

Virus de la leucémie bovine lié au cancer du sein mais pas à la co-infection par le virus du papillome humain: étude cas-témoins de femmes au Texas

[Kimberly A. Baltzell RN, PhD, MS](#)

[Hua Min Shen MD](#)

[Savitri Krishnamurthy MD](#)

[Jennette D. Sison MPH](#)

[Gerard J. Nuovo MD](#)

[Gertrude C. Buehring PhD](#)

Première publication: 20 décembre 2017

<https://doi.org/10.1002/cncr.31169>

Citations: [13](#)

Nous remercions Anita L. Vines de l'Université du Texas MD Anderson Cancer Center pour l'organisation et l'expédition des échantillons, Steve Ruzin et Diane Tran de l'Université de Californie à Berkeley pour leur aide dans le formatage des chiffres, et Kan Tong de l'Université de Californie à Berkeley pour la vérification des références.

[SECTIONS](#)

[PDF](#)

[OUTILS](#)

[PARTAGER](#)

Abstrait

CONTEXTE

Le virus de la leucémie bovine (BLV) et le papillomavirus humain (HPV) ont déjà été identifiés dans le tissu mammaire humain et ont été associés au cancer du sein dans des études indépendantes. L'objectif de la présente étude était de tester la présence de BLV et de HPV dans les mêmes échantillons de tissus mammaires pour déterminer si les virus étaient associés au cancer du sein individuellement ou ensemble.

MÉTHODES

Des coupes de tissu mammaire enchâssées dans de la paraffine, fixées au formol, ont été reçues de 216 femmes de l'University of Texas MD Anderson Cancer Center avec

le diagnostic de la patiente. Des méthodes de réaction en chaîne par polymérase in situ et / ou d'hybridation d'ADN ont été utilisées pour détecter des segments d'ADN ciblés de BLV et HPV. Des méthodes statistiques standard ont été utilisées pour calculer les rapports de cotes ajustés selon l'âge, le risque attribuable et les valeurs de *P* pour la tendance liée à l'association entre la présence d'un virus et un diagnostic de maladie du sein.

RÉSULTATS

Les femmes diagnostiquées avec un cancer du sein étaient significativement plus susceptibles d'avoir de l'ADN BLV dans leur tissu mammaire que les femmes avec un diagnostic bénin et sans antécédents de cancer du sein. Les femmes atteintes d'une pathologie mammaire classée comme précancéreuse et sans antécédent de cancer du sein ont également été trouvées comme présentant un risque élevé d'héberger l'ADN BLV dans leur tissu mammaire. Le statut HPV n'était pas associé à une tumeur maligne, à une maladie mammaire pré-maligne ou à la présence de BLV dans les tissus mammaires.

CONCLUSIONS

Les données de la présente étude ont confirmé les résultats d'une association significative entre l'ADN du BLV dans le tissu mammaire et un diagnostic de cancer du sein, mais n'ont pas mis en évidence de souches oncogènes de HPV associées au cancer du sein ou la présence d'ADN du BLV dans le tissu mammaire. Les auteurs pensent que les résultats de la présente étude contribuent à la connaissance globale d'un éventuel rôle causal des virus dans le cancer du sein humain. **Cancer 2018; 124: 1342-9.** © 2017 American Cancer Society .

INTRODUCTION

Le cancer du sein peut-il être causé par un virus? Cette question a imprégné l'esprit des chercheurs au cours des 40 à 50 dernières années depuis la découverte que le cancer mammaire chez la souris était causé par un virus transmis par le lait transmis de la mère aux chiots. Le cancer du sein est clairement une maladie multiforme avec de nombreux facteurs de risque contribuant au résultat final. Cependant, l'identification de la forte implication d'un virus permettrait plusieurs options de prévention. Bien que la prévention de la plupart des cancers soit une prévention secondaire (c.-à-d. Détection et traitement précoces de la maladie en développement), les énormes avantages médicaux et humanitaires de la prévention primaire (c.-à-d. La prévention du déclenchement de la maladie) soulignent la nécessité d'encourager et de soutenir recherche sur les stratégies de prévention antérieures. Les cancers provoqués par des agents infectieux sont particulièrement fortuits en ce que la prévention primaire réussie de nombreuses maladies infectieuses non cancéreuses a fourni des précédents utiles pour la prévention primaire. Des exemples stellaires sont la prévention des vaccins contre le carcinome hépatocellulaire causé par le virus de l'hépatite B (VHB) et les vaccins plus récemment développés contre certaines souches de papillomavirus humain (VPH),

qui causent le cancer du col utérin, le cancer anal et les cancers de la tête et du cou .

1 Le succès du traitement antimicrobien de l' *infection à Helicobacter pylori* pour prévenir les ulcères et les cancers de l'estomac ultérieurs est une autre victoire pour la prévention primaire grâce à une solution relativement simple. **1**

Les virus les plus largement explorés en tant qu'acteurs possibles du cancer du sein humain sont le virus de la tumeur mammaire de souris et les séquences analogues au virus de la tumeur mammaire de souris, le virus d'Epstein-Barr, le HPV et le virus de la leucémie bovine (BLV). Malgré de nombreuses publications **2** , **3** à notre connaissance, il n'y a pas encore de consensus concernant un rôle viral dans l'initiation et / ou le maintien du cancer du sein humain. Notre objectif dans la présente étude était d'examiner les tissus mammaires humains pour la présence de BLV, un deltarétrovirus qui, à notre connaissance, est moins étudié, mais sa présence dans les tissus mammaires humains **4** et une association significative avec le cancer du sein **5** justifier une enquête plus approfondie. La prévalence du BLV chez les bovins américains est de 47,6% des vaches laitières et de 33,6% des bovins de boucherie. **6** Parce que près de 84% de tous les grands troupeaux laitiers aux États-Unis et 78% des troupeaux laitiers au Canada ont des bovins BLV positifs au sein du troupeau, **7** et parce que le lait de toutes les vaches est généralement mis en commun avant d'être commercialisé, il est difficile d'éviter l'exposition au BLV si le lait fait partie de son alimentation. Bien que la pasteurisation inactive le BLV, la consommation de produits laitiers crus et de boeuf insuffisamment cuit n'est pas rare et la transmission par des humains déjà infectés est également plausible. Le BLV est facilement transmis à travers le troupeau par le lait et les voies sanguines. Chez l'homme, les épidémiologistes ont depuis longtemps noté que les pays ayant la plus forte consommation de lait avaient également l'incidence du cancer du sein la plus élevée. **5**

En plus du BLV, nous avons également testé le HPV dans des sections adjacentes des mêmes échantillons de sein représentant différentes classifications de pathologie du tissu mammaire. Puisque le VPH a souvent été identifié comme co - infection les mêmes tissus avec d' autres virus et éventuellement avoir un effet de synergie, **8** nous avons examiné les fréquences relatives de BLV et le VPH pour déterminer si ces virus, seuls ou ensemble, sont associés à des antécédents de cancer du sein .

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Des échantillons de tissus mammaires ont été acquis dans les archives de l'Université du Texas MD Anderson Cancer Center (MDACC). Avant la chirurgie ou la biopsie, les

patients ont donné leur consentement éclairé pour que l'élimination des tissus inutilisés soit à la discrétion du laboratoire de pathologie. Le protocole sur les sujets humains a été approuvé par les comités d'examen institutionnel du MDACC, de l'Université de Californie à San Francisco et de l'Université de Californie à Berkeley. Les patientes éligibles à l'étude étaient celles âgées de ≥ 18 ans qui subissaient une intervention mammaire (biopsie ou excision). Des échantillons ont été achetés de 2009 à 2011 auprès de 218 femmes, ont été traités dans les 24 heures après la chirurgie pour minimiser toute dégradation de l'ADN, et ont été fixés dans du formol neutre tamponné à 10% et incorporés dans de la paraffine. Des coupes de tissus (5 μm d'épaisseur) ont été coupées au MDACC; les sections colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ont été conservées pour un examen de pathologie de routine, 4 sections non colorées ont été expédiées à l'Université de Californie à Berkeley pour des tests de réaction en chaîne par polymérase in situ (IS - PCR) pour le BLV et le HPV de type 16 (HPV - 16), et 2 sections ont été expédiées au Comprehensive Cancer Center de l'Ohio State University pour le test d'hybridation in situ (ISH) (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona) pour l'ADN du HPV (12 souches oncogènes). Deux sujets ont été éliminés de l'étude en raison de la réception de lames cassées, de la petite taille de l'échantillon de tissu et / ou d'un manque de cellules épithéliales mammaires dans l'échantillon, laissant un échantillon final de 216 échantillons. Tous les échantillons ont été sélectionnés pour l'étude en cours et la classification de la pathologie déterminée par le pathologiste de l'équipe (SK) dans le cadre du diagnostic clinique de routine des patients. Les tumeurs ont été classées en utilisant le système de classement histologique combiné de Nottingham.⁹ Les cellules ont été classées comme précancéreuses selon les directives du Comité du Cancer du Collège des Pathologistes Américains basées sur le risque relatif de développer un cancer du sein pour les femmes diagnostiquées avec des changements mammaires non malins particuliers. La catégorie pré-maligne était constituée de tissus diagnostiqués comme carcinome canalaire ou lobulaire in situ et d'une hyperplasie atypique d'origine canalaire ou lobulaire. Le changement fibrokystique, l'atypie épithéliale plate et l'hyperplasie normale ne sont pas considérés comme précancéreux et ont donc été inclus dans la catégorie bénigne (normale), qui a servi de contrôle par rapport auquel les catégories précancéreuse et maligne ont été comparées.

Une IS - PCR directe, adaptée de Nuovo, **10 a** été utilisée pour détecter la présence d'ADN de BLV rétrotranscrit directement dans des coupes de tissu mammaire fixées au formol et pour identifier les types cellulaires positifs pour le BLV. Cette technique a été utilisée précédemment pour détecter le BLV dans les tissus bovins, **11** alpagas, **12** et humains **4**, **5** et diffère de la PCR en solution

standard et de la PCR en temps réel (RT-PCR) de plusieurs manières: 1) aucun ADN n'est extrait; les sections fixées au formol sont montées sur des lames de verre super adhérentes, déparaffinées et perméabilisées avant que la réaction ne soit effectuée; 2) le mélange de PCR a une composition différente de celle utilisée dans les méthodes de solution standard et de RT-PCR; 3) les temps de cycle sont plus longs car les lames de verre sont plus épaisses que les tubes utilisés pour la PCR en solution standard et la RT-PCR; et 4) le thermocycleur utilisé doit être conçu spécifiquement pour accueillir des glissières plutôt que des tubes. IS - PCR a été réalisée comme décrit précédemment en détail. **4** La lignée cellulaire témoin positive pour BLV était la lignée cellulaire FLK (rein d'agneau fœtal), **13** authentifié en tant que mouton à l'aide d'amorces spécifiques au mouton basées sur le gène de la cytochrome C oxydase. **14** La lignée cellulaire témoin positive pour HPV - 16 était CaSki, **15** authentifié en tant qu'être humain par la présence de l'enzyme glycéraldéhyde 3 - phosphate déshydrogénase humaine (GAPDH). Des suspensions épaisses de cellules détachées et rincées de lignées cellulaires témoins ont été étalées sur des lames de microscope en verre à adhérence améliorée, séchées à l'air et fixées pendant 16 à 18 heures avec du formol neutre tamponné à 10%. Pour améliorer l'entrée du mélange de PCR dans les cellules fixées au formol, les échantillons ont été perméabilisés par digestion avec 2 mg / ml de pepsine dans HCl 0,1 N (60 minutes pour les coupes de tissus et 20 minutes pour les frottis cellulaires témoins) et une solution d'inactivation de la pepsine (100 mmol / L de Tris - HCl et 100 mmol / L de NaCl [pH 7,4]) appliqués pendant 1 minute, suivis d'un rinçage salin tamponné au phosphate modifié par Dulbecco et 5 minutes dans de l'éthanol absolu. Les échantillons ont été entourés d'une chambre de joint de cadre de 15 mm × 15 mm (Bio - Rad, Hercules, Californie) et 60 µL de mélange PCR ont ensuite été placés dans la chambre. Après l'ajout du mélange de PCR, le couvercle en plastique a été scellé en appuyant fermement sur le cadre. Les lames ont été placées dans une machine IS - PCR (Hybaid OmniSlide; Cambridge Biosystems, Cambridge, Royaume-Uni) pour l'amplification.

Les séquences d'amorces spécifiques pour BLV, présentées ci-dessous, provenaient de la région *fiscale* de BLV, amplifiant un produit de 114 paires de bases (pb). Leur localisation génomique dans la numérotation bp est conforme au numéro d'accès GenBank EF600696: forward (pb 7310-7329): ATGTCACCATCGATGCCTGG; et inversé (bp 7423-7404): CATCGGCGGTCCAGTTGATA.

Le mélange IS - PCR pour BLV était de 4,0 mmol / L de MgCl₂; 0,4 mmol / L de dNTP; 1 µmol / L d'amorces (Operon Biotechnologies, Huntsville, Alabama); 0,06% d'albumine sérique bovine, 8 µmol / L de digoxigénine-11-dUTP (Hoffman-La Roche,

Bâle, Suisse); et 0,053 U / μ L d'ADN polymérase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, Californie), une polymérase Taq activée uniquement à ≥ 92 ° C, conçue pour réduire les résultats faussement positifs d'une réparation non spécifique de l'ADN par Taq à des températures plus froides.

Les séquences d'amorces pour le HPV - 16 provenaient de la région de la capsid L1 et ont amplifié un produit de 105 pb: avant (bp 1288-1311): TTTGGTCTACAACCTCCCCCAGGA) et inverse (pb 1392-1369): TTCTTTAGGTGCTGGAGGTG TATG).

Le mélange réactionnel IS - PCR pour HPV - 16 était de 4,5 mM de $MgCl_2$, 0,4 mM de désoxyribonucléoside triphosphates, 1 μ M d'amorces (synthétisées par Operon Biotechnologies), 8 μ M de digoxigénine - 11 - désoxyuridine triphosphate, 0,06% d'albumine sérique bovine, et 0,05 U / μ L de polymérase Taq.

Les paramètres de cycle pour les deux virus étaient 1 cycle à 93 ° C pendant 10 minutes, à 92 ° C pendant 2 minutes et à 57 ° C pendant 1,5 minute; pendant 30 cycles à 92 ° C pendant 30 secondes, à 57 ° C pendant 1,5 minute et à 69 ° C pendant 2 minutes; et pendant 1 cycle à 69 ° C pendant 10 minutes. Une fois l'amplification terminée, les couvercles et les chambres ont été retirés et les lames ont été rincées dans une solution saline tamponnée au phosphate modifiée par Dulbecco et la peroxydase endogène a été trempée pendant 30 minutes dans du peroxyde d'hydrogène à 3% dans du méthanol. Le marqueur incorporé dans les produits de PCR a été détecté par des anticorps antidigoxigénine-11-dUTP dans une réaction d'avidine-biotine-immunoperoxydase (Hoffman-La Roche). Le chromogène était la diaminobenzidine (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri). La mesure des résultats était un jugement semi-quantitatif de la densité de couleur brune des cellules: bronzage clair indiqué 1+, le bronzage moyen indique 2+, le brun foncé indique 3+ et le presque noir indique 4+. Les notes $\geq 2+$ ont été considérées comme positives. Les lames ont été lues indépendamment par 2 individus (HMS et GCB).

Initialement, la lignée cellulaire témoin BLV positive (FLK) et la lignée cellulaire BLV négative (Tb₁ Lu) ont été utilisées pour optimiser la réaction et garantir l'absence de réaction faussement positive dans la lignée cellulaire négative. **4** Les contrôles effectués simultanément avec chaque lot d'analyses de tissus humains étaient: 1) un contrôle positif (un frottis de cellules positives pour BLV [lignée cellulaire FLK] ayant réagi avec un mélange de PCR complet); et 2) des contrôles de fond (un frottis de cellules FLK et une section en série adjacente de chaque échantillon ayant réagi avec un mélange de PCR sans amorces) pour exclure les éventuelles réactions faussement positives, propres à chaque tissu, résultant de la peroxydase endogène non éteinte,

réaction non spécifique du anticorps de mouton utilisés dans la détection finale de l'immunoperoxydase, la réparation non spécifique de l'ADN par la polymérase Taq et / ou la présence de cellules pigmentées brunes (mélanocytes, follicules pileux) que l'on trouve parfois dans les tissus mammaires.

HPV DNA ISH a été réalisée en utilisant un protocole précédemment publié. **16** En bref, le kit de détection Ventana ISH iVIEWBlue Plus a été utilisé (Ventana Medical Systems). Après un prétraitement avec digestion par protéase, l'ADN tissulaire a été dénaturé simultanément avec les sondes pour les types de HPV à haut risque et hybridé pendant la nuit, et le signal a ensuite été visualisé avec un conjugué de phosphatase alcaline sur NBT / BCIP (chlorure de tétrazolium nitro-bleu et 5-bromo-4-chloro-3'-indolephosphate p-toluidine) avec une contre-coloration nucléaire rapide. Les contrôles positifs comprenaient des lésions de néoplasie intraépithéliale cervicale avec des types de VPH connus, comme déterminé par séquençage d'ADN. Les témoins négatifs étaient des tissus cervicaux utérins histologiquement normaux.

Analyses statistiques

Les résultats de l'analyse des données pour cette enquête ont été générés à l'aide du logiciel statistique SAS (version 9.4; SAS Institute Inc, Cary, Caroline du Nord). PROC FREQ (SAS Institute Inc) a été utilisé pour les distributions de fréquences, ainsi que pour les tests exacts du chi carré et de Fisher afin de comparer les groupes pour les différences significatives entre les variables catégorielles. Le test PROC T (SAS Institute Inc) a été utilisé pour déterminer la différence significative entre les groupes en ce qui concerne l'âge. Les rapports de cotes (OR) ont été obtenus en utilisant PROC LOGISTIC (SAS Institute Inc) et des intervalles de confiance à 95% (IC à 95%) ont été calculés pour les OR. Le test PROC FREQ Cochran - Armitage pour l'option de tendance (SAS Institute Inc) a été utilisé pour détecter une tendance croissante de la présence virale d'affections bénignes à malignes parmi les échantillons. Toutes les analyses finales ont été ajustées pour l'âge et l'origine ethnique, le cas échéant.

RÉSULTATS

Le tableau **1** résume les caractéristiques démographiques de la population étudiée. Les 5 catégories diagnostiques de sujets, classées selon leur diagnostic clinique et la pathologie de leur échantillon de tissu, étaient remarquablement bien appariées en ce qui concerne l'âge, sans différences statistiquement significatives notées. En ce qui concerne l'ethnicité / race, les sujets se classant comme «blancs»

constituaient la majorité (68%), les autres races / ethnies combinées représentant 32% du total.

Tableau 1. Démographie de la population

Catégories de population ↓	Catégorie de diagnostic					
	Toutes les femmes	Bénin (contrôles)	Malin (cas)	Malignant Plus DCIS	Premalignant	Malin plus prémalin
Non. (%)	216	102 (47,22)	61 (28,24)	90 (41,67)	53 (24,54)	114 (52,78)
Âge au moment du diagnostic, y						
Nombre de sujets pour lesquels des informations sur l'âge sont disponibles	210	96	61	90	53	114
Tranche d'âge, y	30-81	30-78	32-77	32-77	37-81	32-81
Signifier	54,63	54,4	54,59	55,22	55,11	54,89
Médiane ± SE	53,5 ± 0,718	53,0 ± 1,040	53,0 ± 1,440	54,0 ± 1,153	54,0 ± 1,366	54,0 ± 1,020
PROCT test <i>P</i> pour les cas vs témoins			.9111	.5943	.6788	.7622

Catégories de population ↓	Catégorie de diagnostic					
	Toutes les femmes	Bénin (contrôles)	Malin (cas)	Malignant Plus DCIS	Premalignant	Malin plus prémalin
Ethnicité / race, non. (% Du total)						
blanc	147 (68,06)	71 (69,61)	41 (67,21)	59 (65,56)	35 (66,04)	76 (66,76)
Afro-américain	19 (8,80)	9 (8,82)	4 (6,56)	7 (7,78)	6 (11,32)	10 (8,77)
arabe	2 (0,93)	2 (1,96)	0	0	0	0
asiatique	14 (6,48)	6 (5,88)	4 (6,56)	7 (7,78)	4 (7,55)	8 (7,02)
hispanique	24 (11,11)	6 (5,88)	11 (18,03)	16 (17,78)	7 (13,21)	18 (15,79)
Données inconnues ou manquantes	10 (4,63)	8 (7,84)	1 (1,64)	1 (1,11)	1 (1,89)	2 (1,75)
<i>P</i>	.4292 <u>a</u>		.1677 <u>b</u>	.0888 <u>b</u>	.5182 <u>b</u>	.1295 <u>b</u>
Blancs seulement	147 (68,06)	71 (69,61)	41 (67,21)	59 (65,56)	35 (66,04)	76 (66,76)
Toutes les autres races	59 (27,31)	23 (22,54)	19 (31,15)	30 (33,33)	17 (32,08)	36 (31,58)

Catégories de population ↓	Catégorie de diagnostic					
	Toutes les femmes	Bénin (contrôles)	Malin (cas)	Malignant Plus DCIS	Premalignant	Malin plus prémalin
Données inconnues ou manquantes	10 (4,63)	8 (7,84)	1 (1,64)	1 (1,11)	1 (1,89)	2 (1,75)
<i>P</i>	.4754 ^a		.3280 ^a / .3572 ^b	.1684 ^a / .1937 ^b	.2860 ^a / .3341 ^b	.2249 ^a / .2790 ^b

- Abréviations: DCIS, carcinome canalaire in situ; SE, erreur standard.
- ^a une valeur *P* a été dérivée à l'aide du test du chi carré.
- ^b La valeur *P* a été dérivée en utilisant le test exact de Fisher.

Sur la population totale de 214 sujets dans toutes les catégories de diagnostic et avec les informations démographiques disponibles, 73 (34%) étaient positifs pour le segment d'ADN *BRCA1/2* ciblé. La figure 1 est un exemple de réaction positive obtenue par IS-PCR dans des lobules mammaires normaux, qui illustre mieux la réaction positive que les tissus malins car le tissu normal a une taille et un agencement cellulaires relativement uniformes. Notre principale constatation était que les femmes diagnostiquées d'un cancer du sein étaient beaucoup plus susceptibles d'avoir l'impôt BLV ciblé Segment d'ADN dans leur tissu mammaire (OR ajusté selon l'âge / l'origine ethnique, 5,87; IC à 95%, 2,83 à 12,16) par rapport aux femmes avec des diagnostics bénins et sans antécédents de cancer du sein. Le risque attribuable à la population était de 51,82%. Les femmes atteintes d'une pathologie mammaire classée comme précancéreuse avaient également un risque élevé d'héberger le segment BLV ciblé dans le tissu mammaire (OR ajusté selon l'âge, 2,24; IC à 95%, 1,03-4,84). Les détails sont résumés dans le tableau 2. Différences de fréquence importantes dans l'état de BLV des tissus mammaires ont également eu lieu entre les femmes dans diverses catégories de diagnostic: cancer du sein par

rapport précancéreuses (test du chi carré $P = .025$, test exact de Fisher $P = .03$) et précancéreuses par rapport bénignes (test du chi carré $P = .03$). Figure 2 illustre la progression pas à pas de la fréquence du segment d'ADN *fiscal* BLV allant des catégories bénigne à pré maligne à maligne (P pour tendance $<.0001$, test de tendance Cochran-Armitage bilatéral).

Figure 1

[Ouvrir dans la visionneuse de figures PowerPoint](#)

Cellules épithéliales mammaires positives pour le virus de la leucémie bovine (BLV). Le tissu mammaire diagnostiqué comme bénin a montré des coupes transversales de lobules normaux. (A) Un signal de segment d'ADN de *taxe* BLV intense (brun foncé-noir) a été noté dans le cytoplasme de nombreuses cellules épithéliales, en particulier la partie luminale. Aucune réaction nucléaire définitive n'était apparente. (B) Une section adjacente du même tissu a réagi avec le mélange de réaction en chaîne par polymérase sans amorces comme contrôle de fond pour révéler des artefacts potentiels qui pourraient ressembler à une réaction positive (par exemple, mélanine, excès de peroxydase, activité de réparation d'ADN polymérase Taq polymérase non spécifique). Aucun signal brun foncé n'était apparent. Les deux sections ont été légèrement contre-colorées avec du bleu Diff - Quik (grossissement d'origine $\times 40$).

Figure 2

[Ouvrir dans la visionneuse de figures PowerPoint](#)

Tendance d'association de la positivité du virus de la leucémie bovine (BLV) au diagnostic. Bénin n'indique aucun signe de changements pré malins ou malins et aucun antécédent de cancer du sein (103 patientes). Pré malignant indique des changements précancéreux mais aucun changement malin et aucun antécédent de cancer du sein (52 patientes). Malin indique des modifications malignes des tissus et un diagnostic clinique de cancer du sein (61 patientes). Notez l'augmentation progressive de la fréquence de détection du segment d'ADN de l' *impôt* BLV avec progression de la maladie (P pour tendance, $<.0001$).

Tableau 2. Comparaisons des risques entre les groupes de diagnostic et les contrôles

Catégorie de diagnostic Nombre de femmes (% du total)						
Statut BLV	Population totale N = 214	Contrôles (bénins)) N = 103	Cas (malins) N = 61	Cas Plus DCIS N = 89	Cas plus toutes les prémalignités N = 112	Prémalignant t N = 52
Positif (%)	73 (33,80)	20 (19,61)	35 (57,38)	49 (54,44)	53 (46,49)	18 (33,96)
Négatif (%)	141 (64,28)	83 (78,43)	26 (42,62)	41 (45,56)	61 (53,51)	32 (66,04)
Comparaison avec les contrôles		<i>P</i> OR (IC à 95%)	<.0001 <u>a</u> / .0001 <u>b</u> 5.87 (2.83-12.16)	<.0001 <u>a</u> / <.0001 <u>b</u> 5.25 (2.69-10.23)	<.0001 <u>a</u> / <.0001 <u>b</u> 3.80 (2.01-7.18)	.0572 <u>a</u> / .0763 <u>b</u> 2.24 (1.03-4.84)
Statut HPV par IS - PCR						
Positif (%)	14 (6,48)	8 (7,84)	2 (3,28)	3 (3,33)	6 (5,26)	4 (7,55)
Négatif (%)	200 (92,59)	92 (90,20)	59 (96,72)	87 (96,67)	108 (94,74)	49 (92,45)

Catégorie de diagnostic Nombre de femmes (% du total)						
Statut BLV	Population totale N = 214	Contrôles (bénins)) N = 103	Cas (malins) N = 61	Cas Plus DCIS N = 89	Cas plus toutes les prémalinés N = 112	Prémalignant t N = 52
Comparaison avec les contrôles		<i>P</i>	.2286 <u>a</u> /.3211 <u>b</u>	.1691 <u>a</u> /.2201 <u>b</u>	.1492 <u>a</u> /.5811 <u>b</u>	.9210 <u>a</u> /1.0000 <u>b</u>
Statut HPV par ISH						
Positif (%)	11 (5,09)	3 (2,94)	4 (6,56)	7 (7,78)	8 (7,02)	4 (7,55)
Négatif (%)	189 (87,50)	92 (90,20)	56 (91,80)	78 (86,67)	97 (85,09)	41 (77,36)
Comparaison avec les contrôles		<i>P</i>	.3055 <u>a</u> /.4310 <u>b</u>	.1376 <u>a</u> /.1946 <u>b</u>	.1670 <u>a</u> /.2201 <u>b</u>	.1462 <u>a</u> /.2113 <u>b</u>

- Abréviations: IC à 95%, intervalle de confiance à 95%; BLV, virus de la leucémie bovine; DCIS, carcinome canalaire in situ; HPV, papillomavirus humain; ISH,

hybridation in situ; IS - PCR, réaction en chaîne par polymérase in situ; OU, rapport de cotes.

- ^{une} valeur P a été dérivée à l'aide du test du chi carré et ajustée pour l'âge et la race (blanc / non blanc).
- ^b La valeur P a été dérivée en utilisant le test exact de Fisher.

Cependant, parmi les échantillons malins uniquement, le statut BLV n'a pas été associé à une augmentation du grade tumoral.

Le VPH n'a été trouvé que dans 14 des 214 échantillons (7%). La figure 3 illustre une réaction positive de HPV ISH. Le statut HPV n'a pas été associé à une tumeur maligne ou à une prémalignté. En fait, plus d'échantillons bénins étaient positifs pour le VPH pour le segment du génome du VPH ciblé que ceux diagnostiqués comme malins ou prémalins, mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives. Aucune différence significative n'a été notée entre la présence de HPV dans les tissus BLV positifs et BLV négatifs. Les détails sont résumés dans le tableau 2 .

figure 3
[Ouvrir dans la visionneuse de figures PowerPoint](#)

Cellules épithéliales mammaires positives au papillomavirus humain (HPV). (A) Le tissu mammaire diagnostiqué comme hyperplasie lobulaire bénigne a montré des coupes transversales de lobules avec plusieurs couches épithéliales. Les noyaux de nombreuses cellules épithéliales ont montré un motif ponctué sombre typique d'une réaction positive au VPH (flèches) par hybridation in situ. (B) Du tissu cervical utérin HPV négatif avec métaplasie squameuse a été utilisé comme contrôle négatif de la réaction. Aucun motif ponctué sombre n'était apparent dans les noyaux. Le rouge nucléaire rapide a été utilisé comme contre-coloration pour les deux échantillons (grossissement d'origine $\times 40$).

DISCUSSION

Cinq virus sont largement acceptés par la communauté scientifique comme agents responsables des cancers humains: le VHB et le virus de l'hépatite C pour le carcinome hépatocellulaire; HPV pour les cancers du col utérin, du pénis, de la vulve, de la région périunguale et de la tête / du cou; Virus d'Epstein-Barr pour le lymphome de Burkitt; l'herpèsvirus humain 8 pour le sarcome de Kaposi; et le polyomavirus à cellules de Merkel pour le carcinome à cellules de Merkel. Pour le carcinome

hépatocellulaire résultant du VHB et du carcinome cervical, qui ne se trouvent pas principalement chez les individus immunodéprimés, des vaccins ont déjà été développés et assurent une prévention primaire efficace. Il va de soi que d'autres cancers dont l'étiologie est inconnue pourraient éventuellement avoir une étiologie virale, et les investigations dans ce domaine méritent d'être poursuivies.

L'étude présente plusieurs points forts. Premièrement, les amorces utilisées pour IS-PCR sont les plus susceptibles de détecter la présence de BLV. À leur entrée dans une cellule, les deltarétrovirus utilisent leur polymérase (transcriptase inverse) pour transcrire une copie d'ADN de leur génome à ARN. À mesure que les maladies qu'elles provoquent progressent, les régions du génome codant pour la polymérase, la capsid et les protéines d'enveloppe des virus deviennent de plus en plus supprimées, **17**, **18** vraisemblablement pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Pour le BLV chez les bovins et le virus de la leucémie à cellules T humaines, un deltarétrovirus étroitement lié au BLV, tout ce qui peut rester du génome viral dans les phases avancées des maladies est la longue région terminale du promoteur répété et la *taxe* région codant pour la protéine oncogène. La longue région de promoteur de répétition terminale présente une variation de séquence beaucoup plus grande entre les individus que la *taxe*, la plus hautement conservée des régions du génome du BLV. **19** Cette rareté dans la variation de séquence nous porte à croire que les mêmes amorces *fishales* détecteraient cette région dans la majorité des spécimens. La prise en charge de la spécificité de ces amorces pour BLV est double. Tout d'abord, le National Center for Biotechnology Information GenBank BLAST recherche en comparant les séquences d'amorces à toutes les séquences virales de la base de données nucléotidiques **20** indiquant une homologie élevée uniquement avec BLV ($E = 0,23$) et une homologie extrêmement faible ($E = 16,0$ pour l'amorce sens et $255,0$ pour l'amorce antisens) avec les séquences du génome humain, qui incluent les rétrovirus endogènes. La valeur E est une mesure de la similitude du hasard; les valeurs $<1,00$ ont une homologie élevée, tandis que les valeurs $> 1,00$ ont une faible homologie avec la séquence testée. Deuxièmement, une étude précédente a démontré que ces mêmes amorces *fishales* n'ont pas réussi à amplifier les représentants de toutes les familles rétrovirales oncogènes, les lentivirus et les virus signalés comme étant présents dans les tissus mammaires humains (HPV, virus d'Epstein-Barr et rétrovirus endogène humain K [HERV-K]). **4** La région du génome du HPV choisie comme cible pour la PCR provenait de la région de la capsid et a été la cible la plus couramment utilisée pour les études précédentes concernant le cancer du col utérin et le cancer du sein. En raison de la nécessité de préserver le tissu archivistique dans le service de pathologie qui a fourni les

échantillons, il n'a pas été possible d'obtenir d'autres sections pour examiner des zones génomiques supplémentaires des 2 virus.

Une autre force de l'étude actuelle est la technique IS. La contamination croisée avec la lignée cellulaire témoin positive ou entre les échantillons était impossible parce que l'ADN n'était pas extrait et était fixé dans les cellules témoins et les tissus humains et ne pouvait pas s'échapper pour contaminer de façon croisée. Un autre avantage est que l'IS - PCR permet la localisation de l'amplification PCR à des types de cellules particuliers.

Un troisième point fort de la présente étude est l'épidémiologie présentée ici. Les cas, les témoins et les sujets précancéreux étaient extraordinairement bien appariés en ce qui concerne l'âge (tableau [1](#)), ce qui est difficile à faire dans de nombreuses enquêtes impliquant des sujets humains. Ainsi, malgré une taille d'échantillon modérée, les résultats semblent être nets, avec des OR élevés, et les limites inférieures des IC à 95% étaient $> 1,00$ (tableau [2](#)).

Bien que de nombreuses étapes soient nécessaires pour établir la causalité d'une maladie, une association statistiquement significative entre la maladie et l'agent suspect est la première étape la plus essentielle, et la validation de cette association par d'autres chercheurs dans différentes populations est une étape ultérieure essentielle. **21** Les données présentées dans la présente étude indiquent une relation très significative entre la présence du segment d'ADN *fisca*/BLV ciblé et le cancer du sein humain chez les femmes résidant au Texas, corroborant ainsi les résultats d'une étude précédente concernant une population différente de femmes américaines. **5** Le risque attribuable de 51,82% indique que le BLV pourrait être responsable d'au moins la moitié des cas de cancer du sein dans la population étudiée. L'important *La* valeur de p pour la tendance ($<.0001$) est cohérente avec l'idée bien acceptée que le cancer du sein est un processus graduel de transition cellulaire de la normale au cancer, et elle ajoute une nouvelle perspective qu'une infection virale oncogène persistante pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale. Des preuves antérieures selon lesquelles la taxe sur les protéines oncogènes dans le BLV peut inhiber la réparation de l'ADN **22** suggèrent un mécanisme par lequel le BLV pourrait déclencher le cancer du sein sur une période de plusieurs années, car les cellules infectées par le BLV individuelles accumulent des mutations génomiques non réparées.

Cependant, les données de la présente étude ne prennent pas en charge les souches oncogènes du VPH jouant un rôle étiologique dans le cancer du sein, même si 2 méthodes de détection du VPH ont été utilisées. Une méthode a amplifié un segment

d'ADN ciblé du type de VPH le plus courant impliqué dans le cancer du col de l'utérus (HPV - 16) à l'aide d'IS - PCR. L'autre méthode a utilisé un kit commercial (Ventana Medical Systems) qui est fréquemment utilisé dans le diagnostic clinique des infections utérines du col utérin qui ciblait 12 types de PCR oncogènes utilisant l'ISH sans amplification par PCR. La faible fréquence de détection du VPH (<7%) observée avec les deux méthodes dans toutes les catégories de diagnostic ne permet pas de croire que le VPH joue un rôle important dans le cancer du sein, seul ou en synergie avec le BLV. Cela est conforme aux résultats de plusieurs études antérieures concernant le VPH et le cancer du sein. **2, 23**

SOUTIEN FINANCIER

Soutenu par une subvention de la Fondation Avon pour les femmes (subvention 02-2011-103).

DIVULGATIONS DE CONFLITS D'INTÉRÊTS

Kimberly A. Baltzell rapporte des subventions de la Fondation Avon pour le travail effectué dans le cadre de la présente étude.

CONTRIBUTIONS D'AUTEUR

Kimberly A. Baltzell et **Gertrude C. Buehring** étaient responsables du développement et de la conduite globale de l'étude, ainsi que de la rédaction de l'article. **Hua Min Shen, Savitri Krishnamurthy, Gerard J. Nuovo** et **Gertrude C. Buehring** étaient responsables de la conduite de toutes les expériences. **Kimberly A. Baltzell** était responsable de l'analyse et de l'interprétation des données avec **Jennette D. Sison**.

LES RÉFÉRENCES

- 1 Vineis P , Wild CP . Modèles mondiaux de cancer: causes et prévention . *Lancet* . 2014 ; **383** : 549 - 557 .

[CrossrefPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

- 2 Joshi D , Buehring GC . Les virus sont-ils associés au cancer du sein humain? Examiner les preuves moléculaires . *Traitement du cancer du sein Res* . 2012 ; **135** : 1 - 15 .

[CrossrefPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 3 saumons B , Gunzburg WH . Revisiter le rôle d'un rétrovirus des tumeurs mammaires dans le cancer du sein humain . *Int J Cancer* . 2013 ; **133** : 1530 - 1535 .

[Bibliothèque en ligne WileyCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 4 Buehring GC , Shen HM , Jensen HM , Choi KY , Sun D , Nuovo G . ADN du virus de la leucémie bovine dans le tissu mammaire humain . *Emerg Infect Dis* . 2014 ; **20** : 772 - 782 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 5 Buehring GC , Shen HM , Jensen HM , Jin DL , Hudes M , Block G . L'exposition au virus de la leucémie bovine est associée au cancer du sein: une étude cas-témoins . *PLoS One* . 2015 ; **10** : e0134304 .

[CrossrefPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 6 Bauermann FV , Ridpath JF , Dargatz DA . Séroprévalence du virus de la leucémie bovine chez les bovins présentés à l'abattage aux États-Unis . *J Vet Diagn Invest* . 2017 ; **29** : 704 - 706 .

[CrossrefPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 7 Gyles C . Devrions-nous nous préoccuper davantage du virus de la leucémie bovine? *Can Vet J* . 2016 ; **57** : 115 - 116 .

[PubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 8 Guidry JT , Scott RS . L'interaction entre le papillomavirus humain et d'autres virus . *Virus Res* . 2017 ; **231** : 139 - 147 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 9 Pinder SE , Murray S , Ellis IO et al. L'importance du grade histologique du cancer du sein invasif et de la réponse à la chimiothérapie . *Cancer* . 1998 ; **83** : 1529 - 1539 .

[Bibliothèque en ligne WileyCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 10 Nuovo GJ . Hybridation PCR in situ . Dans: S Spector , M Bendinelli , H Friedman , éd. *Détection rapide des agents infectieux* . New York : Plenum Press; 1998 .

[Google Scholar](#)

-
- 11 Duncan RB Jr , Scarratt WK , Buehring GC . Détection du virus de la leucémie bovine par réaction en chaîne par polymérase in situ dans les tissus d'un cas de lymphosarcome bovin sporadique . *J Vet Diagn Invest* . 2005 ; **17** : 190 - 194 .

[CrossrefPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 12 Lee L , Scarratt WK , Buehring GC , Saunders GK . Infection par le virus de la leucémie bovine dans un alpaga juvénile atteint de lymphome multicentrique . *Can Vet J* . 2012 ; **53** : 283 - 286 .

[PubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 13 Van Der Maaten MJ , Miller JM . Réplication du virus de la leucémie bovine dans des cultures de cellules monocouches . *Bibl Haematol* . 1975 ; **43** : 360 - 362 .

[Google Scholar](#)

-
- 14 Cooper JK , Sykes G , King S , et al. Identification des espèces en culture cellulaire: une approche moléculaire à deux volets . *In Vitro Cell Dev Biol Anim* . 2007 ; **43** : 344 - 351 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 15 Pattillo RA , Hussa RO , Story MT , Ruckert AC , Shalaby MR , Mattingly RF . Antigène tumoral et gonadotrophine chorionique humaine dans les cellules CaSki: une nouvelle lignée cellulaire épidermoïde de cancer du col utérin . *Science* . 1977 ; **196** : 1456 - 1458 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 16 G Nuovo , éd. *En Situ pathologie moléculaire et co-expression analyses* . 1er éd. New York : Elsevier; 2013 .

[Google Scholar](#)

-
- 17 Gillet N , Florins A , Boxus M , et al. Mécanismes de la leucémogénèse induite par le virus de la leucémie bovine: perspectives de nouvelles thérapies antirétrovirales chez l'homme . *Rétrovirologie* . 2007 ; **4** : 18 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 18 Kamihira S , Sugahara K , Tsuruda K et al. Proviral état de HTLV-1 intégré dans l'ADN génomique d'hôte de cellules de leucémie adultes des cellules T . *Clin Lab Haematol* . 2005 ; **27** : 235 - 241 .

[Bibliothèque en ligne WileyCASPubMedGoogle Scholar](#)

-
- 19 McGirr KM , GC de Buehring . Tax & rex: chevauchement des gènes du groupe Deltaretrovirus . *Gènes viraux* . 2006 ; **32** : 229 - 239 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 20 National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, National Institutes of Health . Nucléotide standard BLAST . <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . Consulté le 15 novembre 2017 .

[Google Scholar](#)

-
- 21 Hill AB . L'environnement et la maladie: association ou causalité? *Proc R Soc Med* . 1965 ; **58** : 295 - 300 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 22 Philpott SM , Buehring GC . Réparation défectueuse de l'ADN dans les cellules atteintes de virus de leucémie à cellules T humaines / leucémie bovine: rôle du gène fiscal . *J Natl Cancer Inst* . 1999 ; **91** : 933 - 942 .

[CrossrefCASPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

-
- 23 Baltzell K , Buehring GC , Krishnamurthy S , Kuerer H , Shen HM , Sison JD . Preuve limitée de papillomavirus humain dans le tissu mammaire à l'aide de méthodes moléculaires in situ . *Cancer* . 2012 ; **118** : 1212 - 1220 .

[Bibliothèque en ligne WileyPubMedWeb of Science®Google Scholar](#)

Citant la littérature