

## Immuno-marquage du papillomavirus dans le cancer du col utérin

### Immuno-Labeling of Papillomavirus in the cancer of the cervix

Medles M<sup>1</sup>, Bendahmane-Salmi M<sup>2</sup>, Tou A<sup>3</sup>,  
Kandouci A.<sup>4</sup>

#### Correspondance

Medles M.  
E-mail : medles2m@gmail.com  
Tel : (+ 213) 07 72 97 13 04

#### Summary

**Background & objective:** Human papillomavirus (HPV) is recognized as a major risk factor for cervical cancer worldwide. However, the burden of persistent infection with oncogenic HPV-called high-risk (HR HPV) in this type of cancer remains poorly documented in Africa. The objective of this study was to investigate the HPV by immune-histochemistry in biopsies of patients with cervical cancer. **Methods:** In archived biopsies of squamous carcinomas and cervical dysplasia received between 2002 and 2008, the HPV virus was systematically sought by immuno-labeling method in the Pathology Department of University Hospital Sidi Bel Abbès, Algeria. **Results:** Of the 52 biopsies analyzed, the frequency of HPV HR was 91% and 84% in carcinomas and dysplasias, respectively. Postmenopausal women with mean age of 56 years (range 51-60 years) were most affected (36.5%). The intensity of the immuno-labeling was neither correlated with the histological grade lesions nor with the age of the patient. **Conclusion:** Almost all precancerous and cancerous cervical lesions in this series exhibit HPV infection, suggesting that a combined cytology to HPV HR test could improve the sensitivity of the screening of cervical cancer. Mass vaccination campaigns against HPV should be considered to help eradicate this deadly cancer.

**Keywords:** cancer, cervix, HPV HR, immuno-labelling, infection

*History of article: received on October 9<sup>th</sup>, 2015; accepted the June 23<sup>rd</sup>, 2016*

<sup>1</sup> Laboratoire de recherche en Environnement et Santé (LRES) UDL de Sidi-Bel-Abbès, Algérie

<sup>2</sup> Laboratoire de recherche en Environnement et Santé (LRES), UDL de Sidi-Bel-Abbès, Algérie

<sup>3</sup> Service d'Anatomo-pathologie, CHU de Sidi- Bel-Abbès, Algérie

<sup>4</sup> Service de médecine de travail, CHU de Sidi Bel Abbès, Algérie

#### Résumé

**Contexte & objectif :** Le papillomavirus humain (HPV) est reconnu comme facteur de risque majeur du cancer cervical dans le monde. Cependant, le fardeau de l'infection persistante à HPV oncogènes dits à haut risque (HPV HR) dans ce type de cancer, reste peu documenté en Afrique. La présente étude avait pour objectif, de rechercher l'HPV par immuno-histochimie dans les biopsies des patientes avec cancer cervical. **Méthodes :** Recherche systématique du virus HPV par la méthode d'immuno-marquage, sur les biopsies archivées des carcinomes épidermoïdes et des dysplasies cervicales entre 2002 et 2008, dans le service d'anatomopathologie de CHU de Sidi Bel Abbès, en Algérie. **Résultats :** Sur 52 biopsies analysées, la fréquence de l'HPV HR a été de 91 et 84%, respectivement dans les carcinomes et les dysplasies. Les femmes ménopausées d'âge moyen de 56 ans (extrêmes 51-60 ans) étaient les plus affectées (36,5%). L'intensité de l'immuno-marquage n'a été corrélée ni avec le grade histologique des lésions ni avec l'âge de la patiente. **Conclusion :** L'infection à HPV a été détectée dans la quasi-totalité des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de cette série. Ceci renforce l'intérêt de la combinaison de l'examen cytologique et d'un test HPV HR dans le dépistage du cancer du col. Des campagnes de vaccination de masse contre l'HPV sont à envisager pour contribuer à éradiquer ce cancer mortel.

**Mots clés :** cancer, col utérin, HPV HR, immunomarquage, infection.

*Historique article: reçu le 9 oct. 2015; Accepté le 23 juin 2016*

#### Introduction

De par sa forte morbi-mortalité, le cancer du col utérin est un véritable problème mondial de santé publique. En effet, il occupe le deuxième rang parmi les cancers les plus communs chez la femme, son incidence à l'échelle mondiale est de 493 000 nouveaux cas et 200 000 décès par an (1). La recherche de l'agent causal a été à la base du succès de la lutte contre la plupart des maladies infectieuses. Les études épidémiologiques sur l'infection à HPV ont établi le rôle de ces virus dans la genèse des néoplasies cervicales intra-épithéliales et du cancer du col.

De plus, la densité de la charge virale en milieu liquide est fortement liée au grade histologique de la lésion. Ces données renforcent la valeur potentielle du test HPV dans le dépistage du cancer du col utérin. Cependant, les travaux démontrant l'implication de l'HPV dans ce cancer demeurent fragmentaires dans les contrées africaines. L'objectif de la présente étude est de déterminer le fardeau de l'HPV dans les tumeurs cervicales et de rechercher la corrélation possible entre l'âge, la charge virale et le grade histologique.

### Méthodes

Sur 52 biopsies archivées des carcinomes épidermoïdes et des dysplasies cervicales entre 2002 et 2008 au service d'anatomopathologie du CHU de Sidi Bel Abbès, la recherche de l'HPV à haut risque par immuno-histochimie a été effectuée. La technique de marquage réalisée a été manuelle, basée sur l'utilisation de l'anticorps primaire monoclonal anti-HPV (clone K1H8) spécifique des HPV à Haut risque (type 6, 11, 18, 31, 33, 42, 51, 52, 56 et 58) et les deux anticorps secondaires Biotine et Streptavidine.

#### *Protocole de l'immuno-marquage*

A partir des blocs de biopsies paraffinées, des coupes de 2 à 3µm d'épaisseur ont été faites à l'aide d'un microtome selon les étapes ci-après :

- préparation de lames silanisées,
- incubation puis déparaffinage avec de xylènes,
- réhydratation avec de l'alcool absolue,
- dépôts de lames dans une solution de démasquage préchauffée à 98°,
- lavage avec de l'eau distillée,
- dépôts d'une goutte de l'anticorps primaire monoclonal anti HPV (clone : K1H8), puis incubation,
- rinçage avec une solution de lavage,
- dépôt d'une goutte de l'Ac secondaire : Biotine,
- rinçage avec un bain de la solution de lavage,

- dépôt de quelques gouttes de l'eau oxygénée,
- un bain de la solution de lavage,
- dépôt de quelques gouttes de 2<sup>ème</sup> Ac secondaire : Streptavidine,
- lavage avec un bain de la solution de lavage,
- ajout des gouttes de la solution chromogène.

L'étape finale consistait à la coloration avec de l'hématoxyline de MAYER, puis montage et lecture au microscope optique.

L'intensité du marquage a été estimée en fonction du pourcentage des cellules marquées, en retenant comme positives, les valeurs supérieures à 10% des cellules marquées. Une intensité de marquage entre 40 et 60% a été considérée comme moyennement positive et au-delà de 60%, elle était enregistrée comme fortement positive.

### Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de fréquences absolues ou relatives. Nous avons recouru essentiellement à l'analyse statistique descriptive (moyenne).

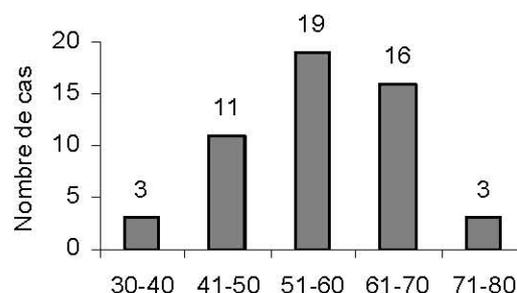
### Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts

### Résultats

#### *Caractéristiques générales de la population d'étude*

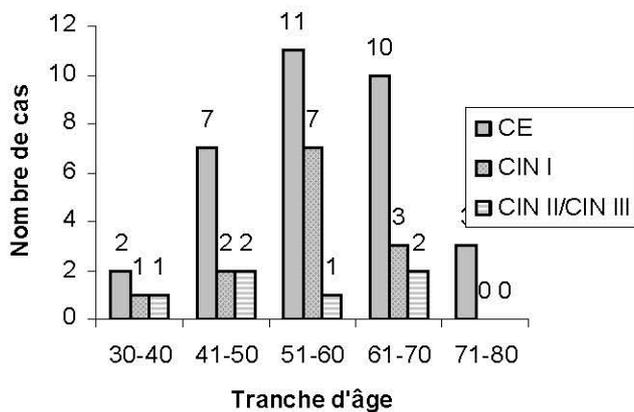
La figure 1 montre la distribution des patientes selon les tranches d'âge et montre que leur âge moyen était de 56 ans ; la majorité des patientes (88,46 %) étaient âgées entre 41 et 70 ans avec un pic (36,5 %) entre 51 et 60 ans. Toutes les femmes de la population d'étude étaient mariées.



**Figure 1 :** Distribution des cas en fonction des tranches d'âge

*Répartition des cas en fonction de l'âge et de l'examen histopathologique*

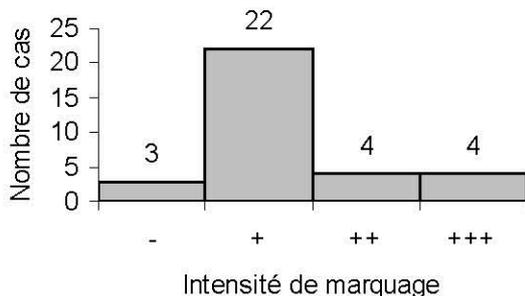
Des 52 biopsies de col utérin analysées par immuno-marquage des HPV HR, 33 ont été des carcinomes épidermoïdes et 19, des dysplasies cervicales. Onze cas (21,15 %) de carcinomes épidermoïdes et 7 de CIN I (36,84 %) étaient âgés entre 51 et 60 ans. Dix cas (19,23 %) de carcinomes épidermoïdes, 3 (15,79%) de CIN I, 2 (10,53%) de CIN II et CIN III, étaient âgés entre 61 et 70 ans (Figure 2).



**Figure 2 :** Distribution des cas en fonction de l'âge et de l'histopathologie

*Fréquence des HPV HR dans les carcinomes épidermoïdes*

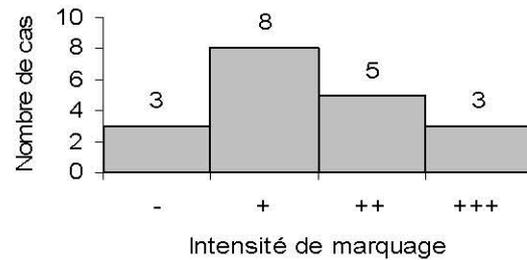
Parmi les 33 cas de carcinomes épidermoïdes, la recherche des HPV HR été positive chez 30 cas (90,91 %) et négative pour 3 d'entre eux (9,09 %) (Figure 3). Les analyses positives l'ont été faiblement pour 22 cas, et fortement pour 4.



**Figure 3 :** Répartition des cas de carcinomes épidermoïdes selon l'intensité de marquage des HPV HR par immunohistochimie  
 - : négative ; + : faiblement positive ; +++ : fortement positive

*Fréquence des HPV HR dans les dysplasies*

Dans 19 cas de dysplasies cervicales, 16 cas (84,21 %) se sont révélés HPV HR positifs et 3 (15,79 %), négatifs. Les analyses positives l'ont été fortement pour 8 cas, moyennement pour 5, et faiblement pour les 3 restants (Figure 4).

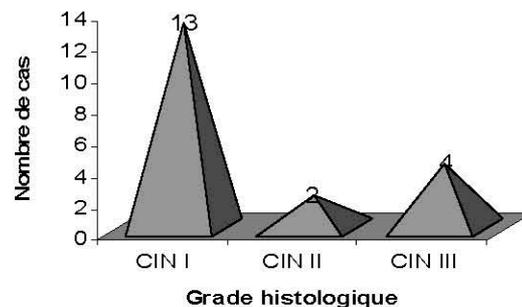


**Figure 4 :** Répartition des cas de dysplasies cervicales selon l'intensité de marquage des HPV HR par immunohistochimie

Le marquage des HPV HR par immunohistochimie était cytoplasmique formant un halo marron autour des noyaux de cellules carcinomateuses (illustrée dans la planche I).

*Répartition des cas de dysplasies cervicales selon le grade histologique*

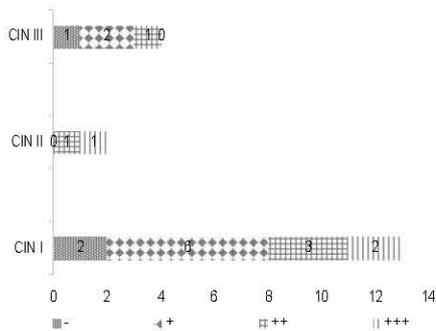
Parmi les 19 cas de dysplasies cervicales, 13 étaient des lésions de bas grade (CIN I), et les 6 autres, des lésions de haut grade (Figure 5).



**Figure 5 :** Répartition des cas de dysplasies cervicales selon le grade histologique

*Répartition des cas de dysplasies cervicales selon le grade histologique et l'intensité de l'immuno-marquage des HPV HR*

Parmi les 19 cas de dysplasies cervicales, l'HPV HR était négatif chez 2 cas de CIN I et un seul cas de CIN III ; 6 autres cas de CIN I et 2 cas de CIN III ont été HPV HR faiblement positifs, 3 cas de CIN I moyennement positifs et 2 autres cas de CIN I fortement positifs (Figure 6).



**Figure 6 :** Répartition des cas de dysplasies cervicales selon le grade et l'intensité de l'immuno-marquage des HPV HR

## Discussion

La présente étude a réalisé l'immuno-marquage de 52 biopsies archivées provenant des patientes âgées entre 38 et 80 ans dont l'âge moyen était de 56 ans. La majorité des patientes (88,46 %) étaient âgées entre 41 et 70 ans avec un pic (36,54 %) entre 51 et 60 ans. Sur les 33 cas de carcinomes épidermoïdes et 19 cas de dysplasies cervicales, 11 cas de carcinomes épidermoïdes et 7 cas de CIN I étaient âgés entre 51 et 60 ans. En accord avec les données de la littérature (2), les tranches d'âge ménopausique et post-ménopausique, sont l'âge le plus propice à l'apparition des lésions cancéreuses après une dizaine ou vingtaine d'années de persistance de l'infection virale. La prépondérance de lésions cervicales à la ménopause, pourrait s'expliquer par les modifications hormonales et leur conséquence immunitaire, peut être aussi par l'atrophie et le risque de microtraumatismes accrus favorisant la pénétration des HPV et leur effet sur la carcinogénèse. Ces résultats corroborent d'autres données de registres sur le cancer dans les pays en développement (3) qui montrent qu'environ 90 % des cas confirmés de néoplasie affectent les femmes âgées d'au moins 35 ans, et que l'incidence de ce cancer est très faible pour les femmes de moins de 25 ans. Le cancer du col utérin affecte plus fréquemment les multipares en période d'activité génitale. Le profil épidémiologique rapporté dans les pays en développement est cependant sensiblement différent de celui observé en Europe (4); en

effet, la répartition par âge de l'incidence des cancers du col utérin en France indique une fréquence croissante de cette pathologie à partir de 20 ans. Cette situation relèverait notamment, de la précocité de l'activité sexuelle chez les jeunes femmes et les adolescentes en Europe.

Parmi les 33 cas de carcinomes épidermoïdes, la recherche des HPV HR par immunohistochimie a été positive dans 30 cas (90,91%); ce résultat est en phase avec les observations dans l'étude de Walboomers et al. publiée en 1999 (5), qui rapportait déjà une positivité de 99,7% pour les HPV HR dans des carcinomes épidermoïdes du col utérin.

Quant aux 19 cas de dysplasies cervicales dans cette série, la recherche du HPV s'est révélée positive chez 16 d'entre eux, et négative dans 3 cas. Ce constat est en phase avec quelques travaux antérieurs. C'est le cas d'une méta-analyse, qui a retrouvé une positivité dans 84 % des lésions dysplasiques (6); de même que dans les travaux de Seigneurin et Morand, qui ont décrit un profil semblable. Ces auteurs ont évoqué un lien de causalité entre l'infection à HPV et les néoplasies intra-épithéliales, en retrouvant de l'ADN viral dans plus de 90% d'échantillons de leur série (7). L'infection à HPV est relativement fréquente dans la population générale, comme rapporté par Winer et al en 2005. Ces auteurs estiment en outre qu'environ sept femmes sur dix ont été exposées aux HPV au moins une fois durant leur vie, et que sans intervention, une femme sur cinq parmi ces dernières pouvait développer un cancer du col (8). L'exposition à ce virus se fait par contact sexuel, souvent lors de premiers rapports sexuels, d'autant qu'ils sont plus précoces. Les femmes jeunes sont alors plus susceptibles de contracter et développer l'infection. Des études américaines sur des étudiantes universitaires et des jeunes femmes ont mis en évidence des prévalences d'HPV particulièrement élevées, de 26 à 39% (9, 10). Les lésions condylomateuses et dysplasiques sont la principale expression clinique de la maladie. Elles peuvent régresser spontanément après de longs mois ou des

années, ou encore persister, et constituer des foyers latents de multiplication virale (11, 12). Ces foyers chroniques peuvent évoluer en dysplasie de haut grade, voire en carcinome du col, comme démontré par Wallin et son équipe dans une enquête prospective (13). Toutes les patientes de la présente série étaient mariées, comme dans les travaux antérieurs de Winer *et al* (8) qui ont démontré que le cancer cervical était extrêmement rare chez les sujets vierges, contrairement au cancer de l'utérus et celui du sein. D'autres études ont suggéré une association positive entre l'activité sexuelle et le développement des CIN; ainsi qu'une corrélation directe avec le risque de l'infection cervicale à HPV chez les femmes jeunes (14, 15).

Le marquage des HPVHR par immunohistochimie sur les biopsies, a été cytoplasmique formant un halo marron autour des noyaux de cellules carcinomateuses (planche I). La coupe (D) est une coupe histologique d'une biopsie de lésion de haut grade avec un immunomarquage fortement positif des cellules basales. Ce phénomène relèverait de la grande affinité que présentent les HPV pour les cellules basales qui en constituent le premier site d'infection à travers la zone de jonction. Culp *et al.* ont démontré que la laminine 5, une protéine de la lame basale et ligand des intégrines, serait capable de piéger des virions HPV 11 ou des VLP HPV 11 et faciliterait leur interaction avec des cellules épithéliales (16).

Concernant l'immunomarquage, l'étude a retrouvé 33 cas de carcinomes épidermoïdes, dont 22 étaient faiblement positifs et 4 fortement positifs. Parmi les 16 cas de dysplasies cervicales, 8 ont été fortement positifs, 5 moyennement positifs, et 3 faiblement positifs. Deux cas de dysplasies cervicales de CIN I et un cas de CIN III ont été HPV HR négatifs, 6 cas de CIN I et 2 de CIN III ont été HPV HR faiblement positifs, 3 cas de CIN I ont été HPV HR moyennement positifs et 2 cas de CIN I ont été fortement positifs. Ces résultats traduisent l'absence de corrélation entre la densité de

l'immunomarquage et la charge virale avec le grade histologique de la lésion. Toutefois, il aurait été plus préférable de calculer la charge virale dans un milieu liquide dans le cadre de la surveillance; car une charge virale élevée est un indicateur de CIN sous-jacente. A cet égard, Cuzick (2002) (17), a montré qu'une charge du HPV 16 élevée dans des frottis de dysplasies légères a une valeur prédictive de 100 % dans la détection d'une lésion de haut grade sous-jacente. Sun *et al.* ont également rapporté que la sévérité et la taille de la lésion étaient fortement corrélées à la charge virale(18).

La dysplasie cervicale liée à la persistance de l'infection à HPV est tributaire de quatre principaux facteurs de risque (19). Il s'agit notamment du type du virus (particulièrement les HPV 16-18), du nombre des copies d'ADN viral (charge virale), de la réponse immunologique de l'hôte aux antigènes viraux, et enfin des facteurs environnementaux (le tabac et les hormones).

Si le papillomavirus à haut risque est l'agent étiologique déterminant dans plus de 90 % des cas de cancer du col, il n'en est pas le facteur exclusif. D'autres circonstances sont incriminées telles que : la précocité de l'activité sexuelle, la multiplicité des partenaires sexuels, la contraception orale, la précarité, le tabagisme et d'autres agents infectieux (l'herpès simplex humain (HSV2), le cytomegalovirus (CMV), l'Epstein Barr Virus (EBV) et les Chlamydiae).

Le cancer du col est un cancer évitable, d'autant plus que les lésions dysplasiques peuvent mettre jusqu'à 10 à 15 ans pour se développer et atteindre le stade d'invasion, le dépistage précoce est donc possible. Celui-ci est encore aléatoire dans notre milieu, lors de consultations routinières, faute de programme organisé. Le dépistage repose quasi-exclusivement sur l'analyse cytologique du frottis cervico-vaginal, dont la sensibilité est faible, ne dépassant pas 60% (20); une enquête publiée en 2002 révélait un nombre inacceptable de cancers invasifs chez des femmes pourtant régulièrement contrôlées par frottis (21). La recherche du HPV améliore sensiblement la détection du cancer du col;

l'absence du virus sur frottis exclut presque toujours et en toute sécurité la présence d'une lésion précancéreuse (22) ; ce qui ne peut être affirmé par la réalisation du seul frottis conventionnel. Des moyens plus sensibles notamment de biologie moléculaire (HCII et PCR) dont la sensibilité est supérieure à 95%, permettent, à côté de l'immunohistochimie, la confirmation de lésions cancéreuses.

#### Limites et forces de l'étude

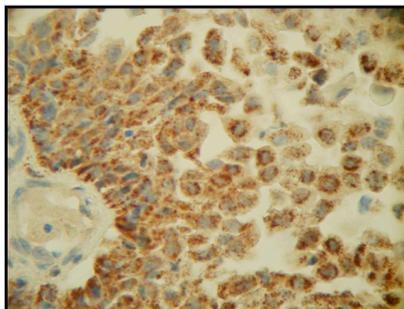
Les résultats présentés méritent néanmoins d'être interprétés avec caution. En effet, le caractère monocentrique et retrospectif de l'étude, ainsi que la faible taille de l'échantillon, sont susceptibles d'affecter la puissance des observations. Il en est de même du manque d'un protocole antérieur validé qui pourrait avoir occasionné la perte de certaines informations utiles. Toutefois, la force de ces observations réside dans leur caractère princeps dans notre contexte de pays à faible ressources. L'enquête

basée sur des techniques validées et fiables de recherche du HPV sur des pièces biopsiques archivées, montre la possibilité et la pertinence de l'approche en oncologie gynécologique dans nos milieux. Des stratégies de prévention et de dépistage peuvent être envisagées, fondées sur des évidences.

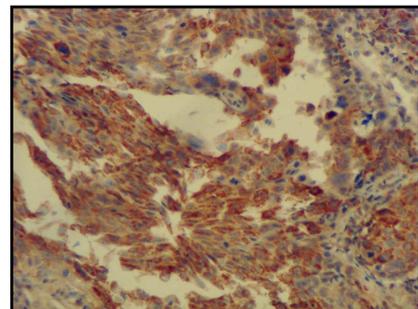
#### Conclusion

L'infection à HPV, sans corrélation évidente avec les caractéristiques sociodémographiques des sujets, la charge virale et le grade histologique, a été détectée dans la quasi-totalité des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de cette série. Ceci renforce l'intérêt de la combinaison de l'examen cytologique et d'un test HPV HR dans le dépistage du cancer du col. Des campagnes de vaccination de masse contre l'HPV sont à envisager en vue de réduire la charge de morbidité imputable à ce cancer.

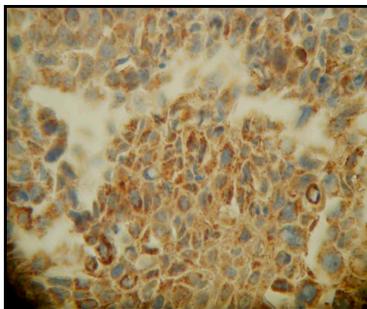
#### Planche I : Immuno-marquage des HPV HR fortement positif



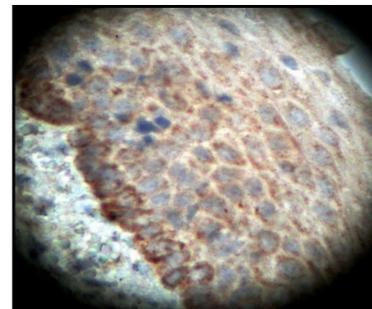
A



B



C



D

(D) Coupe histologique d'une biopsie de lésion de haut grade avec immunomarquage fortement positif des cellules basales (GX1000)

## Références

1. Ferlay L, Bray F, Pisani P and Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence world-wide IARC Cancer Base n°5, Version 2.0. Lyon IARC Press, 2004, 481-88.
2. Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Santé Publique* 2003; **51**: 3-30.
3. Eduardo C, Lazcano-Ponce, S Moss, Alonso dR, Salmeron CJ, Hernandez AM *et al.* Cervical Cancer Screening in Developing Countries: Why Is it Ineffective? The Case of Mexico, *Archives of Medical Research* 1999; **30**: 240-50.
4. Exbrayat C, Col de l'utérus. In : Remontet L, Buemi A, Velten M, Jouglu E, Esteve J, eds. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Paris : Francim, HCL, Inserm, In VS 2003: 107-12.
5. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; **189**: 12-9.
6. Smith JS, Lindsay L, Keys J, Keys J, Franceschi S, Winer R *et al.* HPV type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical neoplasia: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; **121**: 621-32.
7. Seigneurin J. M. et Morand P. Virologie moléculaire médicale. Edition : Lavoisier, 1997, 309- 312.
8. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM *et al.* Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* 2005; **191**: 731-8.
9. Herrero R, Castle PE, Schiffman, M Bratti MC, Hildesheim A, Morales J *et al.* Population based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 464-74.
10. Frenczy A. Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. *AJ of Obstetrics and Gynecology* 1995; **172**: 1331-39.
11. Kotloff KL, Wasserman SS, Russ K, Shapiro S, Daniel R, Brown W *et al.* Detection of genital human papillomavirus and associated cytological abnormalities among college women. *Sexually transmuted diseases* 1998; **25**: 243-50.
12. Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M, Apple RJ *et al.* Determinants of human papillomavirus detection in a US population. *The Journal of infectious diseases* 2001; **183**: 1554-64.
13. Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G *et al.* Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1633-38.
14. Rozendaal L, Westerga J, van der Linden JC, Walboomers J, Voorhorst F, Risse E *et al.* PCR based high risk HPV testing is superior to neural network based screening for predicting incident CIN 3 in women with normal cytology and borderline changes. *J ClinPathol* 2000; **53**: 606-11.
15. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P *et al.* Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; **357**: 1831-6.
16. Culp TD, Budgeon LR, MarinKovich MP, Meneguzzi G and Christensen ND, Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* 2006; **80**: 8940-50.
17. Cuzick J, Role of HPV testing in clinical practice. *Virus Res* 2002; **89**: 263-9.
18. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP and Chu TY, Viral load of high-risk Human Papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; **76**: 41-7.
19. Monsonogo J, Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus. Springer, Paris, 2007, p 4- 35, pp. 435-50.
20. Fahey MT, Irwig L and Macaskill P, meta-analysis of pap test accuracy, *Am J Epidemiol.* 1995; **141**: 680-89.
21. Monsonogo J. Du dépistage à la prise en charge des atypies cytologiques mineures ou mal définies du col : progrès récents. *Revue française des laboratoires* 2002 ; **346** : 41-48.
22. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 2006; **189**: 12-9.