

Bulletin et Mémoires
de
l'Académie royale de Médecine
de Belgique

Volume 160 — Année 2005 — N^{os} 5-6

(pages 287 à 293)

EXTRAIT

**RÔLE DES RÉPONSES IMMUNITAIRES DANS LES LÉSIONS
(PRÉ) NÉOPLASIQUES CERVICALES ASSOCIÉES
AUX PAPILLOMAVIRUS HUMAINS**
(résumé)

par
Ph. DELVENNE, (U.Lg),
Mémoire couronné par l'attribution du prix
Henri Fauconnier (Période 2002-2004)

**PALAIS DES ACADÉMIES
RUE DUCALE, 1
1000 BRUXELLES**

RÔLE DES RÉPONSES IMMUNITAIRES DANS LES LÉSIONS (PRÉ) NÉOPLASIQUES CERVICALES ASSOCIÉES AUX PAPILOMAVIRUS HUMAINS

par

Ph. DELVENNE

Lauréat du Prix Henri Fauconnier (période 2002-2004)

INTRODUCTION

Parmi les cancers qui sont répertoriés chaque année dans le monde, 20% environ sont associés à une infection virale. Les virus impliqués sont, par ordre de fréquence, les virus de l'hépatite, les papillomavirus, le virus Epstein-Barr,... Ces cancers viro-induits suscitent actuellement un intérêt considérable non seulement pour l'étude des mécanismes de la transformation néoplasique mais également pour la mise au point d'une immunothérapie spécifique, voire d'une vaccination anti-tumorale (prophylactique ou thérapeutique). Parmi les cancers associés à une infection virale, la relation entre le développement du cancer du col utérin et l'infection par les papillomavirus humains (HPV), ou du moins par certains types d'HPV, est actuellement l'une des mieux établies. Le cancer du col utérin est, par ordre de fréquence, la deuxième cause de mort par cancer chez la femme dans le monde. Environ 500.000 cas de cancer invasif du col utérin sont recensés chaque année, principalement dans les pays en développement.

Dans les pays occidentaux, on assiste actuellement à une augmentation sensible de cette maladie chez les femmes jeunes. En fait, si l'incidence globale du cancer du col utérin semble se stabiliser ces dernières années, cela tient à une diminution de fréquence chez les femmes âgées alors qu'elle a tendance à augmenter légèrement chez les femmes jeunes. Le cancer du col utérin est donc la cause d'un déficit important, à l'échelon de la population, en années de vie chez les femmes jeunes.

Les carcinomes épidermoïdes invasifs du col utérin sont précédés par des altérations dysplasiques de l'épithélium malpighien du col qui sont désignées par les termes de «néoplasie intraépithéliale cervicale» (CIN; Cervical Intraepithelial Lesion) ou de «lésion squameuse intraépithéliale» (SIL; Squamous Intraepithelial Lesion). Dans la terminologie utilisant les initiales SIL, les lésions dites de «bas grade» incluent les condylomes où l'infection par HPV est morphologiquement évidente et les CIN I, tandis que les lésions dites de «haut grade» sont constituées par les CIN II et les CIN III (Figure 1).

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré l'importance de divers facteurs sexuels dans le développement des cancers cervicaux (précocité des rapports sexuels, promiscuité sexuelle avec des partenaires multiples,...) mais lorsque ces facteurs de risque sont corrigés en fonction de la présence ou non de certains types d'HPV, il ressort que ces virus sexuellement transmissibles constituent le facteur de risque principal.

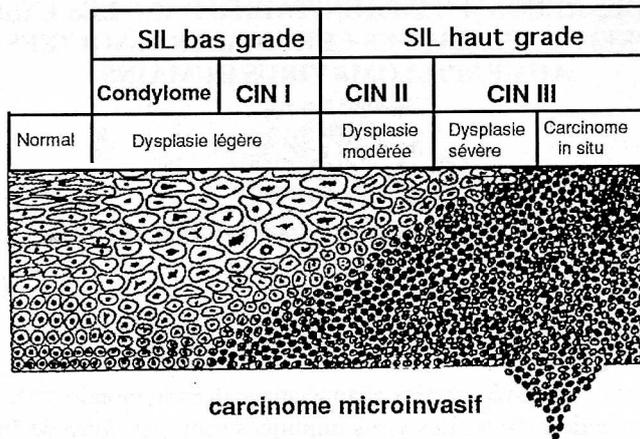


Fig.1

Représentation schématique des terminologies utilisées pour désigner les différents stades de transformation de l'épithélium épidermoïde du col utérin.

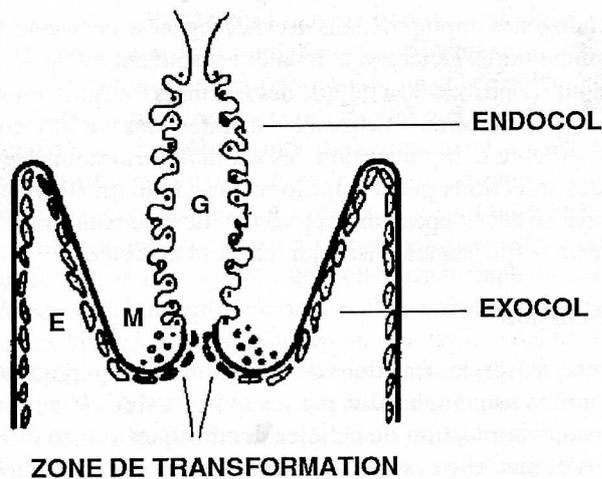
Le génome de HPV est détecté dans plus de 90% des lésions épidermoïdes (pré)cancéreuses du col utérin. De plus, la transcription de certains gènes viraux est régulièrement observée dans ces lésions et les lignées cellulaires qui en dérivent.

Pour bien comprendre la pathologie cancéreuse du col utérin, il convient de rappeler quelques notions histologiques. On distingue généralement deux parties au niveau du col utérin (Figure 2):

- une partie externe ou exocervicale qui est recouverte par un épithélium pluristratifié, de type épidermoïde,
- une partie interne ou endocervicale qui est limitée par un épithélium monostratifié, de type glandulaire.

La jonction entre l'épithélium épidermoïde exocervical et l'épithélium glandulaire endocervical n'est pas figée dans le temps. Cette jonction se déplace en effet vers l'exocol jusqu'à l'âge de vingt ans environ. Ensuite se met en place un processus de métaplasie, c'est-à-dire de transformation de l'épithélium glandulaire en un épithélium épidermoïde, ce qui fait remonter la jonction exo-endocervicale dans le canal endocervical où elle est souvent assez hautement située à la ménopause. La zone de métaplasie épidermoïde de l'épithélium glandulaire correspond à ce qu'on appelle la «zone de transformation» (Figure 2). On distingue donc, en fonction de leur origine au niveau du col, des lésions épidermoïdes et des lésions glandulaires. Seules les lésions épidermoïdes (les plus fréquentes) sont analysées dans ce travail.

Seuls certains types de HPV paraissent représenter un facteur de risque de développement d'un cancer du col utérin, comme l'ont démontré de nombreuses études consacrées à l'analyse de la distribution des types de HPV dans les différentes lésions auxquelles ils sont associés.



E= Epithélium épidermoïde
 G= Epithélium glandulaire
 M= Métaplasie épidermoïde des glandes endocervicales

Fig. 2

Schéma des différentes unités morphologiques formant le col de l'utérus avec illustration de la zone de transformation.

Pour classer le grand nombre de types de HPV, des arbres phylogénétiques ont été réalisés sur la base du degré d'identité de séquences dans certains gènes viraux. Plusieurs branches majeures de ces arbres phylogénétiques portent des types de HPV qui infectent exclusivement la peau. Une branche très ramifiée contient tous les types de HPV qui sont associés, chez l'homme, à une maladie cutanée rare, l'épidermodysplasie verruciforme. Une branche mixte est constituée par des types de HPV qui infectent les muqueuses, ainsi que par des HPV essentiellement ou exclusivement cutanés. Il existe également une branche avec des HPV muqueux à faible risque de transformation maligne et des HPV muqueux à risque élevé de transformation maligne. La localisation phylogénétique des types de HPV peut donc être corrélée de manière assez étroite avec leur tropisme tissulaire ou leur pouvoir pathogène. Nous nous sommes intéressés, dans ce travail, exclusivement aux HPV génitaux.

Si de nombreuses données suggèrent fortement qu'une infection par HPV est un facteur essentiel dans le développement des néoplasies génitales et en particulier cervicales, celle-ci n'est très vraisemblablement pas suffisante. Les infections génitales dues aux HPV sont très répandues, en particulier chez les femmes jeunes, et un long délai est observé entre l'infection et le développement d'un cancer invasif. De plus, les cancers du pénis sont rares chez les partenaires des femmes atteintes d'un cancer intra-épithélial ou invasif du col utérin malgré la fréquence élevée, chez ceux-ci, des infections par HPV et des lésions du pénis qui leur sont associées. D'autres facteurs semblent jouer un rôle déterminant dans l'expression du caractère latent ou transformant de ces virus. Parmi

les cofacteurs endogènes impliqués dans la cancérogenèse cervicale, une perturbation des défenses immunitaires générales et locales est souvent évoquée.

Ce travail est une contribution à l'étude des réponses immunitaires locales dans les lésions cervicales (pré)cancéreuses associées aux infections par HPV. Sa pertinence tient au fait qu'une meilleure compréhension des anomalies immunitaires qui permettent la persistance des infections par le papillomavirus humain (HPV) au niveau du col utérin pourrait aider au développement de protocoles de vaccination ou d'immunothérapie adjuvante des lésions (pré)cancéreuses qui leur sont associées.

Résultats et discussion

Au niveau des muqueuses, les fonctions de présentation antigénique aux lymphocytes T CD4+ sont assurées principalement par les cellules de Langerhans. Ces cellules constituent une sous-population de cellules dendritiques qui se différencient, entre autres, au niveau des muqueuses sous l'action de cytokines ou de chimiokines produites par les kératinocytes (cellules cibles à l'infection par HPV).

Nous avons montré que le développement et la progression des SILs du col utérin induites par HPV sont associées à une réduction de la densité des cellules de Langerhans (Al-Saleh *et coll.* 1998). Outre cette diminution quantitative, les cellules de Langerhans des SILs présentent également un déficit fonctionnel (Giannini *et coll.* 2002). Ce déficit immunitaire pourrait favoriser l'infection virale persistante et la cancérisation des kératinocytes. Le déficit d'activation des cellules de Langerhans présentes dans les SILs est en relation probablement avec une capacité diminuée des kératinocytes transformés par HPV à produire du GM-CSF (Hubert *et coll.* 1999). Les oncoprotéines E6 et E7 du virus HPV pourraient intervenir directement dans cette diminution de production de GM-CSF par des altérations de la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (Havard *et coll.* 2002; 2005). Le déficit d'activation des cellules de Langerhans présentes dans les SILs est en relation probablement également avec une expression accrue de cytokines avec des propriétés immunosuppressives, telles que IL10 et TGF β Transforming Growth Factor beta). Nous avons analysé non seulement des cytokines, comme le GM-CSF et l'IL10, mais aussi des chimiokines dont l'action stimulatrice est connue sur l'attraction des cellules dendritiques. Nous avons mis en évidence notamment une diminution d'expression de MIP3 α dans les SILs par rapport à l'exocol normal (Giannini *et coll.* 2002). Ce déficit de MIP3 α pourrait également expliquer les altérations quantitatives et qualitatives des cellules de Langerhans observées en cas d'infection par HPV.

Ces anomalies immunitaires (réduction de la densité/fonction des cellules de Langerhans) pourraient être la cible d'une manipulation immunothérapeutique car le rétablissement d'une concentration de GM-CSF analogue à celle détectée au niveau de kératinocytes normaux s'est accompagné d'une augmentation significative de la capacité migratoire de cellules dendritiques et de cellules de Langerhans dans des lésions (pré)cancéreuses cervicales formées *in vitro* (Hubert *et coll.* 1999). En l'absence de modèles permettant la multiplication et la maturation terminale des HPV en culture cellulaire ou chez l'animal, nous avons utilisé des lignées immortalisées de kératinocytes du col utérin

obtenues par transfection de l'ADN viral dans le génome cellulaire ou dérivées de cancers cervicaux invasifs selon deux modalités expérimentales, à savoir des cultures en «monocouche» et des cultures organotypiques sur un gel de collagène («équivalent dermique»). Dans ce dernier modèle, des kératinocytes non transformés reproduisent, à l'interface air-liquide, un épithélium morphologiquement normal tandis que des cellules infectées par l'HPV reconstituent un épithélium atypique histologiquement similaire aux lésions préneoplasiques rencontrées *in vivo*. Outre leur caractère plus physiologique, ces cultures ont l'avantage, d'une part, de permettre l'étude (immuno) histologique de l'effet de différents agents potentiellement thérapeutiques sur la capacité de kératinocytes à reproduire un épithélium normal ou préneoplasique et d'autre part, de recréer *in vitro* des lésions préneoplasiques du col utérin avec un environnement immunitaire proche de la situation *in vivo* (Delvenne *et coll.* 2001). De plus, ces lambeaux épithéliaux formés *in vitro* peuvent être manipulés par l'adjonction de cytokines, solubles (Delvenne *et coll.* 1995) ou incorporées dans un hydrogel bioadhésif (Hubert *et coll.* 2004), ainsi que par des effecteurs immunitaires cellulaires (Delvenne *et coll.* 2001). Nous avons également montré que les cellules dendritiques qui migrent dans ces cultures organotypiques sous l'influence du GM-CSF, peuvent induire l'apoptose des kératinocytes transformés par HPV (Hubert *et coll.* 2001). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'infiltration accrue de cellules dendritiques en présence de GM-CSF, telles qu'une augmentation de la durée de vie *in vitro* des cellules dendritiques ou une action chimiotactique sur celles-ci. Il faut remarquer cependant que des facteurs membranaires exprimés par les kératinocytes au niveau du col utérin pourraient également être impliqués *in vivo* dans le recrutement des cellules dendritiques, tels que des molécules d'adhésion cellulaire (E-cadhérine).

En conclusion, une meilleure compréhension des anomalies immunitaires locales durant la progression des lésions (pré)cancéreuses induites par HPV pourrait être utile pour la mise au point de nouveaux protocoles d'immunothérapie chez les femmes porteuses de lésions (pré)cancéreuses associées à ce virus et pour le développement d'un vaccin prophylactique visant à prévenir cette infection virale dans la population générale.

RÉSUMÉ

Parmi les cancers qui sont répertoriés chaque année dans le monde, 20% environ sont associés à une infection virale. La relation entre le développement du cancer du col utérin et l'infection par les papillomavirus humains (HPV) est actuellement l'une des mieux établies.

Si l'infection par certains types de HPV semble être un événement nécessaire dans le développement du cancer du col utérin, elle n'est probablement pas suffisante. Tous les individus infectés par un type viral à haut risque ne développent pas un cancer et il s'écoule souvent une longue période de latence entre l'infection primaire et la tumeur maligne. D'autres facteurs dépendant de l'hôte et/ou de l'environnement semblent nécessaires pour permettre l'expression du potentiel oncogène des HPV.

Ce travail a consisté à analyser le rôle de certains facteurs immunitaires qui, en permettant la persistance des cellules infectées par HPV, pourraient indirectement contribuer au développement du cancer invasif du col utérin. Nous avons d'abord montré que la zone de transformation du col utérin (où se développe la majorité des cancers) est caractérisée par des anomalies immunitaires intrinsèques susceptibles d'expliquer

la sensibilité particulière de cette région au développement des lésions (pré)néoplasiques. Il est probable ensuite que l'infection des cellules du col par HPV entretienne cette immunodéficience locale, en inhibant la production de facteurs solubles et membranaires importants pour la migration et la fonction des cellules qui présentent les antigènes viraux et/ou tumoraux au système immunitaire.

SUMMARY

Etiopathogenic and epidemiological studies have demonstrated that viruses are etiologically linked to approximately 20% of all human malignancies worldwide. Human papillomavirus (HPV) is one of the best characterized viruses associated with human cancer diseases, especially in the uterine cervix.

Although the role of HPV is well established in the cellular transformation and maintenance of the malignant phenotype of keratinocytes, the viral infection by itself is not sufficient for cancer development. The small number of infected individuals eventually developing cancer of the cervix and the long latency period between primary infections and cancer emergence suggest that additional environmental or host factors are involved in malignant progression. In this context, the local mucosal immunity might be expected to play a key role in the host defence against HPV infection and associated (pre)cancerous lesions.

The purpose of this work was to analyse the immune co-factors implicated in the initiation and promotion of the neoplastic process. We have shown that the transformation zone (TZ), where a substantial majority of cervical (pre)cancers develop, is characterized by intrinsic immune alterations which could explain why this region is at higher risk of developing cancer. We have also provided evidence that the viral infection of cervical keratinocytes contributes to the local immunodeficiency by inhibiting the production of soluble and membrane molecules important for the migration and function of antigen-presenting cells.

BIBLIOGRAPHIE

1. AL-SALEH W., GIANNINI SL., JACOBS N., MOUTSCHEN M., DOYEN J., BONIVER J., DELVENNE P., *Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix*, J. Pathol., 184, 283-290 (1998).
2. DELVENNE P., AL-SALEH W., GILLES C., THIRY A., BONIVER J., *Inhibition of growth of normal and human papillomavirus-transformed keratinocytes in monolayer and organotypic cultures by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha*, Am. J. Pathol., 146, 589-598 (1995).
3. DELVENNE P., HUBERT P., JACOBS N., *Epithelial metaplasia: an inadequate environment for anti-tumour immunity?*, Trends Immunol., 25, 169-173 (2004).
4. DELVENNE P., HUBERT P., JACOBS N., GIANNINI SL., HAVARD L., RENARD I., SABOULARD D., BONIVER J., *The organotypic culture of HPV-transformed keratinocytes: an effective in vitro model for the development of new immunotherapeutic approaches for mucosal (pre)neoplastic lesions*, Vaccine, 19, 2557-2564 (2001).
5. GIANNINI SL., HUBERT P., DOYEN J., BONIVER J., DELVENNE P., *Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: Implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix*, Int. J. Cancer, 97, 654-659 (2002).
6. HAVARD L., DELVENNE P., BONIVER J., GIANNINI SL., *Differential production of cytokines and activation of NF-kappa β in HPV-transformed keratinocytes*, Virology, 298, 271-285 (2002).
7. HAVARD L., RAHMOUNI S., BONIVER J., DELVENNE P., *High levels of p105 (NFKB1) and p100 (NFKB2) proteins in HPV16-transformed keratinocytes: role of E6 and E7 oncoproteins*, Virology, 331, 357-366 (2005).
8. HUBERT P., EVRARD B., MAILLARD C., FRANZEN-DETROOZ E., DELATTRE L., FOIDART JM., NOËL A., BONIVER J., DELVENNE P., *Delivery of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in bioadhesive hydrogel stimulates migration of dendritic cells in models of human papillomavirus-associated (pre)neoplastic epithelial lesions*, Antimicrob. Agents Chemother., 48, 4342-4348 (2004).
9. HUBERT P., GIANNINI SL., VANDERPLASSCHEN A., GREIMERS R., FRANZEN-DETROOZ E., JACOBS N., BONIVER J., DELVENNE P., *Dendritic cells induce the death of human papillomavirus-transformed keratinocytes in an in vitro model of cervical (pre)neoplastic lesions*, FASEB, J. 15, 2521-2523 (2001).

10. HUBERT P., VAN DEN BRÛLE F., GIANNINI SL., FRANZEN-DETROOZ E., BONIVER J., DELVENNE P.,
*Colonisation of in vitro- formed cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions
with dendritic cells. Role of granulocyte monocyte-colony stimulating factor, Am. J. Pathol., 154, 775-
784 (1999).*

*

* *