

*COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS
Président : Professeur J. Lansac*

Extrait des Mises à jour en Gynécologie Médicale

—

**Volume 2009
publié le 9.12.2009**



*TRENTE-TROISIÈMES JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2009*

La charge virale : est-ce utile ?

X. CARCOPINO ¹, C. TAMALET ², D. OLIVE ³,
J. GONDRY ⁴, L. BOUBLI ¹ *
(Marseille, Amiens)

Résumé

L'infection à papillomavirus humain (HPV) est le principal facteur de risque de survenue d'un cancer du col de l'utérus. Le test HPV pourrait permettre d'optimiser le dépistage primaire des lésions précancéreuses du col de l'utérus, voire de supplanter la cytologie. Utilisé en complément du frottis cervico-vaginal, le test HPV serait plus sensible que la cytologie seule, et permettrait de limiter la fréquence des tests de dépistage tout en évitant l'écueil des frottis insatisfaisants par manque de matériel cellulaire. Alors que l'intérêt de la charge virale est démontré et admis pour la gestion diagnostique, pronostique et thérapeutique de pathologies virales comme le VIH ou le VHB, la place de la charge virale en HPV reste aujourd'hui très discutée. La charge

1 - Hôpital Nord - Service de gynécologie-obstétrique - Chemin des Bourrely - 13015 Marseille

2 - Hôpital de la Timone - Laboratoire de virologie - Boulevard Jean Moulin - 13005 Marseille

3 - Institut Paoli Calmettes - Laboratoire d'immunologie des tumeurs - 232 boulevard Sainte Marguerite - 13009 Marseille

4 - Centre de gynécologie-obstétrique - 124 rue Camille Desmoulins - 80054 Amiens cedex 1

* Correspondance : Xavier Carcopino - Hôpital Nord - Service de gynécologie-obstétrique - Chemin des Bourrely - 13915 Marseille cedex 20 - E-mail : xcarco@free.fr

virale augmente significativement avec la sévérité des lésions cervicales observées. Mais l'extrême variabilité des charges virales observées limite sa pertinence clinique et son utilisation n'est pas justifiée en pratique courante. Une charge virale élevée est prédictive de la persistance de l'infection à HPV et d'un risque accru de développer secondairement une lésion de haut grade ou un cancer du col de l'utérus. Après le traitement d'une lésion intra-épithéliale de haut grade, elle est également prédictive d'une infection à HPV persistante, d'une lésion résiduelle et/ou d'une récurrence post-thérapeutique. Confronté à une charge virale élevée, et ce même si le frottis est normal, le clinicien doit s'assurer de la normalité du col utérin par un examen colposcopique rigoureux. En l'absence de lésion cervicale avérée, une surveillance rapprochée reste indispensable.

Mots clés : papillomavirus humains, charge virale, dépistage, cancer du col de l'utérus, lésion intra-épithéliale, clairance

INTRODUCTION

Avec 493 000 nouveaux cas et 273 000 décès annuels [1], le cancer du col de l'utérus est en fréquence le deuxième cancer féminin dans le monde et reste un enjeu majeur de santé publique. En France, en 2000, le cancer du col de l'utérus était au 8^e rang des cancers de la femme avec une incidence de 3 400 cas et une mortalité de 1 000 femmes par an [2]. Le cancer du col présente plusieurs caractéristiques justifiant la mise en œuvre d'un dépistage de masse. C'est une maladie assez fréquente, associée à une mortalité élevée et pour laquelle il existe un traitement efficace des formes pré-invasives et invasives précoces. Dans la plupart des pays développés, les programmes de dépistage primaire, basés sur la réalisation d'une cytologie cervico-vaginale répétée tous les trois ans, permettent la détection et le traitement des lésions précancéreuses du col de l'utérus réduisant ainsi massivement l'incidence des cancers infiltrants.

Identifiés dans 97 à 99 % des cancers infiltrants du col de l'utérus [3, 4], les papillomavirus humains (HPV) sont aujourd'hui reconnus comme étant le principal facteur de risque de survenue d'un cancer du col de l'utérus. Pour cette raison, le test HPV a été envisagé comme le moyen d'optimiser le dépistage primaire des lésions précancéreuses du

col de l'utérus, voire de supplanter la cytologie. Utilisé en complément du frottis cervico-vaginal, le test HPV serait plus sensible que la cytologie seule, et permettrait de limiter la fréquence des tests de dépistage tout en évitant l'écueil des frottis insatisfaisants par manque de matériel cellulaire. Aujourd'hui, l'intérêt du test HPV n'est admis que dans deux indications précises : la prise en charge du frottis de type « Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance » (ASCUS) et la surveillance post-thérapeutique des lésions intra-épithéliales de haut grade (LIEHG). Ainsi, l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) et l'ANAES (actuelle Haute autorité de santé) ont admis l'intérêt de la recherche des HPV de haut risque chez les femmes de plus de 30 ans présentant un frottis ASCUS [2, 5]. Réalisé dans ces conditions, un test HPV négatif permet d'exclure une LIEHG alors qu'un test positif indique la réalisation d'une coloscopie. Le Collège national des gynécologues obstétriciens français a récemment recommandé l'introduction du test HPV dans le suivi des patientes traitées pour une LIEHG du col de l'utérus [6]. Les données actuelles de la littérature montrent que le test HPV est plus performant que la cytologie seule pour dépister une lésion résiduelle ou une récurrence [7-9]. Sa valeur prédictive négative est excellente et sa positivité est significativement associée à la présence d'un échec thérapeutique. Dans cette situation, la coloscopie ne serait alors réalisée que dans un but diagnostique en cas de test HPV positif et/ou de cytologie anormale. Enfin, malgré l'existence d'études favorables [10, 11], le test HPV tarde à être introduit dans le dépistage primaire des lésions du col de l'utérus.

Alors que l'intérêt de la charge virale est démontré et admis pour la gestion diagnostique, pronostique et thérapeutique de pathologies virales comme le VIH ou le VHB, la place de la charge virale en HPV reste aujourd'hui très discutée.

VIROLOGIE ET GÉNÉRALITÉS

Les papillomavirus humains (HPV) sont des virus à ADN de la famille de *papillomaviridæ*. Leur génome est une molécule d'ADN bicaténaire circulaire d'environ 8 000 paires de bases. Il comporte trois régions : deux régions codantes (E et L) et une région non codante de régulation URR. La région E comprend plusieurs cadres de lecture ouverts, de E1 à E7. Elle code pour des protéines non structurales

impliquées dans la réplication, la transcription et la transformation cellulaire. Les principales sont les oncoprotéines E6 et E7. La région L code pour des protéines structurales formant la capside. Le génome de l'HPV peut s'intégrer au génome de la cellule humaine infectée. Dans ce cas, la synthèse de l'ADN viral est interrompue au niveau du gène E2 et les gènes E6 et E7 restent intacts.

Ces virus, à tropisme épithélial, sont responsables de lésions fréquentes de la peau et des muqueuses, le plus souvent bénignes. La transmission est directe par contact cutané ou muqueux. Il existe plus de 120 types différents d'HPV, parmi lesquels 96 papillomavirus humains. On estime toutefois qu'une centaine de nouveaux papillomavirus humains supplémentaires restent à découvrir. Au total, 15 types : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82 sont considérés comme étant à haut risque oncogène [12] et comme le principal facteur de risque de dysplasie cervicale intra-épithéliale [13, 14] et de cancer du col utérin [3, 15]. Les HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 et CP6108 sont considérés comme étant à bas risque oncogène pour le col de l'utérus.

La distribution des différents types d'HPV varie en fonction de la région géographique et de l'âge. En France, 97 % des cancers invasifs du col de l'utérus seraient HPV positifs [4], contre 98 % des LIEHG [16]. Ainsi, chez les patientes ayant un cancer invasif du col de l'utérus, les différents types d'HPV observés sont les HPV 16 (73 %) et 18 (19 %), suivis par les HPV 31 (7 %), 33, 68, 45, 52 et 58 (4,1-2,3 %) [4]. En comparaison, les types d'HPV identifiés chez les patientes ayant une LIEHG sont les HPV 16 (62 %), suivis des HPV 31 (15 %), 33 (12 %), 52 (9 %), 51 (8 %), 58 (7 %), 35 et 18 (4 %) [16].

La connaissance de l'histoire naturelle de l'infection à HPV est fondamentale à la compréhension et à l'utilisation du test HPV en pratique clinique. Dans la population féminine, la prévalence de l'infection à HPV est élevée. Elle est maximale avant 30 ans avec 30 % des femmes infectées et décroît ensuite avec l'âge [17]. De la même manière, la prévalence de l'infection à HPV de haut risque est maximale avant 30 ans. Chez les femmes de 20 à 24 ans et de 24 à 29 ans, elle est respectivement de 13 et 17 % et chute ensuite à 2,5-3,9 % après 30 ans [18, 19]. Ces infections sont le plus souvent transitoires. La majorité des femmes vont se débarrasser de l'infection en 8 à 10 mois et ne développeront jamais de lésion cervicale [20-22]. L'infection à HPV de haut risque va persister uniquement chez une minorité d'entre elles et c'est principalement la persistance de l'infection qui expose la patiente au risque de LIEHG et de cancer infiltrant du col de l'utérus [23].

TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DE LA CHARGE VIRALE

La charge virale correspond à la quantité d'ADN d'HPV présente dans un échantillon. Elle peut être déterminée de plusieurs manières et il existe de nombreuses techniques de détection des papillomavirus. Le test commercialisé : Hybrid Capture 2 (HC2) (Digène®) permet la détection de 13 HPV de haut risque, et dans certains cas, une évaluation semi-quantitative de la charge virale [24, 25]. La charge virale est alors évaluée par mesure de la luminescence du test et exprimée en unité relative de luminescence (RLU). Elle peut être déterminée de manière plus précise par technique de PCR en temps réel qui autorise le calcul du nombre de copies par volume d'échantillon ou, de manière plus précise, ramenées au nombre de cellules cervicales [26, 27]. La quantification cellulaire de l'échantillon cellulaire testé est d'ailleurs un avantage évident de la PCR. Il permet ainsi la validation de la qualité de l'échantillon testé et une bonne reproductibilité de la quantification virale [28]. Malgré une évaluation semi-quantitative, le test HC2 permet une évaluation fiable de la charge virale, avec un bon niveau de corrélation avec les résultats obtenus par PCR [29]. Cependant, en ne faisant pas la distinction entre les différents types d'HPV détectés, le test HC2 rapporte une charge virale globale, potentiellement cumulée en cas d'infections multiples ; ce qui pourrait faire surestimer la charge virale spécifique d'un type d'HPV [30]. Il semble que la performance des différentes méthodes de PCR pour la quantification de la charge virale dépende de la séquence cible choisie. La capacité d'intégration du génome viral de l'HPV à celui de la cellule qu'elle infecte aboutit à la cassure du génome, en particulier au niveau de la séquence E2. Alors que le gène E6, grâce à sa préservation lors de l'intégration, semble être une cible de choix pour la quantification des HPV, le ratio E2/E6 aurait une valeur limitée, pouvant jouer sur l'interprétation des résultats de certaines études [31]. De manière générale, il semble que la corrélation de la quantification de la charge virale entre les différentes méthodes de PCR dépende du polymorphisme viral, de la charge virale elle-même, et du degré de la lésion cervicale [32].

La grande diversité des méthodes utilisées dans la littérature médicale se traduit par une grande variation de l'expression des résultats de mesure de la charge virale pouvant compliquer la comparaison des résultats d'une étude à l'autre. Pour l'instant, il n'existe pas de consensus.

VARIATIONS DE LA CHARGE VIRALE ET IMPLICATIONS CLINIQUES

La charge virale a été proposée comme un moyen de discriminer les infections à HPV ayant une relevance clinique des autres. Ainsi, une charge virale élevée pourrait être un marqueur type d'HPV dépendant du risque de LIEHG et/ou de cancer infiltrant du col de l'utérus [33].

La charge virale dépend de plusieurs facteurs, y compris du type d'HPV. Elle est plus importante pour les HPV de type 16 que pour les autres types [26]. Elle semble dépendre également de la taille des lésions observées en colposcopie [34], et est plus importante chez les patientes VIH positives [35, 36]. En pratique, de nombreuses études ont montré une augmentation significative de la charge virale moyenne avec la sévérité des lésions cervicales observées [26, 37-47]. Malgré cela, très peu d'auteurs ont proposé l'utilisation de valeurs seuil en vue d'une application clinique [27, 38, 48]. La principale limite de l'utilisation de la charge virale en pratique courante est son extrême variabilité. Ainsi, malgré une tendance à la corrélation avec le degré de sévérité d'une lésion cervicale, la variabilité des charges virales mesurées est majeure, et cela au sein d'un même degré de sévérité de lésion cervicale [49]. Il semble que la signification clinique de la charge virale varie avec le type d'HPV. Ainsi Broccolo *et al.* rapportent une plus forte association de la charge virale en HPV 16 et 31 avec la sévérité des lésions cervicales par rapport aux autres types d'HPV, en particulier par rapport aux HPV 18 et 33 [50].

Plus que la simple infection à un HPV de haut risque, c'est la persistance de cette infection qui est reconnue comme étant un facteur de risque d'apparition d'une LIEHG du col de l'utérus et de progression vers un cancer infiltrant. Une charge virale élevée est prédictive de la persistance de l'infection à HPV et d'un risque accru de développer secondairement une lésion de haut grade ou un cancer infiltrant [44, 51-57]. Là encore, le risque d'apparition d'une LIEHG, d'un carcinome *in situ* ou d'un cancer infiltrant pourrait varier d'un type d'HPV à l'autre et serait maximal pour une charge virale élevée en HPV 16 [39, 52, 58]. Par rapport à l'observation ponctuelle d'une charge virale élevée, c'est l'évolution et la cinétique de la charge virale qui serait la plus prédictive de la persistance et de l'évolution de l'infection ou de sa clairance [22, 59]. Ainsi, Ho *et al.* ont observé un risque de 45 % de développer une LIEHG du col de l'utérus chez les femmes porteuses d'une lésion de bas grade dont la charge virale

mesurée par PCR augmentait sur une période de 6 mois (OR = 6,1 ; IC à 95 % = 1,6-22,7 ; p < 0,001) [60].

APPORT DE LA CHARGE VIRALE DANS LE DÉPISTAGE

Nous disposons actuellement de preuves suffisantes pour considérer le test HPV comme une méthode efficace pour le dépistage des précurseurs du cancer du col de l'utérus et pouvant potentiellement permettre d'en réduire la mortalité [61]. Utilisé pour le dépistage primaire du cancer du col de l'utérus, le test HPV a fait la preuve d'une meilleure sensibilité que celle de la cytologie, mais d'une spécificité inférieure [7, 10, 62]. Qu'il soit utilisé seul ou couplé à la cytologie, les hautes performances du test HPV en font un outil de dépistage redoutable permettant de dépister mieux et plus rapidement. À terme, de telles performances permettraient d'envisager de rallonger l'intervalle de temps entre deux dépistages, limitant ainsi les surcoûts engendrés [63]. Même si le test HPV tarde à être introduit dans les politiques de dépistage, à l'heure de la vaccination anti-HPV, la chute prévisible des performances de la cytologie conventionnelle va imposer peu à peu le test HPV comme l'outil incontournable du dépistage.

Le seuil de positivité utilisé du test HPV, et donc la charge virale, influence directement les performances du test. D'après Hesselink *et al.*, l'utilisation de la charge virale dans le cadre du dépistage n'améliore pas les performances du test HPV de façon significative et n'est donc pas recommandée [64]. En fait par rapport au seuil habituel retenu (≥ 1 pg HPV DNA/ml), un seuil plus élevé (2 pg/ml) fait chuter la sensibilité du test de 97,4 % à 81,1 %, alors que la spécificité augmente de 94,3 % à 95,5 %, respectivement [65]. Une telle chute de la sensibilité du test HPV avec l'augmentation du seuil de positivité a été également observée par Ordi *et al.* [66]. L'importance de la valeur seuil choisie sur les performances du test HPV en dépistage primaire est également illustrée par les résultats d'un large essai randomisé incluant près de 49 000 femmes comparant le dépistage par test HPV (HC2 test) et par cytologie conventionnelle [67]. Chez des femmes de 35 à 65 ans, cet essai conclut à une meilleure sensibilité relative du test HPV par rapport à la cytologie conventionnelle lorsqu'il est utilisé à un seuil de positivité à 2 pg/ml (1,81 ; IC à 95 % : 1,2-2,72) et ce, au prix d'une très faible diminution de la VPP (0,99 % ; IC à 95 % : 0,67-1,46). Utilisé au seuil classique d'1 pg/ml chez ces mêmes femmes, le test HPV a la

meilleure sensibilité relative par rapport à la cytologie (1,92 ; IC à 95 % : 1,28-2,87), mais la VPP relative est plus nettement diminuée (0,80 ; IC à 95 % : 0,55-1,18).

CHARGE VIRALE ET PRONOSTIC CANCÉROLOGIQUE

Très peu d'études ont évalué l'impact de la charge virale en HPV sur le devenir et le pronostic des cancers du col. Wanram *et al.* ont récemment observé un lien entre la charge virale en HPV 16 et l'évolution des cancers du col de l'utérus de stade précoce. D'après leurs résultats, la charge virale en HPV 16 serait un marqueur prédictif de progression tumorale chez les patientes atteintes d'un cancer du col de stade précoce sans qu'un tel effet soit observé pour les cancers pré-invasifs et les cancers de stade avancé [68].

À ce jour, seules deux études ont évalué l'impact de la charge virale sur la survie des cancers du col [69, 70]. Ces deux études n'ont pas observé de différence significative de la survie entre les femmes ayant un cancer du col de stade précoce avec une charge virale préthérapeutique élevée par rapport aux autres [70]. D'après de Boer *et al.*, seule une forte expression de l'ARN messager des oncoprotéines E6 et E7 est prédictive d'une diminution de la survie des femmes ayant un cancer du col de stade précoce (HR = 7,99 ; IC à 95 % = 1,21-52,78 ; $p = 0,031$), et ce indépendamment du statut ganglionnaire (HR = 14,52 ; IC à 95 % = 1,00-210,48 ; $p = 0,050$) [69].

LE SUIVI POST-THÉRAPEUTIQUE

Dans le suivi post-thérapeutique d'une LIEHG du col de l'utérus, la persistance de l'infection à HPV est le meilleur facteur prédictif de lésion résiduelle et/ou de récurrence alors que sa clairance valide le succès thérapeutique [6-9]. Une telle persistance de l'infection à HPV serait d'autant plus révélatrice que le type d'HPV qui persiste en post-conisation est le même que celui détecté avant [71]. De manière complémentaire, une charge virale élevée est associée à un risque de récurrence post-thérapeutique [72]. En cas de LIEHG, la charge virale préthérapeutique est un facteur de risque indépendant de la persistance

de l'infection après conisation en marges saines [73, 74]. Une charge virale préthérapeutique élevée (≥ 300 RLU) serait également prédictive d'une lésion résiduelle (RR = 2,96 ; IC à 95 % = 1,1-8,1 ; $p = 0,034$) et ce, de manière indépendante du statut des marges de résection (RR = 3,56 ; IC à 95 % = 1,2-10,7 ; $p = 0,023$) [75]. Enfin, d'après Alonso *et al.* une charge virale élevée ($> 1\ 000$ RLU) et des marges envahies sont les deux seuls facteurs prédictifs de lésion résiduelle et/ou de récurrence post-thérapeutique : 31,8 % *versus* 9,4 % ; $p = 0,005$ et 36,4 % *versus* 11,9 % , $p < 0,001$, respectivement [76].

CONCLUSION

La charge virale augmente significativement avec la sévérité des lésions cervicales observées. Si elle a été proposée par de nombreux auteurs comme un moyen de discriminer les infections ayant une relevance clinique des infections transitoires et sans conséquences, l'extrême variabilité des charges virales observées limite sa pertinence clinique et son utilisation n'est pas justifiée en pratique courante. Une charge virale élevée est prédictive de la persistance de l'infection à HPV et d'un risque accru de développer secondairement une lésion de haut grade ou un cancer infiltrant. Plus que l'observation ponctuelle d'une charge virale élevée, c'est l'évolution et la cinétique de la charge virale qui serait la plus prédictive de la persistance et de l'évolution de l'infection ou de sa clairance. Une charge virale élevée doit être considérée comme un marqueur de risque de LIEHG ou de cancer du col de l'utérus. Après le traitement d'une LIEHG, elle est également prédictive d'une infection à HPV persistante, d'une lésion résiduelle et/ou d'une récurrence post-thérapeutique.

Confronté à une charge virale élevée, et ce même si le frottis cervico-vaginal est normal, le clinicien doit impérativement s'assurer de la normalité du col utérin par un examen colposcopique rigoureux visualisant la totalité de la zone de jonction. En l'absence de lésion cervicale avérée, une surveillance rapprochée reste indispensable.

Bibliographie

- [1] Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best practice & research* 2006 Apr;20(2):207-25.
- [2] Évaluation de l'intérêt de la recherche des papillomavirus humains (HPV) dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Anaes 2004.
- [3] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 1999 Sep;189(1):12-9.
- [4] Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer* 2007 Sep 24.
- [5] ACOG Practice Bulletin: clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Number 45, August 2003. Cervical cytology screening (replaces committee opinion 152, March 1995). *Obstetrics and Gynecology* 2003 Aug;102(2):417-27.
- [6] Mergui JL, Polena V, David-Montefiore E, Uzan S. Guidelines for the follow-up of women treated for high-grade cervical neoplasia. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction* 2008 Feb;37(1):S121-30.
- [7] Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006 Aug 21;24(3):S78-89.
- [8] Arbyn M, Paraskevaïdis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecologic oncology* 2005 Dec;99(3-1):S7-11.
- [9] Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, Snijders PJ et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstetrical & gynecological survey* 2004 Jul;59(7):543-53.
- [10] Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaïdis E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecologic oncology* 2007 Jan;104(1):232-46.
- [11] Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaïdis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 2004 Feb 18;96(4):280-93.
- [12] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 2003 Feb 6;348(6):518-27.
- [13] Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 1993 Jun 16;85(12):958-64.
- [14] Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME et al. Human papillomavirus--the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1996 Mar 1;65(5):601-6.
- [15] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992 Nov 11;52(5):743-9.
- [16] Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B et al. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer* 2007 Sep 24.
- [17] Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *The American Journal of Medicine* 1997 May 5;102(5A):3-8.
- [18] Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*

2000 Jul 15;87(2):221-7.

[19] Cibas ES, Hong X, Crum CP, Feldman S. Age-specific detection of high risk HPV DNA in cytologically normal, computer-imaged ThinPrep Pap samples. *Gynecologic Oncology* 2007 Mar;104(3):702-6.

[20] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine* 1998 Feb 12;338(7):423-8.

[21] 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 Jun 9;357(9271):1831-6.

[22] Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, Carbillet JP et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *International Journal of Cancer* 2003 Sep 1;106(3):396-403.

[23] Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama* 2001 Dec 26;286(24):3106-14.

[24] Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002 Jul 20;360(9328):228-9.

[25] Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, Lorincz A. Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *Journal of Medical Virology* 2001 Sep;65(1):155-62.

[26] Carcopino X, Henry M, Benmoura D, Fallabregues AS, Richet H, Boubli L et al. Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *Journal of Medical Virology* 2006 Aug;78(8):1131-40.

[27] Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *Journal of Clinical Microbiology* 2008 Nov;46(11):3678-85.

[28] Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple

R, Higuchi R, Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods* 2003 Sep;112(1-2):23-33.

[29] Pretet JL, Dalstein V, Monnier-Benoit S, Delpout S, Mougou C. High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women. *J Clin Virol* 2004 Oct;31(2):140-7.

[30] Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME et al. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Jun;12(6):477-84.

[31] Roberts I, Ng G, Foster N, Stanley M, Herdman MT, Pett MR et al. Critical evaluation of HPV16 gene copy number quantification by SYBR green PCR. *BMC Biotechnology* 2008;8:57.

[32] Fontaine J, Gravitt P, Duh LM, Lefevre J, Pourreaux K, Hankins C et al. High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Sep;14(9):2200-7.

[33] Boulet GA, Horvath CA, Berghmans S, Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 Apr;17(4):810-7.

[34] Sun CA, Lai HC, Chang CC, Neih S, Yu CP, Chu TY. The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecologic Oncology* 2001 Oct;83(1):95-9.

[35] Damay A, Didelot-Rousseau MN, Costes V, Konate I, Ouedraogo A, Nagot N et al. Viral load and physical status of human papillomavirus (HPV) 18 in cervical samples from female sex workers infected with HPV 18 in Burkina Faso. *Journal of Medical Virology* 2009 Oct;81(10):1786-91.

[36] Lefevre J, Hankins C, Money D, Rachlis A, Pourreaux K, Coutlee F. Human papillomavirus type 16 viral load is higher in human immunodeficiency virus-seropositive women with high-grade squamous intraepithelial lesions than in those with normal cytology smears.

- Journal of Clinical Microbiology 2004 May; 42(5):2212-5.
- [37] Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British Journal of Cancer* 2005 Jun 20;92(12):2195-200.
- [38] Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecologic Oncology* 2007 Sep;106(3):549-57.
- [39] Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A et al. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *International Journal of Cancer* 2007 Dec 15;121(12):2787-93.
- [40] Kovacic MB, Castle PE, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Wacholder S et al. Relationships of human papillomavirus type, qualitative viral load, and age with cytologic abnormality. *Cancer Research* 2006 Oct 15;66(20):10112-9.
- [41] Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *Journal of clinical pathology*. 2006 May;59(5):513-7.
- [42] Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *Journal of Clinical Microbiology* 2007 Mar;45(3):897-901.
- [43] Tsai HT, Wu CH, Lai HL, Li RN, Tung YC, Chuang HY et al. Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Nov;14(11 Pt 1):2544-9.
- [44] van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *International Journal of Cancer* 2002 Apr 1;98(4):590-5.
- [45] Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersson PK, Ponten J et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma *in situ*: a nested case-control study. *Lancet* 2000 Jun 24;355(9222):2194-8.
- [46] Zerbini M, Venturoli S, Cricca M, Gallinella G, De Simone P, Costa S et al. Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *Journal of Clinical Pathology* 2001 May;54(5):377-80.
- [47] Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, Zhang Y, He Y. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol* 2006 Mar;35(3):264-9.
- [48] Snijders PJ, Hogewoning CJ, Hesselink AT, Berkhof J, Voorhorst FJ, Bleeker MC et al. Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology. *International Journal of Cancer* 2006 Sep 1;119(5):1102-7.
- [49] Fiander AN, Hart KW, Hibbitts SJ, Rieck GC, Tristram AJ, Beukenholdt RW et al. Variation in human papillomavirus type-16 viral load within different histological grades of cervical neoplasia. *Journal of Medical Virology* 2007 Sep;79(9):1366-9.
- [50] Broccolo F, Chiari S, Piana A, Castiglia P, Dell'Anna T, Garcia-Parra R et al. Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy. *Journal of Medical Virology* 2009 Feb;81(2):278-87.
- [51] Song SH, Lee JK, Oh MJ, Hur JY, Park YK, Saw HS. Risk factors for the progression or persistence of untreated mild dysplasia of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2006 Jul-Aug;16(4):1608-13.
- [52] Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma *in situ*. *International Journal of Cancer* 2004 Dec 10;112(5):854-9.
- [53] Castle PE, Schiffman M, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB et al. Semiquantitative human papillomavirus type 16 viral load and the prospective risk of cervical precancer and cancer. *Cancer Epidemiol*

Biomarkers Prev 2005 May;14(5):1311-4.

[54] Lai CH, Chao A, Chang CJ, Chao FY, Huang HJ, Hsueh S et al. Host and viral factors in relation to clearance of human papillomavirus infection: a cohort study in Taiwan. *International journal of cancer* 2008 Oct 1;123(7):1685-92.

[55] Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez F, Molano M, Posso H, Moreno V et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *British journal of cancer* 2009 Apr 7;100(7):1184-90.

[56] Fontaine J, Hanksin C, Money D, Rachlis A, Pourreaux K, Ferenczy A et al. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) viral load and persistence of HPV-16 infection in women infected or at risk for HIV. *J Clin Virol* 2008 Nov;43(3):307-12.

[57] Bae J, Seo SS, Park YS, Dong SM, Kang S, Myung SK et al. Natural history of persistent high-risk human papillomavirus infections in Korean women. *Gynecologic Oncology* 2009 Oct;115(1):75-80.

[58] Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *British Journal of Cancer* 2005 Mar 14;92(5):891-4.

[59] Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riettmuller D, Lalaoui N, Mouglin C, Pretet JL. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol* 2006 Mar;35(3):270-7.

[60] Ho CM, Cheng WF, Chu TY, Chen CA, Chuang MH, Chang SF et al. Human papillomaviral load changes in low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *British Journal of Cancer* 2006 Nov 20;95(10):1384-9.

[61] IARC. Cervic cancer screening. In: Press I, editor. *Handbooks of cancer prevention*. Lyon; 2005.

[62] Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International Journal of Cancer* 2006 Sep 1;119(5):1095-101.

[63] Bulkmans NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia

grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 2007 Nov 24;370(9601):1764-72.

[64] Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, Bulkmans NW, van Tellingén JE, Meijer CJ et al. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *International Journal of Cancer* 2009 Jan 15;124(2):381-6.

[65] Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2007 Oct 18;357(16):1579-88.

[66] Ordi J, Alonso I, Torne A, Esteve R, Sierra E, Campo E, et al. Human papillomavirus load in Hybrid Capture II assay: does increasing the cutoff improve the test? *Gynecologic Oncology* 2005 Nov;99(2):313-9.

[67] Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A et al. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *Journal of the National Cancer Institute* 2008 Apr 2;100(7):492-501.

[68] Wanram S, Limpiboon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Guiney DG, Lulitanond V et al. The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2009 Jul;201(1):79 e1-7.

[69] De Boer MA, Jordanova ES, Kenter GG, Peters AA, Corver WE, Trimbois JB et al. High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007 Jan 1;13(1):132-8.

[70] Kim YM, Park JY, Lee KM, Kong TW, Yoo SC, Kim WY et al. Does pretreatment HPV viral load correlate with prognosis in patients with early stage cervical carcinoma? *Journal of Gynecologic Oncology* 2008 Jun;19(2):113-6.

[71] Bae JH, Kim CJ, Park TC, Namkoong SE, Park JS. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. *Int J*

Gynecol Cancer 2007 Nov-Dec;17(6):1271-7.

[72] Bar-Am A, Gamzu R, Levin I, Fainaru O, Niv J, Almog B. Follow-up by combined cytology and human papillomavirus testing for patients post-cone biopsy: results of a long-term follow-up. *Gynecologic Oncology* 2003 Oct; 91(1):149-53.

[73] Nam K, Chung S, Kim J, Jeon S, Bae D. Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *Journal of gynecologic Oncology* 2009 Jun; 20(2):91-5.

[74] Song SH, Lee JK, Oh MJ, Hur JY, Na JY, Park YK et al. Persistent HPV infection after conization in patients with negative margins.

Gynecologic Oncology 2006 Jun;101(3):418-22.

[75] Park JY, Lee SM, Yoo CW, Kang S, Park SY, Seo SS. Risk factors predicting residual disease in subsequent hysterectomy following conization for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) III and microinvasive cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2007 Oct;107(1): 39-44.

[76] Alonso I, Torne A, Puig-Tintore LM, Esteve R, Quinto L, Campo E et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecologic Oncology* 2006 Nov; 103(2):631-6.