être à l'origine des séquences virales détectées dans notre étude. En effet, nous avons suivi minutieusement toutes les précautions expérimentales recommandées dans l'utilisation des techniques PCR et nous avons inclus systématiquement dans nos expériences des contrôles négatifs afin de déceler toute éventuelle contamination par notre contrôle positif (plasmide contenant le génome du virus SV40) ou par d'autres sources de contamination. Il est aussi important de noter que la contamination probable de nos échantillons par l'ADN plasmidique, si elle devait se produire, serait obligatoirement constatée d'une façon similaire dans les tissus mammaires non tumoraux adjacents analysés parallèlement aux tissus tumoraux du sein. Ce qui n'a pas été le cas dans notre étude.

En outre, nous avons inclus une technique PCR permettant la détection d'une séquence de 241 pb appartenant au plasmide contenant le génome du virus SV40 que nous avons utilisé comme contrôle positif. Cette technique nous a permis de s'assurer qu'aucun de nos échantillons n'a été contaminé par ce plasmide puisque aucun résultat positif n'a été retrouvé au cours de cette analyse. De plus, dans notre travail, la taille des séquences d'ADN viral détectées par le couple d'amorce visant l'amplification de la région de régulation de

transcription (242 pb) est compatible avec la détection d'une souche sauvage "archétypale" du virus SV40 (possédant une seule copie de la séquence « *enhancer* » de 72 pb) et non par une souche artificielle de laboratoire (possédant une duplication de la séquence « *enhancer* » de 72 pb) (Lednický *et al.*, 1997 ; Rizzo *et al.*, 1999 ; Lednický et Butel, 2001; Vilchez *et al.*, 2003b). Ces observations constituent un argument supplémentaire en faveur de l'absence d'une contamination de nos échantillons par l'ADN plasmidique.

Par ailleurs, pour vérifier l'authenticité des séquences d'ADN virales détectées par PCR nous avons utilisé la technique de Southern blot en appliquant une sonde interne qui s'hybride d'une manière spécifique aux produits d'amplification de la séquence Tag (Raptis, 2001; Strickler *et al.*, 2001), confirmant ainsi la spécificité des séquences du virus SV40 détectées par PCR. Ce résultat a été aussi conforté par l'utilisation de la technique d'immunohistochimie ciblant la détection des oncoprotéines virales T/tag du virus SV40 donnant un résultat positif dans tous les cas déjà testés positifs par PCR.

Toute cette démarche technique, permet de conclure que le virus SV40 est réellement présent dans le cancer du sein et que sa détection n'est pas le résultat d'une contamination de nos échantillons.

Concernant le virus MMTV-like, en plus de la question liée au risque de contamination probable de nos échantillons par le témoin positif de la PCR s'ajoute l'interrogation sur l'origine endogène ou exogène des séquences *env* du virus MMTV-like détectées. En effet, l'origine de ce virus a été largement discutée dans les cancers du sein humains du fait d'une homologie entre certaines séquences du virus MMTV et les rétrovirus endogènes humains, particulièrement HERV-K10 et HERV-K-T47D. Pour réfuter cela nous avons testé conjointement du tissu tumoral et du tissu mammaire normal adjacent à la tumeur et ceci pour chaque patiente, en utilisant une technique de PCR semi nichée hautement sensible et spécifique (Wang *et al.*, 1995 ; Ford *et al.*, 2003 ; Melana *et al.*, 2001) permettant d'amplifier une séquence de 190 pb appartenant à ce virus (Ford *et al.*, 2003). Cette technique de PCR a été réalisée 3 fois pour chaque cas afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. De plus une analyse par séquençage des produits d'amplification nous a été utile pour s'assurer de l'authenticité des séquences virales détectées. En effet, les séquences retrouvées ont été comparés aux séquences prototypes des virus MMTV et MMTV-like ainsi qu'aux des séquences des rétrovirus endogènes précédemment publiées dans les banques de données GenBank et EMBL. Cette comparaison nous a permis de démontrer que les séquences MMTV-like détectées dans nos échantillons présentent une forte homologie avec

les séquences prototypes des virus MMTV et MMTV-like, mais présentent une faible homologie avec les séquences des virus endogènes. Ces résultats confirment que les séquences retrouvées dans les cas de cancer du sein analysés au cours de notre travail, appartiennent exclusivement au virus MMTV-like et ne peuvent être que d'origine exogène.

Dans notre travail, les papillomavirus humains ont été recherché par PCR visant l'amplification de différentes séquences génomiques appartenant aux régions L1, E1, E6 et E7 d'un large spectre de HPV ano-génitaux, ainsi que les HPV16, 18, 31 et 33 d'une façon plus spécifique vu leur fort pouvoir oncogène et leur implication dans d'autres tumeurs. La recherche de ces virus a été aussi évaluée par la technique morphologique d'hybridation in situ utilisant des sondes commercialisées par Dako.

Pour la recherche des herpesvirus humains HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8, nous avons en premier lieu utilisé des techniques de PCR visant l'amplification d'une manière spécifique des séquences d'ADN bien conservées appartenant au différents virus étudiés. Pour le HSV1 l'amplification vise une séquence de 138 pb (Li *et al.*, 2003) située au niveau de la région de l'ADN polymérase viral. Pour l'EBV l'amplification vise une séquence de 175 pb (Gopal *et al.*, 1990) située au niveau de la région BamH1 G du génome viral. Pour le CMV l'amplification vise une séquence de 167 pb (Tsai *et al.*, 2005) située au niveau de la région IE2 du génome viral. Pour le HHV-6, l'amplification vise une séquence de 223 pb (Zhang *et al.*, 1993) située au niveau de la région de l'ADN polymérase viral. Pour détecter le HHV8 nous avons utilisé une technique PCR visant l'amplification d'une séquence de 233 pb située au niveau de la région codant les protéines de la capsid du génome viral (Chang *et al.*, 1994).

L'utilisation conjointe d'un témoin positif et d'un témoin négatif a également été incluse pour cette famille de virus. Par la suite des techniques d'hybridation in situ et d'immunohistochimie ont été réalisées dans le but de rechercher et de localiser la présence de l'EBV.

Toutes ces précautions plaident en faveur de la fiabilité des techniques utilisées, de l'authenticité et de la spécificité des séquences virales détectés et de la validité des résultats obtenus dans cette étude.

VIII.2. Prévalence des virus dans le cancer du sein

Les résultats de notre travail nous ont permis de démontrer, pour la première fois, la présence du virus SV40 dans le cancer du sein, et ceci par la détection de séquences d'ADN situées au niveau de la région de transcription précoce du génome de ce virus (codante pour l'antigène grand T) dans 22% des cas analysés. Nous avons, également, pu détecter des séquences d'ADN situées au niveau de la région de transcription tardive (codante pour la protéine de la capsid VP1) et de la région régulatrice du génome viral dans tous les cas de cancers du sein positifs pour la région précoce du virus SV40. Par ailleurs, Nous avons démontré l'expression des oncoprotéines virales, l'antigène grand T et l'antigène petit t du virus SV40, par immunohistochimie dans les cellules tumorales dans tous les cas déjà testés positifs par PCR, témoignant que le virus est capable de s'exprimer dans les cellules tumorales.

En ce qui concerne le virus MMTV-like, la présence de séquences de son ADN situées au niveau de la région *env* ont été mises en évidence par PCR semi-nichée dans 14% des cas de cancer du sein de notre série. Par la suite, nous avons pu confirmer l'authenticité des séquences amplifiées par séquençage. Nos résultats rejoignent ceux des études réalisées dans les pays à faible incidence de cancer du sein, tels que la Chine où la présence des séquences du virus MMTV-like ont été détectées dans 16,8% des cas de cancers du sein (Luo *et al.*, 2006). En revanche, la prévalence actuelle du virus MMTV-like dans les cancers du sein en Tunisie est inférieure à celle rapportée dans les pays à forte incidence de cancer du sein, en particulier les États-Unis, où les séquences du virus MMTV-like ont été identifiées dans 30 à 40% des cas de cancer du sein (Wang *et al.*, 1995 ; Melana *et al.*, 2001 ; Etkind *et al.*, 2000).

D'autre part, La prévalence du virus MMTV-like retrouvée dans notre travail est nettement inférieure au taux de 74% signalé dans une étude précédente réalisée sur une population tunisienne par Levine et ses collaborateurs (Levine *et al.*, 2004). La réduction importante de la prévalence des séquences du virus MMTV-like dans les cancers du sein en Tunisie par rapport à la précédente étude pourrait être due à une modification de l'exposition à ce virus et/ou à la disparition de son hôte. Ceci est probablement en relation avec l'amélioration des conditions de vie ainsi que l'augmentation du niveau socio-économique de la population tunisienne.

L'analyse de la présence des papillomavirus humains anogénitaux, par PCR et hybridation in situ, nous a permis de décrire l'absence de tous les génotypes HPV6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 57, et 58 visés par ces techniques. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont également rapporté des résultats négatifs (Wrede *et al.*, 1992 ; Gopalkrishna *et al.*, 1996 ; Bratthauer *et al.*, 1992 ; Lindel *et al.*, 2007 ; de Cremoux *et al.*, 2008). Toutefois, une association significative entre la présence des HPV et le cancer du sein a été rapportée par quelques études (Di Lonardo *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002 ; Damin *et al.*, 2004 ; Widschwendter *et al.*, 2004 ; Kan *et al.*, 2005 ; de Villiers *et al.*, 2005 ; Kroupis *et al.*, 2006 ; Choi *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2008 ; Akil *et al.*, 2008 ; Mendizabal-Ruiz *et al.*, 2009 ; Cantu de Leon *et al.*, 2009).

En analysant la présence des herpesvirus suivants HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8, nous avons mis en évidence la présence de séquences d'ADN appartenant au génome du virus EBV dans 27% des cas de cancer du sein par PCR. Par contre aucun cas n'a été testé positif pour les autres virus. En revanche, en utilisant les techniques morphologiques d'hybridation in situ et d'immunohistochimie le virus EBV n'a pas été retrouvé dans les cellules tumorales, mais quelques cas ont montré une positivité par hybridation in situ présente dans de rares lymphocytes du stroma tumoral, suggérant que le signal détecté par PCR proviendrait de ces lymphocytes.

Au total, une détection virale a été retrouvée pour trois virus : SV40 (22%), MMTV-like (17%) et EBV (27%) et ceci dans des proportions variables. L'analyse de la codétection de ces virus dans les cancers du sein montre l'absence de corrélation entre la détection de ces virus. Ceci suggère que ces virus sont présent dans le cancer du sein l'un indépendamment de l'autre.

VIII.3. Signification biologique de la présence des virus dans le cancer du sein

Dans ce travail, nous avons exploré la présence dans le cancer du sein d'un large spectre de virus appartenant aux familles des *Herpesviridae*, *Papovaviridae* et *Retroviridae*. Ce travail nous a permis de mettre en évidence la présence des virus SV40, MMTV-like et EBV dans respectivement 22%, 14% et 27% des cas de cancer du sein analysés. Cependant, la simple détection de ces virus dans le cancer du sein ne suffit pas pour les impliquer dans le développement de ce cancer.

En ce qui concerne le virus SV40, en plus de sa détection par des techniques PCR permettant l'amplification de séquences appartenant à différentes régions du génome viral (régions de transcription précoce et tardive ainsi que la région de régulation), nous avons pu mettre en évidence l'expression des oncoprotéines t/Tag de ce virus par immunohistochimie dans les cellules tumorales (Chapitre III). La détection de l'expression de ces oncoprotéines virales suggère que le virus SV40 n'est pas un virus passager et qu'il est probablement impliqué dans la pathogénie du cancer du sein. En effet, le pouvoir oncogénique et transformant du virus SV40 dépend essentiellement de l'expression de ces oncoprotéines qui interagissent essentiellement avec deux protéines clés suppresseurs de tumeurs: p53 et pRb induisant l'inactivation de leurs fonctions. En effet, P53 joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire et de la stabilité génétique (Imamura *et al.*, 1994 ; Gottlieb et Oren, 1996; Soussi et May, 1996). P53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Dans le cancer du sein ces mutations ne touchent que près de 15% des cas alors que l'accumulation de la protéine P53 est retrouvée dans 25 à 50% des cas de cancer du sein, suggérant l'existence d'autres mécanismes alternatifs d'inactivation de ce gène dans le cancer du sein.

Dans notre étude nous avons pu mettre en évidence une corrélation statistiquement significative entre la présence du virus SV40 et l'accumulation de p53 ($p=0,05$). Ce résultat supporte le rôle du virus SV40 dans l'inactivation de p53 dans le cancer du sein, et est en accord avec plusieurs études antérieures ayant analysé l'association entre la présence du virus SV40 et l'accumulation de p53 dans des cas de cancers du cerveau, de lymphomes et de mésothéliomes (Carbone *et al.*, 1997 ; Zhen *et al.*, 1999 ; Amara *et al.*, 2007).

D'autre part, il a été démontré, récemment, que la présence du virus SV40 dans les mésothéliomes humains est associée à l'hyperméthylation aberrante de la région promotrice de certains gènes suppresseurs de tumeurs (Toyooka *et al.*, 2001 ; Toyooka *et al.*, 2002 ; Suzuki *et al.*, 2005), suggérant ainsi que le virus SV40 pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'hyperméthylation dans ce type de cancer. Cette association a été aussi retrouvée dans les lymphomes dans notre laboratoire (Amara *et al.*, 2007). Dans le chapitre IV nous avons décrit une corrélation significative entre l'hyperméthylation des promoteurs des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *BRCA1*, et *TIMP3* d'une part et la présence du virus SV40 dans le cancer du sein d'autre part ($p=0,034$; $p=0,043$; $p=0,035$ et $p=0,003$ respectivement). En outre, nous avons trouvé une corrélation significative entre la présence du virus SV40 et l'index de méthylation ($p=0,009$; **Chapitre V**). Ces résultats indiquent que le virus SV40 est capable d'induire des altérations épigénétiques dans les cellules mammaires infectées, ce qui renforce l'hypothèse de son implication dans la pathogénie des cas SV40 positifs. Notre étude est la première qui démontre une association entre un virus et l'hyperméthylation aberrante dans le cancer du sein et suggère ainsi que ce phénomène épigénétique fréquemment observé dans les cancers du sein (Esteller *et al.*, 2000) serait en partie induit par des agents infectieux. Il est également important de rappeler que dans notre série d'étude, l'hyperméthylation n'a pas été exclusivement détectée dans les tumeurs SV40-positives, suggérant l'existence d'autres facteurs favorisant ces altérations.

Récemment des études concernant les mésothéliomes suggèrent que le virus SV40 n'est pas un carcinogène parfait mais plus probablement joue le rôle d'un co-carcinogène qui interagit avec l'amiante pour induire une transformation cellulaire maligne (Kroczyńska *et al.*, 2006 ; Robinson *et al.*, 2006). Une étude réalisée sur des cultures de cellules mammaires normales a montré que l'induction de la transformation maligne de ces cellules nécessite au moins la transduction de trois gènes : Tag du virus SV40, hTERT et H-RAS (Elenbas *et al.*, 2001). Toutes ces observations suggèrent que le virus SV40 ne peut pas à lui seul induire la transformation maligne des cellules mammaires humaines. Ainsi d'autres études sont nécessaires pour bien préciser à quel moment ce virus intervient dans le développement du cancer du sein SV40 positif et pour élucider les autres facteurs qui interagissent avec ce virus pour aboutir à la transformation maligne des cellules mammaires chez l'Homme.

Dans le chapitre V nous avons démontré la présence des séquences *env* du virus MMTV-like dans 14% de cas de cancer du sein. Cette fréquence est nettement inférieure au taux de 74% rapporté dans une étude précédente réalisée par Levine et ses collaborateurs sur des cas diagnostiqués en 1979 (Levine *et al.*, 2004).

De plus, nous avons pu mettre en évidence la présence des séquences MMTV-like exclusivement dans les tissus tumoraux des cas de cancer du sein analysés confirmant ainsi son origine exogène. La comparaison des séquences virales détectées avec les séquences prototypes du virus MMTV et du virus MMTV-like a permis d'écarter l'éventualité d'une contamination endogène.

Bien que le virus MMTV ait été découvert il y a plus d'un demi-siècle (Bittner, 1936), la physiopathologie de ce virus n'est pas encore complètement élucidée, en raison principalement de l'incapacité d'obtenir en culture cellulaire des titres viraux élevés et de son faible potentiel d'infection par rapport à celui des γ -rétrovirus avec l'absence de méthodes de dosage *in vitro* simples et sensibles pour évaluer le potentiel d'infection et de transformation de ce virus (Indik *et al.*, 2005).

Le virus MMTV est un rétrovirus qui s'intègre de façon aléatoire dans le génome des cellules infectées à proximité de proto-oncogènes cellulaires favorisant alors leurs surexpression, induisant l'oncogenèse mammaire (Nuse *et al.*, 1984). Notre étude nous a permis de mettre en évidence une corrélation significative entre la présence des séquences *env* du virus MMTV-like et l'absence d'expression du proto-oncogène HER2 ($p=0,04$). En outre, les résultats de notre étude suggèrent l'existence d'un lien entre la présence des séquences du virus MMTV-like et les récepteurs hormonaux à la progestérone, ce qui soutient également l'hypothèse que ce virus interviendrait dans la carcinogenèse mammaire par des mécanismes autres que ceux mettant en jeu le proto-oncogène HER2.

Dans le chapitre III nous avons aussi démontré que la surexpression de l'oncoprotéine HER2 est inversement corrélée avec la présence du virus SV40 ($p=0,008$). Il semble ainsi que ces virus constituent des facteurs impliqués dans la carcinogenèse du groupe des cancers du sein ne montrant pas une surexpression de HER2. En effet, la surexpression de HER2 survenant par phénomène d'amplification génique constitue l'un des mécanismes admis dans le développement de 20 à 50% des cancers du sein sporadiques.

Pour ce qui est de l'EBV, nos résultats du chapitre VII indiquent la présence de son ADN par PCR dans 27% des cas de cancer du sein, mais son absence dans les cellules tumorales en utilisant des techniques morphologiques d'immunohistochimie et d'hybridation in situ, suggèrent que ce virus serait peu probablement impliqué dans la pathogénie du cancer du sein. Cependant, en analysant les paramètres clinico-pathologiques nous avons constaté que la présence de ce virus dans le cancer du sein est associé à des signes qui reflètent un phénotype agressif des tumeurs : négativité des récepteurs à l'œstrogène et survie courte. Ce qui indique que ce virus pourrait être un marqueur d'agressivité tumorale.

Cependant, l'incapacité à détecter l'EBV par hybridation in situ et immunohistochimie dans les cellules tumorales dans les cas PCR positif n'élimine pas formellement l'hypothèse de l'implication de ce virus dans la pathogénie du cancer du sein. En effet, l'EBV pourrait intervenir dans la carcinogénèse mammaire par un mécanisme « hit and run » ; sa présence dans les cellules tumorales serait donc brève et surviendrait au cours des étapes d'initiation de la tumeur, mais elle induirait des modifications génétiques entraînant la prolifération cellulaire maligne avant d'être perdu.

Il est aussi plausible que l'EBV serait impliqué dans de rares types histologiques de cancer du sein d'où la nécessité de tester un nombre plus important de cas pour retrouver ceux EBV-positifs par immunohistochimie ou hybridation in situ, et/ou de tester d'autres populations à haut risque de cancers associés à ce virus.

VIII.4. Signification clinique et valeur pronostique de la présence des virus dans le cancer du sein

En analysant l'association entre les paramètres clinico-pathologiques et la présence des virus SV40, MMTV-like et EBV, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre ces virus et les paramètres classiques de pronostic suivants : le grade histopronostique SBR, la taille tumorale et la métastase ganglionnaire. En revanche, en analysant le statut d'expression des récepteurs hormonaux une corrélation significative entre la négativité de l'expression des récepteurs hormonaux et la présence de l'ADN de l'EBV et du virus MMTV-like a été retrouvée (Chapitre VI). La négativité de l'expression des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein est un indicateur de pronostic défavorable mais surtout un élément prédictif d'une mauvaise réponse à l'hormonothérapie. Cette négativité pourrait être en relation avec un caractère agressif de la tumeur. Cela est renforcé par l'analyse de l'impact de la présence de l'EBV sur la survie globale et la survie sans rechute dans notre série, en effet il existe une tendance de corrélation entre la présence de ce virus et une survie courte.

En revanche, une corrélation significative entre la présence des virus SV40 et MMTV-like et l'absence de surexpression du proto-oncogène HER2 a été retrouvée (Chapitre III et IV). Ce résultat suggère que ces virus sont associés au groupe des cancers du sein HER2 négatif.

La détermination du statut de HER2 dans les carcinomes mammaires a un double intérêt clinique : une valeur pronostique et une valeur prédictive de la réponse à la chimiothérapie et/ou à l'hormonothérapie. Le développement d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre un récepteur membranaire comme agent thérapeutique (trastuzumab ou herceptine) a ouvert de nouvelles perspectives pour la prise en charge des carcinomes mammaires surexprimant HER2.

Le développement d'outils thérapeutiques ciblant ces deux virus pourrait représenter une voie de recherche intéressante pour le développement de nouveaux traitements pouvant être utile pour la prise en charge des cancers du sein HER2-négatifs et ceci en cas de résistance aux thérapeutiques classiques ou en cas de récurrence ou de dissémination métastatique.

En effet, une stratégie thérapeutique très importante pourrait être envisagée pour les cancers du sein virus positifs, et cela par le déclenchement de mécanismes immunitaires lymphocytaires spécifiques et/ou l'induction de cycles viraux lytiques au sein des cellules infectées pour la destruction ciblée et spécifique des cellules tumorales.

Mais, malgré toutes ces perspectives d'avenir il faut bien admettre que la physiopathologie de ces différents virus et leur implication éventuelle dans le cancer du sein demeure encore méconnue; il serait ainsi judicieux de développer des études *in vitro* sur cultures cellulaires et *in vivo* sur modèles animaux adaptés pour mieux comprendre leur rôle.

Les études récentes du profil d'expression génique de milliers de gènes utilisant les puces à ADN ont établi une nouvelle taxonomie des cancers du sein. Cette classification distingue cinq génotypes tumoraux de base : luminal A, luminal B, normal breast like, HER2+ et basal-like (Sévenet et Cottu, 2004 ; Belkacémi *et al.*, 2008). Ces profils d'expression génique sont corrélés avec différentes caractéristiques cliniques comme la survie ou le développement de métastases. Des études similaires tenant compte du statut MMTV-like et SV40 seront d'un grand intérêt en permettant de préciser le génotype auquel appartient les cancers du sein associés à ces virus.

Chapitre IX

Conclusion

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme dans le monde. Il représente aussi un important problème de santé publique et constitue l'une des principales causes de mortalité par cancer chez les femmes dans le monde.

De nos jours, plusieurs facteurs de risque de développement du cancer du sein sont reconnus, tels que les antécédents familiaux de cancer du sein, l'âge avancé, la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité et l'obésité.

Cependant, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition, en particulier les gènes BRCA1 et BCRA2, impliqués dans 5-10% des cas de cancer du sein. Néanmoins, certains facteurs étiologiques sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement du cancer sein et les virus restent à l'heure actuelle, les pathogènes associés aux cancers, les plus étudiés. En effet de nombreux virus sont aujourd'hui associés de façon spécifique au développement de différents cancers tel que les associations HPV et cancer du col utérin, HHV8 et sarcome de Kaposi, EBV et lymphome de Burkitt ou cancer du cavum.

La relation entre virus et cancer du sein a déjà fait l'objet de nombreuses études, et cela depuis la découverte par Bittner en 1936 que l'induction des tumeurs mammaires chez la souris est causé par un virus appelé MMTV pour « Mouse Mammary Tumor Virus ». Des séquences homologues au gène *env* du MMTV ont récemment été mises en évidence dans une proportion importante de cancer du sein sporadique chez l'Homme, indiquant une étiologie virale possible du cancer du sein. D'autres équipes ont aussi signalé que le virus d'Epstein-Barr pourrait être associé à la pathogénèse de cas sporadiques de cancer du sein chez l'Homme, mais cette association reste à ce jour un sujet de controverse. Au cours des dernières années, différents laboratoires ont signalé la présence du virus SV40 dans plusieurs types de tumeurs humaines.

Les objectifs de ce travail étaient : d'évaluer la prévalence d'un large spectre de virus (SV40, MMTV-like, papillomavirus et herpesvirus humains) dans le cancer du sein chez la femme tunisienne, de préciser les caractéristiques clinico-pathologiques et pronostiques des cancers du sein associés à ces virus et de déterminer la relation entre la présence de ces virus et le profil de méthylation d'un large panel de gènes suppresseurs de tumeurs.

Cette étude a été réalisée sur une série de 122 cas de cancer du sein chez des femmes tunisiennes, diagnostiqués entre 1995 et 2006 au laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached de Sousse. Tous les cas inclus dans ce travail ont été sélectionnés sur la base de la disponibilité conjointe d'un tissu tumoral et d'un tissu normal mammaires frais congelés à -80°C au moment du diagnostic anatomopathologique. Pour la confirmation du diagnostic, toutes les coupes histologiques ont été relues. Pour chaque cas, un bloc de paraffine représentatif de la lésion tumorale a été choisi, il a servi pour les explorations morphologiques par techniques d'immunohistochimie et d'hybridation in situ.

Pour l'ensemble de la série étudiée, une analyse immunohistochimique a été effectuée pour l'évaluation de l'expression des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone, de l'accumulation de P53 et de la surexpression du proto-oncogène HER2.

La recherche du virus SV40 a été effectuée par PCR visant l'amplification de séquences d'ADN situées dans trois régions différentes du génome viral : la région précoce de transcription codant l'antigène grand T, la région tardive de transcription codant la protéine VP1 de la capsidie et la région de régulation de transcription. La spécificité des amplifications obtenues a été confirmée par la technique Southern blot. L'immunohistochimie sur coupes tissulaires déparaffinées a été utilisée pour l'analyse de l'expression des oncoprotéines grand T et l'antigène petit t du virus SV40 en utilisant l'anticorps Pab108.

La recherche du virus MMTV-like a été effectuée par une technique de PCR semi-nichée permettant l'amplification d'une séquence de 190 pb appartenant à la région *env* de ce virus. La vérification de la nature des séquences amplifiées a été analysée par séquençage.

La recherche des HPV ano-génitaux a été effectuée par des techniques de PCR visant l'amplification de différentes séquences d'ADN appartenant aux régions L1, E1, E6 et E7 d'un large spectre de HPV ano-génitaux. La présence morphologique de ces virus a été étudiée par technique d'hybridation in situ.

La recherche des herpesvirus humains a été réalisée par technique PCR visant la détection respective des HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8. L'analyse de l'expression de la protéine de la phase de latence de l'infection par le virus EBV (LMP-1) et de la protéine de la phase de lyse (ZEBRA) a été effectuée par immunohistochimie. L'hybridation in situ a été utilisée pour

la recherche et la localisation cellulaire du virus EBV en utilisant une sonde PNA qui permet la détection simultanée des ARNs viraux EBER1 et 2.

L'analyse du statut de méthylation des promoteurs des gènes étudiés a été effectuée par la technique PCR spécifique de la méthylation (MSP) en utilisant pour chaque gène des coupes d'amorces visant l'amplification, d'une façon spécifique, de l'ADN méthylé et de l'ADN non méthylé.

Les résultats de notre travail nous ont permis de démontrer, pour la première fois, la présence du virus SV40 dans le cancer du sein, et ceci par la détection de séquences d'ADN situées au niveau de la région de transcription précoce du génome de ce virus (codante pour l'antigène grand T) dans 22% des cas analysés. Nous avons, également, pu détecter des séquences d'ADN situées au niveau de la région de transcription tardive (codante pour la protéine de la capsid VP1) et de la région régulatrice du génome viral dans tous les cas positifs pour la région précoce du virus SV40. Par ailleurs, Nous avons démontré l'expression des oncoprotéines virales, l'antigène grand T et l'antigène petit t du virus SV40, par immunohistochimie dans les cellules tumorales dans tous les cas déjà testés positifs par PCR, témoignant que le virus est capable de s'exprimer dans les cellules tumorales.

En analysant les données clinico-pathologiques en fonction de la présence du virus SV40, une corrélation significative a été retrouvée entre la présence de ce virus et l'âge avancé des patientes ($p=0,006$). En effet, les tumeurs SV40 positives sont plus fréquentes chez les patientes de plus de 50 ans en les comparant aux patientes jeunes. Dans le même contexte, une corrélation significative entre la présence de ce virus et l'année de naissance des patientes a été retrouvée ($p=0,004$), indiquant que la majorité des femmes ayant un cancer du sein SV40-positif sont nées avant 1955. Cela indique que ce virus était présent dans la population tunisienne avant la production et l'administration des vaccins antipoliomyélite contaminés par le virus SV40. Une deuxième corrélation significative a été retrouvée entre la présence du virus SV40 d'une part et l'accumulation de la protéine p53 ($p=0,015$) ainsi que l'absence de surexpression de l'oncoprotéine HER2 ($p=0,008$) d'autre part. Ce résultat soutient l'hypothèse du rôle du virus SV40 dans l'inactivation de p53 dans le cancer du sein et que ce virus pourrait intervenir dans des voies de carcinogénèse différentes de la voie HER2. Par ailleurs, l'analyse des données de survie des patientes en fonction du statut SV40 dans les

tumeurs n'a pas montrée de différence dans la survie globale et la survie sans rechute entre le groupe des cancers du sein SV40 positifs comparativement au groupe SV40 négatifs.

Concernant l'analyse de la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur étudiés, nous avons observé des fréquences variables de méthylation entre les différents gènes étudiés *RASSF1A* 78%, *SHP1* 66%, *HIN1* et *BRCA1* 61%, *PI6* et *ER* 47%, *CDH1* et *APC* 42%, *BLU* 40%, *DAPK* 35%, *RARβ2* 34%, *GSTP1* 27%, *TIMP3* 17%, *CCND2* 14% et *hMLH1* 8%. En tenant compte du statut du virus SV40 dans les tumeurs, nous avons constaté que la fréquence de méthylation des gènes *RASSF1A*, *SHP1*, *BRCA1*, et *TIMP3* était significativement plus élevée dans le groupe des cancers du sein SV40 positifs comparativement au groupe SV40 négatifs ($p=0,034$; $p=0,043$; $p=0,035$ et $p=0,003$ respectivement). De plus, nous avons constaté que la moyenne des index de méthylation (MI) dans le groupe des cancers du sein SV40 positifs était significativement supérieure à celle du groupe des cancers du sein SV40 négatifs ($p=0,009$). Ces constatations indiquent que le virus SV40 contribue à l'induction de l'hyperméthylation des promoteurs de multiples gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein.

En ce qui concerne le virus MMTV-like, la présence de séquences de la région *env* de ce virus ont été mises en évidence par PCR semi-nichée dans 14% des cas de cancer du sein de notre série. L'authenticité des séquences amplifiées a été confirmée par séquençage. Nos résultats rejoignent ceux des études réalisées dans les pays à faible incidence de cancer du sein, tels que la Chine (16,8%). En revanche, la prévalence actuelle du virus MMTV-like dans les cancers du sein en Tunisie est inférieure à celle rapportée dans les pays à forte incidence de cancer du sein, en particulier dans les États-Unis (30 à 40%). D'autre part, La prévalence du virus MMTV-like retrouvée dans notre travail est nettement inférieure au taux de 74% signalé dans une étude précédente réalisée par Levine et ses collaborateurs sur une série tunisienne de tumeurs diagnostiquées entre 1978 et 1979. Par conséquent, la réduction importante de la prévalence des séquences du MMTV-like dans les cancers du sein en Tunisie par rapport à la précédente étude pourrait être due à une modification de l'exposition à ce virus et/ou à son hôte. Ceci est probablement en relation avec l'amélioration des conditions de vie ainsi que l'augmentation du niveau socio-économique de la population Tunisienne.

D'autre part, en analysant les données clinico-pathologiques en fonction de la présence du virus MMTV-like. Une corrélation entre la présence des séquences *env* du virus MMTV-like et la négativité des récepteurs à la progestérone ($p=0,03$) et la négativité de HER2 ($p=0,04$) ont été trouvées. Aucun impact de la présence de virus MMTV-like sur la méthylation aberrante des gènes suppresseurs de tumeurs étudiés n'a été retrouvé. Par ailleurs, l'analyse des données de survie des patientes en fonction du statut du virus MMTV-like dans les tumeurs n'a pas montré de différence dans la survie globale et la survie sans rechute entre le groupe des cancers du sein MMTV-like positifs comparativement au groupe MMTV-like négatifs.

En analysant la présence des herpesvirus suivants HSV1, EBV, CMV, HHV6 et HHV8, nous avons mis en évidence la présence de séquences d'ADN appartenant au génome du virus EBV dans 27% des cas de cancer du sein par PCR. Par contre, aucun cas n'a été testé positif pour les autres virus. En revanche, en utilisant les techniques morphologiques d'hybridation in situ et d'immunohistochimie le virus EBV n'a pas été retrouvé dans les cellules tumorales, mais quelques cas ont montré une positivité au niveau des lymphocytes du stroma tumoral, suggérant que le signal détecté par PCR proviendrait de ces lymphocytes.

En tenant compte des données clinico-pathologiques, seule une corrélation significative entre la présence de l'ADN du génome de l'EBV et l'absence d'expression des récepteurs à l'œstrogène ($p=0,008$) a été mise en évidence. Aucun impact de la présence de ce virus sur la méthylation aberrante des gènes suppresseurs de tumeurs étudiés n'a été retrouvé. D'autre part, l'analyse des données de survie des patientes en fonction du statut de l'EBV a permis d'identifier une faible différence dans la survie globale et sans rechute entre les patientes EBV-positives et -négatives avec une meilleure survie dans le groupe testé négatif, mais ces différences n'ont pas atteint le seuil de signification statistique.

L'analyse de la présence des papillomavirus humains anogénitaux, par PCR et hybridation in situ, nous a permis de noter l'absence de tous les génotypes visés par ces techniques (HPV6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 57, et 58). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont également rapporté des résultats négatifs.

Au total, ce travail constitue la première étude qui a exploré la présence d'un large panel de virus dans le cancer du sein. Les résultats de ce travail ont permis d'identifier la présence de trois virus dans le cancer du sein en Tunisie : le virus SV40, le virus MMTV-like et EBV et ceci dans respectivement 22%, 14% et 27% des cas analysés.

Les cancers du sein associés aux virus semblent appartenir au groupe des tumeurs HER2-négatifs et présentant un certain nombre d'altérations moléculaires.

Ces résultats représentent un argument en faveur d'un rôle de ces virus comme cofacteur dans la carcinogénèse du sein. En effet, le cancer du sein est une maladie multifactorielle où plusieurs facteurs (hormonaux, environnementaux et génétiques) ont été associés avec la physiopathologie de ces tumeurs. Ainsi, il est probable que ces virus interagissent avec certains de ces facteurs, conduisant au développement du cancer du sein.

Si les résultats de l'implication de ces virus dans le cancer du sein se confirment, la détection de ces agents viraux pourrait mener à la mise au point de nouveaux traitements et des vaccins préventifs seraient envisageables.

Perspectives :

Plusieurs virus ont déjà été impliqués dans l'apparition de cancers chez l'homme. Les mécanismes permettant d'expliquer le développement de ces cancers sont progressivement mieux appréhendés, même si de nombreuses zones d'ombre demeurent en raison de l'intrication fréquente de différents co-facteurs.

Notre travail nous a permis de déceler la présence du virus SV40 dans le tissu mammaire cancéreux et d'associer sa présence à plusieurs altérations génétiques et épigénétiques. Néanmoins, le lien de causalité entre cette infection virale et le développement de ce cancer reste encore à établir. En effet, les virus ne sont parfois qu'un des maillons d'une longue chaîne dans laquelle peuvent intervenir des facteurs génétiques, environnementaux ou autres. Pour mieux comprendre la physiopathologie de l'implication du virus SV40 dans la carcinogénèse du tissu mammaire, il serait intéressant dans l'avenir d'analyser la présence de

ce virus aussi bien dans les lésions bénignes que dans les lésions précancéreuses (dysplasies atypiques) du sein et les carcinomes in situ.

Par ailleurs, la réalisation d'analyses approfondies des séquences du génome du virus SV40, isolées à partir de cas de cancer du sein, serait judicieuse pour mieux caractériser l'oncogénicité des différentes souches virales. D'autre part, l'étude du profil sérologique du virus SV40 au sein de populations saines comparativement à des populations atteintes d'un cancer du sein représenterait un argument de plus en faveur de l'implication de ce virus dans ce type de cancer.

La confection de sondes spécifiques permettant de reconnaître des séquences appartenant au virus SV40, permettrait dans l'avenir de développer des techniques morphologiques d'hybridation in situ et pourrait être utile dans des applications cliniques ou de recherche.

Il serait également intéressant d'étudier les mécanismes par lesquels le virus SV40 contribue à l'hyperméthylation aberrante des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs mise en évidence dans notre travail. En effet nous pensons que l'analyse de l'interaction entre la présence du virus SV40 dans le cancer du sein et l'expression des ADN-méthyltransférases (DNMTs) pourrait constituer une piste intéressante. Ces enzymes sont impliquées dans le maintien de la méthylation de l'ADN et de la méthylation *de novo* au niveau cellulaire. Leur expression a été corrélée à la présence de certains virus oncogéniques dans d'autres pathologies humaines (Tsai et al., 2002 ; Kanai et al., 2003 ; Saito et al., 2003 ; Li et al., 2005).

Concernant le virus MMTV-like, qui est un rétrovirus n'exprimant aucune oncoprotéine spécifique, il s'intègre dans le génome des cellules hôtes à proximité d'un proto-oncogène cellulaire appelé *wnt1* pouvant induire la transformation cellulaire maligne. La voie de signalisation faisant intervenir les ligands de la famille *Wnt* et leurs récepteurs constitue une voie complexe susceptible de subir de multiples altérations au cours de l'oncogenèse et semble être au premier plan dans les transformations malignes. Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes faisant intervenir les ligands *Wnt*, leurs récepteurs et leurs effecteurs, parmi lesquels la β -caténine, la E-cadhérine, la protéine APC (*adenomatous polyposis coli*) et la GSK3 (glycogène synthase kinase 3), sont décrits dans plusieurs cancers.

Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de la présence du virus MMTV-like sur l'altération de la voie Wnt dans le cancer du sein.

Pour ce même virus il serait aussi important de confectionner des sondes pouvant être utilisées dans une évaluation morphologique de la présence de ce virus au niveau des cellules tumorales par des techniques d'hybridation in situ.

Concernant le virus EBV, sa mise en évidence au niveau des cellules carcinomateuses mammaires n'a pu être confirmée par les méthodes morphologiques utilisées couramment pour sa détection dans les tumeurs qui lui sont déjà associées. C'est pour cela qu'il serait peut être intéressant de développer des anticorps monoclonaux qui permettent de reconnaître avec une bonne sensibilité et spécificité d'autres protéines exprimées au cours de la phase de latence virale telle que la protéine EBNA1.

La recherche d'autres altérations génétiques et épigénétiques associées à la présence de tout ces virus dans le cancer du sein pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ces virus semblent contribuer à la carcinogenèse du sein. La recherche d'une empreinte moléculaire spécifique au groupe des cancers du sein associés à la présence de ces virus par l'utilisation de techniques d'analyses moléculaires à type de micro-puces à ADNc nous semble prometteuse et d'une très grande utilité.

L'ensemble de ces données ouvre une période pleine d'espoir en cancérologie plus particulièrement dans le domaine du cancer du sein. En effet, les données épidémiologiques impliquant des virus oncogènes connus et à découvrir vont nous permettre d'identifier leur rôle initiateur ou promoteur de tumeurs. Si ces résultats venaient à être confirmés, la présence de ces virus pourrait devenir un test pronostic et pourrait mener à la mise au point de nouveaux traitements : Un vaccin préventif du cancer du sein serait envisageable.

Ces données nous imposeraient alors de réévaluer nos stratégies de prévention, d'hygiène et de stérilisation.

Références Bibliographiques

-A-

- Acha-Orbea H, Shakhov AN, Finke D.** Immune response to mmtv infection. *Front Biosci* 2007;12:1594-1609.
- Agathangelou A, Cooper WN, Latif F.** Role of the ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005;65:3497-3508.
- Agathangelou A, Dallol A, Zochbauer-Muller S, Morrissey C, Honorio S, Hesson L, Martinsson T, Fong KM, Kuo MJ, Yuen PW, Maher ER, Minna JD, Latif F.** Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers. *Oncogene* 2003;22:1580-1588.
- Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER, Latif F.** Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 2001;20:1509-1518.
- Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y, Akiba S.** Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: A study in Chile. *Br J Cancer* 2007;97:85-91.
- Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP.** Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998;58:5489-5494.
- Akil N, Yasmeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel AD, Al Moustafa AE.** High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with id-1 expression: A tissue microarray study. *Br J Cancer* 2008;99:404-407.
- Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC, Osborne CK, McGuire WL.** Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:200-206.
- Altundag O, Altundag K, Gunduz M.** Possible association between c-erbB-2 and human papillomavirus-16 in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2004;87:109.
- Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Sriha B, Mokni M, Korbi S.** Presence of simian virus 40 DNA sequences in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with aberrant promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes. *Int J Cancer* 2007;121:2693-2702.
- Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard JL, Van Praagh I, Feillel V, Mouret-Reynier MA, Dauplat J, Chollet P.** Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: A pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 2002;20:791-796.
- Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS.** A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol* 1996;74:853-862.
- Anderson HA, Chen Y, Norkin LC.** Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 1996;7:1825-1834.
- Anderson HA, Chen Y, Norkin LC.** Mhc class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J Gen Virol* 1998;79 (Pt 6):1469-1477.
- Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S.** Association of gsp1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100:169-176.
- Arapshian A, Kuppumbatti YS, Mira-y-Lopez R.** Methylation of conserved CpG sites neighboring the beta retinoic acid response element may mediate retinoic acid receptor beta gene silencing in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 2000;19:4066-4070.
- Arbach H, Viglasky V, Lefeu F, Guinebretiere JM, Ramirez V, Bride N, Boualaga N, Bauchet T, Peyrat JP, Mathieu MC, Mourah S, Podgorniak MP, Seignerin JM, Takada K, Joab I.** Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: Effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol). *J Virol* 2006;80:845-853.
- Arthur RR, Dagostin S, Shah KV.** Detection of BV virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27:1174-1179.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R E, Moore D D.** Short Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience. 1999.
- Axel R, Schlom J, Spiegelman S.** Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumour virus RNA. *Nature* 1972;235:32-36.

-B-

- Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Stolz E, Herbrink P.** Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 1996;34:745-747.
- Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR.** Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999;59:798-802.
- Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R.** Human papilloma virus dnas immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:463-467.
- Barbanti-Brodano G, Martini F, De Mattei M, Lazzarin L, Corallini A, Tognon M.** Bk and jc human polyomaviruses and simian virus 40: Natural history of infection in humans, experimental oncogenicity, and association with human tumors. *Adv Virus Res* 1998;50:69-99.
- Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F, Negrini M, Corallini A, Tognon M.** Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: Results and hypotheses. *Virology* 2004;318:1-9.
- Barnard P, Payne E, McMillan NA.** The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology* 2000;277:411-419.
- Bar-Sinai A, Bassa N, Fischette M, Gottesman MM, Love DC, Hanover JA, Hochman J.** Mouse mammary tumor virus env-derived peptide associates with nucleolar targets in lymphoma, mammary carcinoma, and human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7223-7230.
- Baselga J.** Monoclonal antibodies directed at growth factor receptors. *Ann Oncol* 2000;11 Suppl 3:187-190.
- Bastian PJ, Nakayama M, De Marzo AM, Nelson WG.** [GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular marker of prostate cancer]. *Urologe A* 2004;43:573-579.
- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM.** Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472-477.
- Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P.** Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood* 1999;94:1773-1781.
- Baylin SB, Herman JG.** DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168-174.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP.** Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-196.
- Beaulieu N, Morin S, Chute IC, Robert MF, Nguyen H, MacLeod AR.** An essential role for DNA methyltransferase dnmt3b in cancer cell survival. *J Biol Chem* 2002;277:28176-28181.
- Belinsky SA.** Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:707-717.
- Belkacemi Y, Gligorov J, Ozsahin M, Marsiglia H, De Lafontan B, Laharie-Mineur H, Aimard L, Antoine EC, Cutuli B, Namer M, Azria D.** Concurrent trastuzumab with adjuvant radiotherapy in HER2-positive breast cancer patients: Acute toxicity analyses from the french multicentric study. *Ann Oncol* 2008;19:1110-1116.
- Ben abdallah M.** Epidémiologie des cancers en Tunisie. In: Maalej M, ed. *Cancérologie pratique*. Tunis, Centre de Publication universitaire, 1999: 33-37.
- Ben Ahmed S, Aloulou S, Bibi M, Landolsi A, Nouira M, Ben Fatma L, Kallel L, Gharbi O, Korbi S, Khairi H, Kraiem C.** [breast cancer prognosis in tunisian women: Analysis of a hospital series of 729 patients]. *Sante Publique* 2002;14:231-241.
- Ben Ahmed S, Monastiri K, Chouchane L, el Ouali M, Korbi S, Kraiem C, Khairi H, Bignon YJ.** [hereditary predisposition to breast cancer: Epidemiologic and clinico-anatomic features in 11 tunisian families]. *Tunis Med* 1997;75:111-116.
- Bergeron C, Barrasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G.** Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in low- and high-grade lesions. *Am J Surg Pathol* 1992;16:641-649.
- Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L.** Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995;1:1029-1034.

- Bergsagel DJ, Finegold MJ, Butel JS, Kupsky WJ, Garcea RL.** DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N Engl J Med* 1992;326:988-993.
- Berneman ZN, Torelli G, Luppi M, Jarrett RF.** Absence of a directly causative role for human herpesvirus 7 in human lymphoma and a review of human herpesvirus 6 in human malignancy. *Ann Hematol* 1998;77:275-278.
- Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F.** Mutations of the human e-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 1998;12:226-237.
- Berx G, Van Roy F.** The E-cadherin/catenin complex: An important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-293.
- Bieche I, Khodja A, Lidereau R.** Deletion mapping of chromosomal region 1p32 in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:255-263.
- Bieche I, Lidereau R.** Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14:227-251.
- Bieche I, Lidereau R.** [somatic genetics of breast cancer]. *Bull Cancer* 1997;84:83-96.
- Bindra A, Muradrasoli S, Kisekka R, Nordgren H, Warnberg F, Blomberg J.** Search for DNA of exogenous mouse mammary tumor virus-related virus in human breast cancer samples. *J Gen Virol* 2007;88:1806-1809.
- Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
- Bittner JJ.** Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936;84:162.
- Black MM, Zachrau RE, Shore B, Moore DH, Leis HP.** Prognostically favorable immunogens of human breast cancer tissue: Antigenic similarity to murine mammary tumor virus. *Cancer* 1975;35:121-128.
- Bloom HJ, Richardson WW.** Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;11:359-377.
- Bofill-Mas S, Girones R.** Excretion and transmission of jcv in human populations. *J Neurovirol* 2001;7:345-349.
- Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, Joab I.** Detection of epstein-barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1376-1381.
- Bonnez W.** Taxonomy of the human papillomaviruses. *Clin Infect Dis* 1993;17:1080.
- Bradlow HL, Hershcopf RJ, Martucci CP, Fishman J.** Estradiol 16 alpha-hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: A possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6295-6299.
- Bratthauer GL, Tavassoli FA, O'Leary TJ.** Etiology of breast carcinoma: No apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18. *Pathol Res Pract* 1992;188:384-386.
- Breau WC, Atwood WJ, Norkin LC.** Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J Virol* 1992;66:2037-2045.
- Brestovac B, Harnett GB, Smith DW, Shellam GR, Frost FA.** Human papillomavirus genotypes and their association with cervical neoplasia in a cohort of western Australian women. *J Med Virol* 2005;76:106-110.
- Brink AA, van Den Brule AJ, van Diest P, Meijer CJ.** Re: Detection of epstein-barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:655-656; author reply 656.
- Bukholm IK, Nesland JM, Karesen R, Jacobsen U, Borresen-Dale AL.** Expression of e-cadherin and its relation to the p53 protein status in human breast carcinomas. *Virchows Arch* 1997;431:317-321.
- Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD.** Epigenetic inactivation of rassf1a in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:691-699.
- Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F.** Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 2007;26:1650-1655.
- Butel JS.** Simian virus 40, poliovirus vaccines, and human cancer: Research progress versus media and public interests. *Bull World Health Organ* 2000;78:195-198.

Butel JS, Arrington AS, Wong C, Lednický JA, Finegold MJ. Molecular evidence of simian virus 40 infections in children. *J Infect Dis* 1999;180:884-887.

Butel JS, Lednický JA. Cell and molecular biology of simian virus 40: Implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:119-134.

Byun DS, Lee MG, Chae KS, Ryu BG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of rassfla by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:7034-7038.

-C-

Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C, Sanchez-Cespedes M, Chow NH, Grasso M, Wu L, Westra WB, Sidransky D. Molecular detection of prostate cancer in urine by gstp1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 2001;7:2727-2730.

Calaf G, Russo J. Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 1993;14:483-492.

Callahan R. Mmtv-induced mutations in mouse mammary tumors: Their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:33-44.

Callahan R, Drohan W, Tronick S, Schlom J. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:5503-5507.

Cannon M, Cesarman E. Kaposi's sarcoma-associated herpes virus and acquired immunodeficiency syndrome-related malignancy. *Semin Oncol* 2000;27:409-419.

Cantu de Leon D, Perez Montiel D, Nemcova J, Mikyskova I, Turcios E, Villavicencio V, Cetina L, Coronel A, Hes O. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: Prevalence in a group of mexican patients. *BMC Cancer* 2009;9:26.

Carbone M, Burck C, Rdzanek M, Rudzinski J, Cutrone R, Bocchetta M. Different susceptibility of human mesothelial cells to polyomavirus infection and malignant transformation. *Cancer Res* 2003;63:6125-6129.

Carbone M, Pass HI, Rizzo P, Marinetti M, Di Muzio M, Mew DJ, Levine AS, Procopio A. Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene* 1994;9:1781-1790.

Carbone M, Rdzanek MA, Rudzinski JJ, De Marco MA, Bocchetta M, Ramos Nino M, Mossman B, Pass HI. SV40 detection in human tumor specimens. *Cancer Res* 2005;65:10120-10121.

Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, Procopio A, Mew DJ, Shridhar V, de Bartolomeis A, Esposito V, Giuliano MT, Steinberg SM, Levine AS, Giordano A, Pass HI. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med* 1997a;3:908-912.

Carbone M, Rizzo P, Pass HI. Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: A review of recent developments. *Oncogene* 1997b;15:1877-1888.

Carbone M, Rizzo P, Procopio A, Giuliano M, Pass HI, Gebhardt MC, Mangham C, Hansen M, Malkin DF, Bushart G, Pompetti F, Picci P, Levine AS, Bergsagel JD, Garcea RL. SV40-like sequences in human bone tumors. *Oncogene* 1996;13:527-535.

Caron de Fromentel C, Nardeux PC, Soussi T, Lavielle C, Estrade S, Carloni G, Chandrasekaran K, Cassingena R. Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Exp Cell Res* 1985;160:83-94.

Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in aids-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995;332:1186-1191.

Chadburn A, Hyjek E, Mathew S, Cesarman E, Said J, Knowles DM. Kshv-positive solid lymphomas represent an extra-cavitary variant of primary effusion lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1401-1416.

Chang MS, Lee HS, Kim HS, Kim SH, Choi SI, Lee BL, Kim CW, Kim YI, Yang M, Kim WH. Epstein-barr virus and microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 2003;199:447-452.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in aids-associated kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266:1865-1869.

Charney J, Moore DH. Neutralization of murine mammary tumour virus by sera of women with breast cancer. *Nature* 1971;229:627-628.

Chatlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin Cancer Biol* 1999;9:175-185.

- Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH.** The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982;299:529-534.
- Chim CS, Fung TK, Wong KF, Lau JS, Liang R.** Frequent dap kinase but not p14 or apaf-1 hypermethylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Hum Genet* 2006;51:832-838.
- Chim CS, Liang R, Kwong YL.** Hypermethylation of gene promoters in hematological neoplasia. *Hematol Oncol* 2002;20:167-176.
- Chim CS, Liang R, Leung MH, Kwong YL.** Aberrant gene methylation implicated in the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *J Clin Pathol* 2007;60:104-106.
- Chim CS, Wong KY, Loong F, Srivastava G.** Socs1 and shp1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: Implications for epigenetic activation of the jak/stat pathway. *Leukemia* 2004;18:356-358.
- Choi YL, Cho EY, Kim JH, Nam SJ, Oh YL, Song SY, Yang JH, Kim DS.** Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of Korean women. *Tumour Biol* 2007;28:327-332.
- Christofori G, Semb H.** The role of the cell-adhesion molecule e-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999;24:73-76.
- Chrysogelos SA, Dickson RB.** EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:29-40.
- Chu JS, Chen CC, Chang KJ.** In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett* 1998;124:53-57.
- Chu PG, Chang KL, Chen YY, Chen WG, Weiss LM.** No significant association of Epstein-Barr virus infection with invasive breast carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159:571-578.
- Chuang TC, Yu YH, Lin YS, Wang SS, Kao MC.** The n-terminal domain of SV40 large T antigen represses the HER2/neu-mediated transformation and metastatic potential in breast cancers. *FEBS Lett* 2002;511:46-50.
- Clarke R, Dickson RB, Brunner N.** The process of malignant progression in human breast cancer. *Ann Oncol* 1990;1:401-407.
- Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman FT, Benhattar J.** Methylation of APC, TIMP3, and TERT: A new predictive marker to distinguish Barrett's oesophagus patients at risk for malignant transformation. *J Pathol* 2006;208:100-107.
- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S.** Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: A meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;89:101-105.
- Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ.** Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 2002;62:3347-3350.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE,** editors. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor (NY): CSHL Press; 1997.
- Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T, Feinstein E, Kimchi A.** Dap-kinase participates in TNF- α - and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J Cell Biol* 1999;146:141-148.
- Cohen O, Kimchi A.** Dap-kinase: From functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell Death Differ* 2001;8:6-15.
- Coles BF, Kadlubar FF.** Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: Determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors* 2003;17:115-130.
- Colot V, Rossignol JL.** Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 1999;21:402-411.
- Costello JF, Plass C: Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303.
- Cote S, Sinnott D, Momparler RL.** Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998;9:743-750.
- Cotterchio M, Nadalin V, Sauer M.** Human breast cancer and lymphomas may share a common aetiology involving mouse mammary tumour virus (MMTV). *Med Hypotheses* 2002;59:492-494.

Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer B, Taylor JB. The structure of the human glutathione S-transferase pi gene. *Biochem J* 1988;255:79-83.

Crepin M, Lidereau R, Chermann JC, Pouillart P, Magdamenat H, Montagnier L. Sequences related to mouse mammary tumor virus genome in tumor cells and lymphocytes from patients with breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118:324-331.

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hmlh1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455-3460.

Cyster JG, Goodnow CC. Protein tyrosine phosphatase 1c negatively regulates antigen receptor signaling in b lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity* 1995;2:13-24.

Czerwenka K, Heuss F, Hosmann JW, Manavi M, Lu Y, Jelincic D, Kubista E. Human papilloma virus DNA: A factor in the pathogenesis of mammary paget's disease? *Breast Cancer Res Treat* 1996;41:51-57.

-D-

Dadmanesh F, Peterse JL, Sapino A, Fonelli A, Eusebi V. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the breast: Lack of evidence of epstein-barr virus infection. *Histopathology* 2001;38:54-61.

Damin AP, Damin DC, Alexandre CO. Hpv infection and breast cancer. *Breast* 2007;16:222.

Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84:131-137.

Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a ras association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000;25:315-319.

Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene rassf1a is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 2001;20:3563-3567.

Dang-Tan T, Mahmud SM, Puntoni R, Franco EL. Polio vaccines, simian virus 40, and human cancer: The epidemiologic evidence for a causal association. *Oncogene* 2004;23:6535-6540.

D'Anna R, Le Buanec H, Bizzini B, Burny A, Giannouli C, Zagury JF, Gallo RC, Zagury D, D'Alessio P. Human papillomavirus-16-E7

oncoprotein enhances the expression of adhesion molecules in cervical endothelial cells but not in human umbilical vein endothelial cells. *J Hum Virol* 2001;4:85-95.

Darnton SJ, Hardie LJ, Muc RS, Wild CP, Casson AG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: Loss of expression correlates with poor prognosis. *Int J Cancer* 2005;115:351-358.

Das MR, Sadasivan E, Koshy R, Vaidya AB, Sirsat SM. Homology between RNA from human malignant breast tissue and DNA synthesized by milk particles. *Nat New Biol* 1972; 239:92-5.

Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4632-4642.

Daures JP, Momas I, Bernon J, Gremy F. A vine-growing exposure matrix in the herault area of france. *Int J Epidemiol* 1993;22 Suppl 2:S36-41.

Davie JR, Samuel SK, Spencer VA, Holth LT, Chadee DN, Peltier CP, Sun JM, Chen HY, Wright JA. Organization of chromatin in cancer cells: Role of signalling pathways. *Biochem Cell Biol* 1999;77:265-275.

Day NK, Witkin SS, Sarkar NH, Kinne D, Jussawalla DJ, Levin A, Hsia CC, Geller N, Good RA. Antibodies reactive with murine mammary tumor virus in sera of patients with breast cancer: Geographic and family studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:2483-2487.

de Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X. No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:55-58.

De Marco F, Houissa-Kchouk F, Khelifa R, Marcante ML. High-risk hpv types in tunisia. A pilot study reveals an unexpectedly high prevalence of types 58 and 82 and lack of hpv 18 among female prostitutes. *J Med Virol* 2006;78:950-953.

De Mattei M, Martini F, Corallini A, Gerosa M, Scotlandi K, Carinci P, Barbanti-Brodano G, Tognon M. High incidence of bk virus large-t-antigen-coding sequences in normal human tissues and tumors of different histotypes. *Int J Cancer* 1995;61:756-760.

De Rienzo A, Tor M, Serman DH, Aksoy F, Albelda SM, Testa JR. Detection of sv40 DNA sequences in malignant mesothelioma specimens from the united states, but not from turkey. *J Cell Biochem* 2002;84:455-459.

- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ.** The use of general primers gp5 and gp6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by pcr. *J Gen Virol* 1995;76 (Pt 4):1057-1062.
- de Villiers EM, Lavergne D, McLaren K, Benton EC.** Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 1997;73:356-361.
- de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE.** Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7:R1-11.
- DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM.** SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988;54:275-283.
- Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A.** Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kd protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995;9:15-30.
- Deiss LP, Kimchi A.** A genetic tool used to identify thioredoxin as a mediator of a growth inhibitory signal. *Science* 1991;252:117-120.
- Del Valle L, Gordon J, Assimakopoulou M, Enam S, Geddes JF, Varakis JN, Katsetos CD, Croul S, Khalili K.** Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein t-antigen in tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 2001;61:4287-4293.
- Del Valle L, Gordon J, Enam S, Delbue S, Croul S, Abraham S, Radhakrishnan S, Assimakopoulou M, Katsetos CD, Khalili K.** Expression of human neurotropic polyomavirus jcv late gene product agnoprotein in human medulloblastoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:267-273.
- Deltour S, Chopin V, Leprince D.** [epigenetics and cancer]. *Med Sci (Paris)* 2005;21:405-411.
- Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, de Bruine AP, Herman JG, van Engeland M.** Methylation-specific pcr unraveled. *Cell Oncol* 2004;26:291-299.
- Deshpande CG, Badve S, Kidwai N, Longnecker R.** Lack of expression of the epstein-barr virus (EBV) gene products, ebers, ebnal, lmp1, and lmp2a, in breast cancer cells. *Lab Invest* 2002;82:1193-1199.
- de-The G, Bestetti G, van Beveren M, Gessain A.** Prevalence of human herpesvirus 8 infection before the acquired immunodeficiency disease syndrome-related epidemic of kaposi's sarcoma in east africa. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1888-1889.
- Dhillon VS, Shahid M, Husain SA.** CpG methylation of the fhit, fancf, cyclin-D2, brca2 and runx3 genes in granulosa cell tumors (gcts) of ovarian origin. *Mol Cancer* 2004;3:33.
- Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML.** Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;21:95-100.
- Dickson C.** Role of the int-genes in murine mammary tumor development and implications for human breast cancer. *Int J Cancer Suppl* 1990;5:51-54.
- Digel W, Lubbert M.** DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: Preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;55:1-11.
- Dittadi R, Donisi PM, Brazzale A, Cappellozza L, Brusca G, Gion M.** Epidermal growth factor receptor in breast cancer. Comparison with non malignant breast tissue. *Br J Cancer* 1993;67:7-9.
- Dobrovic A, Simpfendorfer D.** Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997;57:3347-3350.
- Dockrell DH.** Human herpesvirus 6: Molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol* 2003;52:5-18.
- Doorbar J, Gallimore PH.** Identification of proteins encoded by the 11 and 12 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol* 1987;61:2793-2799.
- Douvier S.** papillomavirus infections. *Encycl.Méd.Chir (paris-France)*.
- Drain PK, Holmes KK, Hughes JP, Koutsky LA.** Determinants of cervical cancer rates in developing countries. *Int J Cancer* 2002;100:199-205.
- Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, Cairns P.** Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:6189-6193.
- Dunn BK.** Hypomethylation: One side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci* 2003;983:28-42.

Durst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:1070-1074.

Dyson N, Bernards R, Friend SH, Gooding LR, Hassell JA, Major EO, Pipas JM, Vandyke T, Harlow E. Large t antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol* 1990;64:1353-1356.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 e7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-937.

-E-

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003;300:455.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457-463.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene* 2002;21:5400-5413.

Ehrlich M, Hopkins NE, Jiang G, Dome JS, Yu MC, Woods CB, Tomlinson GE, Chintagumpala M, Champagne M, Dillerg L, Parham DM, Sawyer J. Satellite DNA hypomethylation in karyotyped wilms tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;141:97-105.

Eisinger F, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Rio MC, Birnbaum D, Sobol H. More about: Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving brca1 and brca2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1421-1422.

Eisinger F, Laffargue F, Maraninchi D, Mauvais-Jarvis P, Moatti JP, Namer M, Pujol H, Philip T, Sancho-Garnier H. [guidelines from the national federation of cancer prevention centers (fncc) on trials of drug prevention of breast cancer by tamoxifen]. *Bull Cancer* 1995;82 Suppl 3:237s-238s.

Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 2001;15:50-65.

Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:39-47.

Elledge RM, Clark GM, Hon J, Thant M, Belt R, Maguire YP, Brown J, Bartels P, Von Hoff DD. Rapid in vitro assay for predicting response to fluorouracil in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:419-423.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-410.

Enam S, Del Valle L, Lara C, Gan DD, Ortiz-Hidalgo C, Palazzo JP, Khalili K. Association of human polyomavirus jcv with colon cancer: Evidence for interaction of viral t-antigen and beta-catenin. *Cancer Res* 2002;62:7093-7101.

Engels EA. Cancer risk associated with receipt of vaccines contaminated with simian virus 40: Epidemiologic research. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:197-206.

Engels EA, Katki HA, Nielsen NM, Winther JF, Hjalgrim H, Gjerris F, Rosenberg PS, Frisch M. Cancer incidence in denmark following exposure to poliovirus vaccine contaminated with simian virus 40. *J Natl Cancer Inst* 2003a;95:532-539.

Engels EA, Rodman LH, Frisch M, Goedert JJ, Biggar RJ. Childhood exposure to simian virus 40-contaminated poliovirus vaccine and risk of aids-associated non-hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2003b;106:283-287.

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003a;4:351-358.

Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003b;532:39-49.

Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:629-656.

Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2006;94:179-183.

Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2007;96 Suppl:R26-30.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-3229.

Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione s-transferase p1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998;58:4515-4518.

Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196:1-7.

Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. Hmlh1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 1998;17:2413-2417.

Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and brca1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:564-569.

Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000;60:4366-4371.

Etkind P, Du J, Khan A, Pillitteri J, Wiernik PH. Mouse mammary tumor virus-like env gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient. *Clin Cancer Res* 2000;6:1273-1278.

Etkind PR, Stewart AF, Wiernik PH. Mouse mammary tumor virus (MMTV)-like DNA sequences in the breast tumors of father, mother, and daughter. *Infect Agent Cancer* 2008;3:2.

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

Evron E, Umbrecht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Marks J, Sukumar S. Loss of cyclin d2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2001;61:2782-2787.

-F-

Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, Sukumar S, Argani P. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, cyclin B2 and twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003;107:970-975.

Faedo M, Ford CE, Mehta R, Blazek K, Rawlinson WD. Mouse mammary tumor-like virus is associated with p53 nuclear accumulation and progesterone receptor positivity but not estrogen positivity in human female breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4417-4419.

Falissard B, Chavance M. [the center effect in multicenter studies: Fixed or random?]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1996;44:455-464.

Fawzy S, Sallam M, Awad NM. Detection of epstein-barr virus in breast carcinoma in egyptian women. *Clin Biochem* 2008;41:486-492.

Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988;48:1159-1161.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301:89-92.

Fendrich V, Slater EP, Heinmoller E, Ramaswamy A, Celik I, Nowak O, Chaloupka B, Gerdes B, Bartsch DK. Alterations of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) gene in pancreatic adenocarcinomas. *Pancreas* 2005;30:e40-45.

Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, Huan S, Huang M, Liu J, Sahin AA, Hunt KK, Bast RC, Jr., Shen Y, Issa JP, Yu Y. Correlation between cpg methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007;9:R57.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin MD. GLOBOCAN 2002 cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC cancer base no. 5, version 2.0. IARC Press, Lyon, 2004.

Fernandez-Cobo M, Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Transcription profile of a human breast cancer cell line expressing mmtv-like sequences. *Infect Agent Cancer* 2006;1:7.

Fina F, Romain S, Ouafik L, Palmari J, Ben Ayed F, Benharkat S, Bonnier P, Spyrtos F, Foekens JA, Rose C, Buisson M, Gerard H, Reymond MO, Seigneurin JM, Martin PM. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br J Cancer* 2001;84:783-790.

Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Kostrzewa M, Buchholz E, Manegold C, Lahm H. Promoter methylation of rassfla, rarbeta and dapk predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer* 2006;54:109-116.

Fitzgibbons PL, Connolly JL, Page DL. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the breast. Cancer committee. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1026-1033.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of american pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-978.

Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JI, Asomani SK, Jorgensen GE, Vignarajan S, Kjuul A, Kogner P, Traavik T. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res* 1999;59:1160-1163.

Flaitz CM, Hicks MJ. Molecular piracy: The viral link to carcinogenesis. *Oral Oncol* 1998;34:448-453.

Ford C, Faedo M, Delprado W, Rawlinson W. Correspondence re: C. Ford, et al. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of australian and vietnamese women. *Clin. Cancer res.*, 9: 1118-1120, 2003. *Clin Cancer Res* 2004;10:802.

Ford CE, Tran D, Deng Y, Ta VT, Rawlinson WD, Lawson JS. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of australian and vietnamese women. *Clin Cancer Res* 2003;9:1118-1120.

Fox SB, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Hastrich D, Harris AL. The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: Results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:41-49.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827-1831.

Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991;72 (Pt 5):1039-1044.

Fuks F. [DNA methyltransferases: From chromatin remodeling to cancer]. *Med Sci (Paris)* 2003;19:477-480.

Fukuda M, Wanebo HJ, Tsuei L, Sarkar NH. Leukocyte migration inhibition response to breast cancer antigens and to mouse mammary tumor virus in women with primary breast cancer. *Surg Forum* 1978;29:167-169.

Fukuoka H, Moriuchi M, Yano H, Nagayasu T, Moriuchi H. No association of mouse mammary tumor virus-related retrovirus with japanese cases of breast cancer. *J Med Virol* 2008;80:1447-1451.

Furmanski P, Longley C, Fouchey D, Rich R, Rich MA. Normal human mammary cells in culture: Evidence for oncornavirus-like particles. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:975-977.

Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*. 1994; 266:120-2.

-G-

Gaffey MJ, Frierson HF, Jr., Mills SE, Boyd JC, Zarbo RJ, Simpson JF, Gross LK, Weiss LM. Medullary carcinoma of the breast. Identification of lymphocyte subpopulations and their significance. *Mod Pathol* 1993;6:721-728.

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 1983;11:6883-6894.

Ganem D. Kshv and kaposi's sarcoma: The end of the beginning? *Cell* 1997;91:157-160.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987;196:261-282.

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003;300:489-492.

Gazdar AF, Butel JS, Carbone M. Sv40 and human tumours: Myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2002;2:957-964.

Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, *tap1* and *Imp2* genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 *e7* oncoproteins. *Oncogene* 2000;19:4930-4935.

Gessain A, Maucelere P, van Beveren M, Plancoulaine S, Ayouba A, Essame-Oyono JL, Martin PM, de The G. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in cameroon, central africa. *Int J Cancer* 1999;81:189-192.

Gessain A, Sudaka A, Briere J, Fouchard N, Nicola MA, Rio B, Arborio M, Troussard X, Audouin J, Diebold J, de The G. Kaposi sarcoma-associated herpes-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric castlemans disease: Is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood* 1996;87:414-416.

Ghazi H, Gonzales FA, Jones PA. Methylation of cpg-island-containing genes in human sperm, fetal and adult tissues. *Gene* 1992;114:203-210.

Gion M, Mione R, Dittadi R, Romanelli M, Pappagallo L, Capitanio G, Friede U, Barbazza R, Visona A, Dante S. Relationship between cathepsin d and other pathological and biological parameters in 1752 patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:671-677.

Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bieche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:4415-4422.

Giri I, Yaniv M. Structural and mutational analysis of e2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 1988;7:2823-2829.

Glaser SL, Ambinder RF, DiGiuseppe JA, Horn-Ross PL, Hsu JL. Absence of Epstein-Barr virus EBER-1 transcripts in an epidemiologically diverse group of breast cancers. *Int J Cancer* 1998;75:555-558.

Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, Pallesen G, Gulley ML, Khan G, O'Grady J, Hummel M, Preciado MV, Knecht H, Chan JK, Claviez A. Epstein-barr virus-associated hodgkin's disease: Epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 1997;70:375-382.

Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 1985;228:187-190.

Gopal MR, Thomson BJ, Fox J, Tedder RS, Honess RW. Detection by pcr of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and hiv-seropositives. *Lancet* 1990;335:1598-1599.

Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, Das BC. Absence of

human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:197-202.

Gottlieb TM, Oren M. P53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:77-102.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995;55:5195-5199.

Green JE, Shibata MA, Yoshidome K, Liu ML, Jorcyk C, Anver MR, Wigginton J, Wiltrout R, Shibata E, Kaczmarczyk S, Wang W, Liu ZY, Calvo A, Couldrey C. The c3(1)/sv40 t-antigen transgenic mouse model of mammary cancer: Ductal epithelial cell targeting with multistage progression to carcinoma. *Oncogene* 2000;19:1020-1027.

Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, De Matteo E, Gould VE. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res* 2002;62:4876-4878.

Gu J, Berman D, Lu C, Wistuba, II, Roth JA, Frazier M, Spitz MR, Wu X. Aberrant promoter methylation profile and association with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:7329-7338.

Gumus M, Yumuk PF, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, Basaran G, Kaya H, Barisik N, Turhal NS. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25:515-521.

Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:462-466.

-H-

Hachana M, Trimeche M, Ziadi S, Amara K, Gaddas N, Mokni M, Korbi S. Prevalence and characteristics of the mmtv-like associated breast carcinomas in tunisia. *Cancer Lett* 2008;271:222-230.

Hachana M, Trimeche M, Ziadi S, Amara K, Korbi S. Evidence for a role of the simian virus 40 in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2009;113:43-58.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

- Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC.** Towards an integrated model for breast cancer etiology: The lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res* 2004;6:213-218.
- Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Minna JD, Gazdar AF.** Aberrant promoter methylation and silencing of the *rassf1a* gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* 2002;21:4345-4349.
- Hareuveni M, Lathe R.** Breast cancer sequences identified by mouse mammary tumor virus (MMTV) antiserum are unrelated to *mmtv*. *Int J Cancer* 1990;46:1134-1135.
- Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS.** Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* 2002;360:1557-1563.
- Hassen E, Chaieb A, Letaief M, Khairi H, Zakhama A, Remadi S, Chouchane L.** Cervical human papillomavirus infection in tunisian women. *Infection* 2003;31:143-148.
- Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA.** Inactivation of *p53* enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1996;56:892-898.
- Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K.** Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the *e7* oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4442-4446.
- Henderson IC.** Risk factors for breast cancer development. *Cancer* 1993;71:2127-2140.
- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K.** Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet* 2004;20:320-326.
- Hennig EM, Nesland JM, Di Lonardo A, Venuti A.** Multiple primary cancers and hpv infection: Are they related? *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:53-54.
- Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM.** Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:121-135.
- Herman JG.** Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 1999;9:359-367.
- Herman JG, Baylin SB.** Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-2054.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB.** Methylation-specific PCR: A novel *pcr* assay for methylation status of *cpg* islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-9826.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB.** Inactivation of the *cdkn2/p16/mts1* gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530.
- Herrmann K, Niedobitek G.** Lack of evidence for an association of Epstein-Barr virus infection with breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 2003;5:R13-17.
- Hesson L, Bieche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, Latif F.** Frequent epigenetic inactivation of *rassf1a* and *BLU* genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 2004;23:2408-2419.
- Hirama T, Koeffler HP.** Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995;86:841-854.
- Holland JF, Pogo BG.** Mouse mammary tumor virus-like viral infection and human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5647-5649.
- Holland JF, Pogo GT.** Possible etiology of human breast cancer: Comment. *Biomed Pharmacother* 1999;53:334.
- Honorat JF, Ragab A, Lamant L, Delsol G, Ragab-Thomas J.** *Shp1* tyrosine phosphatase negatively regulates *npm-alk* tyrosine kinase signaling. *Blood* 2006;107:4130-4138.
- Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, Vooijs GP, Speel EJ, Ramaekers FC.** Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of *hpv 16/18* and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 2004;202:23-33.
- Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, Kurihara H, Mori M, Saito N.** Epigenetic inactivation of *rassf1a* candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 2003;22:7862-7865.
- Horiuchi K, Mishima K, Ohsawa M, Aozasa K.** Carcinoma of stomach and breast with lymphoid stroma: Localisation of epstein-barr virus. *J Clin Pathol* 1994;47:538-540.

Hou P, Ji M, Yang B, Chen Z, Qiu J, Shi X, Lu Z. Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. *Cancer* 2006;106:1602-1609.

House MG, Herman JG, Guo MZ, Hooker CM, Schulick RD, Cameron JL, Hruban RH, Maitra A, Yeo CJ. Prognostic value of hmlh1 methylation and microsatellite instability in pancreatic endocrine neoplasms. *Surgery* 2003;134:902-908; discussion 909.

Howley PM. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res* 1991;51:5019s-5022s.

Hsu CH, Chang MD, Tai KY, Yang YT, Wang PS, Chen CJ, Wang YH, Lee SC, Wu CW, Juan LJ. HCMV IE2-mediated inhibition of hat activity downregulates p53 function. *EMBO J* 2004;23:2269-2280.

Hsu HS, Chen TP, Wen CK, Hung CH, Chen CY, Chen JT, Wang YC. Multiple genetic and epigenetic biomarkers for lung cancer detection in cytologically negative sputum and a nested case-control study for risk assessment. *J Pathol* 2007;213:412-419.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for e6-ap, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus e6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 1993;13:775-784.

Hummel M, Abecassis MM. A model for reactivation of cmv from latency. *J Clin Virol* 2002;25 Suppl 2:S123-136.

-I-

Ikeda S, Kishida M, Matsuura Y, Usui H, Kikuchi A. Gsk-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2a complexed with axin. *Oncogene* 2000;19:537-545.

Imai M, Yamada C, Saga S, Nagayoshi S, Hoshino M. Immunological cross reaction between sera from patients with breast cancer and mouse mammary tumor virus. *Gann* 1979;70:63-74.

Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. P53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994;84:2412-2421.

Inda MM, Castresana JS. Rassf1a promoter is highly methylated in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Neuropathology* 2007;27:341-346.

Indik S, Gunzburg WH, Salmons B, Rouault F. Mouse mammary tumor virus infects human cells. *Cancer Res* 2005;65:6651-6659.

Inoue K, Arai T, Aoyagi M. Real time observation of binding of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) to vero cells and neutralization of HSV-1 by sulfonated human immunoglobulin. *J Biochem* 1997;121:633-636.

Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;32:31-43.

Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor cpg island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994;7:536-540.

Ito M, Ito G, Kondo M, Uchiyama M, Fukui T, Mori S, Yoshioka H, Ueda Y, Shimokata K, Sekido Y. Frequent inactivation of rassf1a, blu, and SEMA3b on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2005;225:131-139.

-J-

Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated pcr and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995;33:901-905.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-254.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assoc* 1958; 53: 457-481.

Jasani B, Cristaudo A, Emri SA, Gazdar AF, Gibbs A, Krynska B, Miller C, Mutti L, Radu C, Tognon M, Procopio A. Association of sv40 with human tumours. *Semin Cancer Biol* 2001;11:49-61.

Jeronimo C, Costa I, Martins MC, Monteiro P, Lisboa S, Palmeira C, Henrique R, Teixeira MR, Lopes C. Detection of gene promoter hypermethylation in fine needle washings from breast lesions. *Clin Cancer Res* 2003;9:3413-3417.

Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators rassf1a, shp-1 and socs-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005;129:60-65.

Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 1996;56:2463-2467.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-428.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-167.

Josefsson A, Livak K, Gyllensten U. Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:490-496.

-K-

Kajikawa M, Okada N. Lines mobilize sines in the eel through a shared 3' sequence. *Cell* 2002;111:433-444.

Kalkan A, Ozdarendeli A, Bulut Y, Yekeler H, Cobanoglu B, Doymaz MZ. Investigation of epstein-barr virus DNA in formalin-fixed and paraffin- embedded breast cancer tissues. *Med Princ Pract* 2005;14:268-271.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW. Erbb2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5321-5325.

Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93:946-948.

Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer Lett* 2003;192:75-82.

Kao SY, Tu HF, Chang KW, Chang CS, Yang CC, Lin SC. The retinoic acid receptor-beta (RAR-beta) mrna expression in the oral squamous cell carcinoma associated with betel quid use. *J Oral Pathol Med* 2002;31:220-226.

Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997;13:444-449.

Katich SC, Zerfass-Thome K, Hoffmann I. Regulation of the cdc25a gene by the human papillomavirus type 16 e7 oncogene. *Oncogene* 2001;20:543-550.

Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, Tamiya S, Tateishi N, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. *Mod Pathol* 2006;19:106-114.

Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu Rev Public Health* 1996;17:47-67.

Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, s-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995;104:42-49.

Keydar I, Ohno T, Nayak R, Sweet R, Simoni F, Weiss F, Karby S, Mesa-Tejada R, Spiegelman S. Properties of retrovirus-like particles produced by a human breast carcinoma cell line: Immunological relationship with mouse mammary tumor virus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4188-4192.

Khan NA, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, Higashi M, Sagara Y, Yoshinaka H, Tsuji T, Natsugoe S, Douchi T, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in japan. *Br J Cancer* 2008;99:408-414.

Khoury JD, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Amin HM, Lai R. Methylation of shp1 gene and loss of shp1 protein expression are frequent in systemic anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2004;104:1580-1581.

Kijima Y, Hokita S, Takao S, Baba M, Natsugoe S, Yoshinaka H, Aridome K, Otsuji T, Itoh T, Tokunaga M, Eizuru Y, Aikou T. Epstein-barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *J Med Virol* 2001;64:513-518.

Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT. Promoter methylation of dap-kinase: Association with advanced stage in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2001;20:1765-1770.

Kim JC, Koo KH, Roh SA, Cho YK, Kim HC, Yu CS, Kim HJ, Kim JS, Cho MK. Genetic and epigenetic changes in the apc gene in sporadic colorectal carcinoma with synchronous adenoma. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:203-209.

Kim NR, Lin Z, Kim KR, Cho HY, Kim I. Epstein-barr virus and p16ink4a methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri. *J Korean Med Sci* 2005;20:636-642.

Kim YI, Giuliano A, Hatch KD, Schneider A, Nour MA, Dallal GE, Selhub J, Mason JB. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 1994;74:893-899.

King CR, Kraus MH, Williams LT, Merlino GT, Pastan IH, Aaronson SA. Human tumor cell lines with EGF receptor gene amplification in the absence of aberrant sized mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1985;13:8477-8486.

King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *brca1* and *brca2*. *Science* 2003;302:643-646.

Kinyamu HK, Fryer CJ, Horwitz KB, Archer TK. The mouse mammary tumor virus promoter adopts distinct chromatin structures in human breast cancer cells with and without glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2000;275:20061-20068.

Kafe H, Wechsler J, Gaulard P, Gosselin B. [Epstein-Barr virus: pathologic implications]. *Ann Pathol.* 1998; 18:16-28.

Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Nishimine M, Ishida E, Shimada K. DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:767-773.

Korbi S, Descoteaux-Chatti D. Le cancer dans le centre tunisien. *Sousse : Edition Copie, 1995 : 58.*

Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, Suuronen R, Lindqvist C, Auvinen E, Molijn A, Quint WG, Vaheri A, Aaltonen LM. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003;107:401-406.

Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: Cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 1956;63:1245-1261.

Kosuge H. Hhv-6, 7 and their related diseases. *J Dermatol Sci* 2000;22:205-212.

Krajcinovic M, Ghadirian P, Richer C, Sinnott H, Gandini S, Perret C, Lacroix A, Labuda D, Sinnott D. Genetic susceptibility to breast cancer in french-canadians: Role of carcinogen-metabolizing enzymes and gene-environment interactions. *Int J Cancer* 2001;92:220-225.

Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, Battagli C, Ehya H, Klein-Szanto A, Cairns P. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by cpg island hypermethylation. *Clin Cancer Res* 2004;10:28-32.

Krieg P, Amtmann E, Jonas D, Fischer H, Zang K, Sauer G. Episomal simian virus 40 genomes in human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:6446-6450.

Kroczynska B, Cutrone R, Bocchetta M, Yang H, Elmishad AG, Vacek P, Ramos-Nino M, Mossman BT, Pass HI, Carbone M. Crocidolite asbestos and sv40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:14128-14133.

Krop I, Player A, Tablante A, Taylor-Parker M, Lahti-Domenici J, Fukuoka J, Batra SK, Papadopoulos N, Richards WG, Sugarbaker DJ, Wright RL, Shim J, Stamey TA, Sellers WR, Loda M, Meyerson M, Hruban R, Jen J, Polyak K. Frequent HIN-1 promoter methylation and lack of expression in multiple human tumor types. *Mol Cancer Res* 2004;2:489-494.

Krop IE, Sgroi D, Porter DA, Lunetta KL, LeVangie R, Seth P, Kaelin CM, Rhei E, Bosenberg M, Schnitt S, Marks JR, Pagon Z, Belina D, Razumovic J, Polyak K. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9796-9801.

Kroupis C, Markou A, Vourlidis N, Dionyssiou-Asteriou A, Lianidou ES. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem* 2006;39:727-731.

Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomaki P. Genetic and epigenetic modification of *mlh1* accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* 2000;156:1773-1779.

Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, Vocke CD, Duh FM, Zabarovsky E, Minna JD, Rhim JS, Emmert-Buck MR, Linehan WM, Lerman MI. The *rassfla* tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 2002;62:3498-3502.

Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PM, Johnson PJ, Huang DP. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:131-137.

-L-

Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-barr virus in epithelial cell tumors: A breast cancer study. *Cancer Res* 1995;55:39-45.

Lai HC, Lin YW, Chang CC, Wang HC, Chu TW, Yu MH, Chu TY. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, *blu* and *rassfla*, located at 3p21.3 in cervical neoplasias. *Gynecol Oncol* 2007;104:629-635.

- Lambert PF.** Papillomavirus DNA replication. *J Virol* 1991;65:3417-3420.
- Laumbacher B, Fellerhoff B, Herzberger B, Wank R.** Do dogs harbour risk factors for human breast cancer? *Med Hypotheses* 2006;67:21-26.
- Lawson JS, Tran D, Rawlinson WD.** From bittner to barr: A viral, diet and hormone breast cancer aetiology hypothesis. *Breast Cancer Res* 2001;3:81-85.
- Lawson JS, Tran DD, Ford C, Rawlinson WD.** Elevated expression of the tumor suppressing protein p53 is associated with the presence of mouse mammary tumor-like env gene sequences (mmtv-like) in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;87:13-17.
- Lednický JA, Butel JS.** Simian virus 40 regulatory region structural diversity and the association of viral archetypal regulatory regions with human brain tumors. *Semin Cancer Biol* 2001;11:39-47.
- Lednický JA, Garcea RL, Bergsagel DJ, Butel JS.** Natural simian virus 40 strains are present in human choroid plexus and ependymoma tumors. *Virology* 1995;212:710-717.
- Lednický JA, Stewart AR, Jenkins JJ, 3rd, Finegold MJ, Butel JS.** Sv40 DNA in human osteosarcomas shows sequence variation among t-antigen genes. *Int J Cancer* 1997;72:791-800.
- Lee JO, Kwun HJ, Jung JK, Choi KH, Min DS, Jang KL.** Hepatitis b virus x protein represses e-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene* 2005;24:6617-6625.
- Lehmann U, Celikkaya G, Hasemeier B, Langer F, Kreipe H.** Promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene in breast cancer is associated with the invasive lobular subtype. *Cancer Res* 2002;62:6634-6638.
- Lespagnard L, Cochaux P, Larsimont D, Degeyter M, Velu T, Heimann R.** Absence of epstein-barr virus in medullary carcinoma of the breast as demonstrated by immunophenotyping, in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1995;103:449-452.
- Levine PH, Mesa-Tejada R, Keydar I, Tabbane F, Spiegelman S, Mourali N.** Increased incidence of mouse mammary tumor virus-related antigen in tunisian patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1984;33:305-308.
- Levine PH, Pogo BG, Klouj A, Coronel S, Woodson K, Melana SM, Mourali N, Holland JF.** Increasing evidence for a human breast carcinoma virus with geographic differences. *Cancer* 2004;101:721-726.
- Levy JA.** Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8). *Lancet* 1997;349:558-563.
- Lewis CM, Cler LR, Bu DW, Zochbauer-Muller S, Milchgrub S, Naftalis EZ, Leitch AM, Minna JD, Euhus DM.** Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 2005;11:166-172.
- LH S, CH W.** TNM classification of malignant tumours, ed 5th. John Wiley & Sons, 1998.
- Li J, El-Naggar A, Mao L.** Promoter methylation of p16ink4a, rassf1a, and dapk is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2005;104:771-776.
- Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, Mei Q, Ke Y.** P53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in china. *Cancer* 2002;95:2571-2576.
- Li Y, Pan Z, Ji Y, Sheppard M, Jeffries DJ, Archard LC, Zhang H.** Herpes simplex virus type 1 infection associated with atrial myxoma. *Am J Pathol* 2003;163:2407-2412.
- Liang W, Tian H.** Hypothetic association between human papillomavirus infection and breast carcinoma. *Med Hypotheses* 2008;70:305-307.
- Lin JH, Tsai CH, Chu JS, Chen JY, Takada K, Shew JY.** Dysregulation of HER2/HER3 signaling axis in epstein-barr virus-infected breast carcinoma cells. *J Virol* 2007;81:5705-5713.
- Lin TS, Lee H, Chen RA, Ho ML, Lin CY, Chen YH, Tsai YY, Chou MC, Cheng YW.** An association of dnmt3b protein expression with p16ink4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Lett* 2005;226:77-84.
- Lindel K, Forster A, Altermatt HJ, Greiner R, Gruber G.** Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: No evidence of a viral etiology in a group of swiss women. *Breast* 2007;16:172-177.
- Litvinov SV, Golovkina TV.** [expression of antigens related to structural protein antigens of mmtv in breast cancer cells]. *Vopr Onkol* 1985;31:47-53.
- Litvinov SV, Golovkina TV.** Expression of proteins immunologically related to murine mammary tumour virus (MMTV) core proteins in the cells of breast cancer continuous lines mcf-7, t47d, mda-231 and cells from human milk. *Acta Virol* 1989;33:137-142.

Liu B, Wang Y, Melana SM, Pelisson I, Najfeld V, Holland JF, Pogo BG. Identification of a proviral structure in human breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:1754-1759.

Liu E, Thor A, He M, Barcos M, Ljung BM, Benz C. The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene* 1992;7:1027-1032.

Liu VW, Tsang P, Yip A, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. Low incidence of hpv DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2001;82:269-272.

Liu XQ, Pan ZG, Li MZ, Jiang JH, Fu J, Long QX, Wang XZ, Zeng YX. [analysis of suppressive roles of blu gene at 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma]. *Ai Zheng* 2003;22:128-135.

Liu Y, Klimberg VS, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Chiriva-Internati M, Henry-Tillman R, Hermonat PL. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *J Hum Virol* 2001;4:329-334.

Longnecker MP, Tseng M. Alcohol, hormones, and postmenopausal women. *Alcohol Health Res World.* 1998; 22:185-9.

Lopez DM, Parks WP, Silverman MA, Distasio JA. Lymphoproliferative responses to mouse mammary tumor virus in lymphocyte subsets of breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1981;67:353-358.

Lopez-Rios F, Illei PB, Rusch V, Ladanyi M. Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive pcr results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet* 2004;364:1157-1166.

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328-337.

Luo T, Wu XT, Zhang MM, Qian K. [study of mouse mammary tumor virus-like gene sequences expressing in breast tumors of chinese women]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006;37:844-846, 851.

Lusso P, Gallo RC. HHV-6 and CMV pneumonitis in immunocompromised patients. *Lancet* 1994;343:1647-1648.

-M-

Maalej M, Frikha H, Ben Salem S, Daoud J, Bouaouina N, Ben Abdallah M, Ben Romdhane K. [breast cancer in tunisia: Clinical and epidemiological study]. *Bull Cancer* 1999;86:302-306.

Macsween KF, Crawford DH. Epstein-barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003;3:131-140.

Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the jc virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:49-73.

Malivanova TF, Litvinov SV, Plevaya EB, Kryukova IN. Detection in the blood serum of breast cancer patients of circulating immune complexes containing antigens showing common epitopes with structural proteins of mouse mammary tumour virus (MMTV). *Acta Virol* 1988;32:129-137.

Manavi M, Bauer M, Pischinger K, Czerwenka K. Detection of human papillomavirus on papanicolaou-stained cervical smears using indirect in situ polymerase chain reaction hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:353-357.

Manfredi JJ, Dong J, Liu WJ, Resnick-Silverman L, Qiao R, Chahinian P, Saric M, Gibbs AR, Phillips JI, Murray J, Axten CW, Nolan RP, Aaronson SA. Evidence against a role for SV40 in human mesothelioma. *Cancer Res* 2005;65:2602-2609.

Mansouri A, Spurr N, Goodfellow PN, Kemler R. Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation* 1988;38:67-71.

Mant C, Cason J. A human murine mammary tumour virus-like agent is an unconvincing aetiological agent for human breast cancer. *Rev Med Virol* 2004;14:169-177.

Mant C, Cason J. Mouse mammary tumor virus and human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:1112; author reply 1112-1113.

Marchetti A, Barassi F, Martella C, Chella A, Salvatore S, Castrataro A, Mucilli F, Sacco R, Buttitta F. Down regulation of high in normal-1 (HIN-1) is a frequent event in stage i non-small cell lung cancer and correlates with poor clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10:1338-1343.

- Marsit CJ, Kim DH, Liu M, Hinds PW, Wiencke JK, Nelson HH, Kelsey KT.** Hypermethylation of rassfla and blu tumor suppressor genes in non-small cell lung cancer: Implications for tobacco smoking during adolescence. *Int J Cancer* 2005;114:219-223.
- Martin JK, Jr., van Heerden JA, Gaffey TA.** Synchronous and metachronous carcinoma of the breast. *Surgery* 1982;91:12-16.
- Martinelli M, Martini F, Rinaldi E, Caramanico L, Magri E, Grandi E, Carinci F, Pastore A, Tognon M.** Simian virus 40 sequences and expression of the viral large t antigen oncoprotein in human pleomorphic adenomas of parotid glands. *Am J Pathol* 2002;161:1127-1133.
- Martini F, Iaccheri L, Martinelli M, Martinello R, Grandi E, Mollica G, Tognon M.** Papilloma and polyoma DNA tumor virus sequences in female genital tumors. *Cancer Invest* 2004;22:697-705.
- Martini F, Lazzarin L, Iaccheri L, Corallini A, Gerosa M, TrabANELLI C, Calza N, Barbanti-Brodano G, Tognon M.** Simian virus 40 footprints in normal human tissues, brain and bone tumours of different histotypes. *Dev Biol Stand* 1998;94:55-66.
- Maruyama R, Sugio K, Yoshino I, Maehara Y, Gazdar AF.** Hypermethylation of FHIT as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;100:1472-1477.
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF.** Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-8663.
- Matsubayashi H, Sato N, Fukushima N, Yeo CJ, Walter KM, Brune K, Sahin F, Hruban RH, Goggins M.** Methylation of cyclin d2 is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues. *Clin Cancer Res* 2003;9:1446-1452.
- Matsuoka M.** Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene* 2003;22:5131-5140.
- Mauri FA, Maisonneuve P, Caffo O, Veronese S, Aldovini D, Ferrero S, Cozzaglio F, Dalla Palma P, Galligioni E, Barbareschi M.** Prognostic value of estrogen receptor status can be improved by combined evaluation of p53, bcl2 and pgr expression: An immunohistochemical study on breast carcinoma with long-term follow-up. *Int J Oncol* 1999;15:1137-1147.
- May FE, Westley BR.** Characterization of sequences related to the mouse mammary tumor virus that are specific to MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 1989;49:3879-3883.
- May FE, Westley BR, Rochefort H, Buetti E, Diggelmann H.** Mouse mammary tumour virus related sequences are present in human DNA. *Nucleic Acids Res* 1983;11:4127-4139.
- McCabe MT, Low JA, Imperiale MJ, Day ML.** Human polyomavirus BKV transcriptionally activates DNA methyltransferase 1 through the pRb/E2F pathway. *Oncogene* 2006;25:2727-2735.
- McCall SA, Lichy JH, Bijwaard KE, Aguilera NS, Chu WS, Taubenberger JK.** Epstein-barr virus detection in ductal carcinoma of the breast. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:148-150.
- McCoy JL, Tagliabue A, Ames RE, Teramoto YA, Cannon GB, Alford C, Herberman RB, Schlom J.** Indirect leukocyte migration inhibition in breast cancer and benign breast disease patients by mouse mammary tumor virus grown in feline kidney cells. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:569-576.
- McGlennen RC. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med* 2000;20:383-406.
- McGrath CM.** Replication of mammary tumor virus in tumor cell cultures: Dependence on hormone-induced cellular organization. *J Natl Cancer Inst* 1971;47:455-467.
- McGrath CM, Jones RF.** Hormonal induction of mammary tumor viruses and its implications for carcinogenesis. *Cancer Res* 1978;38:4112-4125.
- Medina D.** Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. *Cancer Res* 1976;36:2589-2595.
- Mehta SP, Sirsat SM, Jussawalla DJ.** Humoral antibodies to mouse mammary tumor virus in sera from breast cancer patients. *Indian J Exp Biol* 1978;16:1126-1130.
- Melana SM, Holland JF, Pogo BG.** Search for mouse mammary tumor virus-like env sequences in cancer and normal breast from the same individuals. *Clin Cancer Res* 2001;7:283-284.
- Melana SM, Picconi MA, Rossi C, Mural J, Alonio LV, Teyssie A, Holland JF, Pogo BG.** [detection of murine mammary tumor virus (MMTV) env gene-like sequences in breast cancer from argentine patients]. *Medicina (B Aires)* 2002;62:323-327.

- Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramirez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Moran-Moguel MC, Montoya-Fuentes H.** Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:189-194.
- Menke DM, Griesser H, Moder KG.** Lymphomas in patients with connective tissue disease. Comparison of p53 protein expression and latent EBV infection in patients immunosuppressed and not immunosuppressed with methotrexate. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113:212-8.
- Merhavi E, Cohen Y, Avraham BC, Frenkel S, Chowers I, Pe'er J, Goldenberg-Cohen N.** Promoter methylation status of multiple genes in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4403-4406.
- Mermelshtein A, Gerson A, Walfisch S, Delgado B, Shechter-Maor G, Delgado J, Fich A, Gheber L.** Expression of d-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. *Br J Cancer* 2005;93:338-345.
- Mesa-Tejada R, Oster MW, Fenoglio CM, Magidson J, Spiegelman S.** Diagnosis of primary breast carcinoma through immunohistochemical detection of antigen related to mouse mammary tumor virus in metastatic lesions: A report of two cases. *Cancer* 1982;49:261-268.
- Michaelis M, Kotchetkov R, Vogel JU, Doerr HW, Cinatl J, J.** Cytomegalovirus infection blocks apoptosis in cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1307-1316.
- Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM.** The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large t-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J* 1992;11:5013-5020.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W.** A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266:66-71.
- Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ.** Detailed methylation analysis of the glutathione s-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* 1999;18:1313-1324.
- Mink S, Hartig E, Jennewein P, Doppler W, Cato AC.** A mammary cell-specific enhancer in mouse mammary tumor virus DNA is composed of multiple regulatory elements including binding sites for ctf/nfi and a novel transcription factor, mammary cell-activating factor. *Mol Cell Biol* 1992;12:4906-4918.
- Missaoui N, Hmissa S, Frappart L, Trabelsi A, Ben Abdelkader A, Traore C, Mokni M, Yaacoubi MT, Korbi S.** P16ink4a overexpression and HPV infection in uterine cervix adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2006;448:597-603.
- Mittag F, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A, Schneider-Stock R.** DAPK promoter methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett* 2006;240:69-75.
- Miyamoto K, Ushijima T.** Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:293-301.
- Mizunuma H, Kanazawa K, Ogura S, Otsuka S, Nagai H.** Anticarcinogenic effects of isoflavones may be mediated by genistein in mouse mammary tumor virus-induced breast cancer. *Oncology* 2002;62:78-84.
- Mok E, Golovkina TV, Ross SR.** A mouse mammary tumor virus mammary gland enhancer confers tissue-specific but not lactation-dependent expression in transgenic mice. *J Virol* 1992;66:7529-7532.
- Mok MT, Lawson JS, Iacopetta BJ, Whitaker NJ.** Mouse mammary tumor virus-like env sequences in human breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2864-2870.
- Momparler RL, Bovenzi V.** DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000;183:145-154.
- Moore DH, Sarkar NH, Kramarsky B, Lasfargues EY, Charney J.** Some aspects of the search for a human mammary tumor virus. *Cancer* 1971;28:1415-1424.
- Morrow CS, Cowan KH, Goldsmith ME.** Structure of the human genomic glutathione s-transferase-pi gene. *Gene* 1989;75:3-11.
- Moss SM.** Breast carcinoma mortality rates and screening. *Cancer* 1997;79:1-2.
- Mougin C, Bernard B, Lab M.** [biology of papillomavirus ii infections. Their role in the carcinogenesis of the cervix]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1998;56:21-28.
- Muhlich J, Bajanowski T, Rickert CH, Roggendorf W, Wurthwein G, Jurgens H, Fruhwald MC.** Frequent but borderline methylation of p16 (INK4a) and TIMP3 in medulloblastoma and spnet revealed by quantitative analyses. *J Neurooncol* 2007;83:17-29.

Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20:7888-7898.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-527.

Muradrasoli S, Forsman A, Hu L, Blikstad V, Blomberg J. Development of real-time pcrs for detection and quantitation of human mmtv-like (hml) sequences hml expression in human tissues. *J Virol Methods* 2006;136:83-92.

Murata H, Khattar NH, Gu L, Li GM. Roles of mismatch repair proteins hms2 and hmlh1 in the development of sporadic breast cancer. *Cancer Lett* 2005;223:143-150.

Murray PG, Lissauer D, Junying J, Davies G, Moore S, Bell A, Timms J, Rowlands D, McConkey C, Reynolds GM, Ghataura S, England D, Carroll R, Young LS. Reactivity with a monoclonal antibody to Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 defines a subset of aggressive breast cancers in the absence of the EBV genome. *Cancer Res* 2003;63:2338-2343.

Murray PG, Qiu GH, Fu L, Waites ER, Srivastava G, Heys D, Agathangelou A, Latif F, Grundy RG, Mann JR, Starczynski J, Crocker J, Parkes SE, Ambinder RF, Young LS, Tao Q. Frequent epigenetic inactivation of the rassf1a tumor suppressor gene in hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 2004;23:1326-1331.

Mymryk JS, Berard D, Hager GL, Archer TK. Mouse mammary tumor virus chromatin in human breast cancer cells is constitutively hypersensitive and exhibits steroid hormone-independent loading of transcription factors in vivo. *Mol Cell Biol* 1995;15:26-34.

-N-

Nabi S, Trimeche M, Ziadi S, Baccouche D, Amara K, Mestiri S, Hmissa S, Gaddas N, Mokni M, Toumi I, Korbi S. [prevalence of high risk oncogen hpv by in situ hybridization and by pcr in condyloma acuminata in the region of the tunisian center]. *Tunis Med* 2006;84:170-176.

Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, Dawson DB, Ansari MQ, Sald J, Knowles DM. Primary effusion lymphoma: A distinct clinicopathologic entity associated with the kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood* 1996;88:645-656.

Nagayoshi S, Imai M, Tsutsui Y, Saga S, Takahashi M, Hoshino M. Use of the immune adherence hemagglutination test for titration of breast cancer patients' sea cross-reacting with purified mouse mammary tumor virus. *Gann* 1981;72:98-103.

Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, Fukuhara S, Hino M, Kanamaru A, Ogawa H, Aozasa K. Correlation between promoter hypermethylation of gstp1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 2007;86:557-564.

Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N. Frequent loh on 22q12.3 and timp-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2005;85:165-175.

Nakamura M, Sakaki T, Hashimoto H, Nakase H, Ishida E, Shimada K, Konishi N. Frequent alterations of the p14(ARF) and p16(INK4a) genes in primary central nervous system lymphomas. *Cancer Res* 2001;61:6335-6339.

Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, Kojika S, Shiraishi K, Miyamoto N, Karakida N, Kagami K, T OK, Mori T, Nakazawa S. P16/mts1/INK4a gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. *Leukemia* 1999;13:884-890.

Nakatsuka S, Liu A, Dong Z, Nomura S, Takakuwa T, Miyazato H, Aozasa K. Simian virus 40 sequences in malignant lymphomas in japan. *Cancer Res* 2003;63:7606-7608.

Nakatsuka S, Liu A, Yao M, Takakuwa T, Tomita Y, Hoshida Y, Nishiu M, Aozasa K. Methylation of promoter region in p27 gene plays a role in the development of lymphoid malignancies. *Int J Oncol* 2003;22:561-568.

Nakatsuka S, Takakuwa T, Tomita Y, Miwa H, Matsuzuka F, Aozasa K. Role of hypermethylation of dap-kinase CpG island in the development of thyroid lymphoma. *Lab Invest* 2000;80:1651-1655.

Narayan A, Ji W, Zhang XY, Marrogi A, Graff JR, Baylin SB, Ehrlich M. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1998;77:833-838.

Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, Graff JR. Aberrant methylation of the estrogen receptor and e-cadherin 5' cpg islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:4346-4348.

Ng MH, To KW, Lo KW, Chan S, Tsang KS, Cheng SH, Ng HK. Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1724-1729.

-O-

Ogawa H, Tanaka H. Occurrence of antibody against intracytoplasmic a-particles of mouse mammary tumor virus in sera from breast cancer patients. *Gann* 1978;69:539-544.

Oka T, Ouchida M, Koyama M, Ogama Y, Takada S, Nakatani Y, Tanaka T, Yoshino T, Hayashi K, Ohara N, Kondo E, Takahashi K, Tsuchiyama J, Tanimoto M, Shimizu K, Akagi T. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* 2002;62:6390-6394.

Osawa T, Chong JM, Sudo M, Sakuma K, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Fukayama M. Reduced expression and promoter methylation of p16 gene in epstein-barr virus-associated gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1195-1200.

Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:2552-2555.

Ozdarendeli A, Camci C, Aygen E, Kirkil C, Toroman ZA, Dogru O, Doymaz MZ. SV40 in human thyroid nodules. *J Clin Virol* 2004;30:337-340.

-P-

Pacini F, Vivaldi A, Santoro M, Fedele M, Fusco A, Romei C, Basolo F, Pinchera A. Simian virus 40-like DNA sequences in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1998;16:665-669.

Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B. Infectious agents and cancer: Criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* 2004;14:453-471.

Pani G, Kozlowski M, Cambier JC, Mills GB, Siminovitch KA. Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J Exp Med* 1995;181:2077-2084.

Park JS, Kim EJ, Lee JY, Sin HS, Namkoong SE, Um SJ. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer* 2001;91:822-827.

Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, Prencipe M, Scintu M, Apicella A, Rossiello R, Liguoro G, Seripa D, Gravina C, Rabitti C, Rinaldi M, Nicol T, Tommasi S, Paradiso A, Schittulli F, Altomare V, Fazio VM. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:5349-5354.

Parkin DM, Ferlay J, Hamdi-Cherif M. Cancer in Africa: epidemiology and prevention. IARC Press, Lyon, 2003.

Perkins RS, Sahn K, Marando C, Dickson-Witmer D, Pahnke GR, Mitchell M, Petrelli NJ, Berkowitz IM, Soteropoulos P, Aris VM, Dunn SP, Krueger LJ. Analysis of Epstein-Barr virus reservoirs in paired blood and breast cancer primary biopsy specimens by real time pcr. *Breast Cancer Res* 2006;8:R70.

Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV. Organisation et analyse des essais thérapeutiques comparatifs comportant une longue surveillance des malades. *Rev Epidem Santé Publ* 1979; 27: 167-255.

Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Campo E. P16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;91:2977-2984.

Piva R, Rimondi AP, Hanau S, Maestri I, Alvisi A, Kumar VL, del Senno L. Different methylation of oestrogen receptor DNA in human breast carcinomas with and without oestrogen receptor. *Br J Cancer* 1990;61:270-275.

Pogo BG, Holland JF. Possibilities of a viral etiology for human breast cancer. A review. *Biol Trace Elem Res* 1997;56:131-142.

Pogo BG, Melana SM, Holland JF, Mandeli JF, Pilotti S, Casalini P, Menard S. Sequences homologous to the mouse mammary tumor virus env gene in human breast carcinoma correlate with overexpression of laminin receptor. *Clin Cancer Res* 1999;5:2108-2111.

Porter D, Lahti-Domenici J, Torres-Arzayus M, Chin L, Polyak K. Expression of high in normal-1 (HIN-1) and uteroglobin related protein-1 (UGRP-1) in adult and developing tissues. *Mech Dev* 2002;114:201-204.

Preciado MV, Chabay PA, De Matteo EN, Gonzalez P, Grinstein S, Actis A, Gass HD. Epstein-barr virus in breast carcinoma in argentina. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:377-381.

-Q-

Qiu GH, Tan LK, Loh KS, Lim CY, Srivastava G, Tsai ST, Tsao SW, Tao Q. The candidate tumor suppressor gene BLU, located at the commonly deleted region 3p21.3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 2004;23:4793-4806.

Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu MC, Ehrlich M. Satellite DNA hypomethylation vs. Overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res* 1999;423:91-101.

-R-

Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in NRF2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3410-3415.

Reddy AN, Eisele DW, Forastiere AA, Lee DJ, Westra WH, Califano JA. Neck dissection followed by radiotherapy or chemoradiotherapy for small primary oropharynx carcinoma with cervical metastasis. *Laryngoscope* 2005;115:1196-1200.

Reddy AN, Jiang WW, Kim M, Benoit N, Taylor R, Clinger J, Sidransky D, Califano JA. Death-associated protein kinase promoter hypermethylation in normal human lymphocytes. *Cancer Res* 2003;63:7694-7698.

Remmele W, Stegner HE. [recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologie* 1987;8:138-140.

Rencic A, Gordon J, Otte J, Curtis M, Kovatich A, Zoltick P, Khalili K, Andrews D. Detection of jc virus DNA sequence and expression of the viral oncoprotein, tumor antigen, in brain of immunocompetent patient with oligoastrocytoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7352-7357.

Reuss FU, Coffin JM. Stimulation of mouse mammary tumor virus superantigen expression by an intragenic enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9293-9297.

Reuther FJ, Lohler J, Herms J, Hugo HH, Schindler C, Leithauser F, Melzner I, Moller P, Scheil S. Low incidence of SV40-like sequences in ependymal tumours. *J Pathol* 2001;195:580-585.

Riabykh TP, Malivanova TF, Litvinov SV, Gel'fand EV, Kriukova IN. [correlation of mmtv antibody expression and risk factors of human breast cancer]. *Vopr Onkol* 1996;42:40-45.

Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW. Methylation of the brca1 promoter is associated with decreased brca1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 2000;21:1761-1765.

Richardson A. Is breast cancer caused by late exposure to a common virus? *Med Hypotheses* 1997;48:491-497.

Riquelme E, Tang M, Baez S, Diaz A, Pruyas M, Wistuba, II, Corvalan A. Frequent epigenetic inactivation of chromosome 3p candidate tumor suppressor genes in gallbladder carcinoma. *Cancer Lett* 2007;250:100-106.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL. SEER cancer statistics review, 1973–1999. National Cancer Institute, Bethesda, MD, 2002.

Rizzo P, Di Resta I, Powers A, Ratner H, Carbone M. Unique strains of SV40 in commercial poliovaccines from 1955 not readily identifiable with current testing for sv40 infection. *Cancer Res* 1999;59:6103-6108.

Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 1993;197:176-187.

Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3139-3155.

Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. Dnmt1 forms a complex with rb, E2F1 and hdac1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000;25:338-342.

Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human DNA methyltransferases (Dnmts) 1, 3a and 3b: Coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2291-2298.

Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000;1:11-19.

Robinson C, van Bruggen I, Segal A, Dunham M, Sherwood A, Koentgen F, Robinson BW, Lake RA. A novel SV40 tag transgenic model of asbestos-induced mesothelioma: Malignant transformation is dose dependent. *Cancer Res* 2006;66:10786-10794.

Roizman B, Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes* 2001;8:23-27.

Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:939-942.

Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Bhatia K, Saglio G, Vitolo U, Pileri SA, Esteller M, Carbone A, Gaidano G. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of b-cell neoplasia. *Haematologica* 2004;89:154-164.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3156-3165.

Rudlinger R, Smith IW, Bunney MH, Hunter JA. Human papillomavirus infections in a group of renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 1986;115:681-692.

Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York (USA), 1996: 403-413.

-S-

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986;324:163-166.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.

Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Increased protein expression of DNA methyltransferase (Dnmt) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular

carcinomas. *Int J Cancer* 2003;105:527-532.

Sakuma K, Chong JM, Sudo M, Ushiku T, Inoue Y, Shibahara J, Uozaki H, Nagai H, Fukayama M. High-density methylation of p14ARF and p16INK4a in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004;112:273-278.

Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 2003;170:998-1002.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi x174 DNA. *Nature* 1977;265:687-695.

Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2381-2402.

Sarkola M, Rintala M, Grenman S, Syrjanen S. Human papillomavirus DNA detected in breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:557-558.

Sarmanova J, Benesova K, Gut I, Nedelcheva-Kristensen V, Tynkova L, Soucek P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with hodgkin's and non-hodgkin's lymphomas. *Hum Mol Genet* 2001;10:1265-1273.

Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Greenberg MD, Lorincz AT. HPV DNA testing in cervical cancer screening: Results from women in a high-risk province of costa rica. *JAMA* 2000;283:87-93.

Schlom J, Spiegelman S, Moore D. RNA-dependent DNA polymerase activity in virus-like particles isolated from human milk. *Nature*. 1971; 231:97-100.

Schultz ER, Rankin GW, JR, Blanc MP, Raden BW, Tsai CC, Rose TM. Characterization of two divergent lineages of macaque rhadinoviruses related to kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 2000;74:4919-4928.

Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, Buchardt M, Seifert HH, Visakorpi T. Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;35:58-65.

Schwartz D. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion Médecine Sciences 3ème éd. Paris, 1969, 314.

Schwartz LH, Koerner FC, Edgerton SM, Sawicka JM, Rio MC, Bellocq JP, Chambon P, Thor AD. PS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1991;51:624-628.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-114.

Secchiero P, Bonino LD, Lusso P, Abele MC, Reato G, Kerim S, Palestro G, Zauli G, Valente G. Human herpesvirus type 7 in hodgkin's disease. *Br J Haematol* 1998;101:492-499.

Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded e1 protein contains multiple activities required for bpv DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:702-706.

Serraino D, Piselli P, Scognamiglio P. Viral infections and cancer: Epidemiological aspects. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:224-228.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin d/cdk4. *Nature* 1993;366:704-707.

Sevenet N, Cottu PH. [breast carcinoma and genomic technology: Contribution of DNA microarrays]. *Bull Cancer* 2004;91 Suppl 4:S226-231.

Shah K.V. Polyomavirus. *Virology*, 2nd Edition. (Eds B.N. FIELDS, D.M. KNIPE et al. Raven Press, Ltd., New York, pp: 1609-1623, 1990.

Shah KV. SV40 and human cancer: A review of recent data. *Int J Cancer* 2007;120:215-223.

Shah KV, Hudson C, Valis J, Strandberg JD. Experimental infection of human foreskin cultures with BK virus, a human papovavirus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976;153:180-186.

Shah KV, Rollison DE. Investigation of the sv40-human cancer association: Look for the full signature of the virus. *Dis Markers* 2001;17:159-161.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-1677.

Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 2000;96:73-92.

Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11:2156-2162.

Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11:2156-2162.

Shiozawa E, Takimoto M, Makino R, Adachi D, Saito B, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, Shimozuma J, Maeda T, Kohno Y, Kawakami K, Nakamaki T, Tomoyasu S, Shiokawa A, Ota H. Hypermethylation of cpg islands in p16 as a prognostic factor for diffuse large b-cell lymphoma in a high-risk group. *Leuk Res* 2006;30:859-867.

Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The rassf1a tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin d1 accumulation. *Mol Cell Biol* 2002;22:4309-4318.

Shivapurkar N, Harada K, Reddy J, Scheuermann RH, Xu Y, McKenna RW, Milchgrub S, Kroft SH, Feng Z, Gazdar AF. Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas. *Lancet* 2002;359:851-852.

Shivapurkar N, Takahashi T, Reddy J, Zheng Y, Stastny V, Collins R, Toyooka S, Suzuki M, Parikh G, Asplund S, Kroft SH, Timmons C, McKenna RW, Feng Z, Gazdar AF. Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphoid and hematopoietic malignancies and their relationship to aberrant promoter methylation of multiple genes. *Cancer Res* 2004;64:3757-3760.

Shuyama K, Castillo A, Aguayo F, Sun Q, Khan N, Koriyama C, Akiba S. Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in china. *Br J Cancer* 2007;96:1554-1559.

Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin d2 is an fsh-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996;384:470-474.

Sieber OM, Tomlinson IP, Lamlum H. The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor-genetics, function and disease. *Mol Med Today* 2000;6:462-469.

- Singal R, Ferdinand L, Reis IM, Schlesselman JJ.** Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. *Oncol Rep* 2004;12:631-637.
- Singal R, Ginder GD.** DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-4070.
- Sirchia SM, Ferguson AT, Sironi E, Subramanyan S, Orlandi R, Sukumar S, Sacchi N.** Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. *Oncogene* 2000;19:1556-1563.
- Slamon DJ.** The future of ERBB-1 and ERBB-2 pathway inhibition in breast cancer: Targeting multiple receptors. *Oncologist* 2004;9 Suppl 3:1-3.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL.** Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A.** Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712.
- Smith E, De Young NJ, Tian ZQ, Caruso M, Ruszkiewicz AR, Liu JF, Jamieson GG, Drew PA.** Methylation of timp3 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;14:203-210.
- Smith RD, Galla JH, Skahan K, Anderson P, Linnemann CC, Jr., Ault GS, Ryschkewitsch CF, Stoner GL.** Tubulointerstitial nephritis due to a mutant polyomavirus bk virus strain, BKV(CIN), causing end-stage renal disease. *J Clin Microbiol* 1998;36:1660-1665.
- Smorodinsky NI, Argov S, Ghendles Y, Bakimer R, Krup M, Lupu R, Keydar I, Shoenfeld Y.** Human monoclonal antibodies derived from pleural effusion lymphocytes of a patient with breast carcinoma react with human breast cancer-associated antigens and mouse mammary tumor virus polypeptides. *Exp Cell Biol* 1987;55:237-249.
- Soejima K, Fang W, Rollins BJ.** DNA methyltransferase 3b contributes to oncogenic transformation induced by sv40t antigen and activated ras. *Oncogene* 2003;22:4723-4733.
- Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H, Kim JW, Choi EJ, Kirschner MW, Lim DS.** The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-CDC20 complex. *Nat Cell Biol* 2004;6:129-137.
- Soubeyran I, Quenel N, Coindre JM, Bonichon F, Durand M, Wafflart J, Mauriac L.** PS2 protein: A marker improving prediction of response to neoadjuvant tamoxifen in post-menopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 1996;74:1120-1125.
- Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, d'Agay MF, Clauvel JP, Raphael M, Degos L.** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric castlemans disease. *Blood* 1995;86:1276-1280.
- Soussi T, May P.** Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: A second look. *J Mol Biol* 1996;260:623-637.
- Stewart TH, Sage RD, Stewart AF, Cameron DW.** Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, mus domesticus. *Br J Cancer* 2000;82:446-451.
- Stratton K, Almario DA, McCormick MC.** **Immunization Safety Review.** SV40 Contamination of Polio Vaccine and Cancer. The National Academies Press: Washington, DC, 2003.
- Strickler HD.** A multicenter evaluation of assays for detection of SV40 DNA and results in masked mesothelioma specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:523-532.
- Strickler HD, Goedert JJ, Fleming M, Travis WD, Williams AE, Rabkin CS, Daniel RW, Shah KV.** Simian virus 40 and pleural mesothelioma in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:473-475.
- Sudo M, Chong JM, Sakuma K, Ushiku T, Uozaki H, Nagai H, Funata N, Matsumoto Y, Fukayama M.** Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in epstein-barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004;109:194-199.
- Sui LF, Williamson J, Lowenthal RM, Parker AJ.** Absence of simian virus 40 (SV40) DNA in lymphoma samples from tasmania, australia. *Pathology* 2005;37:157-159.
- Suzuki M, Toyooka S, Shivapurkar N, Shigematsu H, Miyajima K, Takahashi T, Stastny V, Zern AL, Fujisawa T, Pass HI, Carbone M, Gazdar AF.** Aberrant methylation profile of human malignant mesotheliomas and its relationship to SV40 infection. *Oncogene* 2005;24:1302-1308.
- Sweet BH, Hilleman MR.** The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960;105:420-427.

-T-

- Tabbane F, el May A, Hachiche M, Bahi J, Jaziri M, Cammoun M, Mourali N.** Breast cancer in women under 30 years of age. *Breast Cancer Res Treat* 1985;6:137-144.
- Takahashi T, Shivapurkar N, Reddy J, Shigematsu H, Miyajima K, Suzuki M, Toyooka S, Zochbauer-Muller S, Drach J, Parikh G, Zheng Y, Feng Z, Kroft SH, Timmons C, McKenna RW, Gazdar AF.** DNA methylation profiles of lymphoid and hematopoietic malignancies. *Clin Cancer Res* 2004;10:2928-2935.
- Takeichi M.** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251:1451-1455.
- Takino H, Okabe M, Li C, Ohshima K, Yoshino T, Nakamura S, Ueda R, Eimoto T, Inagaki H.** P16/INK4a gene methylation is a frequent finding in pulmonary malt lymphomas at diagnosis. *Mod Pathol* 2005;18:1187-1192.
- Tavassoli FA, Davilee P.** Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon, 2003.
- Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, Belanger C, Bell R, Berry S, Bogden R, Chen Q, Davis T, Dumont M, Frye C, Hattier T, Jammulapati S, Janecki T, Jiang P, Kehrer R, Leblanc JF, Mitchell JT, McArthur-Morrison J, Nguyen K, Peng Y, Samson C, Schroeder M, Snyder SC, Steele L, Stringfellow M, Stroup C, Swedlund B, Swense J, Teng D, Thomas A, Tran T, Tranchant M, Weaver-Feldhaus J, Wong AK, Shizuya H, Eyfjord JE, Cannon-Albright L, Labrie F, Skolnick MH, Weber B, Kamb A, Goldgar DE.** The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 1996;12:333-337.
- Tchou JC, Lin X, Freije D, Isaacs WB, Brooks JD, Rashid A, De Marzo AM, Kanai Y, Hirohashi S, Nelson WG.** GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2000;16:663-676.
- Tekmal RR, Keshava N.** Role of MMTV integration locus cellular genes in breast cancer. *Front Biosci* 1997;2:d519-526.
- Telenti A, Marshall WF, Smith TF.** Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:2187-2190.
- Testa JR, Carbone M, Hirvonen A, Khalili K, Krynska B, Linnainmaa K, Pooley FD, Rizzo P, Rusch V, Xiao GH.** A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas. *Cancer Res* 1998;58:4505-4509.
- Testa JR, Giordano A.** SV40 and cell cycle perturbations in malignant mesothelioma. *Semin Cancer Biol* 2001;11:31-38.
- Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ, Honchel R, Halling KC.** Altered expression of hms2 and hmlh1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996;56:4836-4840.
- Thomas M, Pim D, Banks L.** The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of hpv. *Oncogene* 1999;18:7690-7700.
- Thompson D, Easton D.** The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9:221-236.
- Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R, Munger K.** The hpv E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene* 2001;20:3629-3640.
- Thorne LB, Ryan JL, Elmore SH, Glaser SL, Gulley ML.** Real-time pcr measures epstein-barr virus DNA in archival breast adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2005;14:29-33.
- Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB, Rose C.** Association between high concentrations of MR 52,000 cathepsin d and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49:6008-6014.
- Toi M, Tominaga T, Osaki A, Toge T.** Role of epidermal growth factor receptor expression in primary breast cancer: Results of a biochemical study and an immunocytochemical study. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:51-58.
- Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, Wang Y, Liu L, Tsark WM, Wilczynski SP, Li J, You M, Pfeifer GP.** Tumor susceptibility of rassfla knockout mice. *Cancer Res* 2005;65:92-98.
- Topp WC, Rifkin DB, Sleigh MJ.** SV40 mutants with an altered small-t protein are tumorigenic in newborn hamsters. *Virology* 1981;111:341-350.

Torrisani J, Lopez F. Methylation de l'AND et régulation épigénétique des cancers. *Hépatogastro* 2003; 6: 455-467.

Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003;22:7369-7375.

Toyooka S, Carbone M, Toyooka KO, Bocchetta M, Shivapurkar N, Minna JD, Gazdar AF. Progressive aberrant methylation of the rasfla gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene* 2002;21:4340-4344.

Toyooka S, Pass HI, Shivapurkar N, Fukuyama Y, Maruyama R, Toyooka KO, Gilcrease M, Farinas A, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant methylation and simian virus 40 tag sequences in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 2001;61:5727-5730.

Toyooka S, Toyooka KO, Miyajima K, Reddy JL, Toyota M, Sathyanarayana UG, Padar A, Tockman MS, Lam S, Shivapurkar N, Gazdar AF. Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:3034-3041.

Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, Chang HY, Chang YS. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10084-10089.

Tsai JH, Tsai CH, Cheng MH, Lin SJ, Xu FL, Yang CC. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J Med Virol* 2005;75:276-281.

Tsubura A, Morii S. [review: Transmission of mouse mammary tumor virus (MMTV) and its tumorigenesis-comparison between mouse mammary tumor system and human breast cancer]. *Jikken Dobutsu* 1992;41:111-121.

Tsuda H, Takarabe T, Kanai Y, Fukutomi T, Hirohashi S. Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. *Am J Pathol* 2002;161:859-866.

Tubiana M, Koscielny S. [natural history of human cancer and prognostic factors. The example of breast cancer]. *Bull Cancer* 1987;74:43-57.

Tubiana M, Koscielny S. The natural history of breast cancer: Implications for a screening strategy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:1117-1120.

-U-

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

-V-

Van Landuyt H, Mouglin C, Drobacheff C, Bernard C, Merle C, Lab M, Laurent R. [anogenital papillomavirus lesions in humans with or without hiv infection. Comparison of colposcopic, histopathological and virological results]. *Ann Dermatol Venereol* 1993;120:281-286.

Vanchiere JA, White ZS, Butel JS. Detection of BK virus and simian virus 40 in the urine of healthy children. *J Med Virol* 2005;75:447-454.

Vicent GP, Ballare C, Zaurin R, Saragueta P, Beato M. Chromatin remodeling and control of cell proliferation by progestins via cross talk of progesterone receptor with the estrogen receptors and kinase signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:59-72.

Vilchez RA, Butel JS. Re: Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:633; author reply 633-634.

Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, Madden CR, Butel JS. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med* 2003a;114:675-684.

Vilchez RA, Kozinetz CA, Butel JS. Conventional epidemiology and the link between SV40 and human cancers. *Lancet Oncol* 2003b;4:188-191.

Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA, Halvorson SJ, White ZS, Jorgensen JL, Finch CJ, Butel JS. Association between simian virus 40 and non-hodgkin lymphoma. *Lancet* 2002;359:817-823.

Virmani A, Rathi A, Heda S, Sugio K, Lewis C, Tonk V, Takahashi T, Roth JA, Minna JD, Euhus DM, Gazdar AF. Aberrant methylation of the cyclin D2 promoter in primary small cell, nonsmall cell lung and breast cancers. *Int J Cancer* 2003;107:341-345.

Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunningham HT, Farinas AJ, Milchgrub S, Euhus DM, Gilcrease M, Herman J, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1a in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:1998-2004.

Vivaldi A, Pacini F, Martini F, Iaccheri L, Pezzetti F, Elisei R, Pinchera A, Faviana P, Basolo F, Tognon M. Simian virus 40-like sequences from early and late regions in human thyroid tumors of different histotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:892-899.

Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ. Ras uses the novel tumor suppressor rassf1 as an effector to mediate apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:35669-35672.

Vos MD, Martinez A, Ellis CA, Vallecorsa T, Clark GJ. The pro-apoptotic ras effector norel may serve as a ras-regulated tumor suppressor in the lung. *J Biol Chem* 2003;278:21938-21943.

Voso MT, Gumiero D, D'Alo F, Guidi F, Mansueto G, Di Febo AL, Massini G, Martini M, Larocca LM, Hohaus S, Leone G. Dap-kinase hypermethylation in the bone marrow of patients with follicular lymphoma. *Haematologica* 2006;91:1252-1256.

-W-

Wachsman JT. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: Relation to carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;375:1-8.

Walsh JW, Zimmer SG, Perdue ML. Role of viruses in the induction of primary intracranial tumors. *Neurosurgery* 1982;10:643-662.

Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 1985;43:831-840.

Wang Y, Go V, Holland JF, Melana SM, Pogo BG. Expression of mouse mammary tumor virus-like env gene sequences in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:2565-2568.

Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana S, Liu X, Pelisson I, Cantarella A, Stellrecht K, Mani S, Pogo BG. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:5173-5179.

Wang Y, Jiang JD, Xu D, Li Y, Qu C, Holland JF, Pogo BG. A mouse mammary tumor virus-like long terminal repeat superantigen in human breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:4105-4111.

Wang Y, Melana SM, Baker B, Bleiweiss I, Fernandez-Cobo M, Mandeli JF, Holland JF, Pogo BG. High prevalence of mmtv-like env gene sequences in gestational breast cancer. *Med Oncol* 2003;20:233-236.

Wang Y, Pelisson I, Melana SM, Go V, Holland JF, Pogo BG. MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. *Arch Virol* 2001;146:171-180.

Wang Y, Pelisson I, Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Detection of MMTV-like ltr and ltr-env gene sequences in human breast cancer. *Int J Oncol* 2001;18:1041-1044.

Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V. immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3687-3691.

Weggen S, Bayer TA, von Deimling A, Reifemberger G, von Schweinitz D, Wiestler OD, Pietsch T. Low frequency of SV40, JC and BK polyomavirus sequences in human medulloblastomas, meningiomas and ependymomas. *Brain Pathol* 2000;10:85-92.

Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer-a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:255-265.

White MK, Khalili K. Polyomaviruses and human cancer: Molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology* 2004;324:1-16.

Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Mueller-Holzner E, Marth C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *J Clin Virol* 2004;31:292-297.

Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Muller HM, Amberger A, Zeschnigk M, Widschwendter A, Abendstein B, Zeimet AG, Daxenbichler G, Marth C. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:826-832.

Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:5462-5482.

Wiernik PH, Etkind PR. Is mouse mammary tumor virus an etiologic agent of human breast cancer and lymphoma? *South Med J* 2006;99:108-110.

Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000;87:992-1005.

Wildeman AG. Regulation of SV40 early gene expression. *Biochem Cell Biol* 1988;66:567-577.

Wiley A, Katsaros D, Fracchioli S, Yu H. Methylation of the insulin-like growth factor binding protein-3 gene and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:210-218.

Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:138-162.

Wiseman C. Breast cancer and mouse mammary tumor virus. *Ann Intern Med* 1983;99:411.

Witkin SS, Egeli RA, Sarkar NH, Good RA, Day NK. Virolysis of mouse mammary tumor virus by sera from breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:2984-2987.

Witkin SS, Sarkar NH, Kinne DW, Good RA, Day NK. Antibodies reactive with the mouse mammary tumor virus in sera of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1980;25:721-725.

Witt A, Hartmann B, Marton E, Zeillinger R, Schreiber M, Kubista E. The mouse mammary tumor virus-like env gene sequence is not detectable in breast cancer tissue of austrian patients. *Oncol Rep* 2003;10:1025-1029.

Wong N, Lam WC, Lai PB, Pang E, Lau WY, Johnson PJ. Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159:465-471.

Wong NA, Rae F, Herriot MM, Mayer NJ, Brewster DH, Harrison DJ. Sv40 tag DNA sequences, present in a small proportion of human hepatocellular carcinomas, are associated with reduced survival. *J Clin Pathol* 2003;56:904-909.

Wong TS, Chang HW, Tang KC, Wei WI, Kwong DL, Sham JS, Yuen AP, Kwong YL. High frequency of promoter hypermethylation of the death-associated protein-kinase gene in nasopharyngeal carcinoma and its detection in the peripheral blood of patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:433-437.

Wong TS, Tang KC, Kwong DL, Sham JS, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol* 2003;22:869-874.

Wrede D, Luqmani YA, Coombes RC, Vousden KH. Absence of hvp 16 and 18 DNA in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;65:891-894.

Wu C, Guan Q, Wang Y, Zhao ZJ, Zhou GW. Shp-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of jak kinases. *J Cell Biochem* 2003;90:1026-1037.

-X-

Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human dnmt3 gene family. *Gene* 1999;236:87-95.

Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:3441-3454.

Xue SA, Lampert IA, Haldane JS, Bridger JE, Griffin BE. Epstein-Barr virus gene expression in human breast cancer: Protagonist or passenger? *Br J Cancer* 2003;89:113-119.

-Y-

Yamamoto H, Nakayama T, Murakami H, Hosaka T, Nakamata T, Tsuboyama T, Oka M, Nakamura T, Toguchida J. High incidence of sv40-like sequences detection in tumour and peripheral blood cells of japanese osteosarcoma patients. *Br J Cancer* 2000;82:1677-1681.

Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, Kurata T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988;1:1065-1067.

Yan L, Yang X, Davidson NE. Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:183-192.

Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Kanauchi N, Endoh M, Sadahiro M, Motoyama T. Promoter hypermethylation of rassf1a and runx3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2007;58:131-138.

Yang DF, Zhu HF, Shen GX, Tian DY. [the construction of transferrin receptor- mediated hsv-tk gene transfer system and its effect on human hepatocellular carcinoma cells in vitro]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:88-91.

Yang J, Cheng Z, Niu T, Liang X, Zhao ZJ, Zhou GW. Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase shp-1. *J Biol Chem* 2000;275:4066-4071.

Yang J, Cheng Z, Niu T, Liang X, Zhao ZJ, Zhou GW. Protein tyrosine phosphatase shp-1 specifically recognizes c-terminal residues of its substrates via helix alpha0. *J Cell Biochem* 2001;83:14-20.

Yang J, Liang X, Niu T, Meng W, Zhao Z, Zhou GW. Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase shp-1. *J Biol Chem* 1998;273:28199-28207.

Yang J, Liu L, He D, Song X, Liang X, Zhao ZJ, Zhou GW. Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase shp-1. *J Biol Chem* 2003;278:6516-6520.

Yasmeen A, Bismar TA, Kandouz M, Foulkes WD, Desprez PY, Al Moustafa AE. E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. *Cell Cycle* 2007;6:2038-2042.

Yeo S, Lee KK, Han YM, Kang YK. Methylation changes of lysine 9 of histone h3 during preimplantation mouse development. *Mol Cells* 2005;20:423-428.

Yi Lo PH, Chung Leung AC, Xiong W, Law S, Duh FM, Lerman MI, Stanbridge EJ, Lung ML. Expression of candidate chromosome 3p21.3 tumor suppressor genes and down-regulation of BLU in some esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2006;234:184-192.

Yin H, Medstrand P, Kristofferson A, Dietrich U, Aman P, Blomberg J. Characterization of human mmtv-like (hml) elements similar to a sequence that was highly expressed in a human breast cancer: Further definition of the hml-6 group. *Virology* 1999;256:22-35.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997;13:335-340.

Yost K, Perkins C, Cohen R, Morris C, Wright W. Socioeconomic status and breast cancer incidence in california for different race/ethnic groups. *Cancer Causes Control* 2001;12:703-711.

Yu D, Hung MC. Overexpression of erbb2 in cancer and erbb2-targeting strategies. *Oncogene* 2000;19:6115-6121.

Yu D, Liu B, Jing T, Sun D, Price JE, Singletary SE, Ibrahim N, Hortobagyi GN, Hung MC. Overexpression of both p185c-erbb2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene* 1998;16:2087-2094.

Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in chinese and japanese populations. *Anticancer Res* 1999;19:5057-5061.

Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in chinese. *Breast Cancer* 2000;7:33-36.

-Z-

Zammarchi F, Pistello M, Piersigilli A, Murr R, Di Cristofano C, Naccarato AG, Bevilacqua G. MMTV-like sequences in human breast cancer: A fluorescent pcr/laser microdissection approach. *J Pathol* 2006;209:436-444.

Zapata-Benavides P, Saavedra-Alonso S, Zamora-Avila D, Vargas-Rodarte C, Barrera-Rodriguez R, Salinas-Silva J, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra R, Trejo-Avila L. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast cancer samples of mexican women. *Intervirology* 2007;50:402-407.

Zhang L, Nikkari S, Skurnik M, Ziegler T, Luukkainen R, Mottonen T, Toivanen P. Detection of herpesviruses by polymerase chain reaction in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1080-1086.

Zhang Q, Wang HY, Marzec M, Raghunath PN, Nagasawa T, Wasik MA. STAT3 and DNA methyltransferase-1 mediated epigenetic silencing of shp-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant t lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6948-6953.

Zhen HN, Zhang X, Bu XY, Zhang ZW, Huang WJ, Zhang P, Liang JW, Wang XL. Expression of the simian virus 40 large tumor antigen (tag) and formation of tag-p53 and tag-prb complexes in human brain tumors. *Cancer* 1999;86:2124-2132.

Zhu Q, Maitra U, Johnston D, Lozano M, Dudley JP. The homeodomain protein cdp regulates mammary-specific gene transcription and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2004;24:4810-4823.

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

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

Annexes

Annexe 1

Evidence for a role of the Simian Virus 40 in human breast carcinomas

M. Hachana · M. Trimeche · S. Ziadi ·
K. Amara · S. Korbi

Received: 27 November 2007 / Accepted: 7 January 2008 / Published online: 18 January 2008
© Springer Science+Business Media, LLC. 2008

Abstract *Aims of the study* The aim of this study was to investigate whether the Simian Virus 40 (SV40) is implicated in human breast carcinomas (BC). *Experimental design* SV40 presence was investigated by PCR assays targeting the Tag, the regulatory, and the VP1 regions in 109 invasive breast ductal carcinomas from Tunisian women. We also examined the relationship between the presence of SV40 and promoter methylation status of 15 tumor-related genes. Immunohistochemistry was used to investigate the expression of Tag, estrogen and progesterone receptors, HER2, and P53. *Results* SV40 DNA sequences were detected in 22% of tumors and in only 1.8% of the matched non-tumoral tissues. Using immunohistochemistry, SV40 was detected in the tumor cells. Hypermethylation frequencies were 78% for *RASSF1A*, 66% for *SHP1*, 61% for *HIN1* and *BRCA1*, 47% for *P16* and *ER*, 42% for *CDH1* and *APC*, 40% for *BLU*, 35% for *DAPK*, 34% for *RARβ2*, 27% for *GSTP1*, 17% for *TIMP3*, 14% for *CCND2*, and 8% for *hMLH1*. Interestingly, the frequencies of *RASSF1A*, *SHP1*, *BRCA1*, and *TIMP3* methylation, and the mean of the methylation index (MI) were significantly higher in SV40-positive than in SV40-negative cases (*P*-values ranging from 0.043 to 0.003). Moreover, SV40 presence correlates with P53 protein accumulation (32.7% vs. 13.3%; *P* = 0.015) and HER2 low expression (3.7% vs. 28%; *P* = 0.008). We also found SV40 more frequently in patients over 50 years than in younger patients (34.8% vs. 12.3%; *P* = 0.006). *Conclusions* This study is the first to demonstrate the presence of

SV40 in human BC and provides data supporting a role for this virus in the pathogenesis of these tumors.

Keywords BRCA1 · HER2 · Human breast carcinomas · Methylation · P53 · Simian Virus 40 · TIMP3 · Tumor suppressor genes · Tunisia

Introduction

Breast carcinoma (BC) is the most common women's cancer worldwide with more than 800,000 new cases diagnosed every year [1]; it represents a significant health problem worldwide and a major cause of cancer mortality among women [2, 3]. Several risk factors are known, such as age, length of reproductive life, nulliparity, obesity, and so on [4]. Unfortunately, no etiological factor has been identified in human BC, with the exception of the hereditary transmission of some predisposing genes, such as the BRCA genes, accounting for 5–10% of cases [5].

The relationship between viruses and BC is known from induction of mammary cancer in mice by the mouse mammary tumor virus [6, 7]. Particles similar to this mouse virus were also identified in human BC, indicating a possible viral etiology in human BC [8]. Others have reported that Epstein-Barr virus might be associated with the pathogenesis of sporadic cases of human BC [9], but this association remains to date a controversial subject.

Simian Virus 40 (SV40), which belongs to the polyomavirus family, is able to induce various specific tumor types in hamsters and other rodents, and to transform cells from different species, including normal human cells, into cells with a neoplastic phenotype [10]. Over the last several years, different laboratories have reported the presence of SV40 in several types of human tumors, including brain

M. Hachana · M. Trimeche (✉) · S. Ziadi · K. Amara ·
S. Korbi
Department of Pathology, Farhat Hached Hospital,
4000 Sousse, Tunisia
e-mail: m_trimech@yahoo.fr

tumors [11], pleural mesothelioma [12], osteosarcomas [13], lymphomas [14, 15], hepatocellular carcinoma [16], and papillary thyroid carcinoma [17]. The oncogenic potential of SV40 is mediated by the T antigen (Tag) that promote cellular transformation through the interaction and functionally inactivation of P53 [18] and Rb [19], two tumor-suppressor genes critical for cell growth, leading to: abnormalities in cell-cycle regulation, increased cellular proliferation, and defects in the activation of apoptosis pathways.

Several observations point towards a possible similar link between SV40 and human BC. In transgenic mouse models of BC, such the C3(1)/SV40 Tag mouse model, the SV40 Tag is expressed under the regulatory control of the rat prostatic steroid binding protein C3(1) promoter. This promoter targets expression in both the prostate in male mice and mammary gland in female mice. The inactivation of P53 and Rb by SV40 Tag in this model results in spontaneous development of mammary carcinomas, resembling human breast cancers, in 100% of female mice carrying the transgene [20]. In cell culture models, the introduction of three genes encoding for: the SV40 Tag, the telomerase catalytic subunit, and the H-RAS oncoprotein into primary human mammary epithelial cells induces a full oncogenic transformation [21].

Promoter methylation and the associated phenomenon of histone deacetylation are epigenetic changes in chromatin structure that do not alter the DNA sequence and can cause inactivation of genes [22]. Aberrant promoter methylation can inactivate tumor-suppressor genes and can promote tumor development and/or progression including BC [23]. Recent studies have reported a correlation between promoter hypermethylation of several tumor-suppressor genes and the presence of SV40 DNA in leukemias, lymphomas [24], and malignant mesotheliomas [25, 26]. In our recent publication, we have also demonstrated a correlation between methylation of many tumor-suppressor genes and SV40 in human large B-cell lymphomas [15]. These data suggest that SV40 might contribute to DNA methylation and inactivation of tumor-suppressor genes.

The aim of this study is to investigate the probable association of SV40 with human BC. We examined the possible SV40 DNA presence by polymerase chain reaction (PCR), targeting three different regions in the SV40 genome, in a series of a 109 human sporadic BC from Tunisia. Expression of SV40 Tag oncoprotein, P53, HER2, estrogen receptor (ER), and progesterone receptor (PgR) was examined by immunohistochemistry. We also studied the correlation between the SV40 status and the methylation status of a panel of 15 tumor-suppressor and -related genes known or suspected to be altered by hypermethylation in several cancers including BC. These tested genes

included those involved in: cell-cycle regulation (*P16*, *CCND2*, and *RASSF1A*) [27–29], cell adhesion and invasion (*CDH1*, *APC*, and *TIMP3*) [30–32], DNA repair and detoxification (*BRCA1*, *hMLH1*, and *GSTP1*) [32–34], apoptosis (*DAPK*) [35], cell differentiation (*SHP1* and *HIN1*) [36, 37], cell growth inhibition (*BLU*) [38], and hormone receptor-mediated cell signaling (*ER* and *RAR β 2*) [39, 40].

Materials and methods

Patients and samples

The study was approved by the institutional review board of the Farhat-Hached Hospital (Comité d'éthique et de Recherche du CHU Farhat-Hached). Frozen human tissue samples from 109 invasive ductal carcinomas were selected from the breast cancer samples collected between 1995 and 2006 in the tissue bank of the Department of Pathology, Farhat-Hached Hospital of Sousse, Tunisia. Cases were selected on the basis of availability of paired tumor and normal breast frozen tissue samples obtained at the time of primary surgery. All samples were from Tunisian women who lived in the central region of Tunisia. Their age at diagnosis ranged from 31 to 87 years, with a mean of 49.2 and a median of 47. Slides from each case were reviewed by two pathologists (MT and SZ) to ensure the histological diagnosis and to choose the most representative paraffin blocks for immunohistochemical study. All cases were graded according to the modified Scarff-Bloom–Richardson system [41]. The clinical stage of the disease was determined according to the Tumor–Node–Metastasis (TNM) classification of the International Union Against Cancer (UICC, [42, 5th edn]). Clinical pathological data (age, histological grade, tumor size, and lymph node status) are summarized in Table 1.

DNA extraction

For each case, DNA extraction was performed separately from frozen tumor and normal breast tissues using a standard protocol [43]. Briefly, 10–20 cryostat sections (10 μ m thick) of each sample were treated overnight at 56°C with digestion solution containing proteinase K (200 μ g/ml), followed by extraction with a mixture of phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1). DNA was precipitated with ethanol/sodium chloride (0.2 M), resuspended in sterile distilled water, and was immediately quantified on a 6131 Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) and stored at –20°C. To avoid contamination between different specimens special care was taken by changing gloves

Table 1 Clinicopathological characteristics of the 109 Tunisian women with invasive breast ductal carcinoma

Variable	Number of cases (%)
Age (years)	
≤50	63 (57.8)
>50	46 (42.2)
Histological grade ^a	
Grade I	24 (22)
Grade II	41 (37.6)
Grade III	44 (40.4)
Tumor size (mm)	
≤20	24 (22)
>20	85 (78)
Lymph node metastases ^b	
Negative	69 (77.5)
Positive	20 (22.5)
Estrogen receptor ^c	
Negative	62 (56.9)
Positive	47 (43.1)
Progesterone receptor ^c	
Negative	57 (52.3)
Positive	52 (47.7)
P53 ^c	
Negative	60 (55)
Positive	49 (45)
HER2 ^d	
Negative	82 (75.2)
Positive	27 (24.8)

^a Scarff-Bloom and Richardson classification

^b Pathological nodal status was missing in 20 cases

^c Evaluated by immunohistochemistry, and considered positive if >10% of tumor cells showed nuclear staining

^d Evaluated by immunohistochemistry, and considered positive if scored 2+ or 3+ as described in the 'Materials and methods' section

before each cutting. The knife and specimen holder of the cryostat were washed several times with absolute alcohol between each cutting, and knife was changed between each two tissue sample cutting.

Detection of SV40 DNA

Extracted DNAs were first assessed for their suitability for PCR analysis by a control reaction designed to amplify a fragment of 407-base paired (bp) of the β -globin gene, as described previously [44]. Then, all tumor and matched normal DNA samples were screened for the presence of SV40 DNA with a set of primers SVTAGP1 [nucleotide (nt) 4,388–4,413] and SVTAGP3 (nt 4,496–4,513) amplifying a 126-bp fragment of the Tag region specific for SV40 [45]. PCR amplification was performed using 400 ng

of DNA template in a total volume of 25 μ l, containing 0.2 μ M of each sense and antisense primers, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM of each dNTP, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, USA) in a PTC 200TM DNA engine thermal cycler (MJ Research, Watertown, USA). Cycling conditions were the same as those described in our previous report [15]. All steps of the PCR procedure were conducted in parallel with positive and negative controls.

The positive control used was the pSVSph21-N plasmid containing the whole SV40 genome (gift from Dr. Regis A. Vilchez, Baylor College of Medicine, Houston, USA). Negative controls were reactions without added DNA template. Positive control plasmid was added to the control PCR reactions outside the clean room after tubes containing test DNA were closed. The negative controls were always the final samples in a series to verify that no contamination had occurred during the analysis. PCR products were then electrophoresed on a 2% agarose gel containing ethidium bromide and visualized under ultra-violet light using the Gel Doc 2000 System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Each sample was tested four times. Samples were considered to contain SV40 DNA if they exhibit detectable signals at least three times under ethidium bromide staining conditions. To confirm the SV40 specificity of the amplified sequences, PCR products were transferred to a positively charged nylon membranes (Hybond N+; Amersham, Buckinghamshire, UK) using the Trans-Blot SD semi-dry Transfert Cell (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions, and hybridized overnight at 42°C with the SVPROBE2 (nt 4,458–4,479) internal digoxigenin (DIG)-labeled oligoprobe specific for the targeted SV40 Tag sequence. The oligoprobe were labeled with the DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions. Staining reaction was developed overnight with nitroblue tetrazolium chloride (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine salt (BCIP) in the dark without shaking or stirring.

To be sure that SV40 DNA is specifically detected; two additional sets of forward and reverse primer that amplify other regions of the SV40 genome were used [17]. The set of primers RA1 (nt 266–245) and RA2 (nt 5,195–5,218) targets the SV40 regulatory region; it allows the distinction between archetypal SV40 strains containing, only a 72-bp insert motif (expected size of PCR product 242 bp), and laboratory-adapted SV40 strains, with duplicated 72-bp insert sequence (expected size of PCR product 314 bp) [46, 47]. The set of primers LA1 (nt 2,251–2,274) and LA2 (nt 2,545–2,522) amplify a 294-bp sequence in the VP1 gene encoding the major capsid protein of the virus. PCR conditions were the same that those described for the Tag region.

Furthermore, to rule out a possible contamination of our samples by plasmids containing SV40 sequences, a primer pair (5'-GCTCACGCTGTAGGTATCTC-3' and 5'-TCTAGTGTAGCCGTAGTTAG-3') previously described by Carbone et al. [48] was used. This primer pair amplifies a 241-bp fragment of the pUC origin of replication present in many common laboratory plasmid vectors containing SV40 genome. PCR reactions were performed in the same conditions as those used for primer set SVTAGP1/SVTAGP3.

Methylation-specific PCR

A panel of 15 known tumor-suppressor and -related genes was assessed for their methylation status using methylation-specific PCR (MSP): *RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RARβ2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2*, and *hMLH1*.

Sodium bisulfite treatment on genomic DNA from each tumoral sample was performed as we previously described by our laboratory [15]. The modified DNA was used as a template for MSP amplifications with primers specific for either the methylated or modified unmethylated promoter sequences. Primers sequences and PCR conditions were previously described (Table 2). Before the analysis of the methylation status of the target genes, the presence of bisulfite modified DNA in each sample was determined by amplification of 133-bp DNA fragment of the *β-actin* gene, using a primer set [49] which amplify bisulfite modified DNA (but not wild-type DNA), irrespective of the methylation status of the sample.

PCR amplifications were performed with 5 μl of bisulfite-modified DNA templates in 25 μl reaction volumes containing 0.25 μM of each primer pair, 200 μM of each dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 5% DMSO, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega). Cycling conditions were as follows: denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, for 30 s at the specific annealing temperature (Table 2) and for 30 s at 72°C. The reaction was finished with a 5-min extension at 72°C. CpG universal methylated DNA (Qbiogene, CA, USA) was used as the positive control for methylated alleles, and DNA from normal lymphocytes was used as the negative control for unmethylated alleles. Negative controls without DNA were always included in each experiment.

The PCR products generated by MSP were electrophoresed, using 2% agarose gel stained with ethidium bromide, against a 50-bp DNA ladder (Promega) and the images were captured under ultra-violet light using the Gel Doc 2000 System (Bio-Rad). All experiments were performed at least two times and evaluated without investigator knowing the status of SV40 infection.

Immunohistochemical staining

Immunohistochemical staining for ER, PgR, HER2, P53, and SV40 Tag protein expression was performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for all cases using antibodies listed in Table 3. Briefly, 5 μm thick sections of paraffin embedded tissues were cut and dried overnight at 37°C, deparaffinized in toluene, and rehydrated through a series of graded alcohols. Then the sections were rinsed thoroughly with water and placed in Tris-buffered saline (TBS) (0.05 M Tris-HCl, 1.15 M NaCl, pH 7.6). Antigen retrieval was done with the appropriate buffer (Table 3) by boiling sections in water bath for 40 min until temperature reaches 98°C. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% H₂O₂ solution for 5 min, and sections were rinsed gently with TBS. The sections were then incubated with the appropriate primary antibody. After rinsing in TBS, described antibodies were detected using the EnVision+ Labeled Polymer Kit (DakoCytomation) following the manufacturer's instructions. Sections were then washed three times with TBS, followed by application of the Diaminobenzidine Substrate Pack (DakoCytomation) according to the manufacturer's instructions. Finally, the slides were counterstained with hematoxylin, and mounted.

For each experiment, positive and negative controls were included; for negative controls, the primary antibody was omitted and replaced by TBS. Cases of breast carcinoma, previously known to be positive for ER, PgR, HER2 or P53, were used as positive controls. As positive control for SV40 Tag detection, sections from a paraffin-embedded tissue of a transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) positive for SV40 Tag expression were used (kindly provided by Professor P. Wikström, Department of Medical Bioscience, Umea University, Umea, Sweden).

All slides were coded and were evaluated under a light microscope by two experienced pathologists, blinded from any other laboratory data. For ER, PgR, and P53, cases were considered positive if 10% or more of tumor cells showed nuclear staining [50]. Staining for HER2 was scored according to the clinical guidelines for the assessment of HER2 status [51]: a score of zero was defined as no staining or membrane staining in less than 10% of tumor cells. A score 1+ comprised faint or partially-stained membrane in more of 10% of tumor tissue. Overexpression of HER2 was scored as 2+ when weak to moderate complete membrane staining was present in more than 10% of tumor cells. A score of 3+ was interpreted as strong, complete membrane staining in more than 10% of the tumor. A case was considered to overexpress HER2 if it scored 2+ or 3+. The monoclonal antibody used in this study to detect SV40 is directed against the large T and the small t antigens and therefore displays nuclear and cytoplasmic staining.

Table 2 Oligonucleotide sequences of primers used for methylation-specific PCR, their chromosomal locations, PCR product sizes, and annealing temperatures

Genes	Chromosomal locations	Methylation status ^a	Primer		Size (bp)	Annealing temperatures (°C)	Reference
			Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')			
<i>β-actin</i>			TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	AACCAATAAAACCTACTCTCCCTTAA	133	60	[48]
<i>RASSFA1</i>	3p21.3	M	GTGTTAACCGGTTGCGTATC	AACCCCGGAACATAAAACCGA	94	56	[29]
		U	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAAACCCACAAAACCTAAAACAAA	108	58	
<i>hMLH1</i>	3p21.3	M	ACGTAGACGTTTTTATTAGGGTCGC	CCTCATCGTAACTACCCGCG	124	58	[32]
		U	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	118	60	
<i>BLU</i>	3p21.3	M	TTCTGTGGTTATAGTTCGAGAAAAGG	AACGAATTAACCGGCGCTACGC	156	60	[38]
		U	TTTGTGGTTATAGTTTGAGAAAAGTG	AACAAAATTAACCCACCTACAC	156	60	
<i>RAR-β</i>	3p24	M	TCGAGAACCGGAGCGATTCCG	GACCAATCCAACCCGAAACGA	146	57	[40]
		U	TTGAGAAATGTGAGTGAATTGA	AACCAATCCAACCCAAAACAAA	158	59	
<i>APC</i>	5q21-22	M	TATTGCGGAGTCCGGGTC	TCGACGAACTCCCGACGA	98	58	[31]
		U	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	CCAAATCAACAAAACCTCCCAACAA	151	60	
<i>ER</i>	6q25.1	M	GTGTATTTGGATAGTAGTAAGTTCGTC	CGTAAAAAAAACCGGATCTAACCG	118	57	[39]
		U	GGTGTATTTGGATAGTAGTAAGTTCGTC	CCATAAAAACAAAACCAATCTAACCA	120	58	
<i>P16</i>	9p21	M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCCG	GACCCCGAACCCGGACCCGTAA	150	60	[27]
		U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCAAAACCCACAAACCATAA	151	58	
<i>DAPK</i>	9q34	M	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGGCGGA	106	60	[35]
		U	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAAATCCCTGCCAAACACCAA	106	60	
<i>GSTP1</i>	11q13	M	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	GCCCCAATACTAAATCACGACG	91	59	[34]
		U	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	CCACCCCAATACTAAATCACAAACA	97	59	
<i>SHP1</i>	12p13	M	GAAACGTTATTATAGTATAGCGTTC	TCACGGCATACGAAACCCAAAACG	159	56	[36]
		U	GTGAATGTTATTATAGTATAGTGTGTTGG	TTCACACATACAAAACCCAAAACAAT	159	59	
<i>Cyclin D2</i>	12p13	M	GGTCCGATCGTGTGGCC	ACATAAAAACCTCCACGGCTCG	124	59	[28]
		U	GAAAATATATAAAGGGTGTG	CCTAACCCAAAACAAACCAACC	147	59	
<i>HIN1</i>	12p13.32	M	GGTACGGGTTTTTTACGGTTCGTC	AACTTCTTATACCCGATCCTCG	136	60	[37]
		U	GGTATGGGTTTTTTATGTTGTTGTT	CAAAAACCTTCTTATACCCAACTCTCA	136	60	
<i>CDH1</i>	16q22.1	M	TGTAGTACGTAATTTATTTTAGTGGCGTC	CGAATAACGATCGAATCGAAACCG	112	56	[30]
		U	TGGTTGATGTTATGTTATTTATTTTAGTGGTGT	ACACCAAATACAATCAAAATCAAAACCAA	120	58	
<i>BRCA1</i>	17q21	M	GGTTAATTTAGAGTTTCGAGAGACG	TCAACGAACTCACGGCGGCAATCG	86	59	[33]
		U	GGTTAATTTAGAGTTTTGAGAGATG	TCAACAACCTCACACCAACAATCA	75	59	
<i>TIMP3</i>	22q12.3	M	CGTTTCGTTATTTTTGTTTTTCGGTTTC	CCGAAAACCCCGGCTCG	116	58	[32]
		U	TTTTGTTTTGTTATTTTTTTGTTTTGTTTTT	CCCCAAAACCCCAACCTCA	119	59	

^a M, methylated primers; U, unmethylated primers; bp, base pairs

Table 3 Antibodies used in the immunohistochemistry study

Antibodies	Clone	Supplier	Dilution	Incubation conditions	Antigen retrieval
SV40 Tag	Pab 108	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Overnight, 4°C	Citrate buffer (10 mM, pH 9.0)
Estrogen receptor	1D5	DakoCytomation	1:40	30 min, room temperature	Citrate buffer (10 mM, pH 9.0)
Progesterone receptor	PgR636	DakoCytomation	1:40	30 min, room temperature	Citrate buffer (10 mM, pH 9.0)
HER2 (c-erbB-2)	polyclonal	DakoCytomation	1:1000	30 min, room temperature	Citrate buffer (10 mM, pH 6.0)
P53	DO-7	DakoCytomation	1:100	30 min, room temperature	Citrate buffer (10 mM, pH 6.0)

Statistical analysis

Descriptive statistics, such as mean, median, frequency, and percentage were used to summarize patient's characteristics, both SV40 and gene methylation status. Correlations between the presence of SV40 and individual clinicopathological parameters, immunohistochemical findings and methylation status of genes were compared using χ^2 test and Fisher's exact test as appropriate. The methylation index (MI), a reflection of the methylation status of all of the genes tested, is defined as the total number of genes methylated divided by the total number of genes analyzed [26]. To compare the overall degree of methylation for the panel of genes examined, we calculated the MI for each case and then determined the mean for the different groups. Statistical analysis of MI between two groups was performed using the Mann–Whitney non-parametric *U* test. Logistic regression was used to investigate independent factors correlating with the presence of SV40. All analyses were carried out using the SPSS software package (Chicago, IL, USA). All observed differences were considered to be significant when associated with $P < 0.05$.

Results

SV40 DNA detection

In this investigation, breast ductal carcinomas and matched normal breast tissues from 109 Tunisian women were analyzed by independent PCR assays targeting three different regions in the SV40 genome.

In the first step, DNA sample were analyzed by PCR for the conserved SV40 Tag N-terminal coding sequences by the SVTAGP1/3 set of primers, and the identity of the PCR products was verified by Southern blot hybridization with the SV internal specific oligoprobe. Specific SV40 Tag sequences were detected by PCR and confirmed by filter hybridization in 24/109 (22%) of tumor samples. Only 2/109 (1.8%) of the matched non-tumoral tissues display positive signals (Fig. 1). These two positive non-tumor samples correspond to two cases found to be SV40 positive by PCR in tumor samples.

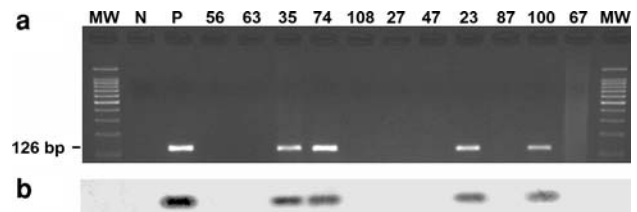


Fig. 1 Representative examples of PCR and Southern blot hybridization screening of human breast carcinomas for the presence of SV40 Tag DNA. Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis (Panel **a**) and hybridization with internal oligoprobe (Panel **b**) for SV40 DNA detection using primers SVTAGP1/3 which amplify a 126-bp fragment in the Tag region. Lanes 35, 74, 23, and 100 represent SV40-positive cases; lanes 56, 63, 108, 27, 47, 87, and 67 represent SV40-negative cases. Lanes MW show 100-bp DNA ladder (Promega); lanes P and N represent positive control (plasmid pSVSph21-N) and negative control (without DNA template), respectively

To validate the presence of SV40 DNA in breast tissues, all tumor and normal samples were also investigated by PCR with two additional set of primers, RA1/2 and LA1/2, targeting respectively the regulatory and the VP1 regions of the virus. These two assays exhibit positive results in all samples found positive for the Tag region (Fig. 2).

To eliminate the possibility that laboratory plasmids might lead to false-positive SV40 PCR results. All our breast samples were tested by PCR using an additional primer set that amplifies a 241-bp sequence present in many common laboratory plasmids containing SV40 genome. This analysis showed that all breast DNA samples were negative and only the positive control (plasmid pSVSph21-N) showed positive signal (Fig. 3).

Immunohistochemical findings

Immunohistochemical study was performed in all cases and interpreted independently from any other laboratory data. Immunostaining for SV40 Tag was found positive in all cases previously showing SV40 positivity by PCR (24/24 cases). All of the 85 cases which tested negative for SV40 by PCR were also found negative for SV40 Tag by immunohistochemistry. SV40 Tag protein expression was detected in the most tumor cells; however, the intensity of

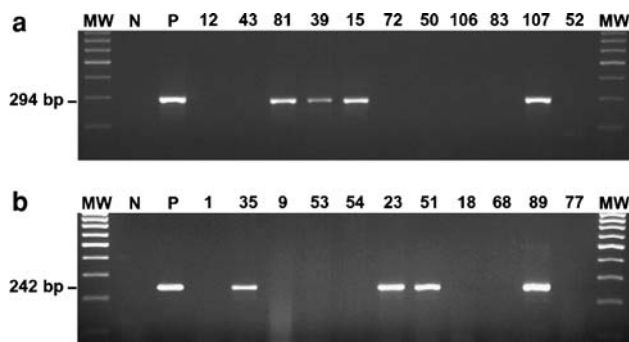


Fig. 2 Representative examples of PCR detection of SV40 VP1 gene and regulatory region in human breast carcinomas. (Panel a) Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis for SV40 DNA detection using primers LA1/2 targeting the VP1 gene; lanes 81, 39, 15, and 107 represent SV40-positive cases; lanes 12, 43, 72, 50, 106, 83, and 52 represent SV40-negative cases. (Panel b) Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis for SV40 DNA detection using primers RA1/2 targeting the regulatory region; lanes 35, 23, 51, and 89 represent SV40-positive cases; lanes 1, 9, 53, 54, 18, 68, and 77 represent SV40-negative cases. Lanes MW shows 100 bp DNA ladder; lanes P and N represent positive (plasmid pSVSph21-N) and negative (without DNA template) controls, respectively

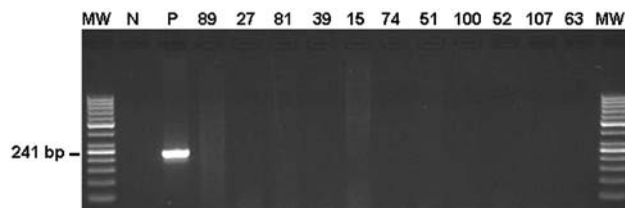


Fig. 3 Ethidium bromide stained agarose gel showing representative examples of PCR experiment using a set of primers amplifying a 241-bp fragment of the pUC origin of replication present in many common laboratory plasmids containing SV40 sequences. This experiment was used to investigate a possible contamination of our DNA breast carcinomas samples by SV40 genome present in the pSVSph21-N plasmid. Lanes MW shows 100 bp DNA ladder; lane N represents negative control (without DNA template). All SV40-positive (lanes 89, 81, 39, 15, 74, 51, 100, and 107) and SV40-negative (27, 52, and 63) BC cases showed negative results, and only the positive control (plasmid pSVSph21-N) showed positive signal (lane P)

staining was lower as compared with the positive control (Fig. 4). In SV40 positive cases, Tag immunostaining was also noted in some normal epithelial cells in the acini and ducts near the tumor, and in some intratumoral lymphocytes. With regard to the other antibodies tested, 43.1%, 47.7%, 45%, and 24.8% of the 109 BC cases were positive respectively for ER and PgR expression, P53 accumulation, and HER2 overexpression (Table 1 and Fig. 5).

Methylation status of tumor-related genes

Aberrant promoter methylation of at least one of the tested genes was found in all tumors. Representative examples of the results of methylation-specific PCR essays are

presented in Fig. 6. The frequency of promoter methylation by gene was as follows: 78% for *RASSF1A*, 66% for *SHP1*, 61% for *HIN1* and *BRCA1*, 47% for *P16* and *ER*, 42% for *CDH1* and *APC*, 40% for *BLU*, 35% for *DAPK*, 34% for *RARβ2*, 27% for *GSTP1*, 17% for *TIMP3*, 14% for *CCND2*, and 8% for *hMLH1* (Fig. 7).

Characteristics of SV40-positive tumors

Comparison of clinicopathological and immunohistochemical findings between SV40-positive and -negative groups is summarized in Tables 4 and 5. Regarding clinical and pathological data, a significant correlation was found between the presence of SV40 and patient's age ($P = 0.006$). Indeed, SV40-positive tumors were more frequently detected in patients aged over 50 years than in younger patients (34.7% vs. 12.7%; $P = 0.006$). With regard to immunohistochemical parameters, a significant correlation was found between SV40 presence and the accumulation of P53 protein (32.7% vs. 13.3%; $P = 0.015$). Furthermore, SV40 presence is inversely correlated with HER2 overexpression (3.7% vs. 28%; $P = 0.008$).

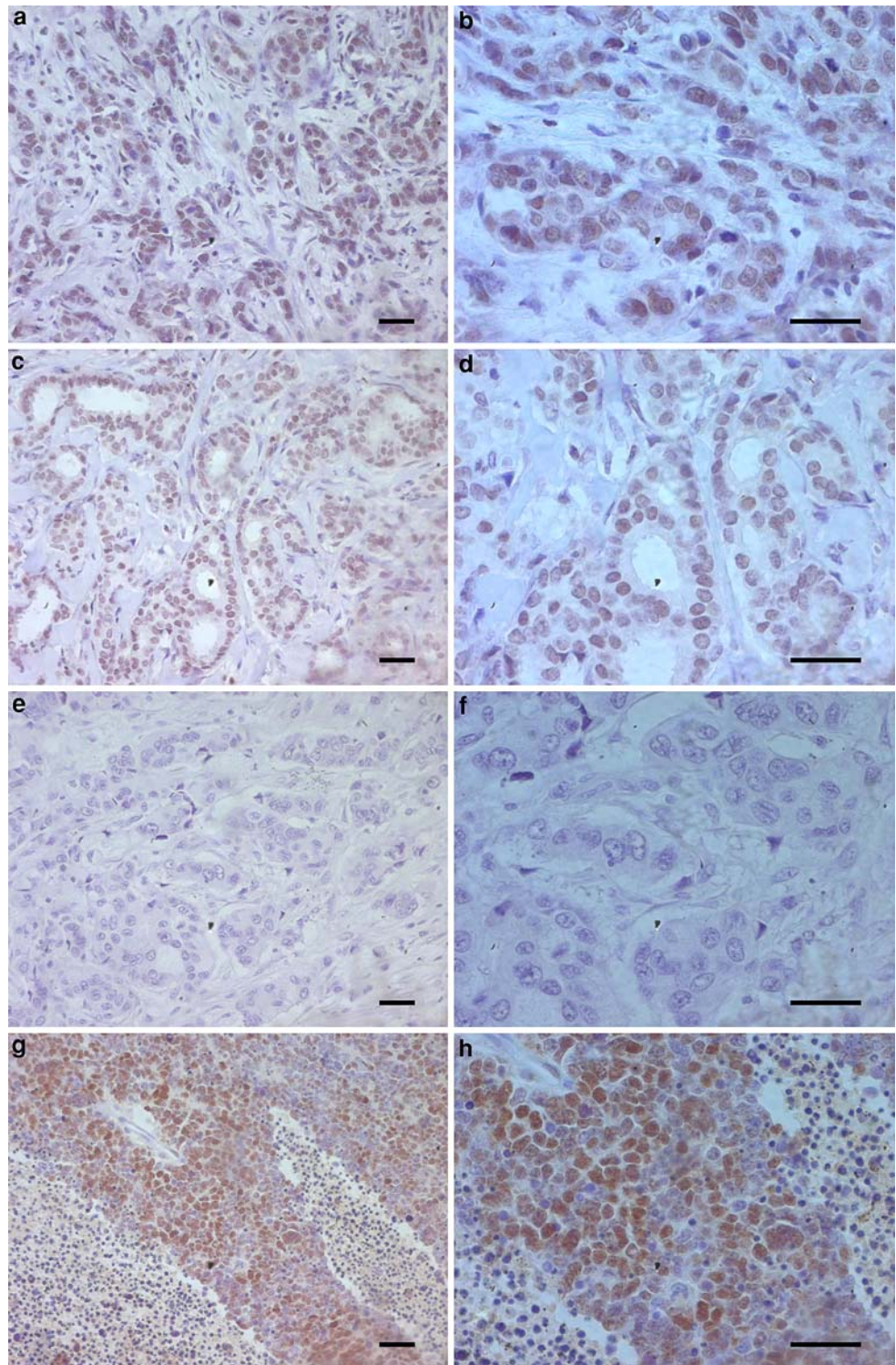
We also examined the possible association between methylation frequencies of the tumor-related genes previously studied and SV40 presence. Significant increases in methylation frequency were observed for *RASSF1A* ($P = 0.034$), *SHP1* ($P = 0.043$), *TIMP3* ($P = 0.003$), and *BRCA1* ($P = 0.035$) genes in SV40-positive compared to SV40-negative tumors (Figs. 6 and 8a). These data were also expressed in terms of MI, which reflects the methylated fraction of the genes tested within SV40-negative and -positive cases; the MI ranged from 0.07 to 0.87, with an average of 0.55 and a median of 0.40. Interestingly, the mean of MI, was significantly higher in SV40-positive than in SV40-negative groups (0.55 ± 0.025 vs. 0.37 ± 0.021 ; $P = 0.009$) (Fig. 8b).

Multivariate analysis (Table 6) revealed that hypermethylation, P53 accumulation, and HER2 low expression are independent parameters strongly associated with SV40 presence.

Discussion

In this study, SV40 DNA sequences were detected by PCR assays and Southern blotting in 24/109 (22%) cases of human BC from Tunisia. In these experiments, we took extra care to exclude the risk that positive results were the product of PCR contamination. In addition to the use of separate areas and reagents for DNA extraction and PCR analyses, DNA from the 109 matched tumor and normal

Fig. 4 Representative examples of immunohistochemical staining for the detection of the SV40 T and t antigens using the Pab108 antibody in breast carcinomas. Panels **a–d** represent positive cases. Panels **e** and **f** represent a negative case. Panels **g** and **h** represent positive control (transgenic adenocarcinoma of mouse prostate). Scale bar: 100 μ m



tissues were extracted in parallel. Similarly, the PCR experiments were done in parallel and repeated three times to confirm the reproducibility of the results. Furthermore, PCR analyses of three different genomic regions of the SV40 genome, using SVTAGP1/3, RA1/2, and LA1/2 primers, have yielded identical results, confirming that the

sequences found in the specimens were authentically of SV40 and not of related viruses or host genome. Moreover, to rule out a possible contamination of our breast samples by plasmids containing SV40 sequences, all our breast samples were tested by PCR assay amplifying DNA sequence present in common laboratory plasmids

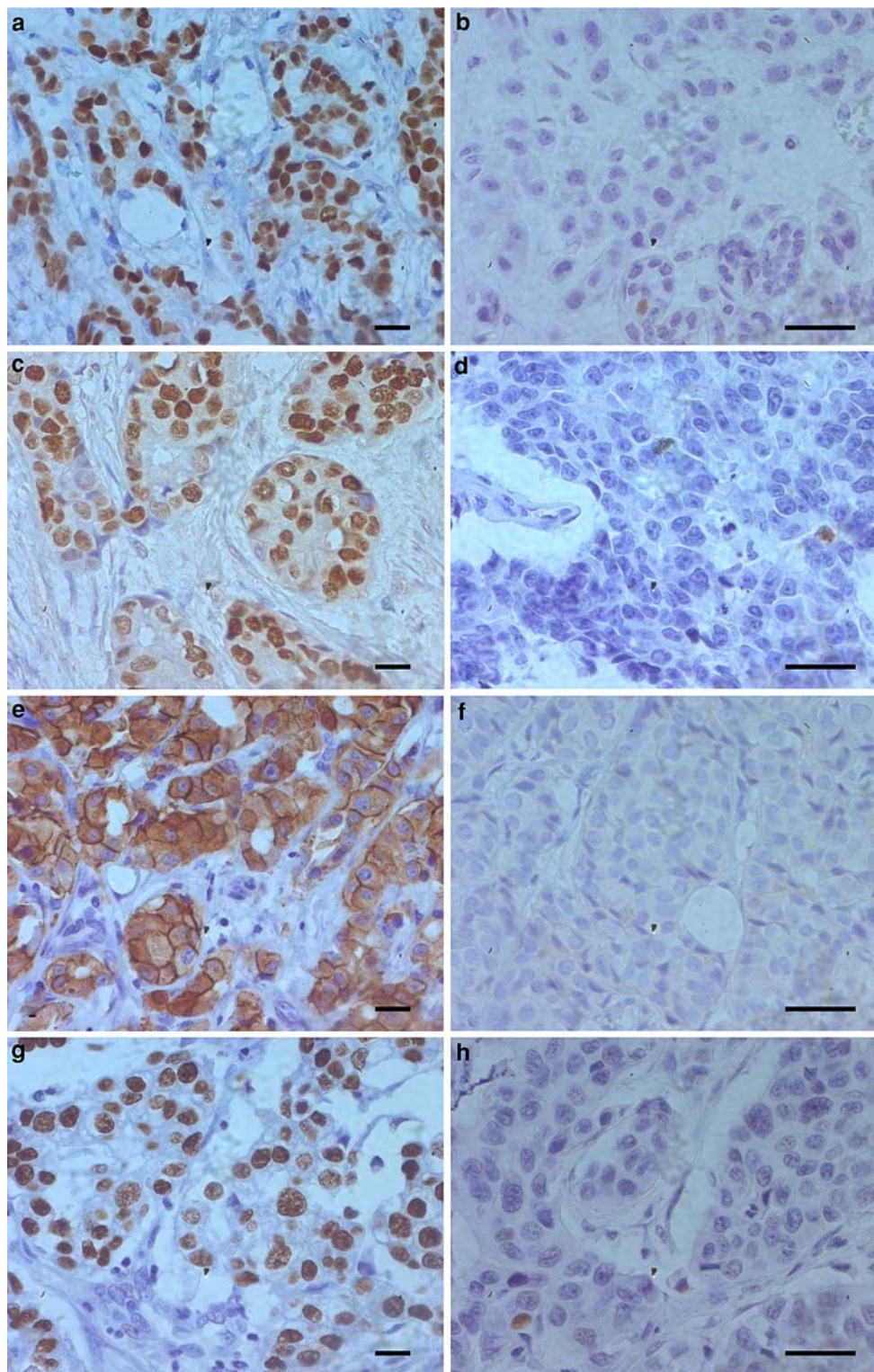


Fig. 5 Representative examples of immunohistochemical staining for estrogen and progesterone receptors, HER2, and P53 in human breast carcinomas. Panels **a**, **c**, **e**, and **g** represent examples of positive cases.

Panel **b**, **d**, **f**, and **h** represent examples of negative cases. Scale bar: 100 μ m

containing SV40 genome. This analysis showed that all breast samples were negative. This experiment rule out the possibility that our SV40-positive BC samples may be

caused by plasmid contamination. In addition, the results of PCR assays were entirely confirmed by immunohistochemistry for Tag oncoprotein expression.

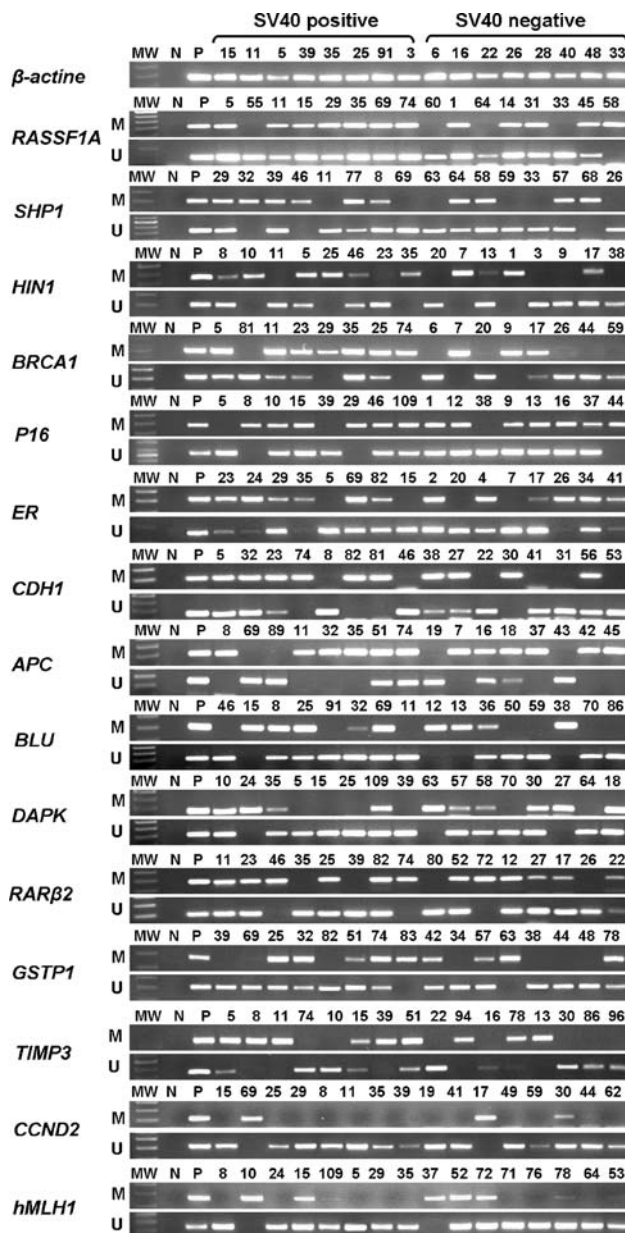


Fig. 6 Representative examples of methylation-specific PCR assays of the methylated alleles (M) and unmethylated alleles (U) of *RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RAR β 2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2*, and *hMLH1* genes in SV40-positive and SV40-negative breast carcinoma cases. The β -actin gene was used as an internal control for bisulfite treatment. Lanes MW shows molecular weight markers; lanes P represent positive controls; lanes N represent negative control

To the best of our knowledge, this is the first extensive search for SV40 in human BC. Regardless of the current study, we realize that no previous attempt to test this hypothesis was performed. Although two previous studies investigating the presence of SV40 in lymphomas from United States and Australia have included a limited number of BC cases as negative control (28 cases and 9 cases, respectively) and have reported negative results, but no

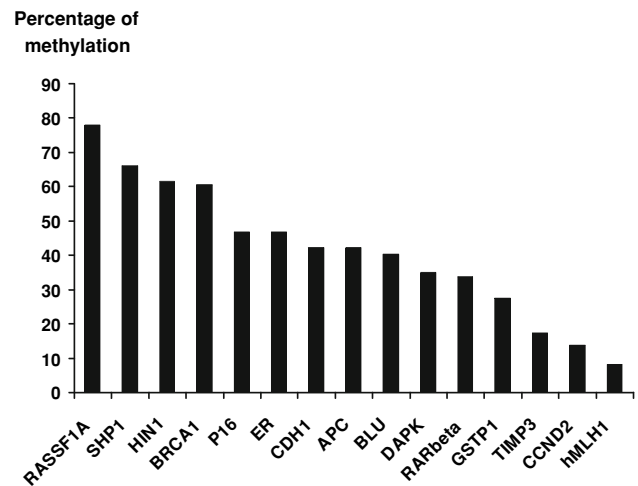


Fig. 7 Histogram of frequencies of aberrant promoter hypermethylation of *RASSF1A*, *SHP1*, *HIN1*, *BRCA1*, *P16*, *ER*, *CDH1*, *APC*, *BLU*, *DAPK*, *RAR β 2*, *GSTP1*, *TIMP3*, *CCND2*, and *hMLH1* genes in a series of 109 breast carcinomas from Tunisia analyzed by methylation-specific PCR

details on the clinicopathological features were given [14, 52]. It is of interest to note that the two latter countries belong to zone of high incidence of breast cancer (101 and 83 per 100,000 women, respectively [53]) and probably of low prevalence of SV40 in BC in relation to the presence of other risk factors like lifestyle, dietary and environmental exposures; whereas, Tunisia belongs to a low-incidence region (20 per 100,000 [53]). Therefore, such interlaboratory variation could reflect real geographical differences in the incidence of SV40 associated BC rather than technical issues. Nevertheless, our results indicate that BC is a new human tumor type found to be SV40 positive. Indeed, in previous reports, brain and bone tumors, pleural malignant mesotheliomas, thyroid carcinomas, pituitary adenomas and different lymphoproliferative disorders were found to be SV40 positive [54–56].

The detection of SV40 DNA sequences in BC does not necessarily indicate a causative role of SV40 in the development of those carcinomas. However, the detection of the viral Tag oncoprotein expression in the tumor cells in our patients suggests that SV40 is not a passenger virus. Indeed, SV40 oncogenicity and transforming ability are strictly dependent on the expression of the early region gene product encoding for Tag which could complexes with the tumor suppressor's P53 and Rb, inactivating their functions; alters the integrity and stability of the host cell genome, including numerical and structural chromosomal aberrations; transactivates many cellular promoters, inducing abnormal gene expression; has ATPase and helicase activities; and binds to cellular DNA, stimulating its replication [57–59]. Interestingly, in the

Table 4 Clinicopathological features of SV40-positive and SV40-negative breast carcinomas

Variable	Number of SV40-negative cases	Number of SV40-positive cases	<i>P</i> -value ^c
<i>Age (years)</i>			0.006
≤50	55	8	
>50	30	16	
<i>Birth year</i>			0.004
<1955	35	19	
1955–1963	32	2	
>1963	18	3	
<i>Histological grade^a</i>			0.775
Grade I	20	4	
Grade II	32	9	
Grade III	33	11	
<i>Tumor size (mm)</i>			0.481
≤20	17	7	
>20	68	17	
<i>Lymph node metastases^b</i>			0.163
Negative	52	17	
Positive	18	2	
<i>Estrogen receptor^c</i>			0.442
Negative	50	12	
Positive	35	12	
<i>Progesterone receptor^c</i>			0.833
Negative	44	13	
Positive	41	11	
<i>P53^c</i>			0.015
Negative	52	8	
Positive	33	16	
<i>HER2^d</i>			0.008
Negative	59	23	
Positive	26	1	

^a Scarff-Bloom and Richardson classification

^b Pathological nodal status was missing in 20 cases

^c Evaluated by immunohistochemistry, and considered positive if >10% of tumor cells showed nuclear staining

^d Evaluated by immunohistochemistry, and considered positive if scored 2+ or 3+ as described in materials and methods section

^e *P*-values were calculated by χ^2 or Fisher's exact tests (two-sided) and were considered to be statistically significant for $P < 0.05$

Bold numbers indicate significant correlations

present study, a significant correlation was found between P53 accumulation and the presence of SV40 in BC ($P = 0.015$). This observation supports a role of SV40 in the inactivation of P53 in human BC. Similar results have been also demonstrated in human mesotheliomas, brain tumors, and lymphomas [60–62].

In the current study we found that the presence of SV40 in BC correlates inversely with HER2 overexpression ($P = 0.008$). Our study is the first to demonstrate such correlation in human clinical cancer trials. HER2 (also named C-erbB-2, neu) is a protooncogene known to be overexpressed in ~30–50% of human breast cancers [63]. HER2 overexpression plays an important role in human BC development and metastasis; it is also associated with therapeutic resistance and poor prognosis, and represents an important target for recent cancer therapies [64]. An interesting in vitro study has shown recently that SV40 large T antigen can act as a transforming suppressor of HER2 overexpressing in human breast tumor cell lines by

negatively regulating the HER2 promoter activity [65]. On the other hand, the inverse correlation between HER2 overexpression and the presence of SV40 may in part explain the rarity of lymph node metastasis in SV40-positive BC group compared to SV40-negative BC group (see Table 4).

Because previous reports suggest an association between aberrant methylation of several tumor-related genes and oncogenic viruses including SV40, we explored such relationship in our series of human BC. We found a significant correlation between the presence of SV40 and promoter methylation in four genes: *RASSF1A*, *SHP1*, *BRCA1*, and *TIMP3* which are important regulators of cell differentiation, DNA repair, and invasion. Our current study is the first investigation showing a relationship between the presence of SV40 and hypermethylation of *TIMP3* and *BRCA1* genes in human cancers. Moreover, a significantly higher hypermethylation rates (MI) were found in SV40-positive BC cases compared with SV40-

Table 5 Summary of demographic and immunochemical findings in SV40-positive breast carcinoma cases^a

Cases number	Birth year	Age (years)	Year of diagnosis	Estrogen receptor	Progesterone receptor	HER2	P53	SV40 Tag
#5	1954	41	1995	–	–	–	+	+
#8	1931	64	1995	–	–	–	+	+
#10	1939	57	1996	–	–	–	+	+
#11	1924	72	1996	+	+	–	–	+
#15	1954	43	1997	–	–	–	+	+
#23	1930	67	1997	–	–	–	–	+
#24	1929	68	1997	–	–	–	–	+
#25	1957	40	1997	–	–	–	+	+
#29	1965	33	1998	–	–	–	+	+
#32	1939	59	1998	+	+	–	+	+
#35	1947	53	2000	–	–	–	+	+
#39	1946	55	2001	+	–	–	–	+
#46	1954	48	2002	+	+	–	+	+
#51	1951	52	2003	+	+	–	+	+
#55	1916	87	2003	+	–	–	+	+
#69	1930	73	2003	+	+	–	+	+
#74	1948	56	2004	+	+	–	–	+
#81	1957	47	2004	+	+	+	+	+
#82	1966	38	2004	+	+	–	–	+
#89	1964	40	2004	–	+	–	+	+
#91	1954	50	2004	–	–	–	–	+
#100	1945	60	2005	–	–	–	+	+
#107	1936	70	2006	+	+	–	+	+
#109	1948	58	2006	+	+	–	–	+

^a Immunostaining scoring systems were described in the materials and methods section

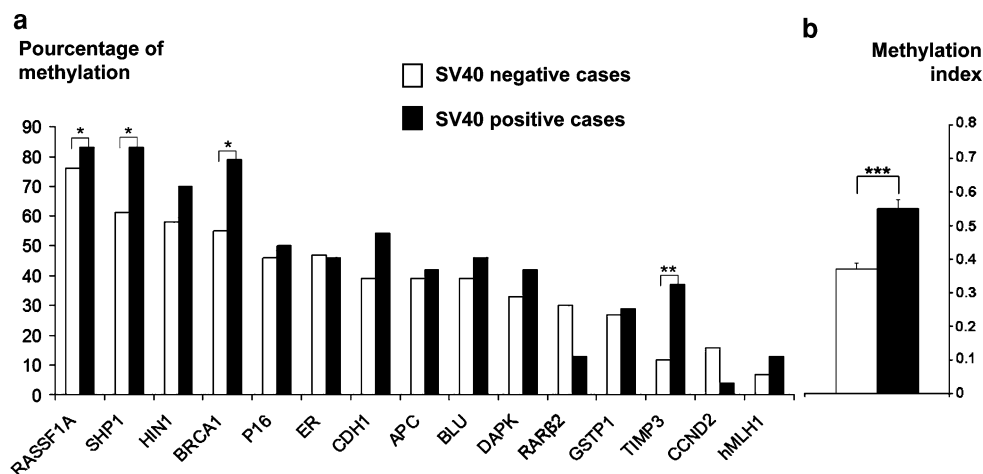


Fig. 8 Comparison of frequencies of aberrant methylation (Panel a) and MI (Panel b) between SV40-negative ($n = 85$; open bars) and SV40-positive ($n = 24$; dark bars) breast carcinoma cases. The frequencies of methylation in SV40-positive and SV40-negative cases

were compared using χ^2 test. The means of MI between the two groups were compared using the Mann–Whitney U nonparametric test. P -value is shown when there is a significant difference between two groups. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

negative cases. These findings support a functional effect of SV40 in BC. Similar results were found in human malignant mesotheliomas and hematopoietic malignancies [15, 25, 26].

Promoter hypermethylation of tumor-suppressor genes is a recognized mechanism of gene silencing in various human malignancies [66]. Although, the exact mechanism of aberrant methylation in SV40-positive cancers remains

Table 6 Multivariate logistic regression analysis including parameters found to be associated with the presence of SV40 in the univariate analysis

Characteristics	SV40 status		Multivariate analysis	
	Number of positive cases	Number of negative cases	Odds ratio (95% confidence interval)	P-value
<i>Mean of methylation index</i>				
<0.4	2	44	8.558 (1.788–40.959)	0.007
≥0.4	22	41		
<i>Age (years)</i>				
<50	8	55	2.733 (0.907–8.237)	0.074
≥50	16	30		
<i>P53</i>				
Negative	8	52	3.388 (1.128–10.174)	0.030
Positive	16	33		
<i>HER2</i>				
Negative	23	59	0.106 (0.013–0.899)	0.040
Positive	1	26		

to be determined, the four involved tumor-suppressor genes in our patients are located on four different chromosomes. Of interest, *RASSF1A*, *BLU*, and *hMLH1*, which are located in tandem at chromosome 3p21, showed differential methylation, with *RASSF1A*, but not *BLU* and *hMLH1* being associated with SV40. Thus, SV40-associated hypermethylation is not a localized process restricted to one or to a limited number of chromosomal loci but is a generalized process affecting multiple genomic sites.

Promoter hypermethylation of multiple genes is a characteristic feature of almost all cancers [66]. In the present study, we did not identify any gene whose methylation is characteristic of the SV40-positive BC, and methylation of many genes was also found in tumors that are not virus associated. This observation indicates that hypermethylation of multiple genes in BC is not restricted to the presence of SV40, and probably other factors may contribute in this alteration. This finding also supports the hypothesis that SV40 appears to be neither necessary nor sufficient to induce cancer [67]. Recent evidence in human mesothelioma suggests that SV40 may not be a complete carcinogen and suggest that it act as a co-carcinogen with asbestos [68, 69]. In breast cell culture models, SV40 Tag can function as one of three minimal cooperating elements along with hTERT and oncogenic H-RAS to fully transform primary human mammary epithelial cells [21]. Taken together, these data suggest that SV40 alone may not be sufficient to induce BC in humans. Breast cancer is a multifactorial disease and many risk factors have been associated with the pathogenesis of this tumor, including hormones and reproductive factors (long-term estrogen exposure, an early menarche, a late menopause, nulliparity, and late prima gravidities), exogenous factors (westernized diet, alcohol, high socioeconomic status, and exposure to

ionizing radiation), genetic factors (family history of breast cancer) [4, 70]. Thus, it is probably that SV40 interacts with some of these factors, leading to the development of BC.

It is of interest to note that in our series SV40 was also detected in some normal epithelial and lymphoid cells near the tumor. Similar finding were reported in pleomorphic adenomas of salivary glands and in thyroid tumors [71, 72]. It is possible that the viral infection may spread from transformed cells to normal cells surrounding the tumor. It is also possible that BC transformed cells represent a favorable environment for SV40, while the corresponding normal tissue does not easily allow SV40 multiplication. However, the detection of the viral Tag oncoprotein expression suggests that SV40 is not a passenger virus. In fact, with its Tag oncoprotein, SV40 may exert its tumorigenic potential in BC tissues. In addition, our finding of a strongly significant correlation between the presence of SV40 and aberrant methylation of multiple tumor-related genes, accumulation of P53, and lessening of HER2 overexpression suggest that, in all probability, the virus plays a role in tumor pathogenesis.

Several in vitro studies and transgenic models also support the link between SV40 and BC. Evidence has been reported that SV40 Tag might interfere with epithelial breast cell growth and differentiation [21]. Moreover, the introduction of the Tag gene into normal epithelial breast cells allows them to escape from early mortality and to lose all differentiated functions [20, 21]. A recent study including multiple transgenic models of epithelial cancers (prostate, breast, and lung) has showed that the introduction of SV40 Tag gene into these transgenic models was associated with aberrant expression of several genes which are critical regulators of the cell-cycle and apoptosis such as P53, Rb, and BRCA1 [73].

The major source of known human exposure to SV40 was immunization with SV40-contaminated poliovaccines in the period from 1955 to 1963, during which large number of people worldwide were inadvertently exposed to live SV40. A recent study indicates that some poliovirus vaccines were contaminated with SV40 after 1963 [74]. In Tunisia, antipoliomyelitis vaccination campaigns were initiated in early 1960s; however, we don't know whether SV40-contaminated poliovaccine lots were used. In the current study, we found that patients with SV40-positive BC were born before 1955. This observation indicates that this viral agent was already present in humans before the production and administration of SV40-contaminated vaccines. This finding also supports the theory that SV40 is an endemic virus in the human population that may be transmitted among humans in a vertical or horizontal fashion, or through an unknown route rather than by contaminated polio vaccines [75]. An earlier study by Caron de Fromental et al. [76] has reported the isolation of SV40 from a cell line (HBL-100) derived from milk of a healthy woman. This observation strengthens the argument that SV40 may target the human breast and supports the hypothesis that SV40 may be transmitted among humans through breast-feeding.

In summary, our study demonstrates the presence of SV40 DNA in 22% of cases of BC from Tunisia. Detectable expression of the Tag oncoprotein in tumor cells suggests a potential role for SV40 in the development of these malignancies. Interestingly, the presence of SV40 was significantly correlated to hypermethylation of multiple tumor-related genes, accumulation of P53 protein, and absence of HER2 overexpression. These findings support a role of SV40 in the pathogenesis of a subset of BC and may have large public health implications.

Acknowledgements This work was supported by the « Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et Technologie » and the « Ministère de la Santé Publique » of Tunisia. The authors thank Dr Regis A. Vilchez from the Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA for his kind gift of the plasmids containing SV40 genomes and Professor P. Wikström from the Department of Medical Bioscience, Umea, Sweden for his kind gift paraffin-embedded tissue of a transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) positive for SV40 Tag expression. We also thank Intissar Toumi, Samir Jaafar, Chedia Haj Salah, and Houda Sghaer for their expert technical assistance.

References

- Parkin DM, Ferlay J, Hamdi-Cherif M et al (2003) Cancer in Africa: epidemiology and prevention. IARC Press, Lyon
- Yost K, Perkins C, Cohen R et al (2001) Socioeconomic status and breast cancer incidence in California for different race/ethnic groups. *Cancer Causes Control* 12:703–711
- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL et al (2002) SEER cancer statistics review, 1973–1999. National Cancer Institute, Bethesda, MD
- Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC et al (2004) Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res* 6:213–218
- King MC, Marks JH, Mandell JB (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302:643–646
- Medina D (1976) Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. *Cancer Res* 36:2589–2595
- Dickson C (1990) Role of the int-genes in murine mammary tumor development and implications for human breast cancer. *Int J Cancer* 5:51–54
- Holland JF, Pogo GT (1999) Possible etiology of human breast cancer. *Biomed Pharmacother* 53:334
- Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E et al (1999) Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 91:1376–1381
- Topp WC, Rifkin DB, Sleight MJ (1981) SV40 mutations with an altered small-t protein are tumorigenic in newborn hamsters. *Virology* 11:341–350
- Bergsagel DJ, Finegold MJ, Butel JS et al (1992) DNA sequences similar to those of simian virus SV40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N Engl J Med* 326:988–993
- Carbone M, Pass HI, Rizzo P et al (1994) Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene* 9:1781–1790
- Yamamoto H, Nakayama T, Murakami H et al (2000) High incidence of SV40-like sequences detection in tumour and peripheral blood cells of Japanese osteosarcoma patients. *Br J Cancer* 82:1677–1681
- Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA et al (2002) Simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 359:817–823
- Amara K, Trimeche T, Ziadi S et al (2007) Presence of simian virus 40 DNA sequences in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with aberrant promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes. *Int J Cancer* 121:2693–2702
- Wong NA, Rae F, Herriot MM et al (2003) SV40 Tag DNA sequences, present in small proportion of human hepatocellular carcinomas, are associated with reduction survival. *J Clin Pathol* 56:904–909
- Pacini F, Vivaldi A, Santoro M et al (1998) Simian virus 40-like DNA sequences in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 15:665–669
- Mietz JA, Unger T, Huijbregtse JM et al (1992) The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J* 11:5013–5020
- Dyson N, Howley PM, Münger K et al (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science* 342:934–937
- Green JE, Shibata MA, Yoshidome K et al (2000) The C3(1)/SV40 T antigen transgenic mouse model of mammary cancer: ductal epithelial cell targeting with multistage progression to carcinoma. *Oncogene* 19:1020–1027
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F et al (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15:50–65
- Esteller M (2002a) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21:4527–4540
- Wong N, Li L, Tsang K et al (2002) Frequent loss of chromosome 3p and hypermethylation of RASSF1A in cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 37:633–639
- Shivapurkar N, Takahashi T, Reddy J et al (2004) Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphoid and hematopoietic malignancies and their relationship to aberrant promoter methylation of multiple genes. *Cancer Res* 64:3757–3760

25. Toyooka S, Pass HI, Shivapurkar N et al (2001) Aberrant methylation and simian virus 40 tag sequences in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 61:5727–5730
26. Suzuki M, Toyooka S, Shivapurkar N et al (2005) Aberrant methylation profile of human malignant mesotheliomas and its relationship to SV40 infection. *Oncogene* 24:1302–1308
27. Herman JG, Merlo A, Mao L et al (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55:4525–4530
28. Evron E, Umbricht CB, Korz D et al (2001) Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 61:2782–2787
29. Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S et al (2001) Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 93:691–699
30. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG et al (1995) E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55:5195–5199
31. Esteller M, Sparks A, Toyota M et al (2000) Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 60:4366–4371
32. Xu XL, Yu J, Zhang HY et al (2004) Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 10:3441–3454
33. Esteller M, Silva JM, Dominguez G et al (2000b) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 92:564–569
34. Cairns P, Esteller M, Herman JG et al (2001) Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 7:2727–2730
35. Toyooka S, Toyooka KO, Miyajima K et al (2003) Epigenetic downregulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin Cancer Res* 9:3034–3041
36. Oka T, Ouchida M, Koyama M et al (2002) Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* 62:6390–6394
37. Krop IE, Sgroi D, Porter DA et al (2001) HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9796–9801
38. Agathangelou A, Dallol A, Zochbauer-Muller S et al (2003) Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers. *Oncogene* 22:1580–1588
39. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF et al (1994) Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 54:2552–2555
40. Widschwendter M, Berger J, Hermann M et al (2000) Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 92:826–832
41. Elston CW, Ellis IO, Goulging H, Pindre SE (1998) Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO (eds) *Systemic pathology*, 3rd edn, vol 13. The Breast, Churchill Livingstone, pp 385–433
42. Sobin LH, Wittekind Ch (eds) (1997) *International Union Against Cancer, 'TNM classification of malignant tumours'*, 5th edn. Wiley-Liss, New York, pp 23–130
43. Bauer HM, Ting Y, Greer CE et al (1991) Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by PCR based method. *JAMA* 265:472–477
44. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT et al (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163–166
45. Nakatsuka S, Liu A, Dong Z et al (2003) Simian virus 40 sequences in malignant lymphomas in Japan. *Cancer Res* 63:7606–7608
46. Lednický JA, Stewart AR, Jenkins JJ et al (1997) SV40 DNA in human osteosarcomas shows sequence variation among T-antigen genes. *Int J Cancer* 72:791–800
47. Reuther FJ, Löhler J, Herms J et al (2001) Low incidence of SV40-like sequences in ependymal tumours. *J Pathol* 195:580–585
48. Carbone M, Rizzo P, Pass HI (2005) Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments. *Oncogene* 15:1877–1888
49. Singal R, Ferdinand L, Reis IM et al (2004) Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. *Oncol Rep* 12:631–637
50. Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8:138–140
51. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ et al (1999) Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States food and drug administration approved scoring system. *J Clin Oncol* 17:1983–1987
52. Sui LF, Williamson J, Lowenthal RM et al (2005) Absence of simian virus 40 (SV40) DNA in lymphoma samples from Tasmania, Australia. *Pathology* 37:157–159
53. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin MD (2004) *GLOBOCAN 2002 cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC cancer base no. 5, version 2.0*. IARC Press, Lyon
54. Barbanti-Brodano G, Martini F, De Mattei M et al (1998) BK and JC human polyomaviruses and simian virus 40: natural history of infection in humans, experimental oncogenicity and association with human tumors. *Adv Virus Res* 50:69–99
55. Butel JS, Lednický JA (1999) Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* 91:119–134
56. Jasani B, Cristaudo A, Emri SA et al (2001) Association of SV40 with human tumors. *Semin Cancer Biol* 11:49–61
57. Ray FA, Peabody DS, Cooper JL et al (1990) SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts. *J Cell Biochem* 42:13–31
58. Fanning E, Knippers R (1992) Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu Rev Biochem* 61:55–85
59. Ludlow JW (1993) Interactions between SV 40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53. *FASEB J* 7:866–871
60. Carbone M, Rizzo P, Grimley PM et al (1997) Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med* 3:908–912
61. Zhen HN, Zhang X, Bu HY et al (1999) Expression of the simian virus 40 large tumor antigen and formation of Tag-p53 and Tag-pRb complexes in human brain tumors. *Cancer* 86:2124–2132
62. Amara K, Trimeche T, Ziadi S et al (2007) Presence of simian virus 40 in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with germinal center B-cell immunophenotype, t(14;18) translocation, and P53 accumulation. *Mod Pathol*. Advance online publication 28 December 2007; doi:10.1038/modpathol.3800993
63. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al (2004) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707–712
64. Yu D, Hung MC (2000) Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 19:6115–6121
65. Chuang TC, Yu YH, Lin YS et al (2002) The N-terminal domain of SV40 large T antigen represses the HER2/neu-mediated transformation and metastatic potential in breast cancer. *FEBS Lett* 511:46–50
66. Esteller M, Fraga MF, Paz MF et al (2002b) Cancer epigenetics and methylation. *Science* 297:1808–1808
67. Gazdar AF, Butel JS, Carbone M (2002) SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2:957–964

68. Kroczyńska B, Cutone R, Bocchetta M et al (2006) Crocidolite asbestos and SV40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters. *PNAS* 103:14128–14133
69. Robinson C, van Bruggen I, Segal A et al (2006) A novel SV40 Tag transgenic model of asbestos-induced mesothelioma: malignant transformation is dose dependant. *Cancer Res* 66:10786–10794
70. Tavassoli FA, Davilee P (2003) Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon
71. Martinelli M, Martini F, Rinaldi E et al (2002) Simian virus 40 sequences and expression of the viral large T antigen oncoprotein in human pleomorphic adenomas of parotid glands. *Am J Pathol* 161:1127–1133
72. Vivaldi A, Pacini F, Martini F et al (2003) Simian virus 40-like sequences from early and late regions in human thyroid tumors of different histotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 88:892–896
73. Deeb KK, Michalowska AM, Yoon CY et al (2007) Identification of an integrated SV40 T/t-antigen cancer signature in aggressive human breast, prostate, and lung carcinomas with poor prognosis. *Cancer Res* 67:8065–8080
74. Cutrone R, Lednicky J, Dunn G et al (2005) Some oral poliovirus were contaminated with infectious SV40 after 1961. *Cancer Res* 65:10273–10279
75. Butel JS, Lednicky JA (1999) Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* 91:119–134
76. Caron de Fromentel CC, Nardeux PC, Soussi T et al (1985) Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Exp Cell Res* 160:83–94

Annexe 2

Prevalence and characteristics of the MMTV-like associated breast carcinomas in Tunisia

M. Hachana, M. Trimeche*, S. Ziadi, K. Amara, N. Gaddas, M. Mokni, S. Korbi

Department of Pathology, Farhat Hached Hospital, Sousse 4000, Tunisia

Received 2 March 2008; received in revised form 2 March 2008; accepted 9 June 2008

Abstract

The involvement of a retrovirus homologous to the mouse mammary tumor virus (MMTV) in the pathogenesis of human breast cancer (BC) has long been assumed, but has never been proven. Previous studies have reported the detection of MMTV-like *env* sequences in variable proportions that did not exceed 40% of BC cases in several countries. However, these viral sequences have been found in higher proportion (74%) in Tunisian diagnosed with BC during the seventies.

This study is an attempt to evaluate the current prevalence of MMTV-like *env* gene in BC in Tunisian women. We used semi-nested PCR that amplify a 190-bp MMTV-like *env* sequence, followed by direct sequencing to screen a series of 122 cases of BC randomly selected. The findings were correlated to clinicopathological data and immunohistochemical expression status of progesterone and oestrogen receptors, HER2, and P53.

Specific MMTV-like *env* sequences were found in 17 (13.9%) cases of breast carcinomas, whereas the same sequences were not detected in matched normal breast tissues. The presence of the viral sequences correlates inversely with progesterone receptor expression (6.8% versus 20.3%; $P = 0.03$) and HER2 overexpression (3.1% versus 17.7%; $P = 0.04$).

This present study confirms the presence of MMTV-like *env* sequences in BC in Tunisian women but describes an important decrease in the prevalence of the viral sequences compared with previous studies. This reduction may be due to some changes in the virological characteristics or exposure to the virus.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Breast cancer; Mouse mammary tumor virus; Tunisia

1. Introduction

Breast cancer (BC) is one of the most prevalent malignancies in women worldwide, yet the etiology of this disease remains unclear. Many studies have identified risk factors for the development of this

tumor, such as age, length of reproductive life, nulliparity, obesity, and the inherited genetic predisposition, but the etiologic and molecular mechanisms related to the breast carcinogenesis remain poorly understood [1].

BC is a multistep disease, and viral infection may play a role in one or more of the steps in its pathogenesis [2]. This suggestion has been based on the proven role of mouse mammary tumor virus (MMTV) as the causal agent of mammary tumor

* Corresponding author. Tel.: +216 21311760; fax: +216 73210355.

E-mail address: m_trimech@yahoo.fr (M. Trimeche).

in mice [3]. Subsequently, various investigators have postulated that a similar virus, MMTV-like, also called human mammary tumor virus (HMTV), might be a cause for human BC [4–7].

More recently, several studies have demonstrate the presence of MMTV-like *env* sequences in 30–40% of BC cases in several Western countries including the United States, Italy, Mexico, Brazil, Argentina, and Australia [7–12]. In Southeast Asia, where BC incidences is known to be low, the presence of MMTV-like *env* sequences in BC is 12% in Japan and 10–17% in China [11,13]; Whereas, Vietnamese BC has been reported to be 0.8% positive [12].

It is interesting to note that BC from Tunisia, a North African country with low incidence of BC as compared to Western countries, have been reported to have the highest proportion of MMTV-like positivity (74%) [14]. But this high prevalence of MMTV-like *env* sequences has been detected in a small series of cases diagnosed between 1978 and 1979, a time when the aggressive form of this cancer: inflammatory BC was endemic in North Africa. Indeed, during the seventies and eighties, two studies have described a high incidence of inflammatory BC (up to 55%) in Tunisia [15,16] compared with United States, where inflammatory BC represents only 1–6% of cases [17]. However, more recent epidemiologic studies showed an important reduction in the frequency of the inflammatory BC in Tunisia which does not exceed at present 10% of all BC cases [18,19]. This reduction contrasts with a continual increase in the incidence of the common forms of BC, with approximately 20 new cases per 100,000 women in 2002 [18,20]. These epidemiological changes of BC in Tunisia concord with a westernisation of lifestyle and an increase of the socioeconomic level of the Tunisian population.

In the light of the epidemiological changes of BC in Tunisia, the aim of this study is to evaluate the current prevalence of the MMTV-like *env* sequences in BC in this country. We also analyzed the possible association between the presence of MMTV-like sequences and different clinical and pathological parameters.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissue samples

Frozen BC tissues samples from 122 Tunisian women were retrieved from samples collected

between 1995 and 2006 in the Department of Pathology at the Farhat-Hached Hospital of Sousse, Tunisia. Ethical approval to perform this study was granted by the institutional review board of the Farhat-Hached Hospital. Cases were selected on the basis of availability of paired frozen samples of breast cancer tissue and matched adjacent normal breast tissue obtained at the time of primary surgery. All samples were from Tunisian women who lived in the central region of Tunisia. Histopathological diagnosis of each tumor was performed according to the WHO criterias [21], resulting in the following distribution: 109 invasive ductal carcinomas, five invasive lobular carcinomas, six medullary carcinomas, and two inflammatory breast carcinomas. Invasive ductal carcinomas were graded according to the modified Scarff-Bloom-Richardson (SBR) system [22]. The clinicopathological data are summarized in Table 1. Slides were reviewed by two pathologists (MT and SZ), and the most representative paraffin blocks were selected for immunohistochemical study of oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2, and P53 expression.

Table 1
Clinicopathological characteristics of Tunisian women with breast carcinomas

Variable	Number of cases (%)
Total	122
Age (yrs)	
<35	15 (12.3)
35–50	58 (47.5)
>50	49 (40.2)
Histological type	
Invasive ductal carcinoma	109 (89.3)
Invasive lobular carcinoma	5 (4)
Medullary carcinoma	6 (4.8)
Inflammatory breast carcinoma	2 (1.6)
Histological grade ^a	
Grade I	23 (20.7)
Grade II	43 (38.7)
Grade III	45 (40.5)
Tumor size (mm)	
≤20	39 (32)
21–50	80 (65.5)
>50	3 (2.5)
Lymph node involvement ^b	
Negative	50 (49)
Positive	52 (51)

^a Scarff-Bloom and Richardson classification was performed only in invasive ductal carcinoma cases.

^b Pathological nodal status was missing in 20 cases.

2.2. Detection of MMTV-like sequences by PCR

Genomic DNA was extracted from frozen tumor and their corresponding normal breast tissues using standard phenol–chloroform extraction protocol [23], and DNA quality was assessed by amplifying a 407-base paired (bp) sequence of the β -globin gene [24].

Detection of MMTV *env* gene-like sequences was performed using semi-nested PCR approach as described previously [25,26]. This technique was chosen for its excellent sensitivity and specificity, its simplicity, and also because the target DNA sequences are not too long compared with other published techniques [8]. Approximately 200 ng of template DNA were used in the first-stage of PCR with outer primers 1X (5'-TGCGCCTTCCCTGAC CAAGGG-3') and 2NR (5'-GTAACACAGGCAG ATGTAGG-3') to amplify a 356 bp segment. The second round used 2 μ l of the first-stage product as template with the primer pair MMTV 5F (5'-GTATGAAGCAGGATGGGTAGA-3') and 2NR, amplifying a 190-bp inner sequence.

All PCR amplifications were performed in 25 μ l mixture containing 0.2 μ M of each sense and anti-sense primers, 10 mM Tris–HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM of each dNTP and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, USA). Thermocycling was performed in PTC-200™ DNA Engine thermal cycler (MJ Research, Watertown, USA) by denaturation at 94 °C for 5 min, then 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 45 s and a final elongation step at 72 °C for 10 min. PCR assays were performed in triplicate to assure reproducibility of the reactions.

As a positive control for the detection of MMTV-like sequences, we used a 2.7 kb *env*-LTR fragment, kindly provided by Pr Beatriz G.-T. Pogo (Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA). Negative controls were reactions without added DNA template.

PCR products were electrophoresed into 2% agarose gels containing ethidium bromide, and visualized with UV-light by the Gel Doc 2000 System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Standard PCR precautions and procedures were used to avoid contamination.

2.3. DNA sequencing

To confirm the presence of viral DNA and to rule out amplification of non-specific or endoge-

nous retroviral sequences, the PCR products of ten randomly selected positive BC samples were sequenced. For that, MMTV *env*-like PCR products were purified from agarose gels using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Purification kit (Promega) and sequenced on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). The sequences were then compared with the corresponding region of the prototype MMTV and HMTV sequences (GenBank Accession Nos. AY152721 and AF243039) using BLAST and ClustalW (version 1.83) programs.

2.4. Immunohistochemistry analysis

Immunohistochemical staining for the detection of ER, PgR, HER2, and P53 expression was assessed on formalin-fixed paraffin embedded tissues using the EnVision+ Labeled Polymer Kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. The primary antibodies used were as follows: ER (clone 1D5, 1:40); PgR (clone PgR636, 1:40); HER2 (polyclonal, 1:1000); and P53 (clone D07, 1:100), all supplied from DakoCytomation. Interpretation of the staining was carried out according to the usual criteria by the same experienced pathologist blinded from any other clinicopathological or molecular data. For ER, PgR, and P53, cases were considered positive if 10% or more of tumor cells showed nuclear staining [27]. To determine the score of HER2 expression the membrane staining pattern was estimated and scored on a scale of 0 to 3+ [28]. A case was considered to overexpress HER2 if it scored 2+ or 3+. Immunohistochemical investigation of invasive ductal carcinoma cases were reported previously [29].

2.5. Statistical analysis

The presence of MMTV-like sequences in tumors were tested for possible association with clinicopathological data (age, histological type and grade, tumor size, and lymph node status) and immunohistochemical parameters (ER, PgR, HER2, and P53) using the χ^2 or the Fisher's exact test where appropriate. *P* values of <0.05 were considered statistically significant. All analyses were carried out with the SPSS 13.0 (for windows) statistical software package.

3. Results

The presence of MMTV-like *env* sequences was investigated on tumor tissues and their corresponding normal breast tissues collected from 122 women with primary BC from Tunisia. The integrity of all the DNA samples was validated by PCR amplification of a 407-bp fragment of the human β -globin gene. Using semi-nested PCR analysis, MMTV-like *env* sequences were detected in 17 (13.9%) of the 122 tumor specimens. Whereas, all of the 122 matched normal breast tissues were negative for these sequences (Fig. 1). To determine whether the amplified fragments were indeed homologous to MMTV-like, the semi-nested PCR products of ten different breast tumors was isolated from the agarose gels and the DNA was sequenced.

In Fig. 2, the sequences of nine breast tumor DNA PCR products are shown and aligned to the corresponding region of the prototype MMTV and MMTV-like sequences (GeneBank Accession Nos. AY152721 and AF243039, respectively). Multiple nucleotide alignment showed 95–97% homology to both MMTV and MMTV-like *env* sequences. All our sequences differed from the positive control, and from prototype sequences, with at least one mismatch, suggesting that no contamination events had occurred. Finally, no significant homology was found when our sequences were compared to the human genome sequences available in GenBank database, indicating that these amplicons were not of human genomic or endogenous retrovirus origin (data not shown).

The comparison of the clinicopathological and immunohistochemical data between the MMTV-like positive and MMTV-like negative BC cases is summarized in Table 2. Overall, no correlation was found between the presence of MMTV-like *env* sequences and age groups, histological type, SBR grade, lymph node status, or tumor size. Immunohistochemical expression of ER and accumulation of P53 did not vary significantly between MMTV-like positive and negative samples. However,

there was a significant correlation between the presence of MMTV-like sequences and PgR ($P = 0.03$) and HER2 ($P = 0.04$) negativity.

4. Discussion

The origin of MMTV-like *env* sequences in human samples, whether exogenous or endogenous, has been widely discussed. Because it has been found almost exclusively in breast tumor tissues, it has been suggested that it has an exogenous origin. In our current study the viral sequences were not detected in normal breast tissues of individuals with MMTV-like *env* positive and negative tumors. Moreover, in previous studies MMTV-like *env* sequences have also been shown to be absent or present in a very low percentage of normal breast tissues (0–1.8%), including those from normal breast tissues anatomically related to tumor tissues [8,12,30]. Additionally, the MMTV-like *env* sequences detected in our cases were highly homologous to the MMTV and the MMTV-like sequences reported previously [8,31], but had low homology (that did not exceed 15%) with the known endogenous viruses, especially HERV-K10 and HERV-K-T47D.

The source and the mode of transmission of MMTV-like virus were not identified, but many hypotheses suggest that it is an exogenous virus transmitted from mice to humans [32]. Additional evidence for an exogenous origin of this virus is supported by the geographical differences in BC incidence and MMTV-like sequences positivity rates in different countries [12,32–34]. This idea is based on the observation that human BC incidence is higher in areas where *Mus domesticus*, is seen. The latter being the common house mouse with abun-

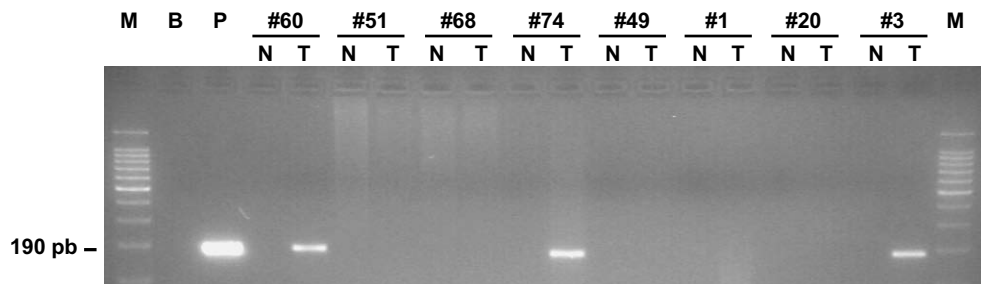


Fig. 1. Representative ethidium bromide-stained 2% agarose gel electrophoresis of the amplification products for the detection of a 190-bp sequence in the MMTV-like *env* gene using a semi-nested PCR assay. Cases #60, #74, and #3 show positivity in tumor (T) but not in normal (N) breast tissues. Cases #51, #68, #49, #1, and #20 lack bands in both tumor and normal breast tissues, indicating the absence of MMTV-like *env* sequence in these cases. Lanes M show 100 bp DNA ladder (Promega); Lanes P and B represent positive (2.7 kb *env*-LTR sequence of the MMTV) and negative (without DNA template) controls, respectively.

```

MMTV AY152721 GAAAATTCCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
HMTV AF243039 GAAAATTCCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #7 GAAAATTCCTCCTAA-GATCCCA-TGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #67 GAAAATTCCTCCTAA-GATCCCA-TGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #15 GAAAATTCCTCCTAA-GATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #60 GGGAAATTCCTCCTAA-GATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #10 GAAAATTCCTCCTAA-GATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #74 GAAAATTCCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #83 GAAAATTCCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #79 GAAAATTCCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #108 GAAAATTCCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
BC #82 GAAAATTCCTCCTAAAGATCCCAATGATAGAGATTTTACTGCTCTAGTTCCCCATACAGAA 60
* * * * *

MMTV AY152721 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
HMTV AF243039 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #7 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #67 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #15 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #60 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #10 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #74 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #83 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #79 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #108 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
BC #82 TTGTTTCGCTTAGTTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGCCAGGATTTCAAGAA 120
* * * * *

MMTV AY152721 CATGAGATGATTCCTACATCTG--CCTGTGTTACT 156
HMTV AF243039 CGTGAGATGATTCCTACATCTG--CCTGTGTTACT 156
BC #7 CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCTGGGTGTTACA 156
BC #67 CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTTACA 156
BC #15 CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCGGCCCTGTG 156
BC #60 CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTTACA 156
BC #10 CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTTACA 156
BC #74 CATGAGATGATTCCTACTTCTGGCCCTGGGTAAA 156
BC #83 CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTTACA 156
BC #79 CGTGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTTACA 156
BC #108 CATGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGGGTGTTACA 156
BC #82 CGTGAGATGATTCCTACATCTGGCCCTGTGTTACA 156
* * * * *

```

Fig. 2. Multiple nucleotide alignment of the MMTV-like *env* sequences from nine Tunisian human breast carcinomas (indicated by their respective Nos.) with mouse mammary tumor virus (MMTV) and human mammary tumor like virus (HMTV) sequences retrieved from GenBank database (Accession Nos. AF243039 and AY152721, respectively). Sequences were aligned and then manually adjusted using CLUSTAL W, version 1.83. Stars show conserved sites along the alignment.

dant MMTV in its genome [11,32]. Moreover, a recent study reported the ability of MMTV to infect human cells, thus reinforcing the hypothesis of enzootic transmission of MMTV from mice to humans [35].

In this study, MMTV-like *env* sequences were detected in 14% of Tunisian BC. This prevalence is considerably lower than the 74% reported in a previous study performed by Levine et al. [14] on a small series of Tunisian patients with BC diagnosed between 1978 and 1979, a time when the inflammatory form of BC was more prominent than it is now. It is important to note that among the 38 BC samples examined in the study of Levine et al., 81.6% were categorized as rapidly progressing tumors (PEV-positive) based on the *poussée évolutive* (PEV) classification system, with 71% showing objective signs of inflammatory BC (redness,

warmth, and edema). When comparing PEV-positive tumors with PEV-negative tumors in the latter series, a higher proportion of aggressive tumors contained the MMTV-like sequences, suggesting a correlation between MMTV-like and inflammatory BC. Therefore, the high frequency of inflammatory BC in the Levine et al. study compared with our current study may account for the difference in the prevalence of MMTV between the two studies.

On the other hand, our result concurs with the other studies performed in low-incidence countries of BC, such as China, in which only 16.8% of the BC cases were found positive for MMTV-like sequences [13]. In contrast, our current prevalence of MMTV-like in BC is lower than reported in areas of high incidence of BC, especially in the United States where MMTV-like sequences were identified in 30–40% of BC [8,30,36]. Similarly, studies of

Table 2
 Characteristics of MMTV-like *env* negative and positive breast carcinomas in Tunisian women

Variables	Number of MMTV-like negative cases (%)	Number of MMTV-like positive cases (%)	P-value ^a
Age (yrs)			0.20
<35	12 (11.5)	3 (17.6)	
35–50	51 (48.5)	7 (41.2)	
>50	42 (40)	7 (41.2)	
Histological type			0.57
Invasive ductal carcinomas	94 (89.5)	15 (88)	
Invasive lobular carcinoma	5 (4.7)	0 (0)	
Medullary carcinoma	4 (3.8)	2 (12)	
Inflammatory breast carcinoma	2 (2)	0 (0)	
Histological grade			0.49
Grade I	19 (19.8)	4 (26.7)	
Grade II	36 (37.5)	7 (46.6)	
Grade III	41 (42.7)	4 (26.7)	
Tumor size (mm)			0.75
≤20	33 (31.5)	6 (35.3)	
21–50	69 (65.7)	11 (64.7)	
>50	3 (2.8)	0 (0.0)	
Lymph node involvement			0.11
Negative	69 (77.5)	12 (92.3)	
Positive	20 (22.5)	1 (7.7)	
Estrogen receptor ^{b, d}			0.80
Negative	59 (56)	9 (47)	
Positive	46 (44)	8 (53)	
Progesterone receptor ^{b, d}			0.03
Negative	51 (48.5)	13 (76.5)	
Positive	54 (51.5)	4 (23.5)	
HER2 ^{c, d}			0.04
–/1+	74 (70.5)	16 (94)	
2+/3+	31 (29.5)	1 (6)	
P53 status ^{b, d}			0.80
Negative	65 (62)	10 (59)	
Positive	50 (48)	7 (41)	

Bold numbers indicate significant correlation.

^a P values were calculated by χ^2 or Fisher's exact tests (two-sided) and were considered to be statistically significant for $P < 0.05$.

^b Evaluated by immunohistochemistry and considered positive if $\geq 10\%$ of tumor cells showed nuclear staining.

^c Evaluated by immunohistochemistry and considered positive if scored 2+ or 3+ as described in Section 2.

^d Immunohistochemical data of invasive ductal carcinoma cases were reported previously [29].

BC cases from Italy, Argentina, and Australia have detected MMTV-like sequences respectively in 37.7%, 31.7%, and 42.2% of tumors [9,10,12]. Although, other independent studies from Italy, Austria, and England have failed to detect MMTV-like sequences in any BC cases investigated [37–39]. These discrepancies have been attributed to possible differences in laboratory procedures and/or standards used, or to tissue heterogeneity [7].

The low frequency of MMTV-like sequences in the current study compared to the previous study of Tunisian BC by Levine et al. [14] may be in part due to differences in the technique employed, but this may not explain the large difference observed. In fact, we used a high sensitive semi-nested PCR assay for the detection of the virus and a high qual-

ity of DNAs obtained from frozen tissues. However, the low frequency of MMTV-like sequences found in the current study cannot be due to selection bias as we investigated a large series of BC specimens randomly selected and obtained from patients living in a large area, well representative of Tunisian population.

Therefore, the important reduction in the prevalence of MMTV-like sequences in Tunisian BC compared with previous reports seems to be due to a change in the exposure to the virus and/or to its host, probably in relation with the improvement of life and socio-economic conditions of Tunisians. This hypothesis is supported by several epidemiological data indicating; i.e., a reduction in the prevalence of the inflammatory form of BC in Tunisia

(up to 55% during the seventies and eighties *versus* less than 10% at present) and an increased prevalence of the common histological type [18,19]. Another less likely hypothesis that could explain the change in the prevalence of MMTV-like associated BC in Tunisia is that some change might have occurred in the viral sequences (mutations, rearrangements, etc.) leading to less oncogenic strains or that make them more difficult to detect with the primers used. Other studies comparing wide viral sequences isolated from elderly and recently diagnosed BC specimens are necessary to verify this hypothesis.

In the current study, the analysis of clinicopathological parameters showed no significant correlation between the presence of MMTV-like sequences and age groups, histological subtype, histological grade, lymph node status, or tumor size, indicating that the presence of the MMTV-like is not restricted to any of the tumor subgroups examined. These findings are in agreement with several previous reports [9,40].

We found no correlation between the presence of MMTV-like sequences and ER expression or P53 accumulation. These findings are in agreement with previous studies showing only a trend correlation between the presence of the MMTV-like *env* sequences and P53 accumulation [9,14,25,40]. Interestingly, our study demonstrates a significant correlation between the presence of MMTV-like sequences and PgR negativity. Most previous studies failed to detect such correlation [9,40]. In contrast, only one study has found a correlation between MMTV-like presence and PgR positivity [25]. The correlation between the presence of MMTV-like sequences and PgR negativity in our study suggests an aggressive phenotype of MMTV-like associated tumors. This observation supports previous findings that correlated MMTV-like positive BC with the overexpression of the laminin receptor, a marker for tumor invasiveness and poor prognosis [9], and is in agreement with previous reports that correlated MMTV-like presence with gestational BC [41] and inflammatory BC [14], which are known to be aggressive.

With regard to HER2, an inverse correlation was found between the presence of MMTV-like sequences and HER2 overexpression ($P = 0.04$). Only two previous studies have investigated the correlation between MMTV-like and HER2 status [9,40], but they have not found significant correlation. HER2 is a proto-oncogene known to be overexpressed in about 30–50% of human breast cancers

[42,43]. HER2 overexpression plays an important role in BC development and metastasis; it is also associated with therapeutic resistance, poor prognosis, and represents an important target for recent cancer therapies [44]. It has been demonstrated *in vitro* that several oncogene products, such as the adenovirus 5 E1A, the Epstein–Barr virus EBNA1, the simian virus 40 large T antigen, c-Myc, c-Cbl, and PEA3 gene products, act as repressors of the HER2 gene [45–49]. The significance of the unexpected inverse correlation between the presence of MMTV-like sequences and HER2 overexpression in our series remains to be clarified since MMTV does not contain an oncogene, but induces transformation by its impact on cellular protooncogenes in the near vicinity of its insertion site, enhancing their activity and dysregulating the cell cycle. Nevertheless, our finding indicates that possible contribution of MMTV-like in human breast carcinogenesis implicates mechanisms other than HER2.

The biological significance of the presence of MMTV-like *env* sequences in human BC is still unclear, and the possibility that these sequences do not contribute to the etiology of BC and are instead an epiphenomenon cannot be ruled out. But the detection of viral DNA only in breast cancerous tissues and not in normal breast tissues, suggests that MMTV-like may be a contributing factor in breast carcinogenesis. Additionally, the results from the current study suggest that some links exist between MMTV-like sequences and hormones; this also supports the above hypothesis. Some authors [50] have proposed a multifactorial model for breast carcinogenesis involving viral infections, hormones, and genetic elements; our data are consistent with such model.

In conclusion, our findings confirm the presence of MMTV-like *env* sequences in BC in Tunisian women. In addition, they describe an important decrease in the prevalence of these viral sequences in BC compared with earlier studies. This reduction suggests a variation in virological characteristics and/or exposure to the virus. The detection of MMTV-like sequences only in breast cancerous tissues, especially those both PgR and HER2 negative suggests that the MMTV may be a contributing factor in human breast carcinogenesis.

Conflict of interest statement

No conflict of interest was declared between any persons incriminated in this work.

Acknowledgements

This work was supported by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et Technologie” and the “Ministère de la Santé Publique” of Tunisia.

The authors thank Pr Beatriz G.-T. Pogo from Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA for her kind gift of the viral positive control.

References

- [1] S.E. Hankinson, G.A. Colditz, W.C. Willett, Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones, *Breast Cancer Res.* 6 (2004) 213–218.
- [2] L.G. Labrecque, D.M. Barnes, I.S. Fentiman, B.E. Griffin, Epstein–Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study, *Cancer Res.* 55 (1995) 39–45.
- [3] J.J. Bittner, The milk influence of breast tumor in mice, *Science* 95 (1942) 462–463.
- [4] W.D. Holder, S.A. Wells, Antibody reacting with murine mammary tumour virus in the serum of patients with breast cancer: possible serological detection method for breast carcinoma, *Cancer Res.* 43 (1983) 239–244.
- [5] N. Segev, A. Hizi, F. Kirenberg, I. Keydar, Characterization of a protein, released by T47D cell-line, immunologically related to the major envelope protein of the mouse mammary tumour virus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1531–1535.
- [6] A.S. Dion, A.J. Girardi, C.C. Williams, A.A. Pomenti, E.S. Redfield, Responses of serum from breast cancer patients to murine mammary tumour virus: fact or artefact?, *J. Natl. Cancer Inst.* 79 (1987) 207–211.
- [7] J.F. Holland, B.G. Pogo, Mouse mammary virus-like viral infection and human breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 5647–5649.
- [8] Y. Wang, J.F. Holland, I.J. Bleiweiss, S. Melana, X. Liu, I. Pelisson, A. Cantarella, K. Stellrecht, S. Mani, B. G.-T.B.G.-T. Pogo, Detection of mammary tumor virus ENV gene-like sequences in human breast cancer, *Cancer Res.* 55 (1995) 5173–5179.
- [9] B.G. Pogo, S.M. Melana, J.F. Holland, J.F. Mandeli, S. Pilotti, P. Casalini, S. Menard, Sequences homologous to the mouse mammary tumor virus *env* gene in human breast carcinoma correlate with overexpression of laminin receptor, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2108–2111.
- [10] S.M. Melana, M.A. Picconi, C. Rossi, J. Mural, L.V. Alonio, A. Teyssie, J.F. Holland, B.G. Pogo, Detection of murine mammary tumor virus (MMTV) *env* gene-like sequences in breast cancer from Argentine patients, *Medicina (B Aires)* 62 (2002) 323–327.
- [11] J.F. Holland, S. Melana, Y. Wang, M. Fernandez-Cobo, J.D. Jiang, B.G. Pogo, Human mammary tumor virus (HMTV) is horizontally, not vertically transmitted, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22 (2003) 873.
- [12] C.E. Ford, D. Tran, Y. Deng, V.T. Ta, W.D. Rawlinson, J.S. Lawson, Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of Australian and Vietnamese women, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1118–1120.
- [13] T. Luo, X.T. Wu, M.M. Zhang, K. Qian, Study of mouse mammary tumor virus-like gene sequences expressing in breast tumors of Chinese women, *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37 (2006) 844–846.
- [14] P.H. Levine, B.G. Pogo, A. Klouj, S. Coronel, K. Woodson, S.M. Melana, N. Mourali, J.F. Holland, Increasing evidence for a human breast carcinoma virus with geographic patterns, *Cancer* 101 (2004) 721–726.
- [15] F. Tabbane, L. Muenz, M. Jaziri, M. Cammoun, S. Belhassen, N. Mourali, Clinical and prognostic features of a rapidly progressing breast cancer in Tunisia, *Cancer* 40 (1977) 376–382.
- [16] N. Mourali, L.R. Muenz, F. Tabbane, S. Belhassen, J. Bahi, P.H. Levine, Epidemiologic features of rapidly progressing breast cancer in Tunisia, *Cancer* 46 (1980) 2741–2746.
- [17] P.H. Levine, S.C. Steinhorn, L.G. Ries, J.L. Aron, Inflammatory breast cancer: the experience of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) Program, *J. Natl. Cancer. Inst.* 74 (1985) 291–297.
- [18] M. Maalej, H. Frikha, S. Ben Salem, J. Daoud, N. Bouaouina, M. Ben Abdallah, K. Ben Romdhane, Breast cancer in Tunisia: clinical and epidemiological study, *Bull. Cancer* 86 (1999) 302–306.
- [19] S. Ben Ahmed, S. Aloulou, M. Bibi, A. Landolsi, M. Nouira, L. Ben Fatma, L. Kallel, O. Gharbi, S. Korbi, H. Khairi, C. Kraiem, Breast cancer prognosis in Tunisian women: analysis of a hospital series of 729 patients, *Santé Publique* 14 (2002) 231–241.
- [20] J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, D.M. Parkin, GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5, version 2.0 IARC Press, Lyon, 2004.
- [21] F.A. Tavassoli, P. Devilee, Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs, WHO Classification of Tumors, IARC Press, 2003.
- [22] C.W. Elston, I.O. Ellis, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term followup, *Histopathology* 19 (1991) 403–410.
- [23] H.M. Bauer, Y. Ting, C.E. Greer, J.C. Chambers, C.J. Tashiro, J. Chimera, A. Reingold, M.M. Manos, Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR based method, *JAMA* 265 (1991) 472–477.
- [24] R.K. Saiki, T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes, *Nature* 324 (1986) 13–19.
- [25] M. Faedo, C.E. Ford, R. Mehta, K. Blazek, W.D. Rawlinson, Mouse mammary tumor-like virus is associated with p53 nuclear accumulation and progesterone receptor positivity but not estrogen positivity in human female breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 4417–4419.
- [26] C.E. Ford, M. Faedo, R. Crouch, J.S. Lawson, W.D. Rawlinson, Progression from normal breast pathology to breast cancer is associated with increasing prevalence of mouse mammary tumor virus-like sequences in man and women, *Cancer Res.* 64 (2004) 4755–4759.
- [27] W. Remmele, H.E. Stegner, Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immuno-

- histochemical estrogen receptor detection (ER ICA) in breast cancer tissue, *Pathologie* 8 (1987) 138–140.
- [28] T.W. Jacobs, A.M. Gown, H. Yaziji, M.J. Barnes, S.J. Schnitt, Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States food and drug administration approved scoring system, *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 1983–1987.
- [29] M. Hachana, M. Trimeche, S. Ziadi, K. Amara, S. Korbi, Evidence for a role of the Simian Virus 40 in human breast carcinomas, *Breast Cancer Res. Treat.* (2008), doi: 10.1007/s10549-008-9901-z.
- [30] S.M. Melana, J.F. Holland, B.G. Pogo, Search for mouse mammary tumor virus-like env sequences in cancer and normal breast from the same individuals, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 283–284.
- [31] M. Ono, T. Yasunaga, T. Miyata, H. Ushikubo, Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome, *J. Virol.* 60 (1986) 589–598.
- [32] T.H. Stewart, R.D. Sage, A.F. Stewart, D.W. Cameron, Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*, *Br. J. Cancer* 82 (2000) 446–451.
- [33] S. Imai, Mouse mammary tumor virus and mammary tumorigenesis in wild mice, *Pathol. Int.* 46 (1996) 919–932.
- [34] Y. Wang, I. Pelisson, S.M. Melana, V. Go, J.F. Holland, B.G. Pogo, MMTV-like env gene sequences in human breast cancer, *Arch. Virol.* 146 (2001) 171–180.
- [35] S. Indik, W.H. Gunzburg, B. Salmons, F. Rouault, Mouse mammary tumor virus infects human cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 6651–6659.
- [36] P. Etkind, J. Du, A. Khan, J. Pillitteri, P.H. Wiernik, Mouse mammary tumor virus-like *ENV* gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1273–1278.
- [37] R. Zangen, S. Harden, D. Cohen, P. Parrella, D. Sidransky, Mouse mammary tumor-like env gene as a molecular marker for breast cancer?, *Int J. Cancer* 102 (2002) 304–307.
- [38] A. Witt, B. Hartmann, E. Marton, M. Schreiber, E. Kubista, The mouse mammary tumor virus-like env gene sequence is not detectable in breast cancer tissue of Austrian patients, *Oncology Rep.* 10 (2003) 1025–1029.
- [39] C. Mant, C.D. Gillett, C. Arrigo, J. Cason, Human murine mammary tumor virus-like agents are genetically distinct from endogenous retroviruses and are not detectable in breast cell lines or biopsies, *Virology* 318 (2004) 393–403.
- [40] J. Lawson, D. Dinh, D. Tran, C. Ford, W. Rawlinson, Elevated expression of the tumor suppressing protein p53 is associated with the presence of mouse mammary tumor-like env gene sequences (MMTV-like) in human breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 87 (2004) 13–17.
- [41] Y. Wang, S.M. Melana, B. Baker, I. Bleiweiss, M. Fernandez-Cobo, J.F. Mandeli, J.F. Holland, B.G. Pogo, High prevalence of MMTV-like env gene sequences in gestational breast cancer, *Med. Oncol.* 20 (2003) 233–236.
- [42] D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* 244 (1989) 707–712.
- [43] I. Bieche, R. Lidereau, Genetic alterations in breast cancer, *Genes Chromosomes Cancer* 4 (1995) 227–251.
- [44] D. Yu, M.C. Hung, Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies, *Oncogene* 19 (2000) 6115–6121.
- [45] D. Yu, T.C. Suen, D.H. Yan, L.S. Chang, M.C. Hung, Transcriptional repression of the neu protooncogene by the adenovirus 5 E1A gene products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 4499–4503.
- [46] Y.C. Lin, J.M. Peng, W.B. Wang, The N-terminal common domain of simian virus 40 large T and small t antigens acts as a transformation suppressor of the HER-2/neu oncogene, *Oncogene* 19 (2000) 2704–2713.
- [47] X. Xing, S.C. Wang, Y. Zou, X.Y. Xia, R. Shao, K.Y. Kwong, Z. Yu, S. Zhang, S. Miller, L. Huang, M.C. Hung, The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis, *Nat. Med.* 6 (2000) 189–195.
- [48] T.C. Chuang, T.D. Way, Y.S. Lin, Y.C. Lee, S.L. Law, M.C. Kao, The Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 may act as a transforming suppressor of the HER2/neu oncogene, *FEBS Lett.* 532 (2002) 135–142.
- [49] T.C. Chuang, Y.H. Yu, Y.S. Lin, S.S. Wang, M.C. Kao, The N-terminal domain of SV40 large T antigen represses the HER2/neu-mediated transformation and metastatic potential in breast cancer, *FEBS Lett.* 511 (2002) 46–50.
- [50] J.S. Lawson, D. Tran, W.D. Rawlinson, From Bittner to Barr: a viral, diet and hormone breast cancer aetiology hypothesis, *Breast Cancer Res.* 3 (2000) 81–85.

Annexe 3

Investigation of human papillomaviruses in breast carcinomas

Mohamed Hachana, Sonia Ziadi, Intissar Toumi, Sadok Korbi, Mounir Trimeche

Department of Pathology, Farhat Hached Hospital, Sousse, Tunisia

Correspondence:

Mounir Trimeche, MD, PhD

Department of Pathology

Farhat Hached Hospital, Sousse 4000, Tunisia

Tel: +21621311760

Fax: +21673210355

E-mail: m_trimech@yahoo.fr

Running title: human papillomaviruses and breast cancer

Keywords: human papillomaviruses, breast cancer, Tunisia

Abstract

The aim of this study was to evaluate the prevalence of broad range of anogenital HPVs in a series of 123 Tunisian breast carcinoma cases. PCR assays were performed to amplify regions within the L1, E1, E6 and E7 open reading frames of a broad range of anogenital HPVs and specific types HPV16, 18, 31 and 33. In addition, we performed an in situ hybridization analysis using HPV biotinylated DNA probes for the detection of broad spectrum of anogenital HPV types, high-risk HPV types (16 and 18), intermediate-risk HPV types (31 and 33) and low-risk HPV types (6 and 11). None of the 123 breast carcinoma samples showed PCR amplification of HPV DNA using the broad spectrum consensus primer-pairs E1-350L/E1-547R and GP5+/GP6+ primers. Furthermore, neither high risk nor low risk HPV types were detected in any of these cases. Moreover, using in situ hybridization for the detection of HPVs, we failed to detect a positive signal in neoplastic cells in any case. Our results suggest that anogenital papillomaviruses are unlikely to play a role in the development of breast carcinomas in Tunisian patients.

Introduction

Breast cancer is one of the most prevalent malignant throughout the world, occupying first place in mortality in women.¹ The etiology of breast cancer is unknown, but there are many risk factors associated with breast cancer development. Multiple genetic, endocrine, environmental and life style factors may contribute to its causation. Also, there is some evidence that breast carcinogenesis may be in some cases associated with viral agents. A possible role of oncogenic HPV in breast cancer has been suspected. Indeed, it has been shown that human breast epithelial cells can be immortalized by HPV types 16 and 18.² This raised the possibility that HPV may be etiologically related to some cases of breast cancer.

However, unlike cervical carcinoma, which is almost always associated with HPV, the causal role of HPV infection in the development of breast carcinoma remains a controversial subject. While some studies report the presence of HPV DNA sequences in breast cancer tissue, especially types 16, 18 and 33,³⁻¹⁷ other studies revealed that HPVs could not be detected in breast cancer.¹⁸⁻²³

In Tunisia, breast cancer is the leading cause-related death among women, with an annual incidence of 19.6/100,000 women.¹ The aim of this current study was to evaluate the prevalence of anogenital papillomaviruses in breast cancer in Tunisia. We examined the presence of these viruses in 123 specimens of human breast cancers using polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridization.

Subjects and methods

Patients and tumors samples

Our current study was conducted on 123 Tunisian women with sporadic breast carcinoma. The cases were diagnosed between 1995 and 2006 at the Farhat-Hached Hospital in Sousse, Tunisia.

The age of patients ranged from 31 to 87 years, with mean age of 49.3 years. One hundred and twelve cases were invasive ductal carcinoma, six was medullary carcinoma, and five were invasive lobular carcinoma according to WHO criterias.²⁴ Invasive ductal carcinomas were graded according to the modified Scarff-Bloom-Richardson (SBR) system as follows: 21.5% grade I, 38.4% grade II, 40.1% grade III.²⁵ Tumors ranged in size from 1 to 8 cm, with a mean of 2.6 cm. Eighty-one patients had no pathological node involvement, whereas 22 had pathological node involvement. Twenty patients had no surgical axillary dissection. Distant metastases were described in only 11 patients at the time of diagnosis. The estrogen receptor, progesterone receptor and HER2/*neu* status of the tumor was performed by immunohistochemistry and revealed a positive result in 44%, 47% and 26% of cases, respectively.

Polymerase chain reaction (PCR)

DNA was extracted from tumor frozen tissues according to standard protocol previously described in our earlier studies.²⁶ Extracted DNA adequacy to PCR analysis was firstly assessed by a PCR assay using a set of primers (GH-20: ACACAACCTGTGTTCACTAGC/GH-21: GGAAAATAGACCAATAGGCAG) amplifying a 407-bp fragment in the human β -globin gene as previously described.²⁷

The presence of HPV-DNA was carried out by polymerase chain reaction (PCR) in three steps. Briefly, a first screening to determine the presence of HPV-DNA was performed using two consensus degenerated primers GP5+/GP6+²⁸ and E1-350L/E1-547R,²⁹ which targets a conserved 150 bp sequence of the L1 open reading frame (ORF) and a conserved 180 pb sequence spanning the E1 ORF, respectively. These primers permit the detection of a large spectrum of anogenital HPV types (6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53,

56, 57, and 58). As a second step, two consensus primer pairs, located within the E6 and E7 ORFs, pU-1M/pU-2R and pU-31B/pU-2R were used to amplify HPV-DNA from high-risk HPV (types 16, 18, 31, 33, 52b, and 58) and low-risk HPV (types 6 and 11), respectively.³⁰ Finally, all samples were tested for HPV types 16, 18, 31, and 33 using type-specific primers located within the E6 ORF.³¹ Appropriate HPV positive controls were included in all amplification reactions.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed on 3 µm thick formalin-fixed paraffin-embedded sections to evaluate the presence of HPV in tumor cells. Formalin-fixed paraffin-embedded sections suitability to in situ hybridization analyze was assessed using biotinylated Human DNA Probe (Ref: X1414, DakoCytomation). All analyzed sections proved adequate for in situ hybridization analysis yielding the presence of dark brown signal in the nuclei of cells.

In brief, for the detection of HPV, paraffin embedded sections were examined with a broad spectrum HPV biotinylated DNA probe purchased from DakoCytomation, which recognises the anogenital HPV types 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51, and 52 (Ref: Y1404, DakoCytomation), and another three specific types of biotinylated DNA probes including: high-risk 16 and 18 (Ref: Y1412, DakoCytomation), intermediate-risk 31 and 33 (Ref: Y1413, DakoCytomation) and low-risk 6 and 11 (Y1411, DakoCytomation) according to the manufacturer's instructions. Positive control formalin-fixed paraffin-embedded tissues infected with HPV were included in every in situ hybridization procedure. Positive signals were seen as dark brown granules in the nuclei of affected neoplastic cells.

Results

The integrity of all the DNA samples was validated by PCR amplification of a 407-bp fragment of the human β-globin gene Fig. 1. Despite the presence of adequate extracted DNA, none of the 123 breast carcinoma samples were HPV positive using consensus E1-350L/E1-547R Fig. 2a. and GP5+/GP6+ Fig. 2b. primers. Neither high risk (HPV 16, 18, 31, 33, 52b, and 58) Fig. 2c. nor low risk (HPV 6 and 11) Fig. 2d. type viruses were detected in any of these cases. In addition using primers specific for HPV 16, 18, 31 and 33 none of cases were positive Fig. 3. Positive controls were always given strong positivity and negative controls were consistently negative. Moreover, in situ hybridization showed no evidence of staining

for HPV DNA in any of the cases. All controls tested in the same conditions stained reproducibly.

Discussion

To date, more than 200 HPV types have been characterized,³² about 40 of them are associated with anogenital neoplasia.³³ Infection with the low-risk HPV6, 11, 42, 43, 44 are responsible for benign lesions (condylomas). The high-risk viruses such as HPV31, 33, 35, 51, 52 and 58 are detected more frequently in low squamous intraepithelial lesions, whereas HPV16 and 18 are predominantly associated with cancers of anogenitalia especially the uterine cervix.³⁴

The anogenital HPV types are found in human infections and cancers at considerably different prevalence and with significant interregional variation.³⁵ However, available data on the prevalence of HPV within healthy women and women with uterine cervix cancer in Tunisia suffer from severe limitations. Moreover available data are derived from a few cities within this country and conceivably refer to specific populations and social groups. In a previous study, it was reported that HPV16 is the most frequent type in Tunisian cervicovaginal cancer, followed by HPV31 HPV18.³⁶ In addition the predominant HPV type reported among prostitute's women is HPV16, but in married women is HPV6.^{37, 38}

In the present study, we evaluated the presence of HPVs in 123 breast carcinoma samples by using DNA PCR amplification of regions within the L1, E1, E6 and E7 open reading frames of wide spectrum of anogenital human HPV genome. The presence of HPVs was also evaluated by in situ hybridization method using specific HPV probes. This is, to the best of our knowledge, the first study investigating the presence of HPVs in breast cancer in Tunisia. Despite the use of high quality of DNA extraction from fresh frozen tissues and the use of high sensitive PCR for the detection of many genomic sequences (E1, L1, E6 and E7) of anogenital HPV types previously validated by most studies,^{3-5, 7, 9} we could not detect HPV genome in any analyzed breast carcinoma cases. This result is in accordance with many previous reports that failed to detect various HPV types in breast carcinoma specimens from France, Switzerland, India, the USA and the UK.^{18, 20-22}

The absence of HPV sequences in the current study cannot be due to selection bias as we investigated a large series of breast cancer specimens randomly selected and obtained from patients living in a large area, well representative of the Tunisian population. In addition,

based on the clinical records none of the patients included in this study have been treated earlier for benign or malignant induced HPV lesion such as uterine cervix carcinomas.

An overview of published papers regarding HPV presence and prevalence in breast cancer tissue is given in [Table 1](#). The rate of HPV positivity in human breast cancer tissues varies from 4.4 to 86% of cases. HPV types 11, 16 and 18 are the most frequent HPV types found in breast cancer in women living in the United States and Brazil were HPV11, 16 and 18,^{5, 7} HPV type 18 is present in the majority of Australian women.⁹ In parallel, HPV type 33 is the most frequent virus in Asian women.⁴ HPV type 16 has been identified in Italian and Norwegian women who had previous cervical neoplasias.³⁹ Moreover, recent study reported that HPV type 16 is the only type present in Canadian women. However, studies on the presence of high-risk HPV in the Middle East reveal that HPV types 18, 33 and 35 are present in breast cancer and normal mammary tissues in Turkish women.⁴⁰ In addition, HPV types 33 and 35 are the predominant viruses in breast cancer tissues in Syrian women. Thus, this data suggests that specific types of high-risk HPV infection in breast tissues are related to specific geographic locations.

It is important to note that in contrast to cervical cancer, HPVs may be difficult to detect in breast cancer specimens.⁹ It has been suggested that these difficulties may be due to low HPV DNA copy numbers in positive breast carcinoma cases. Only one study has attempted to evaluate the viral load of HPV in breast carcinomas using quantitative real-time PCR analysis and revealed that the viral load was much lower than 1 copy per cell.¹³ A low copy number of HPV in non-genital carcinomas has also been reported in studies of Chilean lung carcinomas⁴¹ and Chinese oesophageal cancer,⁴² and in a Finish study on head and neck cancers.⁴³ This extremely low viral load suggests that HPV DNA is unlikely to be involved in the development of breast carcinomas.

On the other hand, the overview of the published data might indicate that epidemiological factors like country of origin and a history of HPV-induced diseases might play an important role in the distribution of HPV in breast cancer. It is important to take into account that incidence of HPV infection in Tunisian women, which belongs to the arabo-islamic population characterized by a conservative lifestyle, is lower than Latin American, Asian countries, and Western countries.⁴⁴ Furthermore, several demographic characteristics such as poor nutrition, high fertility, and lack of access to healthcare can clarify the different rates of HPV infection in breast cancer as well as in cervical cancer.

In conclusion, our study suggests that anogenital papillomaviruses (HPV6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 57, and 58) are unlikely to play a role in the development of breast carcinomas in Tunisian patients. However, the possibility that other subtypes of HPV contribute to breast carcinogenesis can not be ruled out.

Conflict of interest statement

There is no conflict of interest.

References

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D.M, GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5, version 2.0 IARC Press, Lyon, 2004.
2. Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3687-3691.
3. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;21:95-100.
4. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in chinese. *Breast Cancer* 2000;7:33-36.
5. Liu Y, Klimberg VS, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Chiriva-Internati M, Henry-Tillman R, Hermonat PL. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *J Hum Virol* 2001;4:329-334.
6. Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, Mei Q, Ke Y. P53 codon 72 polymorphism (c/g) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in china. *Cancer* 2002;95:2571-2576.
7. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84:131-137.
8. Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Mueller-Holzner E, Marth C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *J Clin Virol* 2004;31:292-297.
9. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93:946-948.
10. de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7:R1-11.

11. Kroupis C, Markou A, Vourlidis N, Dionyssiou-Asteriou A, Lianidou ES. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem* 2006;39:727-731.
12. Choi YL, Cho EY, Kim JH, Nam SJ, Oh YL, Song SY, Yang JH, Kim DS. Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of korean women. *Tumour Biol* 2007;28:327-332.
13. Khan NA, Castillo A, Koriyama C, Kijima Y, Umekita Y, Ohi Y, Higashi M, Sagara Y, Yoshinaka H, Tsuji T, Natsugoe S, Douchi T, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in japan. *Br J Cancer* 2008;99:408-414.
14. Akil N, Yasmeeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel AD, Al Moustafa AE. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in syrian women and their association with id-1 expression: A tissue microarray study. *Br J Cancer* 2008;99:404-407.
15. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramirez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Moran-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:189-194.
16. Cantu de Leon D, Perez Montiel D, Nemcova J, Mikyskova I, Turcios E, Villavicencio V, Cetina L, Coronel A, Hes O. Human papillomavirus (hpv) in breast tumors: Prevalence in a group of mexican patients. *BMC Cancer* 2009;9:26.
17. Tsai JH, Tsai CH, Cheng MH, Lin SJ, Xu FL, Yang CC. Association of viral factors with non-familial breast cancer in taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J Med Virol* 2005;75:276-281.
18. Wrede D, Luqmani YA, Coombes RC, Vousden KH. Absence of hpv 16 and 18 DNA in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;65:891-894.
19. Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, Das BC. Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:197-202.
20. Bratthauer GL, Tavassoli FA, O'Leary TJ. Etiology of breast carcinoma. No apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18. *Pathol Res Pract* 1992;188:384-386.

21. Lindel K, Forster A, Altermatt HJ, Greiner R, Gruber G. Breast cancer and human papillomavirus (hpv) infection: No evidence of a viral etiology in a group of swiss women. *Breast* 2007;16:172-177.
22. de Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X. No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:55-58.
23. Czerwenka K, Heuss F, Hosmann JW, Manavi M, Lu Y, Jelincic D, Kubista E. Human papilloma virus DNA: A factor in the pathogenesis of mammary paget's disease? *Breast Cancer Res Treat* 1996;41:51-57.
24. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs, WHO Classification of Tumors, IARC Press, 2003.
25. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-410.
26. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a pcr-based method. *JAMA* 1991;265:472-477.
27. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324:163-166.
28. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers gp5 and gp6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by pcr. *J Gen Virol* 1995;76 (Pt 4):1057-1062.
29. Josefsson A, Livak K, Gyllensten U. Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:490-496.

30. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K.: Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991;72 (Pt 5):1039-1044.
31. Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Stolz E, Herbrink P. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by pcr in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 1996;34:745-747.
32. McGlennen RC. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med* 2000;20:383-406.
33. Bergeron C, Barrasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in low- and high-grade lesions. *Am J Surg Pathol* 1992;16:641-649.
34. Brestovac B, Harnett GB, Smith DW, Shellam GR, Frost FA. Human papillomavirus genotypes and their association with cervical neoplasia in a cohort of western australian women. *J Med Virol* 2005;76:106-110.
35. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of hpv type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: A meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;89:101-105.
36. Missaoui N, Hmissa S, Frappart L, Trabelsi A, Ben Abdelkader A, Traore C, Mokni M, Yaacoubi MT, Korbi S. P16ink4a overexpression and hpv infection in uterine cervix adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2006;448:597-603.
37. Hassen E, Chaieb A, Letaief M, Khairi H, Zakhama A, Remadi S, Chouchane L. Cervical human papillomavirus infection in tunisian women. *Infection* 2003;31:143-148.
38. De Marco F, Houissa-Kchouk F, Khelifa R, Marcante ML. High-risk hpv types in tunisia. A pilot study reveals an unexpectedly high prevalence of types 58 and 82 and lack of hpv 18 among female prostitutes. *J Med Virol* 2006;78:950-953.
39. Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (cin iii). *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:121-135.

40. Gumus M, Yumuk PF, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, Basaran G, Kaya H, Barisik N, Turhal NS. Hpv DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25:515-521.
41. Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: A study in chile. *Br J Cancer* 2007;97:85-91.
42. Shuyama K, Castillo A, Aguayo F, Sun Q, Khan N, Koriyama C, Akiba S. Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in china. *Br J Cancer* 2007;96:1554-1559.
43. Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Makitie A, Back L, Kontio R, Suuronen R, Lindqvist C, Auvinen E, Molijn A, Quint WG, Vaheri A, Aaltonen LM. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2003;107:401-406.
44. Drain PK, Holmes KK, Hughes JP, Koutsky LA. Determinants of cervical cancer rates in developing countries. *Int J Cancer* 2002;100:199-205.

Legends of figures

Fig. 1. Representative ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis after specific polymerase chain reaction (PCR) of a 407-bp fragment of the human β -globin gene. Lanes M show 100-bp ladder (Promega); lanes T represent positive controls; lanes B represent negative control (without DNA template).

Fig. 2. Representative ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis after specific polymerase chain reaction (PCR) of (a) E1 open reading frame of whole spectrum of anogenital HPV types, (b) L1 open reading frame of whole spectrum of anogenital HPV types, (c) HPV high risk types, (d) HPV low risk types. Lanes M show 50-bp ladder (Promega); lanes T represent positive controls; lanes B represent negative control (without DNA template).

Fig. 3. Representative ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis after specific polymerase chain reaction (PCR) of (a) HPV 16, (b) HPV 18, (c) HPV 31, (d) HPV 33. Lanes M show 50-bp ladder (Promega); lanes T represent positive controls; lanes B represent negative control (without DNA template).

Table 1 Results of studies of the presence and prevalence of HPV in human breast cancer around the world

Region	Authors, years	Country	Sample source	Case	HPV+ %	Subtypes analyzed
North America	Bratthauer, 1992	USA		13	0.0	6, 11, 16, 18
	Liu, 2001	USA	Fresh Frozen tissue	17	35.3	16,18,31
South America	Damin, 2004	Brazil	Paraffin-embedded tissue	101	24.7	16,18
	Mendizabal-Ruiz, 2008	Mexico	Paraffin-embedded tissue	67	4.47	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39
	de Leon, 2009	Mexico	Paraffin-embedded tissue	65	29.4	Multiple
Europe	Di Lonardo, 1992	Italy	Paraffin-embedded tissue	17	29.4	16
	Wrede, 1992	UK		80	0.0	Multiple, 16, 18
	Czerwenka, 1996	Austria	Paraffin-embedded tissue		0.0	6, 11,16,18,31,33,35
	Henning, 1999	Norway	Paraffin-embedded tissue	41	46.3	Multiple
	Widschwendter , 2004	Austria	Fixed	11	63.6	Multiple
	de Villiers, 2005	Germany	Paraffin-embedded tissue	29	86.0	Multiple, 6,11,27,57,66,87
	Kroupis, 2006	Greece	Fresh Frozen tissue	107	15.9	16,58,59,73,82
	Lindel, 2007	Swiss	Paraffin-embedded tissue	81	0.0	Multiple
	de Cremoux, 2008	France	Fresh Frozen tissue	50	0.0	Multiple, 16, 18, 33, 45
Australia	Kan, 2005	Australia	Paraffin-embedded tissue	50	48.0	16,18,33
Asia	Gopalkrishna, 1996	India	Fresh Frozen tissue	30	0.0	16, 18
	Yu, 1999	China and Japan	Paraffin-embedded tissue	72	41.6 11.1	16,18,33
	Li, 2002	China	Paraffin-embedded tissue	28	23.2	16,18
	Tsai, 2005	Taiwan	Fresh Frozen tissue	69	12.9	Multiple
	Choi, 2007	Korea	Paraffin-embedded tissue	123	6.5	Multiple
	Khan, 2008	Japan	Paraffin-embedded tissue	124	19.0	16, 18, 33
Middle East	Gumus, 2006	Turkey	Fresh Frozen tissue	50	74.0	11,16,18,33
East	Akil, 2008	Syrian	Paraffin-embedded tissue	113	61.0	Multiple 16, 18, 31, 33 and 35
Africa	Current study	Tunisia	Fresh Frozen tissue	123	0.0	Multiple, 16, 18,31,33

