

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 143034 9

ANNEE 2005

THESE N°

109/1

**EXPERIENCE SUR LE DEPISTAGE GENOMIQUE
DES INFECTIONS A PAPILLOMAVIRUS HUMAINS
SUR PRELEVEMENTS CERVICAUX**

THESE

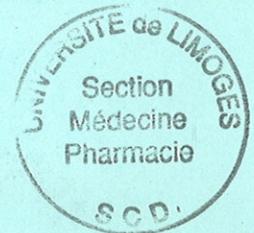
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 25 mars 2005

PAR

Sébastien HANTZ

Né le 24 mai 1975 à Belfort (90)



EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur Denis

- Président

Monsieur le Professeur Aubard

- Juge

Monsieur le Professeur Bonnetblanc

- Juge

Monsieur le Professeur Labrousse

- Juge

Madame le Professeur Rogez

- Juge

Madame le Docteur Alain

- Directeur de thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE



ANNEE 2005

THESE N°

**EXPERIENCE SUR LE DEPISTAGE GENOMIQUE
DES INFECTIONS A PAPILLOMAVIRUS HUMAINS
SUR PRELEVEMENTS CERVICAUX**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 25 mars 2005

PAR

Sébastien HANTZ

Né le 24 mai 1975 à Belfort (90)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur Denis	- Président
Monsieur le Professeur Aubard	- Juge
Monsieur le Professeur Bonnetblanc	- Juge
Monsieur le Professeur Labrousse	- Juge
Madame le Professeur Rogez	- Juge
Madame le Docteur Alain	- Directeur de thèse

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis
Monsieur le Professeur COGNE Michel

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

ROCHE Doriane

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Jean-Luc	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
CHAPOT René	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIENE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	CHIRURGIE UROLOGIQUE ET ANDROLOGIE
DUMONT Daniel (C.S)	MEDECINE DU TRAVAIL
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé (C.S)	REANIMATION MEDICALE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LE MEUR Yannick	NEPHROLOGIE
LEROUX-ROBERT Claude (surnombre)	NEPHROLOGIE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

MAUBON Antoine (C.S)
 MELLONI Boris
 MENIER Robert (surnombre)
 MERLE Louis
 MOREAU Jean-Jacques (C.S)
 MOULIES Dominique (C.S)
 NATHAN-DENIZOT Nathalie
 PARAF François
 PILLEGAND Bernard
 PIVA Claude (C.S)
 PREUX Pierre-Marie
 RIGAUD Michel (C.S)
 SALLE Jean-Yves
 SAUTEREAU Denis (C.S)
 SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)
 STURTZ Franck
 TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre
 TREVES Richard (C.S)
 TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
 VALLAT Jean-Michel (C.S)
 VALLEIX Denis
 VANDROUX Jean-Claude (C.S)
 VERGNEGRE Alain (C.S)
 VIDAL Elisabeth (C.S)
 VIGNON Philippe
 VIROT Patrice (C.S)
 WEINBRECK Pierre (C.S)
 YARDIN Catherine (C.S)

RADIOLOGIE
 PNEUMOLOGIE
 PHYSIOLOGIE
 PHARMACOLOGIE
 NEUROCHIRURGIE
 CHIRURGIE INFANTILE
 ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
 ANATOMIE PATHOLOGIQUE
 HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
 MEDECINE LEGALE
 INFORMATION MEDICALE ET EVALUATION
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
 HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
 RHUMATOLOGIE
 CANCEROLOGIE
 NEUROLOGIE
 ANATOMIE
 BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION
 MEDECINE INTERNE
 REANIMATION MEDICALE
 CARDIOLOGIE
 MALADIES INFECTIEUSES
 HISTOLOGIE-CYTOLOGIE, CYTOGENETIQUE ET BIOLOGIE
 CELLULAIRE ET DE LA REPRODUCTION

PROFESSEUR ASSOCIE A MI-TEMPS

BUCHON Daniel

MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

BUISSON Jean-Gabriel

MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRACTICIENS HOSPITALIERS

ALAIN Sophie

ANTONINI Marie-Thérèse

BOUTEILLE Bernard

CHABLE Hélène

DAVIET Jean-Christophe

DRUET-CABANAC Michel

DURAND-FONTANIER Sylvaine

ESCLAIRE Françoise

JULIA Annie

LAPLAUD Paul

MOUNIER Marcelle

PETIT Barbara

PLOY Marie-Cécile

RONDELAUD Daniel

VERGNE-SALLE Pascale

Bactériologie – virologie – hygiène hospitalière

Explorations Fonctionnelles Physiologiques

Parasitologie - mycologie

Biochimie et génétique moléculaire, chimie des explorations fonctionnelles

Médecine physique et réadaptation

Epidémiologie, économie de la santé et prévention

Anatomie

Laboratoire d'histologie-cytologie, cytogénétique et de Biologie cellulaire et de la reproduction

laboratoire d'hématologie

Biochimie et génétique moléculaire, chimie des explorations fonctionnelles

Bactériologie – virologie – hygiène hospitalière

Anatomie et cytologie pathologiques

Bactériologie – virologie – hygiène hospitalière

Laboratoire d'histologie-cytologie, cytogénétique et de Biologie cellulaire et de la reproduction

Rhumatologie

REMERCIEMENTS

A **Monsieur le Professeur Denis**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, Chef de service, de nous faire l'honneur de présider ce jury après m'avoir transmis sa passion pour la microbiologie et permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire. Qu'il trouve ici l'expression de tout mon respect.

A **Monsieur le Professeur Aubard**, Professeur des Universités de Gynécologie-Obstétrique, Chirurgien des Hôpitaux, Chef de service, d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir participé à notre protocole de recherche. Qu'il reçoive toute ma gratitude pour m'avoir permis de concilier mon stage clinique et mes activités de recherche.

A **Monsieur le Professeur Bonnetblanc**, Professeur des Universités de Dermatologie, Médecin des Hôpitaux, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.

A **Monsieur le Professeur Labrousse**, Professeur des Universités d'Anatomie Pathologique, Praticien Hospitalier, Chef de service, d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir contribué activement à notre étude.

A **Madame le Professeur Rogez**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie à la Faculté de Pharmacie, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et pour son enseignement délivré au cours de mon internat.

A **Madame le Docteur Alain**, Maître de Conférences de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien Hospitalier, pour m'avoir encadré au cours de ce travail et tout au long de mon internat. Qu'elle reçoive toute ma gratitude pour sa patience et sa disponibilité et ses précieux conseils.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ont collaboré à ce travail :

A Madame le Professeur Yardin, Professeur des Universités d'Histologie, Praticien Hospitalier, Chef de service, et Monsieur le Docteur Rondelaud, Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, pour leur contribution à ce travail.

A Mesdames les Docteurs Darreye et Pascal, pour leur lecture intensive des frottis cervico-utérins.

A Madame Abitbol (laboratoire GSK) et Monsieur Soubeyrand (laboratoire Aventis) pour leurs précieux renseignements et leur active participation.

Au Docteur Caly et à tous les médecins du service de Gynécologie-Obstétrique qui ont inclus les patientes dans notre protocole de recherche.

A tout le personnel des secrétariats des services de Gynécologie-Obstétrique et de Cytogénétique.

A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène et plus particulièrement à ceux des secteurs des cultures cellulaires et de biologie moléculaire pour leur gentillesse et leur précieuse collaboration.

Je tiens également à remercier ceux qui ont contribué à ma formation et ceux avec qui j'ai travaillé tout au long de ces années :

A tous les membres des laboratoires du CHU Dupuytren de Limoges pour leur accueil et leur gentillesse.

A Monsieur le Docteur Niocel, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ma formation.

Aux membres de l'unité de recherche EA 3175 de la faculté, et plus particulièrement Gaël et Anne, pour leurs conseils avisés et leur amitié.

A mes co-internes pour leur disponibilité et leur soutien. A Marie-Juliette, Sylvie, Sandrine, François, Khaled et Geoffrey pour leur amitié.

A ma famille, avec toute mon affection

A Valérie, avec tout mon amour

PLAN

INTRODUCTION.....	10
GENERALITES.....	11
I. HISTORIQUE.....	12
II. STRUCTURE DU VIRION.....	13
III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION.....	16
IV. MECANISME D'ONCOGENESE.....	20
V. HISTOPATHOLOGIE DES LESIONS DU COL UTERIN.....	24
VI. EPIDEMIOLOGIE.....	27
VII. DETECTION DES HPV ET LESIONS CERVICALES ASSOCIEES.....	32
VIII. PRINCIPES THERAPEUTIQUES.....	41
IX. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES : APPROCHE VACCINALE.....	43
INTRODUCTION A L'ETUDE EXPERIMENTALE.....	51
MATERIEL ET METHODES.....	54
I. MATERIEL.....	55
II. METHODES.....	58
RESULTATS.....	74
I. PREMIERE PARTIE : COMPARAISON DE TECHNIQUES DE DEPISTAGE VIROLOGIQUE DE L'INFECTION A HPV.....	75
II. DEUXIEME PARTIE: EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A HPV CHEZ LES FEMMES ENCEINTES EN LIMOUSIN.....	90
DISCUSSION.....	93
I. PERFORMANCES ET PERTINENCE DE 2 METHODES DE DEPISTAGE DES HPV HR.....	94
II. ETUDE DE PREVALENCE D'HPV CHEZ LES FEMMES ENCEINTES.....	102
CONCLUSION.....	104
BIBLIOGRAPHIE.....	107

ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ASC-US	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
BR	Bas Risque
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
DO	Densité Optique
dXTP	déoxynucléotide triphosphate
ddXTP	didéoxynucléotide triphosphate
FCU	frottis cervico-utérin
HC2	Hybrid capture 2
HLA	Human Leukocytes Antigen
HPV	Human Papillomavirus
HR	Haut Risque
HSIL	High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
Hsp	Heat shock protein
IL	interleukine
LSIL	Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
SIL	Squamous Intraepithelial Lesion
VLP	Virus Like Particle

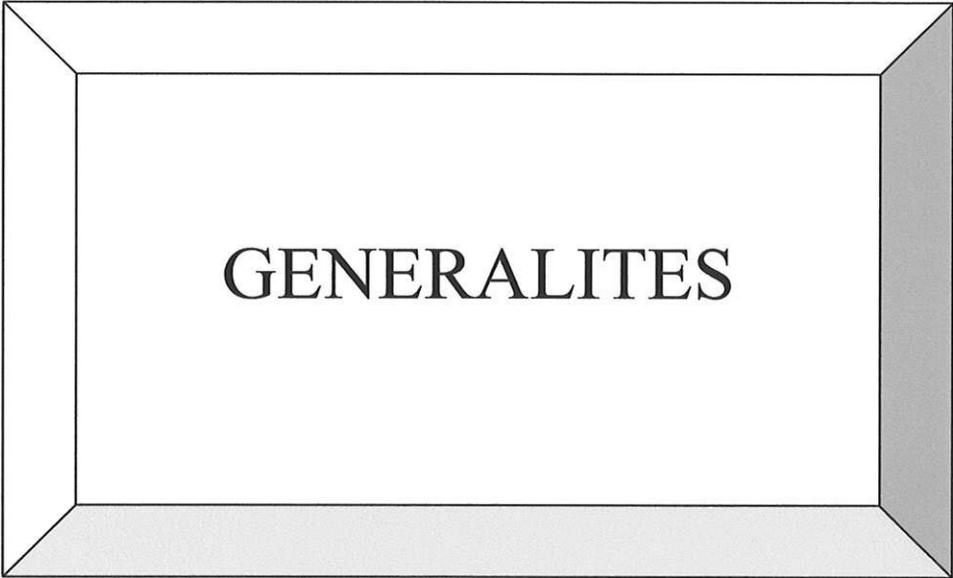
INTRODUCTION

L'infection du tractus génital de la femme par des papillomavirus humains (HPV) est à l'origine du développement de lésions de l'épithélium malpighien du col de l'utérus, qui en cas de persistance d'HPV à haut risque, peuvent évoluer vers un cancer du col. Ce cancer est le deuxième cancer chez la femme en terme de fréquence d'apparition et de mortalité, touchant chaque année plus de 470 000 femmes de par le monde tant dans les pays développés qu'en voie de développement et on estime qu'il serait responsable annuellement de 190 000 décès. En France, le cancer du col se situe au 8^{ième} rang des cancers féminins avec 3387 nouveaux cas estimés en 2000 et environ 1000 décès par an. D'après l'OMS, le cancer du col de l'utérus représente le premier cancer corrélé à 100% à une infection. Afin de combattre ce fléau qui pose un véritable problème de santé publique au niveau mondial, il est apparu nécessaire de mettre en place des stratégies de dépistage et de traitement précoce. Ce dépistage repose encore à ce jour essentiellement sur la recherche de cellules atypiques sur frottis cervico-utérins. Tant pour les pays bénéficiant de ce programme que dans les pays en voie de développement, la mise en oeuvre d'une vaccination contre l'HPV constitue une approche prometteuse du contrôle de la maladie.

Notre étude a consisté à comparer 2 trousse de typage HPV, l'une étant la technique de référence utilisée au laboratoire de Virologie et l'autre n'étant pas encore commercialisée.

Parallèlement, nous avons recherché la présence d'HPV à haut risque chez les femmes lors de leur première consultation de grossesse.

L'ensemble de ces résultats a été confronté aux données cyto-pathologiques de ces patientes afin de mieux cerner la place et l'efficacité de ces tests dans le dépistage et le suivi des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus.



GENERALITES

I. HISTORIQUE

Les lésions induites par des papillomavirus telles que les verrues et les condylomes, étaient déjà connues dans l'Antiquité, certaines descriptions remontant à 500 ans avant J-C par des médecins grecs et romains. Leur origine infectieuse n'avait pas échappé à ceux qui les avaient décrites mais elles étaient assimilées à des formes de syphilis ou de blénorrhagie. L'évidence de leur contagiosité fut décrite au cours du XIX^{ème} siècle par J.F. Payne, médecin anglais, qui constata le développement de lésions verruqueuses sur ses doigts après avoir cureté les verrues de l'un de ses patients (Payne, 1891). Parallèlement, dès 1842, A. Rigoni-Stern, médecin italien de Vérone, a mis en évidence pour la première fois le rôle potentiel du comportement sexuel et du statut marital dans le développement du cancer du col après avoir observé que les patientes décédées d'un cancer du col de l'utérus étaient rarement vierges ou nonnes (Rigoni-Stern, 1842). Cependant, la responsabilité d'un agent infectieux dans la genèse de telle lésion est encore loin d'être évoquée. Il a fallu attendre le début du XX^{ème} siècle pour que la nature virale de l'agent responsable des lésions verruqueuses humaines soit évoquée. En effet, l'inoculation d'un filtrat acellulaire issu de lésions préalablement broyées a permis la transmission de la maladie chez l'homme (Ciuffo, 1907). C'est chez le lapin de garenne que le premier papillomavirus (CRPV, cottontail rabbit papillomavirus) fut décrit en 1933 (Shope, 1933), mais il fallut attendre les années 50 pour mettre en évidence les premières particules virales en microscopie électronique dans les lésions verruqueuses (Strauss, 1950). Le virus n'étant pas cultivable *in vitro*, c'est l'essor de la biologie moléculaire dans les années 70 qui permit d'entreprendre une étude des propriétés des différents papillomavirus humains par l'intermédiaire du clonage des gènes viraux. En ce qui concerne les lésions condylomateuses cervicales, leur aspect cytologique, caractérisé par des cellules dyskaryotiques, est connu depuis les années 60 (Papanicolaou, 1960). Une année plus tard, est émise l'hypothèse selon laquelle la transformation périnucléolaire des cellules ballonisées à halo clair serait due à une altération cellulaire produite par un virus jouant un rôle oncogène. Progressivement, de nombreux travaux démontrent la pluralité des HPV et la spécificité de leur pouvoir pathogène (Gissmann, 1976), ainsi que l'association de certains d'entre eux à des néoplasies intraépithéliales et à des cancers. Une classification des différents génotypes d'HPV a donc pu être établie en fonction du type de lésion et de son risque évolutif. Actuellement, la recherche de ces virus et leur typage doit ainsi conduire à une

meilleure prévention du risque d'apparition de lésions cancéreuses et au développement de stratégies vaccinales.

II. STRUCTURE DU VIRION

Les papillomavirus appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. Ce sont des virus nus comportant une capsidie icosaédrique de 45 à 55 nm de diamètre, formée de 72 capsomères et d'un génome se présentant sous forme d'ADN bicaténaire circulaire d'environ 8 kbp dont un seul brin est codant (Figure 1). Ce génome comporte trois régions : précoce E (*Early*), tardive L (*Late*) et une région non codante de régulation URR (*Upstream Regulation Region*) ou LCR (*Long Control Region*). La région E comporte plusieurs cadres ouverts de lecture (*E1* à *E7*) codant des protéines non structurales, impliquées dans la réplication, la transcription et la transformation cellulaire. La région L comporte deux cadres ouverts de lecture (*L1* et *L2*) codant des protéines structurales.

Région non codante (LCR ou URR)

Elle est située entre *L1* et *E6*, constituée de 400 pb et contient les éléments cis de contrôle de la transcription et de la réplication. En particulier, elle comporte des sites de fixation pour des protéines virales mais aussi pour de multiples activateurs et répresseur transcriptionnels.

Région L

Elle code les 2 protéines de la capsidie virale, *L1* codant pour la protéine majeure de capsidie et *L2* codant la protéine mineure de capsidie. Ces gènes ne sont exprimés que lorsque les virions complets ont été assemblés. Cette transcription semble régulée par des médiateurs cellulaires qui ne sont produits que par les cellules épithéliales les plus différenciées des couches superficielles de l'épithélium infectée.

Région E

Elle est subdivisée en 7 régions codantes (*E1* à *E7*)

- *E1* intervient dans la réplication virale. Elle code 2 protéines nécessaires pour la réplication extra-chromosomique et pour l'achèvement du cycle viral complet,
- *E2* code 2 protéines se fixant sur des sites spécifiques de l'ADN. Une protéine *E2*, correspondant à la traduction de l'ORF *E2*, active la transcription des régions E après fixation sur LCR et une protéine *E2* tronquée inhibe la transcription des régions E. La protéine *E2* détient donc un rôle fondamental dans le cycle viral : elle régule la transcription des oncogènes viraux *E6* et *E7* et active la réplication du génome viral,

- *E3* et *E8* ne sont présentes que dans le génome de certains HPV et leur fonction est à ce jour encore inconnue,
- *E4* code une protéine qui interviendrait dans la maturation de la particule virale,
- *E5* code un agent mitogène sur les cellules hôtes. L'action de cet agent fait intervenir la stimulation de l'expression membranaire des récepteurs aux facteurs de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*) et PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), impliqués dans la tumorigenèse de HPV 16,
- *E6* et *E7* codent 2 protéines qui ont la propriété (en particulier pour les HPV à haut risque de développement de cancer) d'induire la prolifération et la transformation néoplasique des cellules hôtes par inhibition des produits de gènes suppresseurs de tumeurs, respectivement p53 et pRb

Protéine	Expression	Fonction	Réponse immunitaire naturelle
E1	Précoce	Réplication de l'ADN	Absence
E2	Précoce	Facteur de transcription	Réponse à médiation cellulaire dans les lésions qui sont en cours de régression
E4	Tardive	Interaction avec la cytokératine	Absence
E5	Précoce	Stimulation de la prolifération cellulaire	Absence
E6	Intermédiaire	Immortalisation et transformation Liaison avec p53	Absence
E7	Intermédiaire	Immortalisation et transformation Liaison avec pRb	Hypersensibilité de type retardé dans les CIN qui sont en cours de régression Synthèse d'anticorps dans les cancers invasifs
L1	Tardive	Protéine majeure de capsid	Synthèse d'anticorps chez 50 à 100% des patients dans les semaines ou années suivant l'infection
L2	Tardive	Protéine mineure de capsid	Absence

Tableau 1 : Principales protéines virales, fonctions et réponses immunitaires spécifiques de l'hôte (Frazer, 2004)

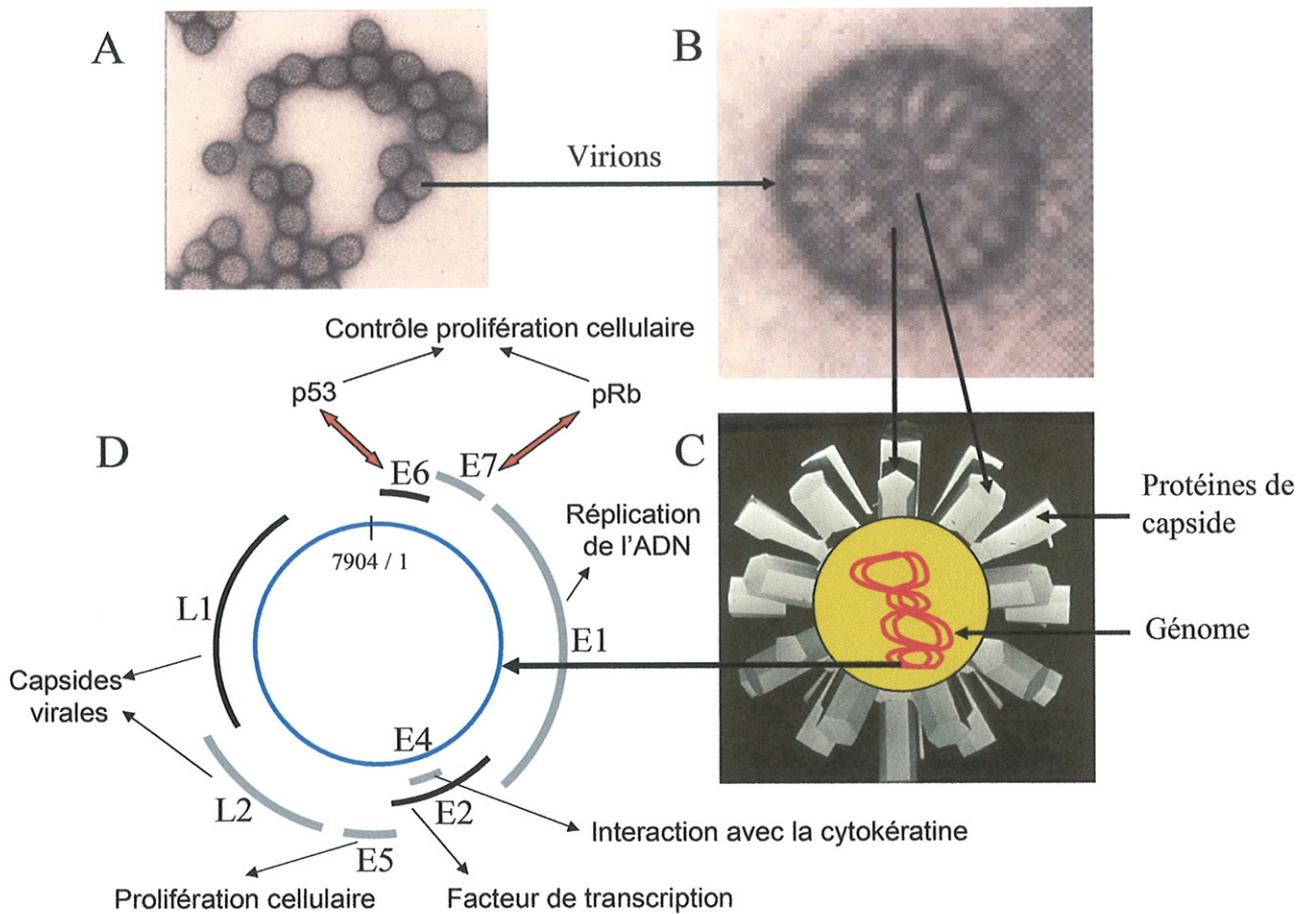


Figure 1 : Structure des papillomavirus.

A et B : Visualisation des virions en microscopie électronique

C : Structure du virus : capside icosaédrique portant des spicules protéiques hautement immunogènes, englobant le génome

D : Génome viral (7904 pb) : ADN circulaire double brin, dont un seul brin, ici en bleu, code pour des protéines de régulation, E1 à E8 et des protéines de structure, L1 et L2. Les protéines impliquées dans la transformation de la cellule hôte sont E5, E6 et E7. 1 : origine de réplication

III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION

1. Histoire naturelle de l'infection

Les papillomavirus peuvent infecter de nombreux vertébrés, dont l'homme mais ils sont caractérisés pour un type donné par une étroite spécificité d'hôte. Les papillomavirus humains (HPV) comportent plus de 100 génotypes, chacun ayant un tropisme épithélial particulier, cutané ou muqueux. La majorité d'entre eux est responsable de lésions bénignes de la peau ou des muqueuses tandis que d'autres génotypes sont associés à des cancers cutanés ou muqueux.

Les HPV pénètrent les épithéliums cutanés ou muqueux à la faveur de microlésions et infectent les cellules basales, siège du renouvellement permanent de l'épithélium. La fixation à ces cellules fait appel aux héparanes sulfates cellulaires puis l'internalisation nécessite l'intervention d'un deuxième récepteur qui n'a été identifié que pour l'HPV 6 ($\alpha 6$ intégrine). L'ADN viral (sous forme épisomale) se multiplie de façon contemporaine du génome cellulaire. Les gènes précoces *E1* (activant la réplication virale) et *E2* (transactivateur) sont alors exprimés, ce qui favorise la multiplication clonale des cellules infectées et donc la prolifération bénigne caractéristique du papillome. L'expression des protéines de capsid L1 et L2 n'a lieu que dans les couches superficielles kératinisées de l'épithélium, où elles s'assemblent pour former des particules virales qui seront libérées par les kératinocytes morts. Sur le plan cytologique, l'effet cytopathogène est caractérisé par la koïlocytose : décrite en 1956 par Koss (Koss, 1956), il s'agit d'une cellule des couches intermédiaires ou les plus externes avec un noyau oedémateux, une chromatine irrégulière (témoin de l'activité virale) et surtout l'existence d'une vacuole intracytoplasmique périnucléaire refoulant le cytoplasme en périphérie ; cette vacuole semble optiquement vide (Figure 2).

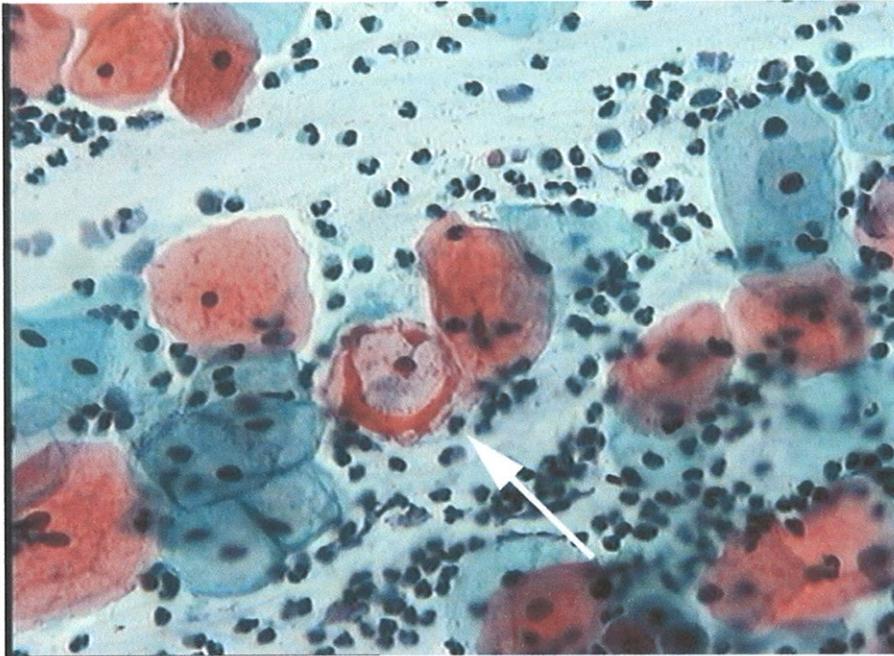


Figure 2 : Photo de koïlocyte

A l'échelon tissulaire, on note une prolifération épithéliale et une modification architecturale avec apparition de micropapilles. Selon le site et la nature des lésions, la quantité de virus produite présente de grandes variations. Les virions sont abondants dans les verrues plantaires, moins abondants dans les condylomes exophytiques et rares dans les condylomes plans. Le virus peut se propager ainsi au sein d'un même épithélium, ceci expliquant le caractère souvent multifocal des lésions au niveau génital principalement, ou être transmis à un autre individu par contact direct (cutané ou sexuel). Une transmission indirecte par l'intermédiaire d'objets contaminés est vraisemblable. La période d'incubation varie de 1 semaine à plusieurs mois.

L'infection peut évoluer selon deux modes : clairance virale ou latence. La majorité des infections à HPV évoluent dans le sens d'une clairance virale qui aboutit à la guérison spontanée de l'infection. Cependant, dans certains cas (dépendants de l'hôte ou du type viral), l'ADN viral peut persister sous forme épisomale à l'état latent et peut alors soit évoluer vers une infection productive lors d'une réactivation soit persister sous forme intégrée au génome cellulaire et entraîner ensuite l'apparition de lésions précancéreuses ou cancéreuses (par délétion du gène *E2* et hyperproduction des gènes *E6* et *E7*).

Du fait des propriétés répliquatives particulières des HPV, les cultures cellulaires conventionnelles ne permettent pas de produire des virions complets. Les cultures *in vitro* des papillomavirus restent limitées à de rares laboratoires de recherche qui utilisent soit des tissus

humains greffés à des souris immunodéficientes (nude ou SCID) soit des systèmes de culture cellulaire sophistiqués reproduisant la différenciation épithéliale.

2. Réponse immunitaire de l'hôte

En réponse à l'infection du tractus génital par les HPV, l'organisme va développer différents mécanismes de défense, en développant une réponse immunitaire spécifique (Figure 3). En effet, il a été montré que l'immunosuppression liée aux traitements antirejets reçus par les transplantés (Sillman, 1997) ou due à l'infection par le VIH chez les patients au stade SIDA (Ferenczy, 2003) empêchait la guérison de l'infection à HPV et augmentait le risque de progression vers la malignité.

La réponse humorale se traduit par la synthèse d'anticorps, spécifiques de types, dirigés contre des épitopes conformationnels portés par les protéines de capsid L1 et L2, détectables entre quatre mois et cinq ans après la première infection dans environ 50 à 80% des cas (Carter, 2000). Cette réponse associe une synthèse locale d'immunoglobulines et une transsudation d'immunoglobulines depuis le plasma, permettant de retrouver in situ de fortes concentrations d'IgG et de faibles concentrations d'IgA-S (IgA sécrétoires) ainsi que de grandes quantités d'IL-10. Il a été montré que le titre de ces anticorps n'était pas corrélé avec le pronostic et ne permettait pas de distinguer les patients à faible ou fort risque de progression vers un cancer invasif.

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est plus difficile à mettre en évidence. Cependant, il a été montré chez l'homme comme chez l'animal que la régression des lésions de bas grade s'accompagnait d'un infiltrat de cellules T (Nicholls, 2001). La réponse serait dirigée contre certaines protéines non structurales et on a trouvé une corrélation entre une réaction spécifique de type vis-à-vis de la protéine virale E7 et une régression spontanée d'une lésion intra-épithéliale (Hopfl, 2000).

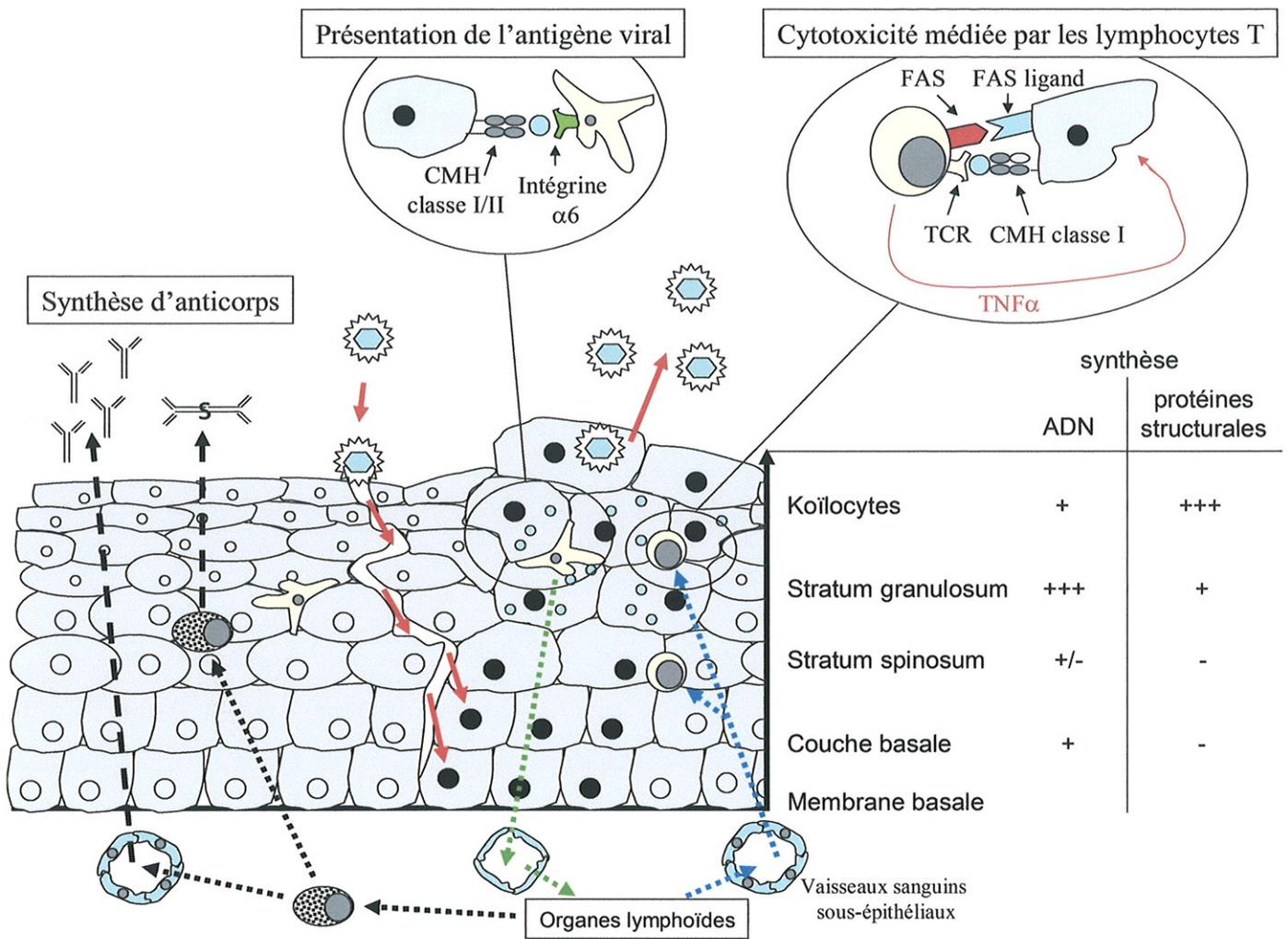
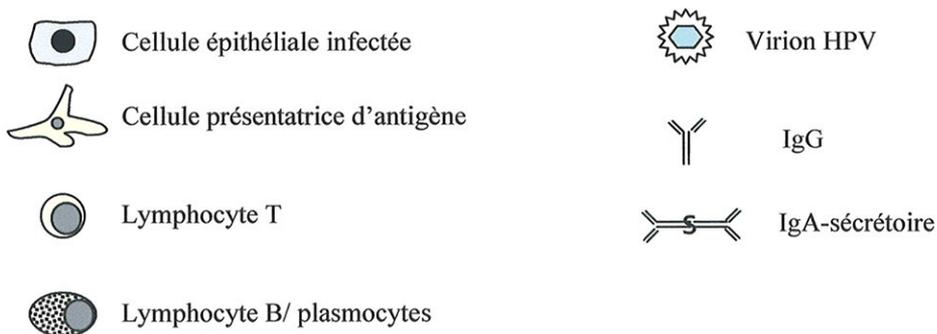


Figure 3. Physiopathologie de l'infection à HPV et réponse immunitaire spécifique de l'hôte



IV. MECANISME D'ONCOGENESE

Le cancer du col se développe principalement au niveau de la zone de transformation située entre l'épithélium glandulaire et l'épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé. De par sa nature, c'est une zone fragile qui va permettre l'entrée du virus. L'histoire naturelle de la carcinogénèse implique l'interaction complexe du virus et de l'hôte pour permettre la transition d'une infection vers un cancer.

1. Mécanismes virologiques

La majorité des infections transitoires étant subcliniques, la progression vers un cancer est liée à la persistance de l'ADN viral et plus précisément à l'intégration du génome viral au sein du génome des cellules de l'hôte (dans les lésions bénignes et de bas grade, l'ADN viral persiste sous forme non intégrée épisomale) (Tableau 3).

L'intégration de l'ADN viral semble pouvoir induire des altérations des proto-oncogènes près desquels elle a lieu. En effet, le gène *c-myc* est surexprimé dans les lignées cellulaires contenant l'ADN d'HPV intégré à sa proximité. De même, les gènes *c-myc* et *N-myc* situés près des séquences virales intégrées dans des cancers génitaux sont réarrangés ou délétés. L'intégration des séquences d'ADN viral a généralement lieu dans des sites chromosomiques fragiles, à proximité de proto-oncogènes ce qui suggère que la longue période de latence entre l'infection par les HPV et le développement d'un cancer pourrait représenter le temps nécessaire au virus pour s'intégrer dans un locus où il pourra interférer avec le fonctionnement d'un gène impliqué dans le développement tumoral.

Sites d'intégration de l'ADN des PVH types 16 et 18.

Sites d'intégration des PVH	Proto-oncogènes ou sites fragiles à proximité	Types de PVH intégrés	Tumeurs ou lignées cellulaires*	Sites d'intégration des PVH	Proto-oncogènes ou sites fragiles à proximité	Types de PVH intégrés	Tumeurs ou lignées cellulaires*
2p24	<i>N-myc</i>	PVH 18	Carcinome du col	9q31-q34	<i>c-abl</i> site fragile	PVH 18	HeLa*
3p21	<i>c-erb A2</i> site fragile	PVH 16	Carcinome du col	12q13	<i>c-int1, c-gli</i> site fragile	PVH 18	SW 756*
3p25-qter	<i>c-rag1</i>	PVH 16	Carcinome du col	12q14-q15	<i>c-int1, c-gli</i> site fragile	PVH 16	SK-v*
5p11-p13**	site fragile	PVH 18	HeLa*	13q14-q32		PVH 16	SiHa*
8q21-q23	<i>c-mos</i> site fragile	PVH 18	C4-I*	20pter-q13	<i>c-src</i>	PVH 16	Carcinome du col
8q24	<i>c-myc</i> site fragile	PVH 18	Carcinome du col HeLa*	22q12-q13**	<i>c-sis</i> site fragile	PVH 18	HeLa*
		PVH 16	Carcinome du col Carcinome du pénis TK-YIK*				

* Les lignées cellulaires HeLa, C4-I, TK-YIK, SW 756 et SiHa sont issues de carcinomes du col utérin, et la lignée SK-v d'une tumeur vulvaire.
** Sites d'intégration localisés sur des chromosomes anomaux.

Tableau 3: Site d'intégration de l'ADN des HPV 16 et 18.

D'après Papillomavirus humains et lésions précancéreuses du col utérin : implication de p53, pRb, cycline D1, PCNA, R-EGF, ras. P. Mathevet, Thèse de doctorat, Lyon, 2002.

La transcription des HPV dépend de facteurs cellulaires ou viraux qui agissent sur la région régulatrice non codante. Elle dépend en particulier de l'état intégré ou épisomal du génome viral. L'intégration d'un certain nombre de copies virales dans le génome de la cellule hôte est responsable d'une rupture du cadre de lecture des gènes viraux. Cette intégration survient habituellement dans la région codant pour le gène *E2*. La rupture de continuité du gène *E2* se traduit par l'absence de répression des promoteurs des gènes *E6* et *E7* ce qui conduit à une hyperexpression de ces deux gènes. Les deux protéines virales *E6* et *E7* sont capables de se lier respectivement aux protéines cellulaires p53 et pRb et d'inactiver ainsi deux protéines essentielles dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (Munger, 1995). En se fixant à la protéine p53, *E6* conduit à son ubiquitination et à sa dégradation rapide. Aussi, toute altération ou inactivation de p53 induit une instabilité chromosomique qui aboutira au développement de cellules malignes par l'accumulation d'aberrations chromosomiques, l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire à la réparation de l'ADN n'étant plus possible. L'apparition de ces cellules malignes est aussi favorisée par le blocage d'une voie apoptotique sous la dépendance de p53. La liaison de *E7* à pRb va entraîner la libération du facteur de transcription E2F qui joue un rôle dans la multiplication cellulaire et dans la synthèse de l'ADN viral (Jones, 1996). De plus, *E7* active la CDK2 p33, protéine contrôlant la progression dans le cycle cellulaire (Tommasino, 1993). En cas d'altération de l'ADN, voire d'instabilité et d'aberration chromosomique, la cellule ne pourra donc plus contrôler son

évolution en s'engageant dans une voie apoptotique pour éviter l'accumulation d'erreurs génétiques.

Mais il est probable que des facteurs cellulaires interviennent aussi dans la régulation de la transcription virale, ces facteurs expliquant la spécificité tissulaire du tropisme des HPV. La région LCR est conservée que l'HPV soit intégré ou épisomal. Elle contient un promoteur (proche de la région codant E6) qui possède des sites de fixation pour E2, et un site activateur spécifique à l'épithélium (qui comprend des sites de fixation pour de multiples facteurs). La LCR contient aussi des éléments de réponse aux estrogènes, à la progestérone et aux glucocorticoïdes. Il apparaît qu'une synergie entre différents facteurs agissant sur la LCR est nécessaire pour obtenir une activité transcriptionnelle pleinement efficace et une expression tissu spécifique. Les capacités des HPV à haut risque d'induire l'immortalisation cellulaire, sont en relation avec les protéines virales E6 et E7. Celles-ci peuvent coopérer pour immortaliser des kératinocytes humains normaux. Cette immortalisation peut aussi être observée sur des cellules cervicales normales, elle est accompagnée par une prolifération cellulaire accrue, et non par l'apparition d'un phénotype malin. En revanche, la maintenance d'un phénotype malin peut être obtenue par l'expression continue de E6 et E7.

Au total, *in vivo*, si E6 et E7 participent à la progression vers l'état dysplasique, l'accumulation d'altérations géniques supplémentaires chez l'hôte est nécessaire pour qu'une cellule infectée échappe à la régulation cellulaire normale et se développe de façon clonale pour former une lésion dysplasique. Du fait de leurs capacités, les produits des gènes *E6* et *E7* des HPV à haut risque sont considérés comme des oncoprotéines. Elles vont en particulier, perturber les points de restriction G1-S et G2-M du cycle cellulaire, aboutissant à une accélération du cycle cellulaire et à l'accumulation d'altérations génétiques. Il semble aussi que E5 puisse intervenir dans le processus de transformation cellulaire car il a été mis en évidence *in vitro*, le fait que E5 peut coopérer avec les récepteurs à EGF pour entraîner en présence d'EGF le développement de large colonies cellulaires.

Dans les rares cas où l'intégration de l'ADN viral n'est pas retrouvée, des mutations peuvent être mises en évidence au niveau de la protéine E2 ou des gènes cellulaires régulant négativement l'expression du génome viral tels que les gènes *YY1*, *Oct-1*, *NFIL-6* codant des facteurs inhibiteurs de transcription (May, 1994).

Un point important concernant l'immortalisation des cellules infectées concerne les télomères. Habituellement, ils deviennent plus courts à chaque division cellulaire et conduisent à la mort de la cellule à partir d'une taille critique. Mais dans le cas du cancer du col, la protéine E6 active une télomérase, qui, conjointement à la survenue d'autres mutations

dans le génome cellulaire, stabilise la longueur des télomères, permettant à la cellule de poursuivre son évolution (Klingelutz, 1996).

Cependant, le rôle des HPV dans la physiopathologie du carcinome du col utérin est encore incomplètement élucidé. L'infection virale via l'expression des protéines E6 et E7 est essentielle mais insuffisante au développement du cancer. Des évènements endogènes (modifications additionnelles du génome des cellules hôtes, réponse immunologique de l'hôte) et exogènes (tabac, traitements hormonaux) sont probablement impliqués.

2. Echappement à la réponse immunitaire

La réponse immunitaire demeure limitée et assez lente à apparaître par comparaison avec d'autres infections virales. Ceci peut s'expliquer par la faible antigénicité du papillomavirus, par le fait que la plupart des protéines non structurales des HPV sont exprimées à des niveaux plus faibles que celles d'autres virus, mais aussi en raison de l'absence de lyse cellulaire ou d'inflammation lors de l'infection. A noter qu'il n'existe pas d'ARN double brin lié au virus capable de déclencher une réponse immune innée (Frazer, 2004). De plus, le virus n'infecte que des cellules épithéliales sans aucune phase virémique, dont l'environnement est plutôt anti-inflammatoire (sécrétion d'IL-10 et de TGF- β).

Il existe différents niveaux d'échappement des HPV à la réponse immune. Le tractus génital de la femme est physiologiquement un mauvais site inducteur de réponses immunes. La glaire cervicale est pratiquement dépourvue d'IgA-S, immunoglobulines habituellement majoritaires au niveau des muqueuses, agissant selon trois modes d'action : exclusion immune, transcytose des complexes immuns et élimination des virus intra-épithéliaux (Bouvet, 1997). Il existe un défaut de présentation et d'activation par absence de cellules M et de nodules lymphoïdes et les kératinocytes, dans lesquels se multiplie le virus, sont de mauvaises cellules présentatrices d'antigène. De plus, on retrouve un défaut de présentation des antigènes au CMH de classe I par diminution de l'expression des protéines TAP et des protéines du CMH de classe I entraînant une faible réponse lymphocytaire cytotoxique. En outre, la synthèse d'IL-10 oriente la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 (immunité humorale) alors qu'une réponse de type Th1 (immunité cellulaire) serait plus propice à l'élimination des virus (Scott, 2001).

Certaines protéines virales ont la capacité de bloquer le système immunitaire de l'hôte. La protéine E6 inhibe les interactions cellules épithéliales - cellules dendritiques, Les protéines

E6 et E7 bloquent la production d'interféron de type 1 et la protéine E5 inhibe le processus de présentation pH-dépendant des peptides antigéniques.

Ainsi, tous ces mécanismes concourent à limiter la réponse immunitaire, et en particulier la cytotoxicité cellulaire. Cet état immunitaire particulier va favoriser la persistance, les récurrences et la progression des infections génitales à HPV. Toutefois, les guérisons spontanées démontrent qu'un processus même imparfait est capable de limiter et de bloquer l'infection virale.

V. HISTOPATHOLOGIE DES LÉSIONS DU COL UTERIN

[Pour revue :(Autillo-Touati, 2003)]

La mise au point par Papanicolaou d'un test de dépistage des anomalies cytologiques du col utérin a constitué une étape essentielle dans la prévention des lésions dysplasiques et du cancer (Papanicolaou, 1960). Ce test est demeuré inchangé pendant plus d'un demi-siècle et ce n'est que ces dernières années que de nouvelles avancées ont été réalisées. Elles intègrent deux points essentiels : l'étiologie virale du cancer du col et la nécessité de disposer d'une classification des lésions standardisées, adaptée à la cytologie, reconnue internationalement, et permettant une meilleure prise en charge des patientes. Le système Bethesda, proposé en 1988 et actualisé en 2001 (Solomon, 2002) satisfait au moins en partie à ces objectifs. Enfin, l'amélioration de la sensibilité et de la spécificité du test passe par l'introduction de techniques innovantes telles que la cytologie en milieu liquide (Monsonogo, 2001), la lecture automatisée des frottis (Howell, 1998) ou encore la détection des HPV (Clavel, 1998).

1. Le système Bethesda

Ce système intègre la notion fondamentale selon laquelle près de 100% des cancers du col sont dus aux HPV, alors que la classification de Papanicolaou range les lésions virales dans les frottis sub-normaux. De plus, il a le mérite de proposer une classification cytologique standardisée basée sur les altérations observées sur les frottis cervicaux. Il recommande de mentionner dans le compte rendu quelle est la qualité du prélèvement afin de rejeter tous ceux qui ne permettent pas de donner une réponse satisfaisante.

Le compte rendu doit comporter un diagnostic descriptif, une conclusion claire, un avis sur la conduite à tenir en cas d'anomalies et une classification du prélèvement (Annexe 1).

2. Altérations cytologiques dues aux HPV

Le système de Bethesda reconnaît deux catégories de lésions malpighiennes intraépithéliales (SIL, *Squamous Intraepithelial Lesion*) : les lésions de bas grade (LSIL, *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) et les lésions de haut grade (HSIL, *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*). Une autre catégorie d'altérations est incluse dans ce système : ce sont les altérations cellulaires pour lesquelles on ne peut parler de SIL et qui sont classées soit en atypies malpighiennes d'origine indéterminée (ASC-US), soit en atypies pour lesquelles on ne peut exclure une lésion de haut grade (ASC-H).

2.1. Lésions de bas grade (LSIL)

2.1.1. Condylomes

Ils témoignent de l'infection virale productive qui se traduit par un effet cytopathogène spécifique, lié à la réplication extrachromosomique complète du génome viral et à la synthèse des protéines de capsid. Les types d'HPV incriminés sont le plus fréquemment les HPV de type 6 et 11.

Le koïlocyte est la cellule pathognomonique de cette lésion (Figure 2). Il s'agit de cellules pavimenteuses différenciées, intermédiaires ou superficielles, caractérisées par la présence d'une vacuole optiquement vide, juxta- ou périnucléaire dont les contours sont irréguliers mais bien définis. Cette cavité, qui témoigne de l'effet cytopathogène du virus, est circonscrite par une zone de cytoplasme densifié où sont refoulés les organites cytoplasmiques. Elle est soulignée par un liseré coloré et irrégulier. Le cytoplasme est éosinophile, basophile ou amphophile. Les rapports nucléocytoplasmiques des koïlocytes sont fortement augmentés.

2.1.2. CIN 1 (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*) ou dysplasies légères

Elles sont caractérisées par des altérations qui touchent les cellules superficielles et intermédiaires de l'épithélium malpighien qui est souvent métaplasique. Les dyscaryoses sont mineures et les rapports nucléocytoplasmiques sont moins augmentés que dans les koïlocytes. Les bi- ou multinucléations sont fréquentes. Ces altérations peuvent s'ajouter à celles du condylome. Bien que ces lésions cellulaires puissent régresser spontanément, elles doivent conduire, selon les recommandations de l'ANAES (2002), à proposer à la patiente une

colposcopie avec éventuellement biopsie dirigée. En effet, elles peuvent ne constituer que la partie visible d'une lésion plus grave.

2.2. Lésions de haut grade (HSIL)

Elles incluent les altérations cellulaires décrites dans les CIN 2 et 3 (respectivement dysplasies modérées et sévères) ou les carcinomes *in situ*. A ce stade, toutes les assises cellulaires sont affectées. Les cellules altérées présentent un défaut de maturation pouvant aller jusqu'à une immaturité totale, les cellules revêtant alors l'aspect et la forme de cellules profondes. Les cellules desquament de façon isolée ou en petits groupes. Les anomalies nucléaires sont très marquées avec un rapport nucléocytoplasmique très augmenté. Les cellules altérées présentent une forte anisocytose et anisonucléose. La présence d'altérations de ce type doit conduire à la réalisation d'une colposcopie avec biopsies dirigées (ANAES, 2002).

2.3. Carcinome malpighien

Les frottis sont caractérisés par la présence de cellules malpighiennes avec dyscaryoses sévères associée à la diathèse tumorale (inflammation, hématies altérées et débris cellulaires nécrotiques). Les cellules dyscaryotiques peuvent être de petite taille (et difficiles à identifier) ou plus grandes avec des signes cytoplasmiques de kératinisation et l'apparition de cellules de formes bizarres. Les anomalies de la chromatine sont encore plus marquées que dans les SIL. Ce diagnostic doit conduire à une intervention thérapeutique d'emblée.

2.4. Atypies d'origine indéterminée : ASC-US et ASC-H

Il s'agit de frottis dont les altérations cellulaires sont trop peu marquées ou trop peu nombreuses pour être rangées dans les lésions de bas grade. On distingue les ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*) pour les atypies de signification indéterminée et les ASC-H (*Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL*) pour les atypies ne permettant pas d'exclure une néoplasie intraépithéliale de haut grade. C'est donc un diagnostic par défaut. Cependant il ne faut pas les négliger car elles peuvent correspondre à une infection par un HPV dans un nombre de cas non négligeable (50% selon l'étude de Autillo-Touati en 1998) ou encore à une lésion de bas grade voire de haut grade (Autillo-Touati, 1998).

Les anomalies cytologiques touchent des cellules de type superficiel ou intermédiaire, qui peuvent présenter un trouble de maturation de type dyskératosique associant une hyperéosinophilie cytoplasmique à une hyperchromie nucléaire. Le rapport nucléocytoplasmique est en général augmenté mais à un degré moindre que dans les lésions de bas grade.

En cas d'ASC-US, trois options sont possibles (ANAES 2002) :

- soit colposcopie d'emblée ;
- soit un frottis de contrôle 6 mois plus tard : si au cours de ce frottis de contrôle les anomalies cytologiques ont disparu, une surveillance régulière est justifiée. Si au cours de cette surveillance des anomalies cytologiques réapparaissent, une colposcopie est impérative, quels que soient leur sévérité et leur délai d'apparition ;
- soit une recherche des HPV hautement oncogènes.

En cas d'ASC-H, une colposcopie est recommandée d'emblée.

VI. EPIDEMIOLOGIE

1. Epidémiologie de l'infection génitale à HPV

L'infection par les HPV génitaux est sexuellement transmissible, touchant principalement les femmes jeunes entre 20 et 30 ans et acquise très précocement lors de la vie sexuelle (40% dans les deux ans qui suivent le premier rapport).

Aux Etats-Unis, 3% des filles ont eu des rapports sexuels avant 13 ans, 18,6% avant 15 ans et 59,2% avant 18 ans (Abma, 2001).

Actuellement, environ 25 à 30 millions de femmes seraient porteuses d'HPV génitaux en Europe. En Angleterre et au Pays de Galles, le pic d'incidence de la première poussée de condylomes génitaux chez les femmes se situe dans la tranche d'âge 16-19 ans (Connor, 1997) (Figure 4).

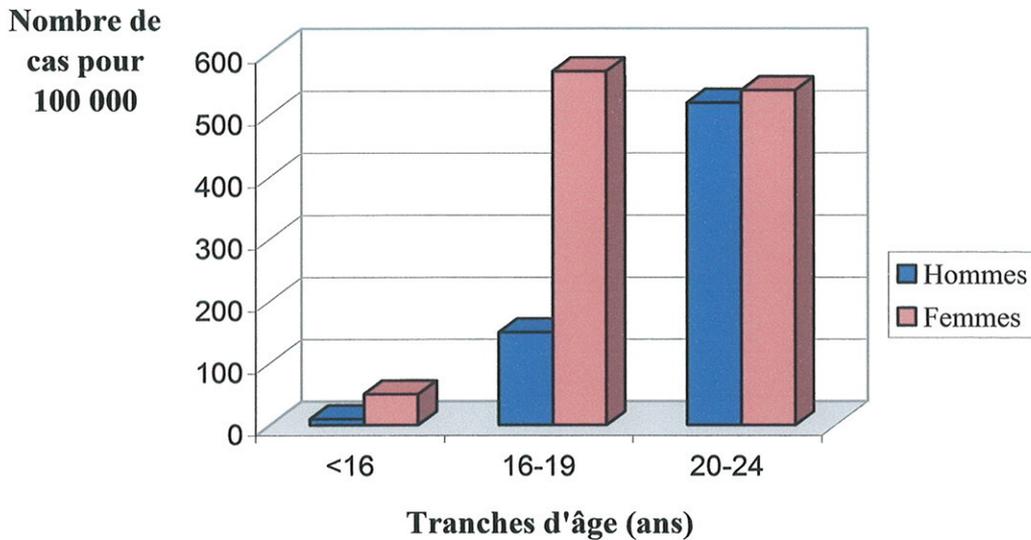


Figure 4 : Incidence de la première poussée de condylomes par tranche d'âge chez les 2 sexes en Angleterre et au Pays de Galle (Connor, 1997)

En France, 18% des filles de 15 ans déclarent avoir des relations sexuelles et l'âge moyen des premiers rapports se situerait à 17 ans (Bozon, 2003). Le risque de contracter une infection à HPV durant une vie entière serait de 80% ; cette infection serait à l'origine de 5% de verrues génitales, 35% de frottis anormaux, 25% de lésions intraépithéliales (tous grades confondus) et de moins de 1% de cancers invasifs (Bosch, 1995). Une étude française portant sur 3832 patientes donne une prévalence globale des HPV de 14,32% dans la population générale tous âges confondus (Boulanger, 2004).

Un certain nombre de facteurs favorisant l'infection à HPV ont été identifiés, parmi ceux-ci on retrouve l'âge de la femme (pic de fréquence entre 25 et 29 ans), l'influence du tabagisme, la précocité des rapports sexuels et la multiplicité des partenaires (Bosch, 2003). Inversement, la présence d'HPV ne semble pas liée au niveau socio-économique selon une étude française (Beby-Defaux, 2003).

Le plus souvent, l'infection guérit spontanément en 1 à 3 ans, mais dans 3 à 10% des cas, elle persiste et évolue entraînant l'apparition de lésions précancéreuses et cancéreuses (Moscicki, 2004). Les facteurs de persistance virale et de progression vers des lésions dysplasiques sont nombreux et encore mal connus. Ils dépendent à la fois de l'hôte et du virus: la clairance virale semble diminuer avec l'âge, avec le tabagisme (Deacon, 2000), en présence d'infections multiples dues à d'autres agents sexuellement transmissibles (*Chlamydia trachomatis*, herpèsvirus et VIH), selon l'intensité des lésions cytologiques observées et en fonction de la

charge virale. L'utilisation de contraceptifs oraux multiplierait par quatre le risque de présenter une infection persistante (Dalstein, 2003) mais son implication est parfois mise en doute d'après les dernières études (Smith, 2003), (Miller, 2004). Concernant la parité, les femmes multipares (cinq grossesses ou plus) présentent un risque plus élevé de développer un cancer du col. Le statut immunitaire de l'hôte (présence d'une immunodépression innée ou acquise) peut également influencer sur l'évolution des lésions. Les facteurs génétiques de l'hôte tels certains groupes HLA semblent jouer un rôle majeur dans la réponse à l'infection à HPV et dans l'évolution de celle-ci, certains haplotypes étant considérés comme protecteurs et d'autres comme associés à la maladie (Hildesheim, 2002).

2. Epidémiologie du cancer du col

Des papillomavirus sont retrouvés selon une étude mondiale dans plus de 99% des cancers du col (Walboomers, 1999). Si ce cancer concerne la totalité des femmes de la planète, on observe une incidence très variable selon les continents et les classes d'âge. L'Institut National de Veille Sanitaire français rapporte l'existence d'un pic d'incidence du cancer du col autour de 40 ans avec une incidence croissante de la mortalité à partir de 30 ans (Exbrayat, 2003) (Figure 5). Ces données confortent les observations de Petry (2001) sur le temps de latence entre l'infection à HPV et le développement du cancer invasif avec un intervalle minimum de 7 ans et un intervalle moyen de 20 à 30 ans (Akoum, 2003).

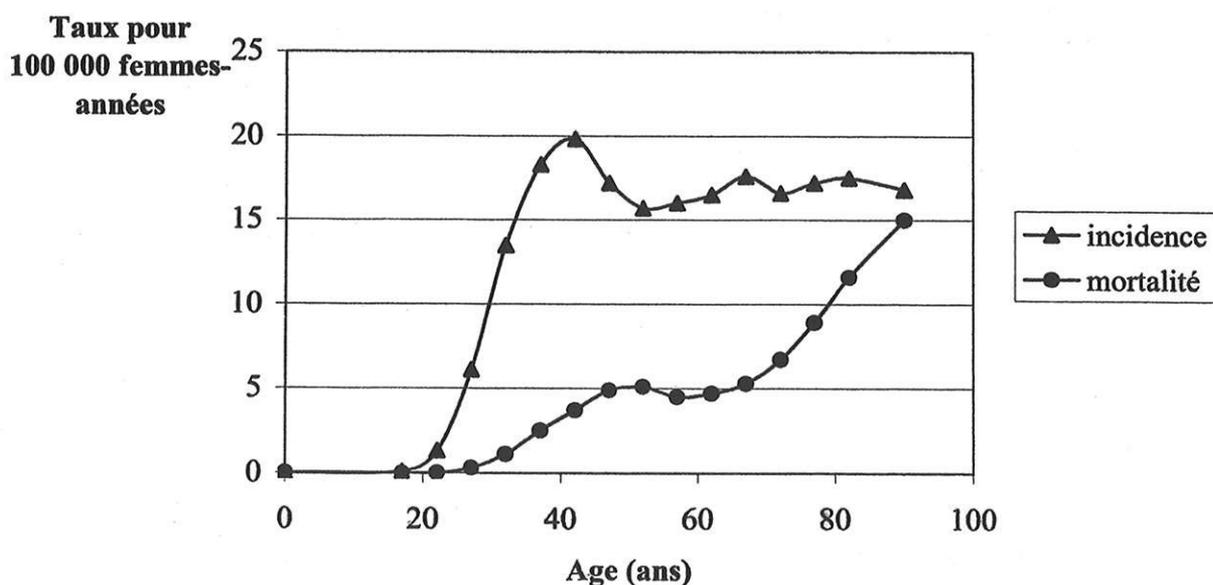


Figure 5 : Incidence et mortalité du cancer du col de l'utérus estimées par âge pour l'année 2000 en France

La conception classique du mécanisme d'oncogénèse repose sur une certaine séquence des évènements : infection par HPV → persistance virale → LSIL → HSIL → cancer (Figure 6).

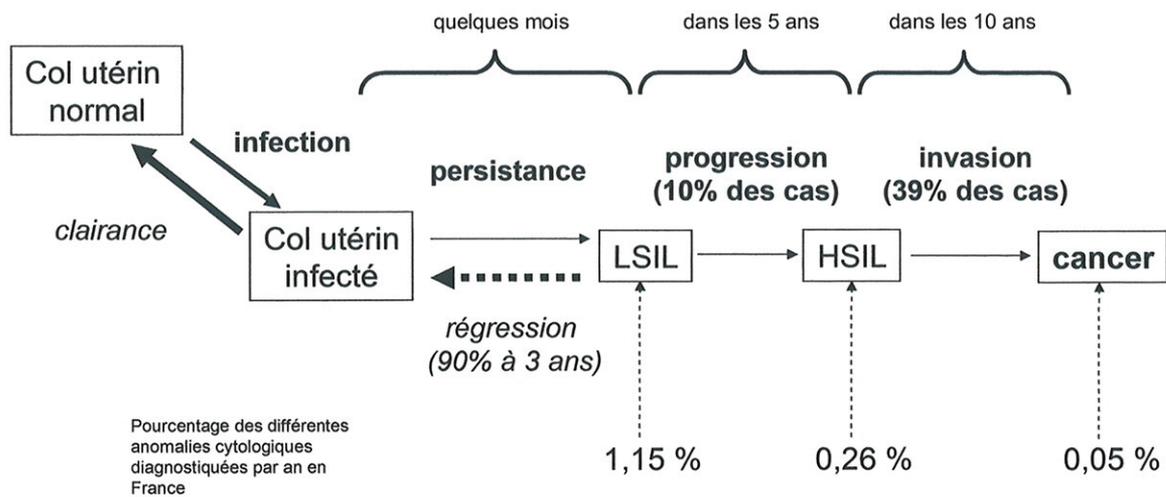


Figure 6 : Fréquence et évolution des lésions du col de l'utérus

Deux génotypes majeurs sont retrouvés dans les cancers du col : HPV 16 dans 50 à 60% des cas et HPV 18 dans 10 à 12% des cas. Ils font partie des génotypes dits à haut risque de développement de cancer. D'autres génotypes moins fréquents également à haut risque peuvent aussi être associés au développement de lésions de haut grade (HPV 45 dans 8% des cas et HPV 31 dans 5% des cas). Cependant, la répartition des génotypes varie selon les zones géographiques (Figure 7).

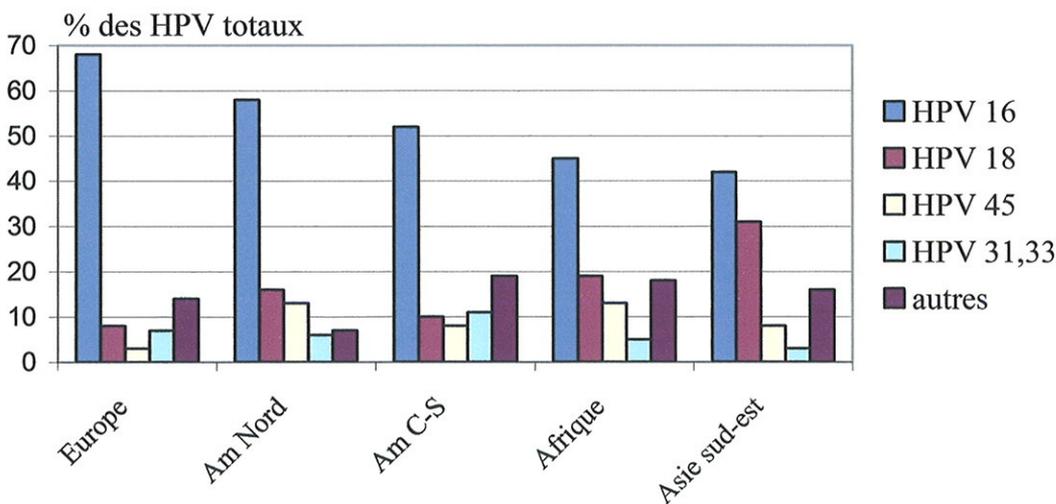


Figure 7 : Répartition mondiale des principaux génotypes à HR (en pourcentage par continent). Am Nord = Amérique du Nord ; Am C-S = Amérique Centrale et du Sud

Les HPV dits à bas risque, sont associés quant à eux à des condylomes et à des néoplasies intraépithéliales de bas grade (LSIL). Les plus fréquents sont les types 6 et 11. Avec 1% de la population française atteinte, soit une prévalence 2 fois supérieure à celle de l'herpès génital, les condylomes acuminés représentent ainsi la plus fréquente des maladies sexuellement transmissibles. Ces lésions surviennent tôt après les premiers rapports sexuels, ce qui explique qu'elles affectent surtout les populations jeunes. Malgré les traitements, les taux de récurrence sont assez élevés, avec un retentissement psychologique important. De surcroît, il n'existe pas de moyen de prévention efficace des condylomes ano-génitaux.

La classification en HPV HR et BR a été revue en 2003 dans une étude épidémiologique réalisée par Munoz et Bosch (Munoz, 2003). Les auteurs classent en haut risque oncogène les HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82 et classent en vraisemblablement à haut risque oncogène les HPV types 26, 53 et 66. Douze génotypes sont classés en bas risque : HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81. Leur classification épidémiologique semble être concordante avec la classification basée sur la phylogénie à l'exception des génotypes 70 et 73 (Tableau 4).

		Classification épidémiologique	
		HR	BR
Classification phylogénétique	HR	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26,* 53,* 66*	70
	BR	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108

Tableau 4 : classification épidémiologique et phylogénétique des différents types d'HPV

*types probablement à HR (d'après Munoz *et al.*, 2003)

Sur le plan économique, le coût du cancer du col de l'utérus est considérable pour la société. En France, le dépistage occasionne 6 000 000 de frottis par an (15€ par frottis) qui détectent 85200 ASCUS pour lesquels sont réalisés des typages viraux à l'aide de tests HPV DNA (48,6 € par test) (ANAES 2004). Sur le plan thérapeutique, le coût du traitement d'un cancer

in situ (CIS) par conisation s'élève à 766€ et celui d'un carcinome micro-invasif par hystérectomie à 2419€. La première année de traitement des cancers à invasion limitée (stade IB et IIA du classement FIGO) a un coût de 9382€ par patient et celle des cancers à invasion étendue (stade IIB, III et IV) un coût de 22153€ (El Mrini, 1997). Ces données intègrent les coûts du traitement à proprement parler ainsi que le coût de la confirmation du diagnostic : temps passé par le personnel, coût des examens complémentaires, des consommables, de l'utilisation du matériel, des dépenses de logistique et de structure.

VII. DETECTION DES HPV ET LESIONS CERVICALES ASSOCIEES

1. Les techniques de frottis cervico-utérins

1.1. Le frottis selon la méthode par étalement

Cette technique conventionnelle (dite de Papanicolaou) est considérée comme la technique de référence. Selon le rapport de l'ANAES (1998), les performances de cette technique ont été évaluées pour les lésions malpighiennes de bas grade et de haut grade. Concernant les LSIL, la sensibilité varie de 32 à 73% avec une spécificité de 40 à 83%, ce qui démontre une grande disparité entre les études. Deux écueils principaux sont à noter : une lecture indépendante n'est pas systématique et un critère de référence n'est présent que dans un nombre limité d'études qui portent souvent sur un petit nombre de cas. Pour les HSIL, la sensibilité varie de 32 à 98% et la spécificité de 57 à 82%. Là encore, on retrouve une variabilité importante qui serait expliquée en partie par des instruments différents pour réaliser les frottis.

1.2. Le frottis en milieu liquide

La technique de recueil en milieu liquide permet une observation avec étalement en couche mince ; on évite ainsi une grande partie des cellules inflammatoires, de la nécrose et des hématies. Cependant, cette technique modifiant les repères visuels habituels nécessite un apprentissage. L'efficacité des méthodes de dépistage et le suivi des lésions a été évaluée dans la revue de Nanda, 12 études utilisant le frottis conventionnel et 3 utilisant le milieu liquide (Nanda, 2000). La sensibilité variait de 30 à 87% lorsque le seuil était LSIL/CIN 1, 44 à 99% lorsque le seuil était HSIL/CIN2/3. La spécificité variait de 93 à 98%. Malgré certains

avantages tels que la réduction du nombre de frottis ininterprétables et l'utilisation d'une partie liquide de recueillement pour effectuer une recherche d' HPV, le consensus n'est pas établi quant à une supériorité par rapport au frottis conventionnel pour identifier les lésions (ANAES 2002).

Plus récemment, le NICE (National Institute for Clinical Excellence) a actualisé l'évaluation précédemment citée en s'appuyant sur 23 études comparatives et 2 méta-analyses, l'une portant sur 14 études et l'autre sur 6. La première a conclu que la sensibilité pouvait être jusqu'à 12% supérieure pour la technique en milieu liquide (type de lésions non précisé) pendant que la seconde n'a pas mis en évidence de différence de spécificité entre les 2 techniques. Il a été alors décidé de recommander la cytologie en milieu liquide pour le dépistage du cancer du col en Angleterre et au pays de Galle.

Les experts de l'ANAES ont validé cette recommandation en précisant que ces milieux liquides devaient être compatibles à la fois pour la cytologie mais également pour la biologie moléculaire à la recherche du génome viral.

2. Diagnostic virologique de l'infection à HPV

Plusieurs techniques sont disponibles pour rechercher la présence d'HPV dans un prélèvement. Toutes sont basées sur la détection d'un fragment de génome d'HPV, certaines déjà disponibles sur le marché sous forme de kit, d'autres nécessitant une approche moins automatisable.

2.1. La technique de capture d'hybrides : Hybrid Capture[®] 2 (HC2, Digene)

Le test ADN HC2 HPV de Digene est un test d'hybridation de l'acide nucléique avec amplification du signal qui utilise une détection par chimiluminescence en format microplaque. Les échantillons contenant la cible ADN recherchée s'hybrident avec un cocktail de sondes ARN spécifiques des types HPV. L'hybride ADN-ARN résultant est capturé à la surface d'un puits sensibilisé avec des anticorps anti-hybride ADN-ARN. Les hybrides immobilisés réagissent ensuite avec des anticorps anti-hybrides ADN-ARN conjugués à la phosphatase alcaline et sont révélés par un substrat chimioluminescent. Chaque anticorps est conjugué à plusieurs molécules de phosphatase alcaline et de multiples anticorps se fixent tout au long de l'hybride ADN-ARN capturé, conduisant à une amplification substantielle du signal. Quand le substrat est clivé par la phosphatase alcaline liée, une

radiation lumineuse est émise qui peut être mesurée en unités RLU (*Relative Light Units*) par un luminomètre. L'intensité de la lumière émise indique la présence ou l'absence d'ADN cible dans l'échantillon. Une intensité RLU égale ou supérieure à la valeur du seuil indique la présence de séquences d'ADN HPV HR dans l'échantillon. Une intensité RLU inférieure à la valeur du seuil indique, soit que la quantité d'ADN présente est inférieure au seuil de détection de la technique, soit l'absence des séquences d'ADN HPV HR spécifiques recherchées (Figure 11 p.59).

Deux tests HC2 se sont succédés sur le marché. Le premier test HC2 peut détecter au moins 18 types d'HPV regroupés en 2 mélanges de sonde :

- un mélange de 13 types potentiellement oncogènes dits à haut risque : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 ;
- un mélange de 5 types non oncogènes dits à bas risque : 6, 11, 42, 43 et 44.

Le second test (test ADN HC2 HPV-haut risque) ne comporte quant à lui que le mélange de sondes spécifiques de génotypes à haut risque.

Le test Hybrid Capture[®] 3 est en cours de développement. Il permettrait une automatisation du test HC2 et serait plus sensible pour détecter les CIN 3.

2.2. La Polymerase Chain Reaction ou PCR

2.2.1. Principe

La technique de PCR (ou amplification en chaîne par la polymérase) permet d'amplifier une séquence d'ADN spécifique délimitée par 2 amorces. L'amplification est réalisée par des cycles successifs automatisés comportant 3 étapes : dénaturation, hybridation et élongation. La répétition des cycles permet l'amplification exponentielle de la séquence d'ADN choisie. La révélation du produit amplifié se fait par migration électrophorétique sur gel et visualisation de la bande de poids moléculaire attendu.

C'est une technique d'une grande sensibilité et sa spécificité dépend du choix des amorces et de l'absence de contamination. Les amorces les plus utilisées sont des amorces consensus MY09/MY11 ou GP5+/GP6+, complémentaires de régions très conservées des génomes viraux (gène *L1* codant la protéine majeure de capside) qui permettent d'amplifier un grand nombre de génotypes.

Le diagnostic de génotype peut être réalisé par différentes approches :

- séquençage direct des produits d'amplification ;

- analyse du polymorphisme de taille des fragments obtenus après coupure des amplicons par un mélange d'enzymes de restriction ;
- hybridation des amplicons avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de la majorité des génotypes génitaux connus. Une approche récente comporte l'hybridation des amplicons avec des sondes oligonucéotidiques spécifiques déposées en parallèle sur une bande de Nylon et la détection des hybrides par une méthode immuno-enzymatique (*Line Dot Blot Assay*). Ces techniques permettent la mise en évidence d'infections multiples.

2.2.2. PCR in situ

L'amplification est réalisée sur des coupes histologiques déparaffinées et prétraitées enzymatiquement. La révélation se fait par une hybridation avec des sondes spécifiques d'HPV. Cette technique est souvent délicate, difficile dans sa réalisation et sa reproductibilité.

2.2.3. PCR quantitative en temps réel

Cette technique est en plein essor et vise à quantifier la charge virale, qui pourrait servir de marqueur d'évolution ou de régression d'une lésion. Elle est basée sur la mesure d'un signal fluorescent à chaque cycle d'amplification, proportionnel à la quantité d'ADN cible présent dans le milieu réactionnel (utilisation de sondes fluorogéniques ciblant la région encadrée par les amorces). Elle quantifie l'ADN viral et cellulaire extraits d'un prélèvement et normalise les résultats (nombre de copies de génome d'HPV par μg d'ADN cellulaire ou par cellule). Cette technique présente de nombreux avantages : elle est plus rapide que la PCR conventionnelle, les probabilités de contaminations sont plus faibles et la reproductibilité est importante grâce à l'analyse simultanée des standards et de la cible.

2.3. Southern Blot

Cette technique consiste à digérer l'ADN extrait par des enzymes de restriction. Les différents fragments sont séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose, puis transférés sur filtre de nitrocellulose ou de nylon. Une hybridation est ensuite réalisée avec des sondes spécifiques.

Elle a longtemps été la méthode de référence pour la détection et l'identification des HPV. C'est la technique la plus sensible et la plus fiable mais elle présente des inconvénients majeurs : elle nécessite des quantités relativement importante d'ADN viral, sa mise en œuvre

est complexe et sa réalisation est longue. Elle n'est donc pas adaptée à un diagnostic virologique de routine.

2.4. Hybridation in situ

Cette technique ne nécessite pas d'extraction d'ADN préalable. L'hybridation est réalisée avec des sondes spécifiques directement sur coupe histologique, frottis ou cellules déposées sur lame par cyto centrifugation et permet de détecter l'accumulation d'ADN viral au sein des cellules infectées. Elle est de réalisation aisée et permet de localiser la situation de l'ADN viral, épisomal ou intégré, selon l'aspect de la ponctuation au microscope : aspect homogène diffus évoquant une forme épisomale et aspect ponctué évoquant une intégration. Cependant elle manque de sensibilité et le bruit de fond peut être assez important, ce dernier devenant même très perturbant si l'on tente d'augmenter la sensibilité en amplifiant le signal de détection. Cette technique présente donc un taux de faux-négatifs élevé. De plus, le nombre de sondes disponibles est limité. Au total, cette technique, présentant des difficultés d'interprétation des résultats, n'est pas utilisable pour un dépistage primaire.

3. Stratégie diagnostique actuelle

3.1. Place du frottis cervico-utérin

Le frottis cervico-utérin demeure à ce jour l'examen de première intention réalisé pour le dépistage du cancer du col et des lésions précancéreuses. Chaque année en France sont réalisés environ 6 millions de frottis dans le cadre du dépistage individuel du cancer du col. Compte tenu de l'épidémiologie de l'infection à HPV et du cancer du col, les recommandations actuelles conseillent de répéter cet examen tous les 3 ans après 2 frottis annuels normaux chez les femmes de 25 à 64 ans (ANAES 2002). Malheureusement, la couverture de la population est estimée aux environs de 55%, ce qui est encore largement insuffisant (Exbrayat, 2003).

Depuis 2001, les résultats des frottis cervico-utérins doivent être exprimés selon le système de Bethesda 2001 quelque soit la technique utilisée.

3.2. Intérêt du typage

La place du typage viral est actuellement très discutée dans la communauté scientifique. Il existe 4 situations où il pourrait être utilisé :

- appréciation de l'évolution d'une néoplasie cervicale prouvée par cyto-colpo-histologie ;
- triage des frottis anormaux pour décider de leur prise en charge ;
- suivi post-thérapeutique
- dépistage primaire

Concernant l'appréciation de l'évolution d'une lésion, il est certain que la persistance de l'infection à HPV constitue un facteur de risque de voir progresser une lésion. Le risque est quasi nul si le portage est transitoire, alors qu'il est de 7% en cas de persistance du virus (Ho, 1995). Globalement, tous les auteurs s'accordent à dire que la persistance du virus notamment combinée à une charge virale élevée constitue un élément prédictif d'une lésion sous-jacente à venir. De plus, le typage viral est un facteur pronostique de l'évolution puisqu'il a été montré que seules les lésions induites par les HPV dont le génotype est considéré comme à haut risque oncogène peuvent évoluer vers un carcinome alors que les lésions induites par les HPV dits à bas risque n'évoluent pas de façon péjorative. La fréquence des HPV à haut risque étant d'autant plus proche de 100% que le grade de la lésion est élevé, le typage prend tout son intérêt devant des anomalies indéterminées sur le frottis ou dans les lésions de bas grade. Dans cette indication, c'est la valeur prédictive négative du test qui semble prédominer.

L'intérêt du typage dans le contexte des frottis anormaux varie là aussi en fonction du résultat de la cytologie. Lorsqu'il s'agit de lésions de bas ou de haut grade au frottis, le typage viral ne présente qu'un intérêt limité sachant d'une part que la fréquence de l'infection à HPV est très élevée dans ce type de lésions et d'autre part que la stratégie de prise en charge sera sensiblement identique avec la réalisation d'une colposcopie et de biopsies dirigées. Par contre, le typage va prendre tout son intérêt dans l'orientation diagnostique face à une lésion de type ASC-US pour laquelle on retrouve d'après la littérature 80% de cols normaux et une fréquence de l'infection à HPV à risque de 30%. Une étude de Solomon portant sur 3000 femmes avec un diagnostic d'ASC-US sur frottis a montré une meilleure sensibilité du test HPV par rapport à des cytologies répétées, conduisant au même nombre de colposcopie, quelque soit la stratégie diagnostique envisagée (Solomon, 2001).

Concernant le suivi post-thérapeutique, l'intérêt du typage HPV prend toute son importance dans une situation très précise : le suivi des patientes qui, en raison de leur jeune âge et souhaitant encore pouvoir procréer, ont subi une technique d'électrorésection pour néoplasie intra-épithéliale à la place d'une conisation chirurgicale. Le problème de cette technique est la possibilité de résection non « *in sano* » ou à la limite de la lésion dont la fréquence est non négligeable : entre 7,8 et 31,8%. Dans les suites de ce type d'intervention, l'ANAES préconise de réaliser un suivi cytologique et colposcopique à 3 et 9 mois, puis une cytologie annuelle. Cependant l'étude de Paraskevaidis a mis en évidence 93% d'HPV positif lorsqu'il y avait une lésion résiduelle, alors que le frottis n'était anormal que dans 48% des cas (Paraskevaidis, 2001). Ces données confortent l'intérêt de ce test dans le suivi des résections non « *in sano* ».

Concernant le dépistage primaire, l'OMS en a donné une définition : « Le dépistage consiste à identifier à l'aide de tests, d'exams ou d'autres techniques d'une application rapide les sujets atteints d'une maladie ou anomalie jusque là passées inaperçues. » L'utilisation du test HPV en première intention pour le dépistage du cancer du col pourrait permettre :

- d'augmenter la sensibilité du dépistage par frottis et diminuer le nombre de faux-négatifs (avec le risque d'augmenter le nombre de faux-positifs). La sensibilité du test HPV est en moyenne de 86% et la spécificité moyenne de 85% contre respectivement 62 et 96% pour la cytologie. Ces données varient selon les études en fonction de la technique de dépistage utilisée (capture d'hybrides ou PCR) et présentent de nombreux biais parmi lesquels des biais de populations, de techniques, ou de standard diagnostique.
- d'élargir l'intervalle entre 2 tests de dépistage en associant le frottis à la recherche du génome viral.

Mais dans l'immédiat, le rapport d'experts de l'ANAES en 2004 démontre que le remplacement du frottis par le test HPV n'est pas justifié. L'opportunité d'utiliser ce test dans le cadre du dépistage devrait être comparée à une stratégie d'optimisation du dépistage actuel dans l'optique d'une meilleure couverture. De nombreuses études (essais randomisés et études de cohorte, réalisation d'un modèle coût-efficacité) sont en cours afin d'étudier le bénéfice médical et économique de cette stratégie.

3.3. Arbres décisionnels (ANAES 2002)

3.3.1. Conduite à tenir en cas de frottis avec atypies des cellules malpighiennes

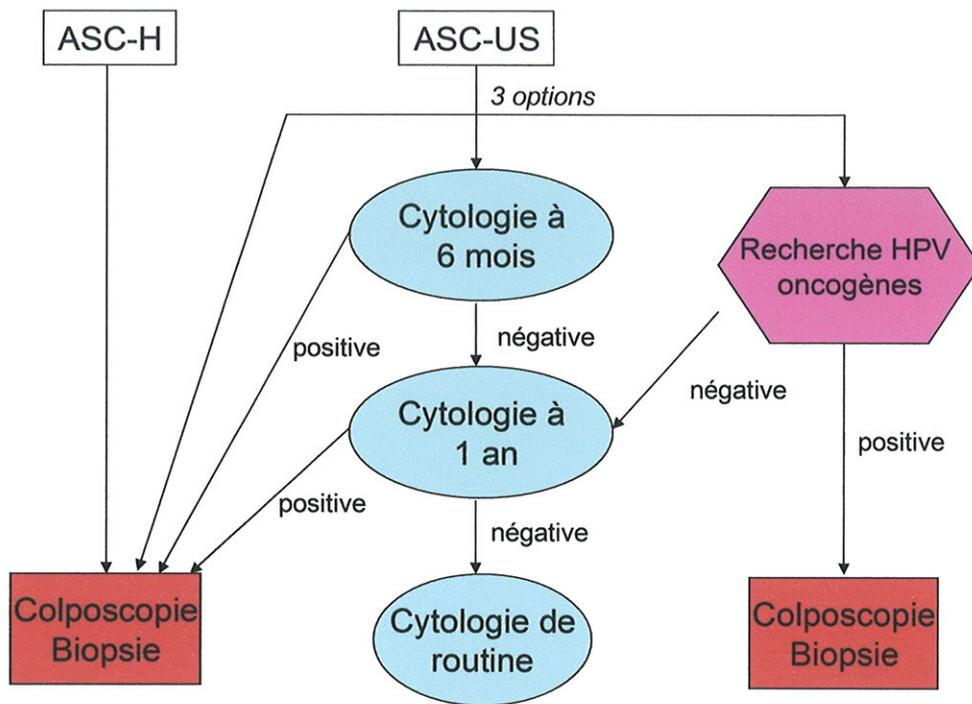


Figure 8 : Arbre décisionnel de prise en charge des atypies des cellules malpighiennes (ASC).

3.3.2. Conduite à tenir en cas de frottis avec lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade (ANAES 2002)

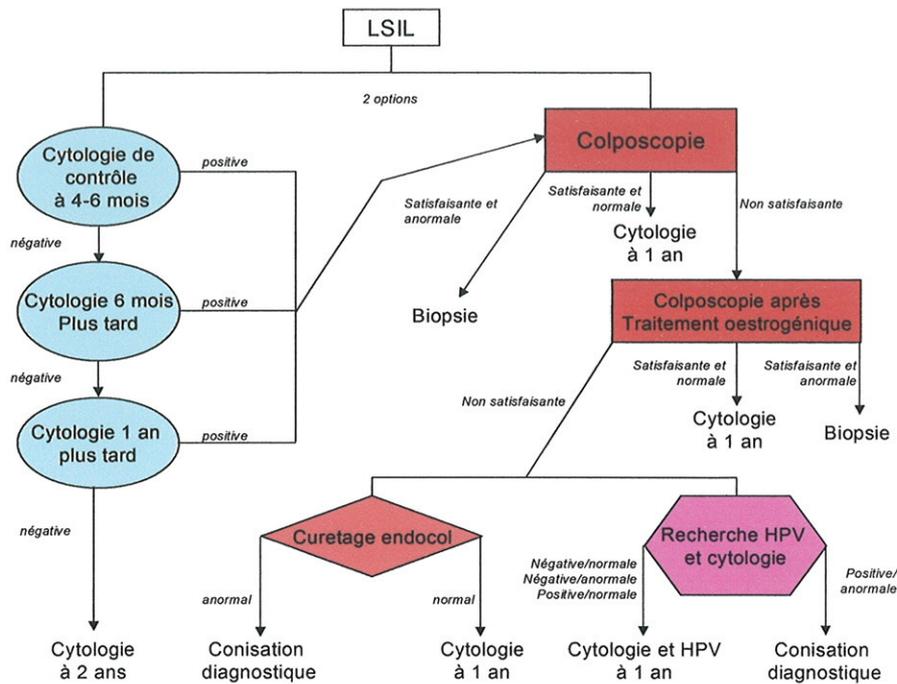


Figure 9 : Arbre décisionnel de prise en charge des lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade (LSIL).

3.3.3. Conduite à tenir en cas de frottis avec lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (ANAES 2002)

- Colposcopie d'emblée (2^e frottis inutile et dangereux) pour repérer les lésions et orienter les prélèvements qui doivent être de bonne qualité. Si l'intégralité des lésions cervicales, notamment vers le canal endocervical, n'est pas observée, la colposcopie n'est pas satisfaisante : exérèse à visée diagnostique.
- Puis 1^{er} contrôle à 3-6 mois : colposcopie et frottis utérin avec biopsies dirigées et/ou curetage endocervical selon l'aspect colposcopique et la situation de la jonction squamocylindrique.
- Si les examens sont normaux : répéter à 6 mois-1 an, puis cytologie annuelle.
- Si les examens sont anormaux : traiter les lésions résiduelles selon leur sévérité et leur situation.

VIII. PRINCIPES THERAPEUTIQUES

[Pour revue : (Douvier, 2004)]

1. Traitements locaux

Ils sont réservés à des lésions de type condylomes

1.1. 5-fluoro-uracile

Ce composé est un antimétabolite , utilisé principalement en complément d'un traitement chirurgical afin de diminuer le nombre de récurrence. Employé seul, son efficacité n'est que de 50% sur les lésions muqueuses. De plus, il est souvent responsable d'irritation ou de sensation de brûlure nécessitant une protection des tissus de voisinage par une pâte d'oxyde de zinc.

1.2. Acide trichloroacétique

Il est utilisé pour son action kératolytique à des concentrations de 50 à 85% application locale répétée 2 ou 3 fois par semaine pendant 3 semaines. C'est le seul traitement utilisable chez la femme enceinte.

1.3. Interféron

Puissant modulateur de l'immunité, il est utilisé dans les lésions limitées, résistantes aux autres thérapeutiques sous forme de gel ou d'injection locale. Son efficacité reste contradictoire d'après les données de la littérature.

1.4. Imiquimod (Aldara[®])

Cette molécule n'est ni un antiviral ni un produit cytolytique mais va agir comme un modulateur de l'immunité, son mode d'action étant encore incomplètement élucidé. Elle stimule fortement la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont activer la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Commercialisée sous forme de crème, elle s'applique en couche mince sur les lésions à raison de 3 fois par semaine pendant un maximum de 16 semaines. Son indication actuelle, donnée lors de son autorisation de mise sur le marché, est le traitement des lésions cutanées à HPV avec un taux d'efficacité variant de 50 à 65% et un taux de récurrence le plus faible parmi les traitements topiques (13% de récurrences à 3 mois).

Actuellement, cette molécule n'a pas d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des lésions muqueuses. L'efficacité dans cette indication est en cours d'évaluation.

2. Traitements médicochirurgicaux

2.1. Méthodes destructrices

Ces méthodes ont pour inconvénient majeur l'absence de contrôle histologique de la zone détruite. Elles peuvent être utilisées pour des lésions exocervicales de petites tailles parfaitement visibles en colposcopie. Les dysplasies modérées voire sévères peuvent bénéficier de ces traitements destructeurs si leur surface ne dépasse pas 2 cm², si les limites sont bien visualisées, si la jonction épithélioglandulaire est bien visible et si les patientes sont observantes, accessibles à un suivi rigoureux. De plus, ces techniques sont pourvoyeuses de peu de complications et sont très confortables pour les patientes.

2.1.1. La cryothérapie

Elle est réalisée le plus souvent à l'azote liquide et consiste en des applications répétées de froid par contact direct avec le produit ou par l'intermédiaire d'une nébulisation ou d'une cryode. Les taux de guérison semblent supérieurs à ceux du traitement médical. La technique de cryochirurgie, plus spécifique des lésions du col utérin, permet une cryonécrose bien limitée, reproductible et contrôlée de la lésion.

2.1.2. L'électrocoagulation

La coagulation par des générateurs haute fréquence réalise une fulguration des lésions. Le taux de guérison est d'environ 95% avec toutefois un taux de récurrence d'environ 30%.

2.1.3. La vaporisation au laser CO₂

Cette technique donne de très bons résultats, tant du point de vue de la cicatrisation que de celui de l'efficacité avec une diminution du taux de progression des lésions de 25 à 4%.

2.2. Méthodes de résection

L'exérèse chirurgicale est réalisée au bistouri froid, au laser ou à l'anse diathermique et permet l'ablation des lésions sous le contrôle de la vue ou du colposcope. La conisation

permet l'exérèse de la zone dysplasique qui sera analysée sur le plan histologique. On réserve ces techniques aux néoplasies intraépithéliales de haut grade. Ces techniques sont équivalentes en terme d'efficacité

Les complications, peu fréquentes dans l'ensemble, sont représentées par les hémorragies (4% des cas environ), les sténoses cervicales (généralement modérées) et les complications obstétricales liées à la présence d'un col court (accouchement prématuré) et cicatriciel (dystocie cervicale).

L'hystérectomie est réservée à des patientes de plus de 40 ans, ne désirant plus de grossesse, et ayant une pathologie utérine associée.

IX. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES : APPROCHE VACCINALE

1. Vaccins prophylactiques

Jusqu'à ce jour, seul le vaccin contre l'hépatite B avait démontré sa capacité à prévenir un processus cancéreux en l'occurrence l'hépatocarcinome (Chang, 1997). Le fait que les HPV représentent un facteur essentiel dans la genèse de plus de 99% des cancers du col permet d'envisager la prévention de ce cancer grâce à une vaccination. L'un des facteurs limitants réside dans le fait, d'une part qu'il existe plusieurs types oncogènes et d'autres parts que les anticorps neutralisants développés après une infection naturelle à HPV sont spécifiques de type. Heureusement près de 80% des cancers du col sont induits par quatre types d'HPV dits à haut risque (types 16, 18, 31, 45) et à lui seul l'HPV 16 serait à l'origine de 50% des tumeurs (Lorincz, 1992). Ainsi, un vaccin bivalent 16-18 a un taux de couverture théorique de 60 à 70% et un vaccin tétravalent dirigé contre les quatre types d'HPV cités un taux de couverture théorique de 80% des HPV impliqués dans les cancers du col. Ces taux théoriques sont bien sur à nuancer en fonction de l'efficacité réelle des deux types de vaccins et de l'incidence de ces types dans la zone géographique considérée.

1.1. Principe

La vaccination prophylactique a pour but d'induire la synthèse d'anticorps neutralisants dirigés essentiellement contre la protéine de capsid L1 (voire L2) de l'HPV (Schiller, 2004). Ces anticorps doivent, pour agir, être présents au niveau de la muqueuse et des sécrétions du

col utérin avant la première exposition au virus. Jusqu'à ce jour, les vaccins antiviraux classiques actuellement développés utilisent des virus vivants atténués ou inactivés, voire des antigènes purifiés. Dans le cas d'un vaccin contre l'HPV, cette stratégie ne peut pas être envisagée pour deux raisons : les cultures d'HPV sont très difficiles à réaliser et le génome viral contient des oncogènes (E6 et E7). Le risque d'une carcinogénèse induite par une vaccination ne saurait être pris alors que l'objectif est précisément de protéger contre un processus cancéreux. La principale approche choisie pour le développement d'un vaccin préventif repose sur l'utilisation de pseudo-particules virales ou VLP L1 (*Virus-Like-Particles*). Cette approche a été envisagée à la suite de la découverte de la propriété que possède la protéine L1 des HPV de s'auto-assembler en pseudo-particules virales lorsqu'elle est produite en grande quantité (Hagensee, 1993). De plus ces VLP L1 possèdent une morphologie quasi identique à celle des virions et sont capables d'induire la production de hauts titres d'anticorps neutralisants contre des épitopes conformationnels du virus (Rose, 1998). Les VLP L1 sont non infectieuses ; elles sont produites à partir du gène L1 introduits dans différents systèmes eucaryotes, levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ou cellules d'insectes (*Spodoptera frugiperda* Sf-9 et *Trichoplusia ni* Hi-5) infectées par des baculovirus pour leur faire exprimer la protéine de capside. Le gène cloné dans le génome de ces vecteurs est exempt de séquences oncogènes d'HPV. Pour les premiers essais cliniques, le choix de la VLP L1 s'est donc imposé.

1.2. Premiers essais chez l'animal

Les papillomavirus étant des virus spécifiques d'espèce, il n'existe pas de modèle animal d'infection par le papillomavirus humain. Des infections expérimentales par des papillomavirus animaux ont apporté la preuve qu'il est possible d'induire une immunité protectrice par vaccination à l'aide de VLP L1 par voie parentérale (Breitburd, 1995). De plus, le transfert passif d'IgG d'animaux immunisés par des VLP L1 à des animaux naïfs a montré que l'induction d'anticorps neutralisants était nécessaire et suffisante pour assurer une protection efficace (Suzich, 1995). Mais, les papillomavirus animaux constituent des modèles imparfaits qui ne sont pas transposables à la prévention d'infections génitales humaines à HPV à l'aide de VLP L1. L'immunité naturelle anti-HPV reposant essentiellement sur la présence d'IgG provenant majoritairement du sérum par transsudation, le choix de la vaccination parentérale s'est donc imposé et a été testé avec succès chez l'animal après injection de VLP L1 d'HPV16. Quant à la vaccination par voie orale (Rose, 1999) ou nasale

(Balmelli, 1998), elle requiert des doses très importantes de VLP L1 et nécessite l'adjonction d'adjuvants (Dupuy, 1999). Les VLP L1 semblent donc antigéniquement stables au niveau du tractus gastrointestinal et de ce fait, on ne peut exclure dans l'avenir une administration per os compatible avec une vaccination de masse et une logistique simplifiée, plus adaptée aux pays en voie de développement (Roden, 2004).

1.3. Essais vaccinaux chez l'homme par voie parentérale : des résultats prometteurs

Des essais cliniques de phase I/II ont été entrepris chez des sujets sains volontaires pour étudier la réponse immunitaire induite par les VLP L1 chez l'homme. Ils ont reçu soit un vaccin VLP L1 HPV 11 (Evans, 2001) soit un vaccin VLP L1 HPV 16 (Harro, 2001) par voie intramusculaire, à différents dosages et en présence ou non d'adjuvant. Ces essais ont permis de vérifier l'immunogénicité et la tolérance de ces vaccins. Récemment, l'équipe de L. Koutsky a publié les résultats d'un essai clinique en double aveugle du vaccin VLP L1 HPV 16 (Koutsky, 2002). Dans cette étude, 2392 jeunes femmes ont été sélectionnées par randomisation pour recevoir soit un placebo, soit 3 doses de 40µg de vaccin VLP L1 HPV 16 selon un schéma d'administration : 0, 2 et 6 mois. Sur un suivi moyen de 17,4 mois après la vaccination, une infection persistante à HPV 16 est survenue chaque année chez 3,8% de femmes dans le groupe placebo contre 0% dans le groupe vacciné. De plus, dans le groupe placebo, on a noté neuf cas de CIN (néoplasie intra-cervicale) liés à la présence d'HPV 16. Cette étude a permis de vérifier que la vaccination permettait d'obtenir une réduction significative de l'incidence des infections et des CIN liées à HPV 16. Quant au vaccin VLP L1 HPV 11, des anticorps neutralisants dirigés contre HPV 11 ont été détectés dans le sérum des patientes vaccinées (Brown, 2001). Des travaux récents sur les vaccins VLP L1 HPV 16 (Fife, 2004) et VLP L1 HPV 18 (Ault, 2004) ont étudié l'immunogénicité et la tolérance vis-à-vis de différentes doses de vaccins : les deux vaccins semblent bien tolérés avec seulement quelques réactions locales au site d'injection et sont très immunogènes dès les plus faibles doses de vaccins (10 µg par dose). De larges essais initiés par le NIH (National Institute of Health, Bethesda, USA) et les laboratoires Merck et GlaxoSmithKline (GSK) sont en cours afin de vérifier l'efficacité des vaccins VLP L1, la possibilité de développer conjointement des réponses dirigées contre différents génotypes en utilisant des vaccins VLP L1 multivalents et enfin d'estimer la durée de la protection à long terme ainsi que la réduction de l'incidence du cancer du col. Les HPV de génotype 16 et 18 étant impliqués à eux seuls dans 60 à 72% des cancers du col, il a semblé indispensable d'inclure ces deux génotypes dans les

différents vaccins mis au point. Cependant, les laboratoires ont choisis deux approches différentes : le laboratoire GSK teste un vaccin VLP L1 bivalent (types 16 et 18) ciblant la protection contre le seul cancer du col, tandis que le laboratoire Merck/APMSD a choisi une approche utilisant un vaccin VLP L1 quadrivalent (types 6, 11, 16 et 18) avec le double objectif de prévenir le cancer du col (HPV types 16 et 18) et les condylomes (les HPV type 6 et 11 seraient impliqués dans environ 90% des condylomes). Ces vaccins contiennent 20 à 40 µg d'antigène VLP L1 de chaque type et un adjuvant (hydroxyde d'aluminium seul ou avec du MPL [3-deacylated monophosphoryl lipid]). Le vaccin quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) VLP L1 (Merck/APMSD) (Villa, 2002) de même que le vaccin bivalent (types 16, 18) VLP L1 (GSK) (Harper, 2004), actuellement en cours d'essais cliniques, ont montré être généralement bien tolérés et hautement immunogènes. Le vaccin VLP L1 HPV16 (Merck) (Mao, 2004) et le vaccin bivalent VLP L1 HPV16/18 (GSK) (Harper, 2004) montrent une efficacité respectivement de 94% et 91,6% en terme de protection contre l'infection à HPV16 ou HPV16/18 et une efficacité de 100% en terme de prévention des lésions dysplasiques de haut grade liées à HPV16 ou HPV16/18 sur un suivi respectivement de 42 et 27 mois. Par ailleurs, les travaux de Pinto *et al.* ont exploré le développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (prolifération de lymphocytes T CD4+ et CD8+) chez des patientes vaccinées par le vaccin VLP L1 HPV 16 et confirmé l'existence d'une telle réponse chez 40 à 55% des femmes (Pinto, 2003). Cependant, il reste à savoir si cette réponse cellulaire est dirigée contre les cellules infectées par HPV 16 et quelle est la persistance de cette immunité.

1.4. Stratégies vaccinales

Les vaccins anti-papillomavirus représentent un énorme espoir en terme de santé publique car ils sont susceptibles de prévenir efficacement le 2^{ème} cancer de la femme et de réduire à la fois les coûts humains et de santé. Les premiers essais cliniques montrent l'efficacité de l'approche VLP L1 et la nécessité d'inclure dans un vaccin les différents génotypes à haut risque les plus fréquemment retrouvés (notamment les HPV 16 et 18) sachant qu'il n'existe pas d'immunité croisée entre les différents génotypes.

1.4.1. Populations cibles

La transmission des papillomavirus étant essentiellement sexuelle, la vaccination doit donc intervenir avant l'âge des premiers rapports sexuels, c'est-à-dire vers 10-12 ans. Mais la vaccination d'enfants contre cette maladie sexuellement transmissible requiert l'autorisation

parentérale. L'acceptation d'une telle vaccination par les parents n'est pas sans retentissement psychologique. Ainsi, pour être réellement efficace et ne pas créer de stigmates sociaux, un programme d'éducation adapté est nécessaire. L'homme étant lui aussi porteur et vecteur d'HPV (Schiffman, 2003), le plus souvent de façon asymptomatique, il pourrait paraître judicieux de l'inclure dans un programme de vaccination. Cette vaccination des adolescents contre les HPV aurait également l'avantage de les responsabiliser en terme de prévention des infections sexuellement transmissibles. Une approche statistique a estimé qu'avec un taux de couverture de 90%, une efficacité vaccinale de 75% et une immunité persistante sur 10 ans, la vaccination des 2 sexes réduirait la prévalence d'un génotype donné de 45% contre 30% en cas de vaccination des femmes seules (Hughes, 2002). Cependant, aucune donnée actuelle ne nous permet d'affirmer que l'homme va développer une réponse immunitaire contre le HPV et si cette réponse le protégera contre une infection à HPV. De plus, une approche coût-efficacité a montré en terme de QALY (quality-adjusted life year) un surcoût considérable et déraisonnable de la vaccination des 2 sexes (Taira, 2004). Quant aux sujets immunodéprimés, particulièrement exposés au développement de cancer (Hawes, 2003), leur vaccination pourrait être intéressante, mais on manque de données permettant d'évaluer la réponse post-vaccinale dans ces populations par rapport à celle retrouvée chez les sujets sains.

1.4.2. Réponse immunitaire et schéma vaccinal

L'efficacité du vaccin VLP L1 est essentiellement jugée sur la présence d'anticorps neutralisants circulants et le niveau de protection conféré est corrélé au titre des anticorps spécifiques dans le sérum. L'équipe de Nardelli-Haefliger a montré que la vaccination avec un vaccin VLP L1 était également à l'origine d'une réponse humorale au niveau des sécrétions cervicales ce qui confirme l'importance du titre des anticorps sériques pour assurer la protection de la muqueuse génitale, sachant que la majorité des IgG présentes au niveau de la muqueuse génitale provient du plasma par transsudation (Nardelli-Haefliger, 2003). Les essais cliniques récents rapportent des titres élevés d'anticorps induits par la vaccination avec une décroissance relativement rapide ce qui laisserait présager une longue durée d'action de ces vaccins mais malgré tout limitée dans le temps. Une durée de protection supérieure à 4 ans semble déjà acquise. Mais l'immunité à médiation cellulaire et les cellules mémoires sont susceptibles de jouer un rôle dans la protection au long cours même en l'absence d'anticorps sériques décelables comme cela a été clairement démontré pour les vaccins contre les virus des hépatites A et B. Toutefois, en l'absence de données, on doit être prudent. Du fait que la réponse immune naturelle aux HPV est lente à apparaître et qu'elle est de faible intensité,

différents auteurs considèrent que l'exposition à un HPV après vaccination aurait peu de chance d'être suivie d'une réactivation de la réponse immune comme cela peut être le cas pour de nombreux autres virus (Lowy, 2003). La nécessité d'un rappel vaccinal est donc à envisager, mais un suivi dans le temps des cohortes vaccinées apportera peut-être une réponse concernant la durée de protection conférée et permettra de préciser les éventuels rappels anamnestiques induits par des contacts avec des HPV sauvages appartenant aux types contenus dans le vaccin. Enfin, ce suivi permettra de vérifier qu'il n'y a pas de substitution des types vaccinaux par d'autres types oncogènes.

1.4.3. Impact sur le dépistage

Dans la situation la plus favorable avec une couverture vaccinale de plus de 90% et une efficacité vaccinale de 100% d'un vaccin VLP L1 HPV16 et 18, il subsisterait encore 25 à 30% de cancers du col dus à des génotypes différents des HPV 16 et 18. Même si cette approche vaccinale permet d'espérer une réduction très sensible du nombre de cancer du col, l'efficacité demandera du temps et la vaccination anti-HPV ne saurait entraîner une remise en question du dépistage par frottis associé ou non à la recherche de papillomavirus avant des décennies.

2. Vaccins thérapeutiques

Ces vaccins ont comme objectif de faire régresser des lésions précancéreuses, une fois l'infection à HPV établie, en induisant une réponse immunitaire spécifique à médiation cellulaire. Les protéines E6 et E7 semblent constituer des cibles intéressantes pour cette approche thérapeutique car elles sont fortement exprimées durant la progression vers la malignité et sont présentées à la surface des kératinocytes par les molécules du système HLA, constituant des antigènes étrangers, cible potentielle du système immunitaire de l'hôte par rapport aux antigènes propres à la cellule cancéreuse. La principale difficulté de cette démarche est d'induire une réponse là où le système immunitaire a échoué.

Différentes approches ont été développées pour stimuler l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. La vaccination à l'aide d'un peptide E7 d'HPV16 a permis de générer des réponses T cytotoxiques chez des patients présentant un cancer du col (Steller 1998). Cependant cette action cytotoxique est fortement restreinte à certains haplotypes du CMH. Des vaccins à base de protéines ont été testés : ils présentent l'avantage de ne pas être

restreints au CMH et sont donc moins dépendants du groupe HLA du patient. Jusqu'à présent, des essais utilisant des protéines de fusion E7-protéine D d'*Haemophilus* (Hallez 2004) ou des protéines complètes E7 d'HPV 16 (Simon P 2003) ont permis de vérifier la présence d'infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ au niveau de néoplasies intraépithéliales cervicales mais malheureusement sans réponse clinique. Cependant, les travaux récents de Prévaille ont montré qu'un vaccin composé d'adénylate cyclase recombinante de *Bordetella pertussis* contenant des épitopes de la protéine E7 d'HPV 16 a permis d'induire une réponse immunitaire cytotoxique intense qui a été suivie d'une régression tumorale chez 100% des animaux testés (Preville, 2005).

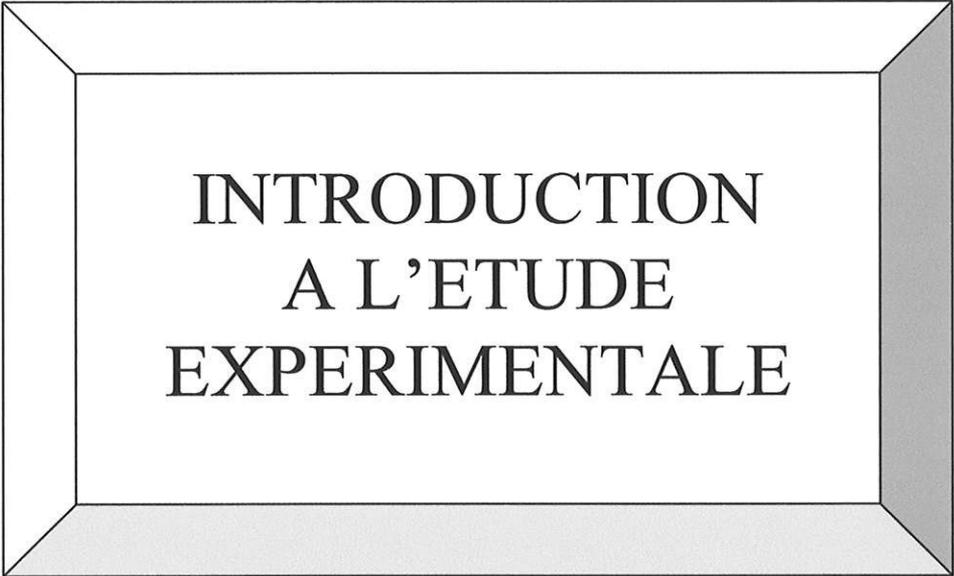
D'autres stratégies utilisent des vecteurs viraux tels que le virus de la vaccine, des adénovirus, et l'AAV (*Adeno-Associated Virus*) ou bactériens tels des *Salmonella*, *Listeria* et *Lactococcus*. Un essai clinique entrepris chez l'homme avec un virus de la vaccine recombinant exprimant une protéine E2 (MVA E2) a montré une forte réponse cytotoxique et une régression complète des lésions précancéreuses (CIN 1, 2 et 3) après vaccination (Corona 2004). Les études utilisant des vecteurs bactériens ont démontré l'induction d'une immunité cellulaire avec une forte réponse cytotoxique (Baud 2004, Bermudez-Humaran 2004).

Les vaccins ADN ont une faible immunogénicité basale. Le principe consiste à stimuler l'immunogénicité en réalisant la fusion du gène codant un antigène viral (E7 le plus souvent) avec une séquence qui active le processus de présentation des antigènes par ciblage intracellulaire comme le gène *Hsp 70* de *Mycobacterium bovis* (Chen 2000a). Une autre approche consiste à utiliser directement l'ADN codant les protéines E6 ou E7 mutées (Shi 1999) de façon à abolir leur pouvoir transformant ; cette dernière a également permis d'obtenir une réponse cytotoxique. Cependant, on peut toujours redouter que la séquence d'ADN vaccinal, porteuse d'un promoteur viral fort, soit capable de s'intégrer dans le génome humain.

D'autres stratégies utilisent les cellules comme vecteur. Une première approche consistant à transférer *in vitro* dans des cellules dendritiques la protéine E7 (De Bruijn 1998), des peptides de E7 (Ossevoort 1995) ou encore un plasmide codant E7 (Wang 2000) permet d'induire une réponse immunitaire protectrice contre la croissance des cellules tumorales exprimant E7. Une deuxième approche consiste à utiliser les cellules tumorales du patient modifiées génétiquement *in vitro* afin de les rendre immunogènes et de les réinjecter chez le même patient. Cette stratégie ne peut s'envisager que chez un patient présentant une tumeur à un stade avancé. Chez les souris, un vaccin à base de cellules tumorales transduites avec des gènes de cytokine comme l'IL-12 (Hallez 1999) a produit des effets anti-tumoraux puissants.

3. Vaccins combinés

Ces vaccins ont pour ambition de permettre à la fois la protection des cellules contre l'entrée du virus grâce à la présence d'anticorps neutralisants et l'élimination des cellules infectées par HPV. Le principe consiste donc à utiliser des antigènes capables de déclencher une réponse immunitaire humorale et cellulaire au sein de la muqueuse. Actuellement, ce sont les vaccins VLP chimériques (CVLP) qui correspondent le mieux à ces exigences. Ils sont composés de VLP dans lesquelles des polypeptides non structuraux sont fusionnés à une extrémité d'une protéine de capsid L1 ou L2. Récemment, l'équipe de Schreckenberger *et al.* a mis au point un vaccin HPV16 L1E7 CVLP et l'a utilisé pour traiter des patients présentant des CIN II/III ; il a été possible d'observer à la fois la production de titres élevés d'anticorps neutralisants et une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Parallèlement, une amélioration de l'histologie a été observée dans 50% des cas chez les vaccinés contre 15% dans le groupe placebo. Mais les résultats ne sont encore que préliminaires et de nombreux essais seront encore nécessaires avant de confirmer l'efficacité sur l'homme de tels vaccins curatifs.



**INTRODUCTION
A L'ETUDE
EXPERIMENTALE**

L'infection à HPV constitue un véritable problème de santé publique de part son implication dans la genèse de près de 100% des cancers du col de l'utérus. Les résultats récents des premiers essais cliniques à grande échelle concernant un vaccin prophylactique contre l'HPV étant très prometteurs, il nous a paru intéressant de mieux cerner l'épidémiologie de l'infection à HPV afin de pouvoir suivre son évolution lorsque ces vaccins commenceront à se mettre en place.

Dans ce contexte et de façon plus large dans l'optique d'un dépistage et d'un suivi optimisé des lésions cervico-utérines, nous avons souhaité comparer les performances et la pertinence par rapport au frottis de 2 méthodes, un test de capture d'hybrides (Digene) marqué CE et un test d'amplification-hybridation (Argène), pour les valeurs proches du seuil de détection. Dans le cas d'éventuelles discordances entre les 2 techniques, nous avons développé des techniques d'amplification de l'ADN suivies par un typage à l'aide d'un séquençage du gène *L1*. L'ensemble des résultats a été comparé aux données de la littérature.

Le deuxième objectif de notre étude a consisté à étudier l'épidémiologie des HPV dans cette sous-population par comparaison à une population jeune « tout venant », celle des femmes enceintes venant consulter au CHU. Cette population est intéressante à deux niveaux : elle concerne une classe d'âge caractérisée par la plus forte prévalence de l'infection à HPV et la grossesse impose un suivi médical réglementaire.

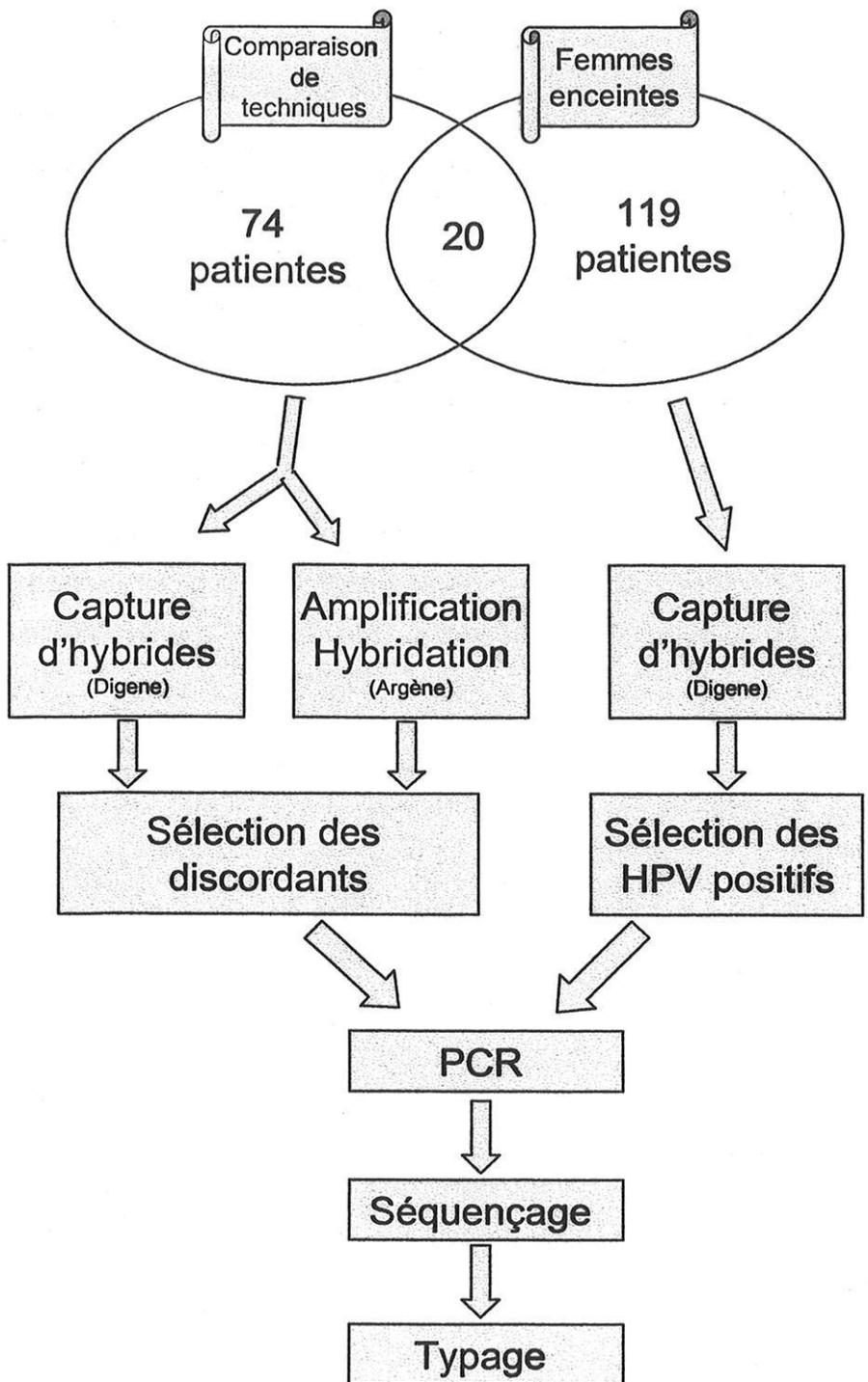
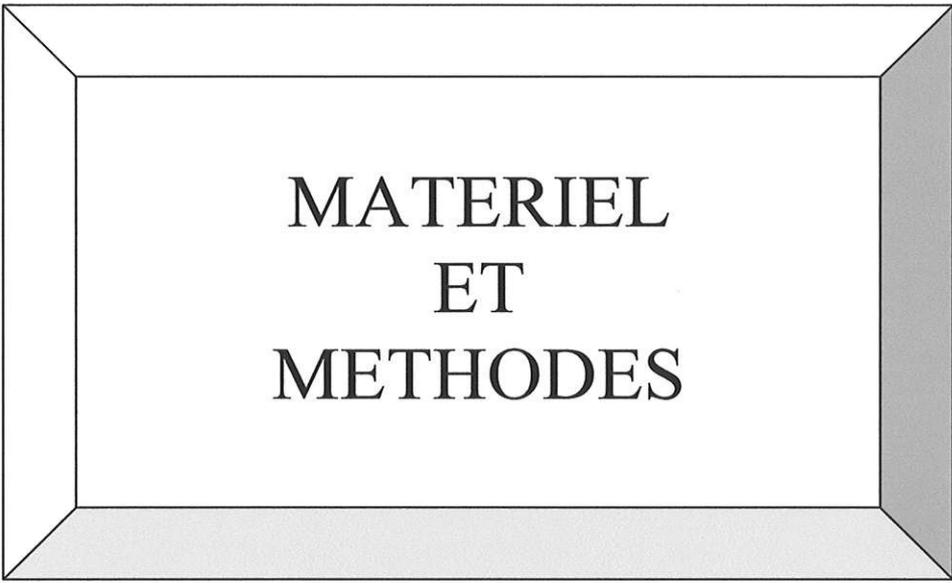


Figure 10 : Schéma global de notre étude expérimentale



MATERIEL
ET
METHODES

I. MATERIEL

1. Patientes

Deux groupes de patientes ont été inclus dans notre étude.

Premier groupe :

Un échantillon de 94 patientes a été sélectionné sur la base du résultat de la technique de détection des HPV utilisée en routine dans le laboratoire de virologie du CHU de Limoges parmi les prélèvements parvenant de différents centres. Les critères de sélection de ces patientes étaient prioritairement une faible charge virale (valeur du ratio < 10) et la discordance éventuelle entre le résultat du test virologique et celui du FCU.

Ratio	Nombre de patientes
> 10	34
5 à 10	11
1 à 5	17
0,6 à 1	9
< 0,6	23

Tableau 5 : Valeur des ratios de la technique Digene des patientes sélectionnées

Nous avons ainsi sélectionné un panel de résultats variés en vue de comparer 2 techniques de détection du génome d'HPV. En outre, les patientes du 2^{ème} groupe présentant un typage HPV positif ont toutes été incluses pour la comparaison de technique.

Deuxième groupe :

Toutes les femmes enceintes venant consulter pour une grossesse au CHU de Limoges à compter du 1^{er} juin 2002 sont concernées par cette étude. Ce projet est envisagé en collaboration avec les praticiens des services concernés. Le nombre d'accouchements est d'environ 2000 par an. La population résiduelle selon les critères d'inclusion et d'exclusion

est estimée à 400 patientes par an, d'après les données du service de Gynécologie-Obstétrique.

Les critères d'inclusion sont les suivants:

- Femmes enceintes de plus de 20 ans n'ayant pas bénéficié d'un frottis dans l'année précédente ou ayant eu un frottis dont les résultats ont été trouvés anormaux, et nécessitant donc un contrôle,
- Affiliées à la sécurité sociale
- Ayant signé le consentement éclairé.

Critères d'exclusion :

- Absence de signature du consentement éclairé

2. Examen gynécologique et prélèvements

Au cours du premier trimestre de la grossesse, et si possible au cours du premier mois de grossesse un frottis cervico-utérin pour étude anatomo-pathologique et un prélèvement à la cytobrosse pour détection et typage des HPV par la méthode Hybrid Capture 2 HPV Test (Digene) sont effectués, après information de la patiente sur les implications d'un tel dépistage et obtention de son consentement écrit.

Au cours de cette première consultation est également réalisé un interrogatoire visant à répertorier les facteurs de risques de cancer du col utérin et d'infection à Papillomavirus.

Un examen attentif du périnée recherche la présence de lésions externes à HPV pouvant être associées à des lésions du col.

Le frottis cervico-utérin est adressé au laboratoire de cytogénétique ou d'anatomopathologie, pour classification cytologique.

Le prélèvement à la cytobrosse est adressé au laboratoire de virologie pour recherche et typage des HPV en hybridation moléculaire permettant une classification en haut risque ou bas risque et mesure semi quantitative de la charge virale afin d'en apprécier la valeur pronostique.

Cette étude sera poursuivie dans le futur au-delà du présent travail.

3. Types de prélèvements parvenus au laboratoire

Selon l'origine des prélèvements (Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, laboratoires de cytopathologie ou gynécologues libéraux), le recueil de cellules cervicales s'effectuent à

l'aide de systèmes différents. Les prélèvements effectués dans la région de Limoges et ses environs (CHU, laboratoire de cytopathologie ou gynécologues libéraux) sont réalisés à l'aide d'une cytobrosse conservée dans un tampon fourni par le fabricant (HC Cervical Sampler®) tandis que les prélèvements que nous recevons au laboratoire en provenance d'autres régions sont recueillis dans un milieu liquide permettant également la réalisation du frottis dit en phase liquide. Deux types de système de recueil existent pour cette technique: Labonord® et Cytoc ThinPrep® Pap Test™ en solution PreservCyt®.

II. METHODES

1. Hybrid Capture[®] 2 HPV Test

Ce test permet la détection qualitative de l'ADN d'HPV dans des prélèvements cervicaux par hybridation moléculaire *in vitro* avec amplification de signal par chimiluminescence en format microplaque. Ce test, commercialisé par la firme Digene, permet la détection de 18 types d'HPV. Les 18 sondes spécifiques de types sont réparties en 2 panels :

- sondes de types 6, 11, 42, 43, 44 pour détecter les HPV dits à bas risque ;
- sondes de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 pour détecter les HPV dits à haut risque.

A compter de 2003, la firme Digene a modifié la composition de son kit en supprimant la détection des HPV à bas risque ; à noter que la détection des HPV à haut risque est poursuivie avec les mêmes sondes que celles du test précédent. Pour différencier ces tests, l'appellation a été modifiée en Test ADN Hybrid Capture[®] 2 HPV-haut risque. Les 2 kits ayant été utilisés lors de notre étude, la distinction entre les 2 sera naturellement mentionnée lors de l'exposé des résultats et leur interprétation.

1.1. Principe

Cette technique comporte 4 étapes :

- dénaturation de l'ADN viral
- hybridation avec les sondes spécifiques de type
- capture des hybrides
- détection des hybrides

Toutes ces étapes doivent être rigoureusement effectuées selon les recommandations du fabricant afin que les résultats soient interprétables et reproductibles.

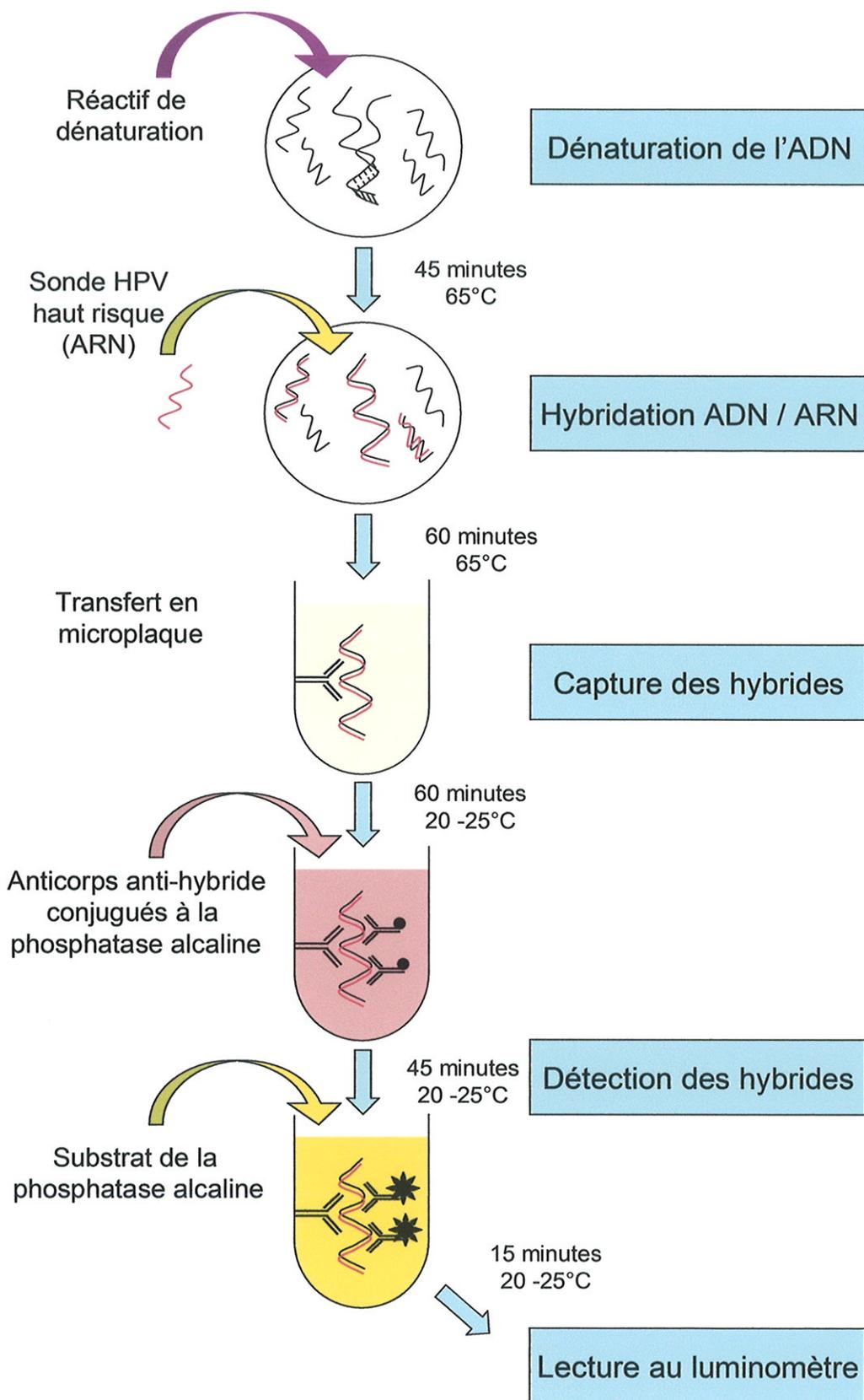


Figure 11 : Principe du test Hybrid Capture 2 (Digene)

1.1.1. Etape de dénaturation

Les échantillons nous parviennent dans un milieu de transport qui permet leur conservation. Selon le mode de prélèvement, Labonord, Cytoc ou type cytobrosse, il convient de réaliser des étapes spécifiques nécessaires à améliorer l'efficacité de la dénaturation.

Pour les prélèvements Labonord :

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon, 4 mL sont prélevés et centrifugés à 4000T/min pendant 20 minutes. Le surnageant est jeté tandis que le culot cellulaire est remis en suspension dans 100 µL de PBS stérile et 40 µL de protéinase K (10 mg/ mL). L'ensemble est incubé pendant une nuit à 37°C ou 3 heures à 56°C. A la suite de cette digestion, 100 µL de réactif de dénaturation sont ajoutés.

Pour les prélèvements Cytoc :

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon, 4 mL sont prélevés et mélangés à 400 µL de tampon de conversion des échantillons (solution tamponnée avec éosine Y et 0,05% d'azide de sodium). Le mélange est centrifugé à 4000T/min pendant 20 minutes. Pendant la centrifugation, il faut préparer une solution constituée de 1 volume de milieu de transport pour échantillon et ½ volume de réactif de dénaturation (respectivement 120 et 60 µL par échantillon). Le surnageant est ensuite décanté avant de resuspendre le culot cellulaire dans 150 µL du mélange précédemment reconstitué.

Pour les prélèvements type cytobrosse :

Un mL d'échantillon est prélevé après avoir bien homogénéisé l'ensemble du prélèvement et mélangé à 500 µL de réactif de dénaturation (solution diluée d'hydroxyde de sodium).

La suite de l'étape de dénaturation est commune aux 3 types de prélèvements. Il est nécessaire de traiter en parallèle le calibrateur HPV haut risque (HPV 16 : 1 pg/mL), les contrôles de qualité HPV haut risque (HPV 16 : 5 pg/mL) et bas risque (HPV 6 : 5 pg/mL) et le contrôle négatif en leur ajoutant respectivement 500 µL, 500 µL, 500µL et 1000 µL de réactif de dénaturation. Un indicateur coloré est présent dans le réactif de dénaturation. Un virage au violet de la couleur des échantillons indique que l'étape est correctement réalisée. Les tubes sont ensuite placés dans un bain-marie à 65°C pendant 45 minutes.

A la fin de cette étape, les échantillons dénaturés peuvent être congelés si la suite de la technique ne peut pas être réalisée.

A noter que le virage de coloration des échantillons lors de l'étape de dénaturation peut ne pas se produire dans le cas de prélèvements cervicaux contenant du sang ou d'autres composants biologiques, mais les résultats n'en sont pas affectés tant que les contrôles et calibrateurs présentent un changement de coloration.

1.1.2. Etape d'hybridation

Avant de débiter cette étape, il est nécessaire de bien vortexer les échantillons pendant au moins 5 secondes. Soixante-quinze μL de chaque échantillon, contrôle et calibrateur dénaturés sont déposés dans les microtubes d'hybridation selon le schéma de la microplaque préalablement déterminé et incubés 10 minutes à température ambiante. Cette étape nécessite une précaution toute particulière car il existe un risque de contamination croisée d'un tube à l'autre. Les microtubes sont ensuite incubés pendant 10 minutes entre 20 et 25°C.

Le mélange de sonde est vortexé puis distribué à raison de 25 μL dans chaque microtube contenant les contrôles, les calibrateurs et les échantillons, en s'assurant de ne pas provoquer d'éclaboussures lors du dépôt.

Après avoir couvert les microtubes d'une feuille adhésive et fixé le couvercle, l'ensemble est soumis à une agitation à 1100 +/- 100 T/minutes pendant 3 +/- 2 minutes. Suite à l'agitation, les échantillons virent au jaune exceptés les échantillons en solution PreservCyt qui virent au rose. Ce virage colorimétrique témoigne de la présence d'une quantité suffisante de sonde. En cas d'absence de virage colorimétrique, un excès de sonde peut être ajouté. L'ensemble est alors incubé à 65°C pendant 60 minutes.

1.1.3. Capture des hybrides

Le contenu entier des microtubes est alors transféré dans la microplaque en respectant le schéma préalablement établi. IL convient de s'assurer que la pipette ne touche pas la surface interne des micropuits recouverte par les anticorps anti-hybrides.

La microplaque est ensuite recouverte puis incubée sur l'agitateur rotatif (1100 +/- 100 T/minutes) pendant 60 minutes à température ambiante (20-25°C).

A la fin de l'étape de capture, il faut vider le liquide des micropuits par un retournement de la microplaque en la secouant vers le bas et la sécher sur un papier absorbant.

1.1.4. Détection des hybrides

Dans chaque puits de la microplaque sont déposés 75 µL de réactif de détection 1 contenant des anticorps anti-hybrides marqués à la phosphatase alcaline. Tous les puits doivent présenter la même intensité de coloration rose. Après avoir été couverte, la microplaque est incubée entre 20 et 25°C pendant 30 à 45 minutes. Le contenu des puits est ensuite vidé par retournement et la plaque séchée sur du papier absorbant. Six cycles de lavage sont alors nécessaires à évacuer l'excès d'anticorps marqué à la phosphatase alcaline ; les puits ne doivent donc plus contenir de liquide résiduel rose.

La deuxième étape de cette détection est l'amplification du signal par un substrat chimiluminescent de la phosphatase alcaline contenu dans le réactif de détection 2. On dépose 75 µL de ce réactif 2 par puits ; tous les micropuits doivent alors virer au jaune. La microplaque est alors recouverte d'un film étanche et propre et incubée à 20-25°C pendant 15 minutes. Immédiatement après cette incubation, la microplaque est lue au luminomètre de Microplaque 2000 Digene (DML 2000™) : les résultats sont exprimés en RLU (Relative Light Unit). Un logiciel spécifique au DML 2000™ permet d'enregistrer les échantillons puis d'éditer une feuille de résultats des échantillons testés et comportant les valeurs des contrôles et des calibrateurs nécessaires à la bonne interprétation des résultats.

1.2. Critères de vérification de calibration du test

La vérification de la calibration du test est effectuée pour s'assurer que les réactifs et le matériel de la calibration et de contrôle fournis fonctionnent correctement, permettant ainsi une détermination précise de la valeur seuil du test.

Contrôle négatif

Le contrôle négatif doit être testé en triple dans chaque série de test. La moyenne du contrôle négatif doit être ≥ 10 et ≤ 250 RLU pour pouvoir commencer le test. Les résultats du contrôle négatif doivent présenter un coefficient de variation (% CV) de $\leq 25\%$. Si le % CV est $> 25\%$, la valeur du contrôle avec une valeur de RLU la plus éloignée de la moyenne est éliminée comme donnée s'écartant nettement de l'ensemble des observations. La moyenne est alors recalculée en utilisant les 2 valeurs de contrôle restantes. Si la différence entre la moyenne et chacune des 2 valeurs est $\leq 25\%$, cette étape est validée. Sinon, la vérification de la calibration du test est invalide et la série de test doit être recommencée pour tous les échantillons de patientes.

Calibrateurs

Le calibrateur HPV-haut risque doit être testé en triple dans chaque série de test. Les résultats de calibrateur doivent présenter un coefficient de variation (% CV) de $\leq 15\%$. Si le % CV est $> 15\%$, Il faut procéder de la même façon que lors de la validation du contrôle négatif. Si la différence entre la moyenne et chacune des 2 valeurs est $\leq 15\%$, cette étape est validée. Sinon, la vérification de la calibration du test est invalide et la série de test doit être recommencée pour tous les échantillons de patientes.

1.3. Calcul de la valeur seuil

Une fois la série d'échantillons validée selon les critères mentionnés ci-dessus, la valeur du seuil de positivité est calculée et correspond à la moyenne des valeurs de RLU pour le calibrateur (HRC). Ensuite, toutes les valeurs RLU des échantillons doivent être converties en un ratio pour la valeur seuil appropriée.

$$\text{Résultat du test} = \text{RLU échantillon} / \text{Valeur seuil}$$

1.4. Contrôle qualité

Pour que le test soit considéré valide, ces contrôles doivent être inclus dans chaque série de test, et le RLU/seuil de chaque contrôle doit être compris dans la marge acceptable suivante. Si les contrôles se trouvent en dehors de cette marge, le test est invalide et doit être répété.

Contrôles	Niveau HPV	Type HPV	Résultats attendus (RLU / seuil) Sonde HPV- haut risque
QC1-LR	Bas	Bas risque (HPV 6)	< 1
QC2-HR	Bas	Haut risque (HPV 16)	≥ 2

Tableau 6 : Caractéristique des contrôles de qualité

1.5. Interprétation des données

Le seuil de 1pg/mL du test ADN hc2 HPV-haut risque est équivalent à 100 000 copies HPV/mL ou 5000 copies HPV par test.

- Les échantillons avec un ratio RLU/seuil $\geq 1,0$ sont considérés positifs.
- Les échantillons avec un ratio RLU/seuil $< 1,0$ sont considérés négatifs pour les 13 types d'HPV testés : soit les séquences d'ADN HPV haut risque de ces 13 génotypes sont absentes, soit la charge virale est inférieure au seuil de détection.

- Pour des valeurs de ratio proche de 1, il faut répéter le test ou utiliser des techniques alternatives.

2. HPV Consensus (Argène)

Cette trousse est utilisée pour le dépistage du génome de 25 types d'HPV dans les prélèvements cervicaux par hybridation avec une sonde biotinylée sur plaque de microtitration, après amplification génique par PCR.

Elle différencie les 2 groupes d'HPV suivants : HPV à haut risque oncogène (types 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58) et HPV à bas risque (types 6 et 11). Une sonde générique permet un dépistage plus large des types d'HPV en un seul puits : 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68.

2.1. Principe

Cette technique comporte 5 étapes majeures :

- extraction d'ADN total
- amplification du génome d'HPV par PCR
- dénaturation de l'ADN viral et fixation dans la microplaque
- hybridation avec des sondes spécifiques : générique, haut risque et bas risque
- révélation

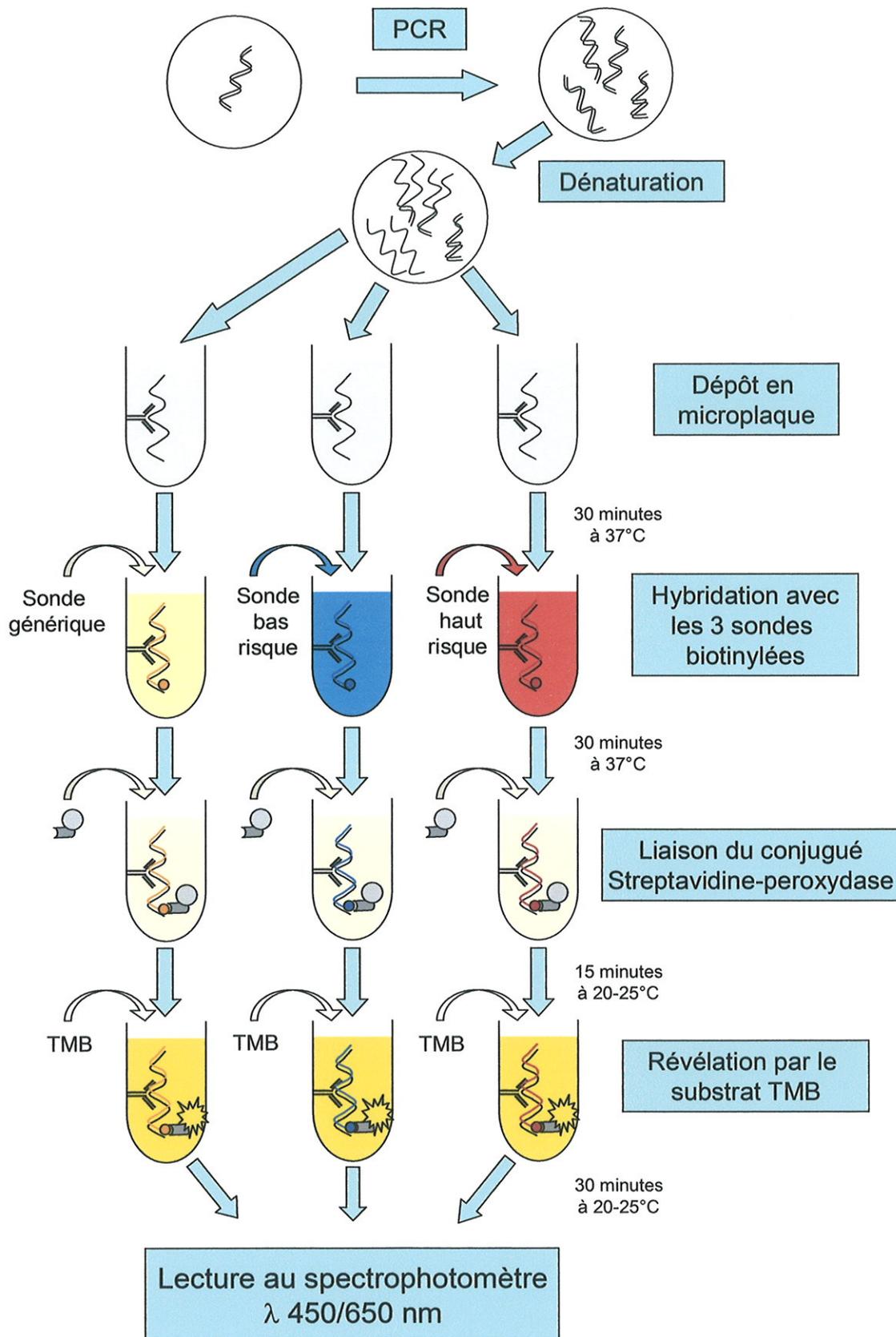


Figure 12 : Principe du test HPV Consensus (Argène)

2.1.1. Extraction d'ADN total

Les prélèvements cervicaux ayant été préalablement traités par une étape de dénaturation pour la détection des génomes d'HPV par la technique HC2, ils doivent subir une étape de renaturation. Une solution de renaturation est préparée à partir d'un mélange d'acétate de potassium 3M et d'acide acétique glacial 5M puis conservée à +4°C. Le processus de renaturation nécessite l'adjonction de 80 µL de solution de renaturation à 320 µL de prélèvement dénaturé.

L'ADN est extrait à l'aide du kit QIAamp DNA Blood Mini Kit® (Qiagen) selon les recommandations du fabricant avec quelques modifications. La première étape consiste à lyser les cellules par la protéinase K. Afin d'augmenter l'efficacité de cette lyse protéique, l'échantillon d'ADN renaturé est réparti en 2 aliquots de 200 µL, auxquels sont ajoutés 20 µL de protéinase K. A chaque aliquot sont ajoutés 200 µL de tampon AL. Après incubation à 56°C pendant 10 minutes, 200 µL d'éthanol sont ajoutés avant de distribuer chaque aliquot sur une colonne Qiagen l'un à la suite de l'autre. La suite de l'extraction est conforme au protocole Qiagen.

L'ADN total est ensuite conservé à +4°C.

2.1.2. Contrôle interne d'extraction : amplification HLA

Afin de vérifier la présence d'ADN et l'absence d'inhibiteur dans l'échantillon extrait, une réaction d'amplification d'un gène HLA humain est réalisée selon le protocole utilisé au laboratoire : 4 µL d'extrait d'ADN sont amplifiés en présence de 2 µL de tampon 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,05% de détergent W1, 200 µM de désoxynucléotides triphosphates (dXTP = dATP + dCTP + dGTP + dTTP), 0,15 µM de chaque amorce (GH26 et GH27) et 0,6 U de Taq DNA polymérase® (Invitrogen) dans un volume final de 20 µL.

Amorces	sequence	Tm (°C)
GH 26	5'-GTGCTGCAGGTGTAAACTTGTACCAG-3'	66
GH 27	5'-CACGGATCCGGTAGCGGTAGAGTG-3'	72

Tableau 7 : Composition des amorces GH 26 et GH 27

Chaque PCR est réalisée dans un thermo-cycleur (Perkin-Elmer 9600) et consiste en une succession cyclique de 3 étapes : après une dénaturation de 4 minutes à 94°C se succèdent 40

cycles composés d'une dénaturation (1 minute à 94°C), une hybridation (1 minute à 55°C) et une élongation (1 minute à 72°C). Une étape finale de 7 minutes à 72°C termine l'amplification.

Les fragments amplifiés sont visualisés par migration électrophorétique (1 heure à 100Volts) de 5 µL de produits de PCR en gel d'agarose 1% (InVitrogen) contenant 10µg/µl de bromure d'éthidium (Sigma) en présence d'un marqueur de poids moléculaire.

En l'absence d'amplification lors de la PCR, l'ADN des échantillons extraits est dilué au 1/5^e afin de rechercher la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase. Si l'ADN peut être amplifié après cette dilution, celle-ci sera nécessaire lors de toutes les PCR utilisées pour amplifier le génome des HPV.

Seuls les échantillons dont le gène HLA a pu être amplifié sont utilisés pour tester la technique Argène.

2.1.3. Amplification du génome d'HPV

L'amplification est réalisée à la fois dans la région conservée L1 et dans la région E6/E7 à l'aide d'amorces consensus dont la séquence se situe dans la région L1 pour amplifier les 25 génotypes d'HPV et dans la région E6/E7 pour amplifier les génotypes spécifiques des HPV haut et bas risque. Pour chaque réaction de PCR, un témoin positif (fourni dans la trousse) et négatif (eau) sont systématiquement incorporés dans chaque série d'échantillons. Le témoin positif est un mélange d'ADN purifié contenant le fragment amplifié de la région L1 obtenu à partir des types d'HPV suivants : 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58.

La trousse comporte un mélange (mix) prêt à l'emploi pré-aliquoté en tubes de polypropylène pour amplification de 0,2 mL et contenant tous les réactifs nécessaires à la PCR à l'exception de la Taq polymérase qu'il faut ajouter lors de la réalisation de la PCR.

Après ajout de 2 U de HotStarTaq™ (Qiagen) et de 5 µL d'échantillon extrait dans le mix, les tubes sont placés dans un thermocycleur (Perkin-Elmer 9600). La séquence d'amplification comporte une activation de la HotStarTaq™ à 95°C pendant 15 minutes puis 2 phases d'amplification : 10 cycles (dénaturation pendant 1 minute à 94°C, hybridation pendant 1 minute à 60°C et élongation pendant 1 minute et 15 secondes à 72°C) et 35 cycles (dénaturation pendant 45 secondes à 94°C, hybridation pendant 1 minute à 55°C et élongation pendant 1 minute et 15 secondes à 72°C). Une étape finale de 5 minutes à 72°C termine l'amplification.

La taille du produit amplifié est de 450 pb et sera systématiquement contrôlée sur gel d'agarose à 1% en présence d'un marqueur de poids moléculaire.

2.1.4. Dénaturation de l'ADN viral et fixation dans la microplaque

A compter de cette étape, il faut traiter parallèlement aux produits de l'amplification un témoin négatif de révélation appelé également « blanc échantillon ». Pour chaque échantillon ou témoin, 20 µL de produit amplifié sont mélangés à 35 µL d'une solution 1. L'ensemble est vortexé puis centrifugé 5 minutes à 13 000 T/min. Cinquante µL de ce mélange sont alors transférés dans un tube propre en prenant garde de ne pas resuspendre le culot et mélangés à 50 µL de solution 2 au vortex. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 900 µL de solution 3 sont ajoutés et l'ensemble est vortexé. Cent µL de ce mélange sont déposés dans les puits de la microplaque en respectant le schéma de plaque préalablement établi. Pour chaque échantillon, il faut disposer de 3 puits : un premier pour l'hybridation avec la sonde générique, un deuxième pour la sonde haut risque et un troisième pour la sonde bas risque. L'incubation de la fixation de l'ADN dénaturé dure 30 minutes à 37°C.

2.1.5. Hybridation avec des sondes spécifiques

Après l'étape de fixation, les puits de la microplaque sont vidés par retournement et les différentes sondes biotinylées (sonde Générique HPV, sonde HPV haut risque et sonde HPV bas risque) sont distribuées à raison de 100 µL de sondes par puits. Chaque échantillon, témoin négatif, témoin positif ou témoin négatif de révélation doit être hybridé avec chacune des 3 sondes pendant 30 minutes à 37°C. L'hybridation est suivie d'un cycle de 5 lavages avec une solution de lavage fournie dans la trousse.

2.1.6. Révélation

Après avoir dilué le conjugué dans son diluant au 1/50^e, 100 µL de la solution de conjugué streptavidine-peroxydase sont déposés dans chaque puits. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, 5 cycles de lavage sont à nouveau effectués. Cent µL de substrat TMB (Tétraméthylbenzidine) sont déposés dans chaque puits pendant 30 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de 100 µL par puits de solution d'arrêt. La microplaque est ensuite analysée à l'aide d'un spectrophotomètre. La densité optique (DO) est lue à 450 nm ou à 450/650 nm.

2.2. Validation du test

L'interprétation des résultats de la série n'est possible que si la DO des témoins négatifs de révélation de la trousse (hybridés respectivement avec les 3 sondes HPV) est $< 0,150$ UDO pour chaque puits correspondant.

2.3. Calcul de la valeur seuil

Une valeur seuil (S) est calculée à partir de la moyenne des 3 valeurs obtenues avec les témoins négatifs de révélation de la trousse après hybridation avec chacune des sondes.

Le calcul est réalisé selon les équations :

$$\text{Lecture de DO à 450 nm : } S = \text{DO moyenne} + 0,150$$

$$\text{Lecture de DO à 450/650 nm : } S = \text{DO moyenne} + 0,100$$

Pour que le test soit complètement validé, il faut que les valeurs de DO des témoins négatifs d'amplification soient inférieures à la valeur seuil et que les valeurs de DO des témoins positifs d'amplification soient supérieures à la valeur seuil. Dans le cas contraire, la manipulation doit être remise en cause et la série recommencée.

2.4. Interprétation des résultats

Une fois le test validé, il faut comparer les DO des échantillons obtenues après hybridation avec les sondes Générique, Haut risque et Bas risque à la valeur S calculée.

L'interprétation est alors réalisée selon le principe suivant :

- si DO échantillon $> S + 10\%$: l'amplification est positive pour au moins un des types d'HPV correspondant à la sonde.
- si DO échantillon $< S - 10\%$: l'amplification est négative pour les types d'HPV correspondant à la sonde.
- si DO échantillon $= S \pm 10\%$: le produit amplifié doit être testé à nouveau.

Si un nouveau test doit être réalisé, l'interprétation est la suivante :

- si DO échantillon $> S + 10\%$: l'amplification est positive pour au moins un des types d'HPV correspondant à la sonde.
- si DO échantillon $< S - 10\%$: l'amplification est négative pour les types d'HPV correspondant à la sonde.
- si DO échantillon $= S \pm 10\%$: l'amplification doit être recommencée à partir d'un nouvel échantillon.

3. Amplification d'un fragment du gène *L1* par la PCR MY

Les résultats discordants entre les 2 techniques sont ensuite analysés à l'aide d'une PCR utilisant les amorces consensus MY09 et MY11 (Manos, 1989). Un fragment de 450 pb du gène *L1* d'HPV est amplifié à partir de 10 µL d'ADN extrait dans un volume final de 100 µL, en présence de 2.5 U de Taq DNA polymerase® (Qiagen), 10 µL de tampon 10X (Tris-Hcl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂) avec 1 mM de MgCl₂, 0,5 µM d'amorces et 200 µM de dXTP. L'amplification est réalisée dans les mêmes conditions que la PCR HLA et comporte une initiation de 5 minutes à 94°C, 40 cycles incluant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute puis une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Amorces	sequence	Tm (°C)
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	62
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	61

Tableau 8 : Composition des amorces MH09 et MY11

Les fragments amplifiés sont visualisés selon le principe évoqué pour la PCR HLA. Les produits de PCR détectables sont purifiés sur membrane de silice en mini-colonne (QIAquick PCR purification kit®, Qiagen) selon les données du fabricant pour l'étape de séquençage.

4. Amplification d'un fragment du gène *L1* par la PCR nichée GP

Les échantillons non détectables après amplification par la PCR MY sont ensuite analysés à l'aide d'une PCR nichée utilisant les amorces consensus GP5 et GP6 (Husnjak, 2000). Un fragment d'environ 150 pb du gène *L1* d'HPV est amplifié à partir de 50 à 100 ng de produit de PCR MY dans un volume final de 50 µL, en présence de 2.5 U de Taq DNA polymerase® (Qiagen), 5 µL de tampon 10X (Tris-Hcl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂) avec 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM d'amorces et 200 µM de dXTP. L'amplification est réalisée dans les mêmes conditions que la PCR HLA et comporte une initiation de 5 minutes à 94°C, 40 cycles incluant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 45°C pendant 30

secondes et une élongation à 72°C pendant 30 secondes puis une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Amorces	sequence	Tm (°C)
GP5	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3'	54
GP6	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCA-3'	48

Tableau 9 : Composition des amorces GP5 et GP6

Les fragments amplifiés sont visualisés selon le principe évoqué pour la PCR MY. Les produits de PCR sont purifiés sur membrane de silice en mini-colonne (QIAquick PCR purification kit[®], Qiagen) selon les données du fabricant.

5. Sensibilité des PCR MY et GP

La sensibilité a été testée sur un produit d'amplification de PCR MY dilué en eau distillée de manière à obtenir une gamme d'ADN variant de 1µg à 10⁻⁷ fg. La concentration en ADN du produit d'amplification MY a été déterminée par mesure de D.O. à l'aide d'un spectrophotomètre. La gamme d'ADN a été amplifiée par la PCR MY. Secondairement, les produits de cette première amplification ont été amplifiés par la PCR nichée GP.

6. Séquençage du gène *L1*

Les différents génotypes de papillomavirus humains présentent des modifications de leur séquence nucléotidique au sein du gène *L1*. Ces mutations ponctuelles constituent le polymorphisme génotypique du gène *L1* des HPV. La comparaison de ces séquences à une banque de données va ainsi permettre de déterminer le génotype de chaque papillomavirus.

6.1. Principe

Il est basé sur la méthode dite des didéoxynucléotides (Sanger, 1977). Cette technique de séquençage utilise le kit Big DyeTm Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ABI Prism[®] (Applied Biosystems). Des didéoxynucléotides triphosphates (ddXTP : ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), marqués par des fluochromes différents, sont ajoutés au mix

d'amplification. Dès qu'un ddXTP est incorporé lors de la synthèse d'ADN, l'absence de fonction OH en 3' empêche toute liaison phosphodiester avec un autre dXTP et induit donc l'arrêt de la synthèse d'ADN. On considère que, statistiquement, chaque copie de la séquence ne sera interrompue qu'une seule fois, et en un endroit différent. Les fragments ainsi obtenus sont séparés par migration électrophorétique en gel capillaire et détectés par des photodétecteurs, qui recueillent la lumière émise par les fluorochromes des extrémités 3' après excitation par un faisceau laser.

6.2. Réaction de séquence

Les amorces utilisées sont MY09 et MY11 ou GP5 et GP6 selon la PCR qui a permis l'amplification, à la concentration de 100 pmol/μL. Un tube réactionnel est préparé pour chaque amorce, avec 10 à 30 ng (2 à 3 μL) de produit de PCR purifié, 25 pmol d'amorce, 2,5 μL de tampon de séquence 5X (Big Dye Sequencing Buffer) et 2,5 μL de mix de séquence (Big Dye, contenant dXTP, ddXTP marqués, tampon de réaction et Taq polymérase). Après une étape de dénaturation initiale à 96°C pendant 5 minutes, la réaction s'effectue sur 25 cycles : dénaturation à 96°C pendant 6 secondes, hybridation à 50°C pendant 5 secondes et élongation à 60°C pendant 4 minutes. Les produits de séquence sont purifiés par chromatographie d'exclusion à l'aide du kit Dyeex[®] de Qiagen, lyophilisés et réhydratés en formamide.

6.3. Analyse des produits de séquence

Les séquences nucléotidiques sont analysées sur le séquenceur ABI Prism 310 Genetic Analyser[®] (Applied Biosystems) couplé au logiciel Sequencing Analysis 2.1.2[®] (Applied Biosystems), puis décryptées à l'aide du logiciel Chromas[®].

Afin de déterminer le génotype des différents isolats, les séquences sont comparées à l'ensemble des séquences génomiques disponibles dans la banque de données GenBank à l'aide du logiciel Blast[®].

7. Analyse statistique de la comparaison de techniques

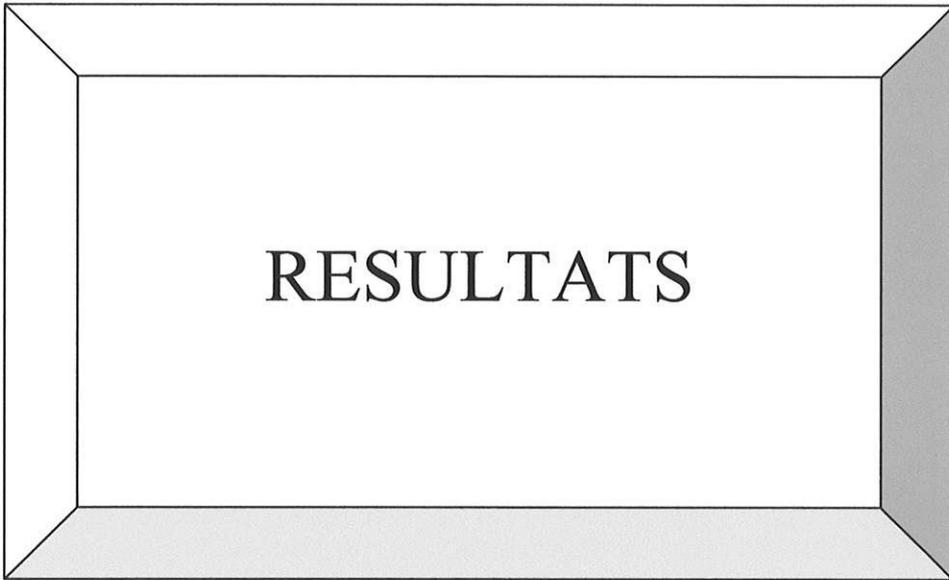
Afin d'analyser la reproductibilité et la concordance entre ces 2 trousseaux diagnostiques, le test κ a été appliqué aux résultats obtenus par ces 2 techniques. La première étape consiste à

calculer le coefficient de concordance (C_c) qui est le rapport du nombre de résultats concordants sur le nombre d'examens comparés. Ensuite, on calcule le coefficient de concordance attendue (C_a).

On appelle coefficient kappa le terme : $\kappa = (C_c - C_a) / (1 - C_a)$

L'interprétation du test κ dépend de la valeur calculée du coefficient κ :

- coefficient κ négatif : discordance entre les 2 tests
- $0 < \kappa \leq 0,2$: très faible concordance
- $0,2 < \kappa \leq 0,4$: faible concordance
- $0,4 < \kappa \leq 0,6$: concordance modérée
- $0,6 < \kappa \leq 0,8$: bonne concordance
- $0,8 < \kappa \leq 1$: excellente concordance



I. PREMIERE PARTIE : COMPARAISON DE TECHNIQUES DE DEPISTAGE VIROLOGIQUE DE L'INFECTION A HPV

1. Cytologie et dépistage virologique chez 94 patientes

Le panel de patientes sélectionnées pour cette comparaison présente une hétérogénéité de lésions cytologiques. Conventionnellement, la classification de Bethesda 2001 a été utilisée pour décrire ces lésions. Pour les comptes-rendus cytologiques établis avec une nomenclature antérieure, les résultats ont été convertis avec la classification de Bethesda afin de pouvoir uniformiser et comparer les résultats.

Parmi les 94 patientes sélectionnées dans notre étude, la répartition des lésions cytologiques était la suivante :

- 14 frottis cervico-utérins normaux
- 14 frottis cervico-utérins sans signe de malignité mais présentant soit des signes d'infection par des micro-organismes, soit des modifications non néoplasiques
- 35 lésions type ASC-US
- 28 lésions type LSIL
- 3 lésions type HSIL

Aucune lésion de type carcinome malpighien.

2. Résultats de la technique Digene comparés aux résultats cytologiques

Avant mars 2004, la technique Digene utilisée détectait les HPV BR avec une sonde hybridant les types 6, 11, 42, 43 et 44 et les HPV HR avec une sonde hybridant les types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68. Les 15 échantillons sélectionnés avant cette date ont donc bénéficié d'un typage des HPV BR et HR. Cependant, la majorité des échantillons a été sélectionnée après mars 2004 et n'a donc bénéficié que d'un typage HR, ce dernier seul étant recommandé pour le dépistage des cancers du col de l'utérus conjointement au frottis cervico-utérin.

Ainsi, tout au long de l'étude et sauf indication contraire, nous ne considérerons pour la technique Digene que le résultat positif ou négatif en HR afin que tous les résultats de typage soient comparables. De ce fait, ces résultats expriment le niveau du risque d'évolution vers un cancer selon que le dépistage des HPV HR soit positif ou négatif.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 10 :

94 patientes		Résultat du frottis (nombre)					Total (94)
		Normal (14)	Absence de SIL (14)	ASC-US (35)	LSIL (28)	HSIL (3)	
Test HPV	HR positifs	10 (71,4%)	9 (64,3%)	18 (51,4%)	21 (75%)	3 (100%)	61 (64,9%)
	HR négatifs	4	5	17	7	0	33

Tableau 10 : Comparaison des résultats du test Digene et des données cytologiques sur un panel de 94 patientes sélectionnées préférentiellement sur un ratio faible par la technique Digene (60 échantillons ont un ratio < 10) et sur des discordances cyto-virologiques (23 frottis sur 31 présentent des lésions cervicales avec un ratio < 1)

Parmi nos 94 patientes, on retrouve 61 typages HR positifs (64,9%) tandis que 33 patientes demeurent négatives vis-à-vis de la détection d'HPV HR.

L'analyse du typage par lésions met en évidence 71,4% d'HPV HR dans les frottis normaux, 57,1% dans les frottis présentant des infections, 71,4% dans les frottis présentant des modifications non néoplasiques, 51,4% dans les frottis ASC-US, 75% dans les frottis LSIL et 100% dans les frottis HSIL.

Parmi les 19 typages HR positifs à frottis sans lésion dysplasique, 11 ont un ratio supérieur à 10, 3 dans l'intervalle 5-10 et 5 dans l'intervalle 1-5. Ils présentent donc un signal fort.

3. Résultats de la technique Argène comparés aux résultats cytologiques

Cette comparaison a été effectuée sur la même population que précédemment. La trousse de typage Argène permet la détection des HPV HR et BR. De plus, elle dispose d'une sonde générique qui détecte un panel plus large d'HPV comprenant les types HR et BR inclus dans les sondes spécifiques HR et BR.

Les résultats mettent en évidence la détection de 51 HPV HR, 13 HPV génériques, 4 HPV BR et 26 négatifs parmi 94 patientes. Parmi les frottis normaux ou sans SIL, on détecte 18 HPV HR. Parmi les ASC-US, on retrouve 12 HPV HR. Dix-neuf HPV HR sont mis en évidence dans les LSIL et 2 dans les HSIL.

Pour permettre une interprétation clinique des données, les résultats peuvent être exprimés en fonction du niveau de risque de développer un cancer : patiente à risque élevé en cas de détection d'HPV HR ou patiente sans risque ou à risque faible en cas de détection d'HPV BR ou de négativité (tableau 11).

		Résultat du frottis					Total
		(nombre)					
81 patientes		Normal (13)	Absence de SIL (14)	ASC-US (28)	LSIL (24)	HSIL (2)	(81)
Test HPV	Risque élevé	9 (69,2%)	9 (64,3%)	12 (42,8%)	19 (75%)	2 (100%)	51 (63%)
	Risque faible ou nul	4	5	16	5	0	30

Tableau 11 : Estimation par le test Argène du risque oncogène en fonction des différentes lésions cytologiques en excluant les résultats positifs avec la sonde générique

Le résultat « générique » ne permet pas de classer les patientes en fonction du niveau de risque puisque la sonde générique détecte à la fois des HPV HR et BR. Les 13 échantillons ainsi étiquetés doivent donc être évincés de la comparaison et seront étudiés avec les résultats discordants.

On retrouve ainsi 51 patientes à risque élevé contre 30 patientes à risque faible, avec 69,2% de HR positifs parmi les frottis normaux, 64,3% parmi les frottis sans lésion dysplasique, 42,8% parmi les ASC-US, 75% parmi les LSIL et 100% parmi les HSIL.

4. Performances comparées des tests Digene et Argène

4.1. Résultats globaux

Parmi les frottis normaux, 9 échantillons sont concordants positifs HR et 4 sont concordants négatifs. Un échantillon est discordant HR (Digene)/générique (Argène).

Pour les frottis sans signe de malignité mais présentant des modifications non néoplasiques ou des signes d'infection, 12 échantillons analysés sont concordants : 8 positifs HR et 4 négatifs. Deux échantillons sont discordants.

Les frottis présentant un résultat de type ASC-US ont conduit à des typages positifs HR et concordants dans 10 cas, négatifs et concordants dans 14 cas et discordants dans 11 cas.

Le typage des lésions de bas grade (LSIL) a mis en évidence des HPV HR dans 19 cas par les 2 techniques. Cinq cas ont été retrouvés négatifs ou BR par les 2 tests. Quatre échantillons ont des résultats discordants.

Les frottis HSIL ont conduit à 2 typages HR concordants et un typage discordant HR (Digene)/générique (Argène).

Les résultats détaillés sont exposés dans le tableau 12.

Cytologie	Digene	Argène	Nombre d'échantillons
Normal	Négatif	Négatif	4
	HR	Générique	1
	HR	HR	9
Absence SIL	Négatif	Négatif	3
	Négatif	BR	1
	Négatif	HR	1
	HR	Négatif	1
	HR	HR	8
ASC-US	Négatif	Négatif	13
	Négatif	BR	1
	Négatif	Générique	1
	Négatif	HR	2
	HR	Négatif	1
	HR	BR	1
	HR	Générique	6
	HR	HR	10
LSIL	Négatif	Négatif	4
	Négatif	BR	1
	Négatif	Générique	2
	HR	Générique	2
	HR	HR	19
HSIL	HR	Générique	1
	HR	HR	2

Tableau 12 : Comparatif des lésions cytologiques et des résultats de typage viral

Générique : Hybridation avec la sonde générique Argène (types : 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68)

BR : Hybridation avec la sonde bas risque Argène (types 6 et 11)

HR : Hybridation avec la sonde haut risque (Digene : types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) ou (Argène : types 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58)

4.2. Comparaison des tests Digene et Argène

Dans un premier temps, la comparaison a été effectuée sur 81 patientes présentant un résultat interprétable : risque oncogène élevé ou faible. En effet, cette sélection est nécessaire pour rendre les 2 techniques homogènes en terme de résultats. Les résultats sont regroupés dans le tableau 13.

		Argène	
		Nombre de patientes	
81 patientes		HR	BR / négatif
		51	30
Digene	HR	48	3
	51	(59,2%)	(3,7%)
Nombre de patientes	Négatif	3	27
	30	(3,7%)	(33,4%)

Tableau 13 : Comparaison des résultats Digene versus Argène sur l'ensemble des 81 patientes présentant des résultats interprétables

Quarante huit patientes ont été détectées comme patientes à risque tandis que 27 sont considérées comme à risque faible par les 2 techniques. Cependant 6 patientes présentent des résultats discordants.

La comparaison globale portant sur 81 patientes met en évidence 75 résultats concordants (48 HR et 27 BR ou négatifs). La concordance de ces 2 techniques est estimée à 92,6% avec un coefficient κ de 0,84. On peut donc considérer que ces 2 techniques de typage présentent une excellente concordance de leurs résultats ($0,8 < \kappa < 1$).

Dans un deuxième temps, nous avons sélectionné à partir de la population précédente les patientes dont le résultat Digene présentait un ratio inférieur à 10 afin de cibler les patientes dont les résultats sont plus proches de la valeur seuil. Ce panel regroupe 49 patientes. Les résultats sont regroupés dans le tableau 14.

49 patientes		Argène	
		Nombre de patientes	
		HR	BR / négatif
		20	29
Digene	HR	17	2
		(34,7%)	(4,1%)
Nombre de patientes	Négatif	3	27
		(6,1%)	(55,1%)

Tableau 14 : Comparaison des résultats Digene versus Argène (échantillon de 49 patientes avec un ratio < 10)

La concordance est retrouvée 44 fois sur 49 soit dans 89,8% des cas. Nous avons ainsi retrouvé 17 typages HR concordants et 27 typages négatifs ou BR concordants. Cinq patientes présentent à contrario des résultats discordants.

Ce critère de sélection de 49 patientes provoque essentiellement une diminution du nombre d'échantillons avec des résultats HR positifs. Nous retrouvons alors 44 résultats concordants et 5 résultats discordants. La concordance de ces 2 techniques est estimée à 86,3% avec un coefficient κ de 0,73. On peut donc considérer que ces 2 techniques de typage présentent une bonne concordance de leurs résultats pour les échantillons dont le ratio est inférieur à 10. On observe donc une concordance moindre dès lors qu'on s'intéresse à une population pour laquelle le résultat de typage est faiblement positif ou négatif.

Les échantillons discordants ont été analysés par typage moléculaire dans la région *L1*. Les résultats sont présentés au paragraphe 5.

4.3. Pertinence comparée des 2 tests par rapport aux frottis

La confrontation de nos résultats avec ceux de la littérature est présentée dans le tableau 15.

	Test utilisé pour l'étude	% HPV HR (FCU Normal)	% HPV HR (ASC-US)	% HPV HR (LSIL)	% HPV HR (HSIL)	% HPV HR (cancer)
Etude Limoges (2005)	Digene n = 94 femmes*	67,8%	51,4%	75%	100%	0
	Argène n = 81 femmes*	66,7%	42,8%	79%	100%	0
Etude Besançon Riethmuller (1999)	Digene N = 466 femmes non sélectionnées	14,3%	41,1%	59,4%	81,6%	100%

Tableau 15 : Comparaison des résultats des études de Limoges et de Besançon (Riethmuller, 1999) prenant en compte le pourcentage respectif d'HPV HR retrouvé par type de lésion.

* rappel= population sélectionnée préférentiellement sur un ratio faible par la technique Digene et sur des discordances cyto-virologiques

Du fait des critères de sélection de notre étude face à une étude comportant des femmes non sélectionnées, la prévalence des HPV HR parmi les FCU normaux est 4 fois plus importante dans notre étude. La prévalence des HPV HR dans les ASC-US est comparable dans les 2 études et avec les 2 techniques. Pour les LSIL et les HSIL, les résultats sont comparables en terme de prévalence d'HPV HR.

5. Amplification et séquençage du gène *L1* des patientes ayant des résultats discordants.

Dans un premier temps, nous avons étudié les 6 patientes présentant des résultats discordants à l'issue de la comparaison de technique, une patiente avec une lésion de bas grade au FCU (LSIL) mais dont les résultats des 2 tests sont demeurés négatifs et une patiente avec une LSIL et une discordance résultat Digene négatif et résultat Argène positif BR.

Dans un deuxième temps, il nous a paru intéressant de typer les patientes dont le résultat correspondait à une double population HR / BR (n = 4) ou les patientes pour lesquelles on ne retrouvait qu'une hybridation avec la sonde générique (n = 13).

5.1. Optimisation du protocole d'amplification du gène L1

Nous avons choisi d'utiliser une amplification en 2 étapes afin d'augmenter la sensibilité de détection des souches d'HPV. Dans un premier temps, nous avons utilisé une PCR MY avec les amorces consensus MY09 / MY11 permettant l'amplification d'un fragment d'environ 450 pb (la taille du fragment peut varier de quelques paires de base selon le génotype amplifié). Pour les échantillons n'ayant pu être amplifiés par la PCR MY, nous avons utilisé dans un deuxième temps une PCR nichée avec les amorces GP5 / GP6 permettant d'amplifier un fragment d'environ 150 pb.

La sensibilité de chacune de ces PCR a été calculée à partir de notre gamme de dilution d'ADN viral. La limite de détection de la PCR MY est de 10 fg d'ADN.

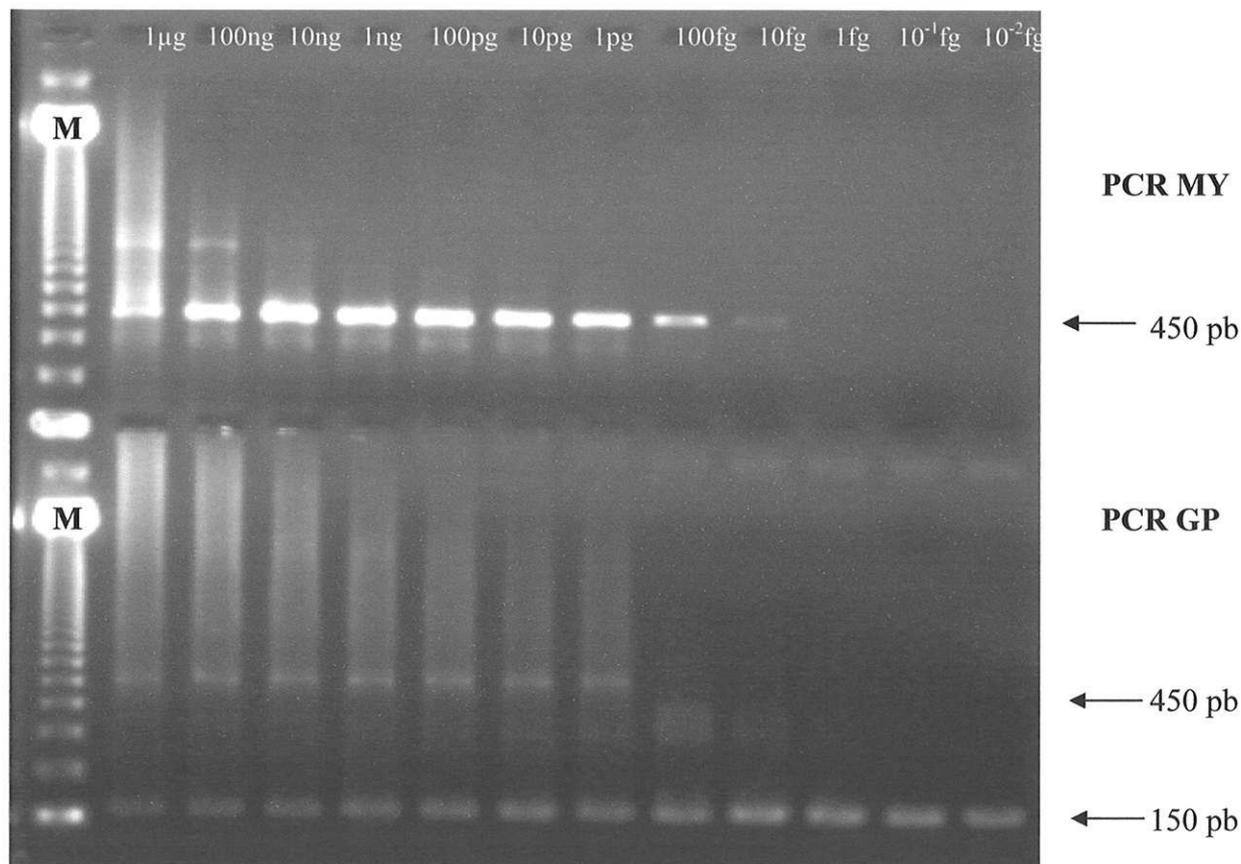


Figure 13 : Sensibilité des PCR MY et GP testée sur une gamme de dilutions d'ADN en eau distillée (1 µg à 10⁻⁷ fg)

M : marqueur de poids moléculaire 123pb

La PCR GP a également été testée à partir d'un produit de PCR MY. La limite de détection est de 10^{-2} fg d'ADN.

5.2. Mise en évidence de la présence d'ADN viral dans les échantillons discordants

Nous avons retrouvé 23 échantillons positifs par PCR (11 positifs en primo-amplification et 12 positifs en PCR nichée). Deux échantillons n'ont pas pu être amplifiés avec les 2 PCR. Ces résultats de PCR ont permis de trancher en faveur de l'une ou l'autre technique selon les échantillons. Un résultat négatif avec les 2 PCR est alors considéré comme définitivement dépourvu d'ADN d'HPV.

5.3. Analyse par typage moléculaire des résultats discordants, ou positifs HR/BR ou positifs avec la sonde générique

Le typage moléculaire a concerné les 6 échantillons discordants entre les 2 méthodes, une discordance négatif Digene / positif BR Argène avec une LSIL, une discordance cyto-virologique, les 4 échantillons HR/BR et les 13 échantillons positifs par la sonde générique. Les différents génotypes retrouvés au sein de cette population ont été classés en HR et BR selon la dernière classification épidémiologique des génotypes HPV établie par Munoz en 2003.

L'étude des génotypes montre que parmi les 6 échantillons discordants, 3 ont été retrouvés négatifs par la technique Digene. Deux échantillons négatifs par Digene ont été considérés HR par Argène et comportaient effectivement 2 souches HR (génotypes 58 et 31) qui aurait pu être détectés par la sonde HR Digene mais dont les ratios étaient inférieurs au seuil de positivité (respectivement 0,35 et 0,31). Le 3^{ème} avait un résultat Argène HR/BR mais seule une souche BR de type 54 a été retrouvée : la sonde Digene ne pouvait donc pas le détecter et seule la sonde générique Argène aurait dû être positive.

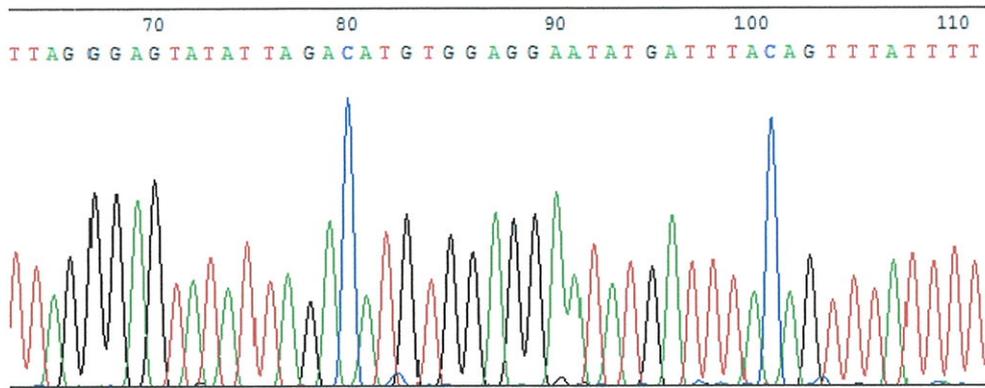


Figure 14 : Electrophorégramme de l'échantillon n°04018679 : génotype 54

Parmi les 3 autres discordants :

Deux échantillons sont étiquetés HR par la technique Digene et négatif par Argène. L'un ne comportait pas d'ADN d'HPV détectable (ratio Digene 1,1) et serait donc un faux positif tandis que l'autre a permis la détection d'un HPV HR (génotype 53) qui aurait du être détecté par la sonde générique Argène mais pas par la sonde HR Digene.

Le 3^{ème} échantillon détecté HR par Digene a été retrouvé BR par Argène. IL s'agissait en fait d'un génotype 39. Cependant, l'existence d'un mélange de souches est fort probable (cf électrophorégramme)

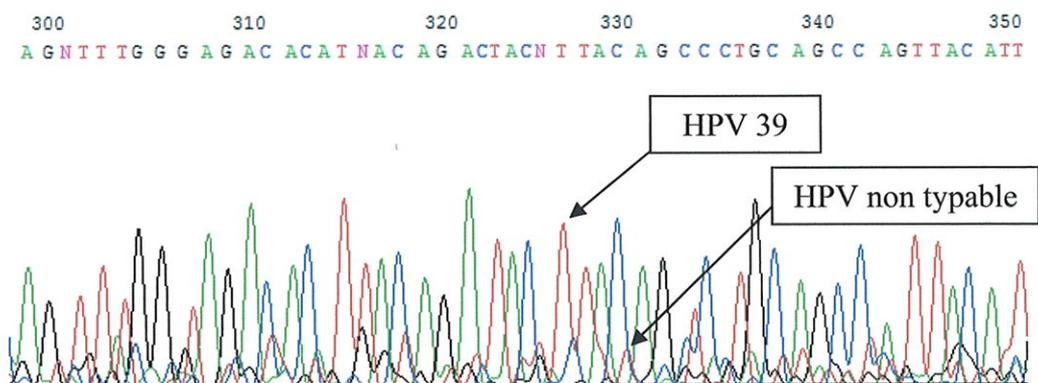


Figure 15 : Electrophorégramme de l'échantillon n°04014481:
génotype 39 majoritaire

L'échantillon négatif par les 2 techniques avait été sélectionné car sa valeur de ratio était proche du seuil et présentait une cytologie type LSIL. Un HPV BR (génotype 44) a été retrouvé dans celui-ci. Il ne pouvait être détecté par la sonde HR Digene mais aurait dû être détecté par la sonde générique. Un échantillon négatif en Digene a été considéré BR et

comportait effectivement un HPV 6 ce qui explique qu'il n'ait pas été détecté par la sonde HR Digene.

Parmi les 4 mélanges de souches HR/BR supposés par la technique Argène, 4 sont étiquetées HR par la technique Digene. Le géotypage retrouve un seul mélange de souches HR / BR (33 / 6). Concernant les 3 autres échantillons, on retrouve un mélange de 2 souches HR (18 / 33) et 2 échantillons contenant une seule souche : HR dans un cas (18) et BR dans l'autre cas (6).

Les différents résultats du typage moléculaire des échantillons trouvés générique par Argène sont regroupés dans le tableau 16.

Pour les 10 échantillons typés génériques par Argène et HR par Digene, 6 correspondaient à des souches HR (géotypes 16, 33, 39, 53 ou 68) et 4 à des souches BR (62, 70, mélange 62/70 et 84). Les géotypes 16 et 33 auraient dû être détectés par les sondes spécifiques. Les géotypes 53, 62, 70 et 84 n'auraient pas dû être détectés par la sonde HR Digene et les géotypes 39, 53 et 68 étaient seulement présents dans la sonde générique Argène et pas dans les sondes spécifiques ce qui coïncide avec nos résultats. Les 10 échantillons ont été trouvés positifs en HR Digene avec des ratios compris entre 1,02 et 7,73 pour 8 d'entre-eux et pour 2 échantillons des ratios de 104,5 et 2162.

Pour les 3 échantillons typés génériques par Argène et négatif par Digene, un échantillon avec un ratio de 1 ne contenait pas d'ADN d'HPV tandis que les 2 autres ont permis la détection respectivement d'une souche HR (géotypes 33) et d'une souche BR (géotype 54).

13 patientes	Typage moléculaire		
	HR	BR	négatif
Typage Argène	7	5	1
Générique			

Tableau 16 : distribution des résultats de la sonde générique Argène par typage moléculaire

Les résultats discordants entre les 2 techniques ainsi que le résultat de génotypage en fonction des lésions cytologiques correspondantes sont regroupés dans le tableau 17.

Echantillons	Résultats					
	Digene	Ratio Digene	Argène	PCR	Génotypes	Cytologie
0401 9671	négatif	0,35	HR	pos (GP)	58	ASC-US
0401 9881	négatif	0,31	HR	pos (GP)	31	ASC-US
0401 8679	négatif	0,92	HR / BR	pos (GP)	54	absence SIL
0401 7529	HR	3,3	négatif	pos (MY)	53	absence SIL
0500 0482	HR	1,1	négatif	neg		ASC-US
0401 4481	HR	77,48	BR	pos (MY)	39	ASC-US
0500 0944	négatif	0,96	négatif	pos (GP)	44	LSIL
0500 0274	négatif	0,51	BR	pos (MY)	6	LSIL
0400 3803	HR	104,5	limite seuil générique	pos (MY)	68	normal
0402 4173	HR	1,46	générique	pos (MY)	53	HSIL
0401 3926	HR	4,25	générique	pos (MY)	53	ASC-US
0401 7389	HR	7,05	générique	pos (MY)	62 / 70	ASC-US
0402 1652	HR	7,73	générique	pos (GP)	62	ASC-US
0402 3228	HR	6,36	générique	pos (GP)	16	ASC-US
0402 3847	HR	1,5	générique	pos (MY)	70	ASC-US
0402 7318	HR	3,22	générique	pos (GP)	33	AS-CUS
0500 0940	HR	1,02	générique	pos (GP)	84	LSIL
0402 2058	HR	2162	générique	pos (MY)	39	LSIL
0401 6836	négatif	1	limite seuil générique	neg		ASC-US
0302 6971	négatif	0,1	générique	pos (GP)	33	LSIL

0402 3808	négatif	0,96	générique	pos (GP)	54	LSIL
0401 4486	HR	302	HR/ seuil BR	pos (MY)	18 / 33	LSIL
0401 5617	HR	1038,49	HR / BR	pos (MY)	6 33	
0401 7208	HR	1,63	HR / BR	pos (GP)	6	LSIL
0402 6748	HR	6,89	HR / BR	pos (GP)	18	LSIL

Tableau 17 : Synthèse des résultats des échantillons discordants (les génotypes HR sont indiqués en gris).

Pour rappel :

La sonde HR du kit Digene permet de détecter les types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.

La sonde HR du kit Argène permet de détecter les types 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58.

La sonde BR du kit Argène permet de détecter les types 6 et 11.

La sonde générique permet un dépistage plus large des types d'HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68.

Le typage moléculaire de 23 patientes a permis de mettre en évidence la présence de 14 génotypes différents parmi cette population. D'après la classification épidémiologique de Munoz présentant l'avantage d'être plus proche de la clinique, nous avons retrouvé 8 génotypes HR différents et 6 génotypes BR différents.

Génotypes	6	16	18	31	33	39	44	53	54	58	62	68	70	84
Nombre de patientes (n=20)	2	1	1	1	2	2	1	3	2	1	1	1	1	1

Tableau 18 : Répartition des génotypes pour les patientes monoïnfectées (n= 20)
(les génotypes HR sont indiqués en gris)

Génotypes	6 / 33	18 / 33	62 / 70
Nombre de patientes (n=3)	1	1	1

Tableau 19 : Répartition des génotypes pour les 3 patientes présentant des coinfections (n= 3) (les génotypes HR sont indiqués en gris)

Parmi les 23 échantillons que nous avons séquencés, nous avons retrouvés 13 patientes qui hébergeaient un HPV HR dont une présentait une coinfection par 2 génotypes HR (18 et 33), une patiente avec une coinfection HR/BR (génotypes 6 et 33) et 9 patientes avec un génotype BR dont une avec une coinfection par 2 génotypes BR (62 et 70).

II. DEUXIEME PARTIE: EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A HPV CHEZ LES FEMMES ENCEINTES EN LIMOUSIN

A ce jour, 139 patientes ont accepté d'être incluses dans le protocole de dépistage d'HPV pendant leur premier trimestre de grossesse.

Le dépistage est réalisé par la technique Digene à la recherche d'HPV HR et BR jusqu'à mars 2004 et HPV HR de mars 2004 à ce jour.

Echantillons	Ratio Digene (BR-HR)		Digene	Argène	Cytologie	Génotypage
0300 4155	0,81	1636	HR	HR	normal	31
0300 8317	0,2	938,5	HR	HR	LSIL	33
0300 8335	0,13	2,02	HR	HR	normal	31
0300 8913	17,81	0,17	BR	0	normal	neg
0300 8915	0,17	13,6	HR	HR	normal	33
0401 4997	nf	1,24	HR	HR	normal	33
0301 3791	0,19	6,79	HR	HR	abs SIL	52
0301 8084	0,29	2,45	HR	HR	abs SIL	31
0302 2346	0,49	92,69	HR	HR	normal	16
0302 4112	1,96	0,2	BR	0	abs SIL	70
0302 6971	1600,7	0,1	BR	lim seuil gener	LSIL	33
0400 2777	0	1659,8	HR	HR	LSIL	56
0400 3803	65	104,5	HR	lim seuil génér	normal	68
0400 4231	6,1	0,09	BR	BR	abs SIL	6
0400 4398	0,16	53	HR	HR	abs SIL	16
0401 0533	nf	81	HR	HR	LSIL	16
0401 3275	nf	547	HR	HR	normal	35
0401 4481	nf	77,48	HR	BR	ASCUS	39
0402 5208	nf	45	HR	HR	abs SIL	70
0402 6654	nf	35,52	HR	HR	normal	52

Tableau 20 : Résultats comparatifs sur des prélèvements provenant de patientes dont le dépistage a mis en évidence un HPV HR ou BR faisant figurer cytologie et typage moléculaire correspondants (nf = non fait ; abs = absence ; génotype HR en gris ; *en italique* : prélèvements de la même patiente à 6 mois d'intervalle).

Parmi ces 19 patientes, 18 présentaient une recherche d'HPV positive avec une répartition de 15 HPV HR et 3 HPV BR. Tous les prélèvements de ces patientes positives ont été testés par les 2 techniques ; les résultats de cette comparaison ont été intégrés dans la première partie des résultats. Secondairement, un typage moléculaire a été effectué sur ces échantillons.

Les résultats présentés en italique correspondent à 2 prélèvements de la même patiente, les numéros d'échantillons étant dans l'ordre chronologique. Cette patiente est donc infectée par le même génotype d'HPV à plus de 6 mois d'intervalle avec une nette décroissance de la valeur de son ratio témoignant vraisemblablement d'une diminution de la charge virale. Ses frottis, contrôlés en double lecture, ne présentent aucun signe de lésion.

Les échantillons 03026971 et 04003803, trouvés discordants entre les 2 techniques ont été typés avec les autres échantillons discordants mis en évidence à l'issue de la comparaison de techniques. Le typage des femmes enceintes représente donc 16 résultats supplémentaires.

Parmi les 16 résultats spécifiques à la population de femmes enceintes, 2 patientes présentent des résultats discordants au niveau du typage. Nous avons retrouvé le génotype 70 (génotype non présent sur les sondes Digene et Argène) et une absence de génome d'HPV détectable pour des échantillons étiquetés BR par la première version de la technique Digene.

De surcroît, certains types d'HPV retrouvés après séquençage n'auraient pas dû être détectés par les sondes utilisées dans les kits.

Parmi les dépistages HPV positifs, notre population compte donc 73,6% de frottis cervico-utérins sans signe de dysplasie, ce qui est particulièrement élevé. Parmi les femmes présentant des lésions cervicales, on retrouve 1 ASC-US associé à un HPV 39 et 4 LSIL associés aux génotypes 16, 33 et 56.

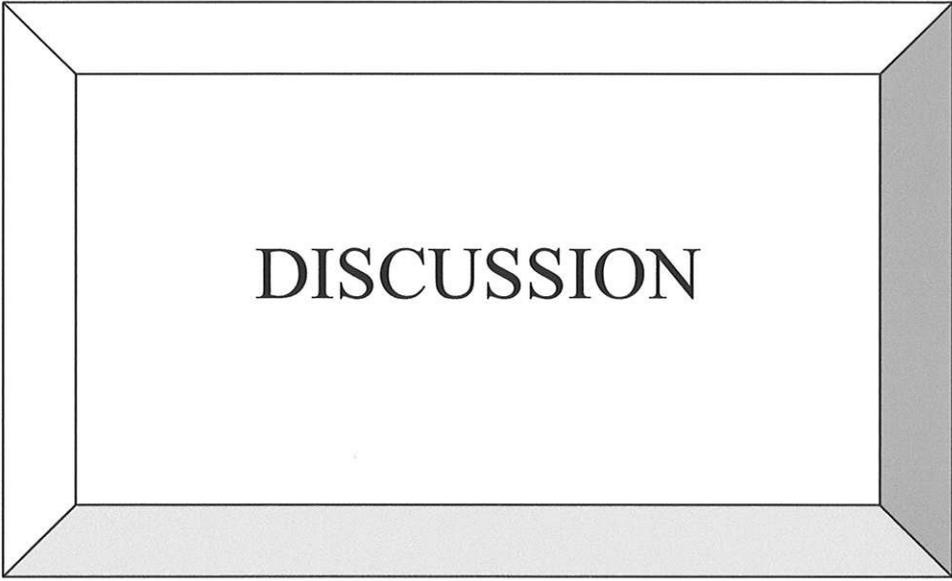
Dans cette étude, la prévalence de l'infection à HPV s'élève à 13% avec une répartition de 83% de génotypes HR et 17% de génotypes BR.

Le tableau 21 regroupe les différents génotypes retrouvés parmi les femmes enceintes et leur proportion respective dans cette population.

Génotypes	6	16	31	33	35	39	52	56	68	70
Nombre de Patientes n=18	1	3	3	3	1	1	2	1	1	2
Pourcentage	5,6%	16,6%	16,6%	16,6%	5,6%	5,6%	11,1%	5,6%	5,6%	11,1%

Tableau 21 : Répartition des génotypes chez les femmes enceintes

On retrouve majoritairement les génotypes 16, 31 et 33 parmi les HR et les génotypes 70 et 6 parmi les BR.



Les HPV ayant été déclarés comme étant les agents responsables, le « primum movens » des cancers du col (même si des cofacteurs interviennent) (zur Hausen, 1994), leur détection au sein de l'épithélium cervico-utérin apparaît de plus en plus comme un auxiliaire décisionnel pour le clinicien en complément du frottis cervico-utérin. Ainsi, la nécessité d'une technique sensible et spécifique s'est rapidement imposée. De nombreuses publications ont apporté la preuve de l'aptitude de la technique Hybrid Capture 2 (Digene) à la détection du génome des HPV HR sur des prélèvements cervicaux. Cependant, toute technique de diagnostic se doit d'être remise en question lorsqu'une autre apparaît sur le marché. Nous avons donc souhaité effectuer une comparaison avec une technique d'amplification-hybridation (HPV Consensus, Argène) ne disposant pas encore d'une autorisation de mise sur le marché pour une activité de diagnostic. Les résultats de ces 2 techniques soulèvent un certain nombre de points importants que nous allons détailler : la sensibilité de chacune des techniques par rapport aux résultats des frottis cervico-utérins, la concordance des résultats obtenus par ces 2 techniques et enfin le détail des résultats discordants à l'aide d'un génotypage par séquençage du gène *L1*.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons aux résultats de l'étude sur la détection des HPV chez les femmes enceintes et la répartition des différents génotypes dans cette population.

I. PERFORMANCES ET PERTINENCE DE 2 METHODES DE DEPISTAGE DES HPV HR

L'objectif principal de notre travail a été d'intégrer les résultats des 2 techniques dans un contexte de pratique quotidienne de laboratoire qui consiste à répondre aux attentes des cliniciens. C'est dans cette optique que nous avons sélectionné notre panel de patientes afin qu'il soit le plus représentatif possible d'une activité de routine. Ainsi, la population étudiée est issue de toute la région sud-ouest ce qui implique naturellement différents anatomopathologistes et différentes techniques de frottis cervico-utérins. Concernant les anatomopathologistes, tous n'utilisant pas encore le système de Bethesda pour codifier les lésions dysplasiques des cellules du col utérin, nous avons établi les concordances entre les anciennes dénominations et celles du système de Bethesda afin de pouvoir comparer les lésions entre-elles (Annexe 1). Quant aux techniques de frottis, certains centres utilisent la technique du frottis en phase liquide tandis que d'autres pratiquent toujours la technique par étalement. La sensibilité des 2 techniques est différente. Dans une étude multicentrique

(Monsonogo, 2001), il a été montré que la technique de frottis en phase liquide permettait de détecter 29% d'ASC-US et 39% de SIL en plus par rapport au frottis conventionnel. Même si d'autres études n'ont pas retrouvé de telles différences et malgré de grandes variations de sensibilité intercentre pour cette technique, elle apparaît tout de même globalement de sensibilité supérieure au frottis conventionnel par étalement.

1. Données cytologiques de notre étude

Parmi les résultats de frottis des 94 patientes sélectionnées, nous retrouvons 14 frottis normaux (14,9%), 14 frottis sans signe de malignité (14,9%), 35 ASC-US (37,2%), 28 LSIL (29,8%) et 3 HSIL (3,2%). La proportion des différentes lésions de notre population étudiée n'est évidemment pas représentative de leur véritable prévalence puisque les frottis normaux représentent 97% des tous les frottis réalisés en France. Parmi les 3% de frottis anormaux, sont habituellement diagnostiqués 1,4% d'ASC-US, 1,1% de LSIL, 0,25% de HSIL et moins de 0,05% de cancer (Bergeron, 2005). Mais notre population présente un biais de sélection puisque les prélèvements sont adressés au laboratoire de virologie pour typage des HPV en complément d'un résultat de frottis et non dans le cadre d'un dépistage primaire systématique (frottis + typage HPV). Aucun typage correspondant à une lésion de type carcinome malpighien n'a été adressé au laboratoire. Cependant, l'inclusion d'une telle lésion dans une comparaison de technique de dépistage aurait été d'intérêt limité car d'après les données de la littérature, la prévalence des HPV dans ce type de lésion est proche de 100%. Le virus doit donc être facilement retrouvé dans ce cas quelle que soit la technique utilisée.

2. Performances comparées des 2 techniques de dépistage des HPV Digene et Argène

A l'issue de l'interprétation des résultats de cette comparaison de technique, il apparaît clairement que les 2 techniques n'ont pas la même efficacité. Globalement, les coefficients de concordance sont bon à excellent mais cela après avoir évincé de la comparaison les résultats dit génériques par la technique Argène car ils ne permettent pas de classer les HPV en fonction de leur risque oncogène. Ce résultat de test n'est d'aucune valeur pour le clinicien. Ainsi, tous ces résultats « génériques » pourraient conduire à des colposcopies excessives et une anxiété inutile de la patiente. Sur certains prélèvements à faible charge virale, cette

technique s'est révélée plus sensible que la technique Digene en détectant des HPV HR. Toutefois, il s'agit de génotypes plus rares dont l'implication dans la cancérogenèse est moins évidente que pour HPV 16 et 18 par exemple. Ce test, dans sa définition actuelle, n'apporte pas de bénéfice supplémentaire par rapport au test Digene dans la stratégie de dépistage actuellement définie lors des dernières recommandations de l'ANAES en 2004.

Quant aux résultats de la technique de capture d'hybride, ils tendent à mettre en évidence les limites de cette technique. De nombreuses études ont mis en avant l'intérêt de cette technique depuis la fin des années 90. Clavel et *al.* ont montré que le test Hybrid Capture 2 (HC2) de Digene était d'une grande sensibilité (92,8%) pour la détection des lésions de haut grade, meilleure que celle du test de 1^{ière} génération (71,4%) et très proche de celle d'une PCR utilisant les amorces GP5+/GP6+ (Clavel, 1998). Les travaux de Solomon et *al.* ont ensuite mis en évidence l'intérêt du test HC2 dans la prise en charge des femmes avec une lésion de type ASC-US (Solomon, 2001). De plus cette technique semble avoir une bonne reproductibilité interlaboratoire comme le prouve le coefficient κ de 0,84 (Castle, 2004). Plus récemment, Clavel et *al.* ont montré que les femmes qui présentaient conjointement un résultat de frottis normal et un test HC2 négatif constituaient une population à faible risque de développer des lésions de haut grade et de ce fait, leur rythme de suivi pourrait être diminué en augmentant l'intervalle entre 2 dépistages de 3 à 5 ans (Clavel, 2004).

Cependant, nos résultats, diffèrent de ceux de la littérature en ce qui concerne la proportion d'HPV HR positifs parmi les frottis normaux (67,8% d'HPV HR par la technique Digene et 66,7% par la technique Argène versus 14,3% dans l'étude de Besançon (Riethmuller, 1999)) et la proportion d'ASC-US parmi tous les frottis de l'étude (37,3% dans notre étude versus 5,7% dans l'étude de Besançon). Cela s'explique par une sélection volontaire de patientes présentant des valeurs proches du seuil de positivité ou des résultats discordants entre le typage et le frottis et mettent en avant les difficultés d'interprétation de cette technique dans ce cas de figure.

3. Interprétation des résultats discordants

3.1. Choix de la PCR

La PCR est la méthode la plus sensible pour détecter l'ADN viral au sein d'un prélèvement. Cependant, les HPV présentent une hétérogénéité significative en terme de séquence nucléotidique qui est à l'origine des différents génotypes. Ainsi, une PCR unique et universelle n'est pas utilisable pour la détection de tous les génotypes. Les méthodes développées ont d'abord utilisé des amorces consensus telles que MY09/MY11 (Manos, 1989) puis des amorces avec des séquences hautement conservées telles GP5+/GP6+ (de Roda Husman, 1995). Actuellement, l'ensemble des études retrouve une efficacité similaire des PCR utilisant soit le couple d'amorces MY09/MY11 soit le couple d'amorces GP5+/GP6+. Ces PCR permettent l'amplification de la majorité des génotypes retrouvés au niveau des muqueuses génitales.

Nous avons choisi d'utiliser la PCR avec les amorces MY09/MY11 (ou PCR MY) dans un premier temps. Cependant, la sensibilité de cette PCR, bien qu'excellente, pouvait être mise en défaut pour les échantillons contenant un très faible nombre de copies d'ADN viral. Nous avons donc décidé de coupler à cette PCR MY une PCR nichée utilisant les amorces GP5 et GP6 (Husnjak, 2000). Cette méthode permet d'augmenter la taux de détection d'environ 40% par rapport à la PCR MY seule. Elle est donc indiquée dès qu'un échantillon ne peut pas être amplifié avec la PCR MY ou si la quantité de produit de PCR obtenue à l'issue de la première amplification n'est pas suffisante pour effectuer un séquençage de celui-ci.

Nous avons retrouvé respectivement une sensibilité de 10fg et de 10^{-2} fg pour la PCR MY et la PCR nichée GP, ce qui est en accord avec les données de la littérature. Comparativement, le seuil théorique de la technique Digene est estimé à 5000 copies par test soit 50 fg par test.

3.2. Génotypage des discordants

A l'issue de la comparaison de technique sur 81 échantillons, 6 se sont révélés discordants. Parmi les 3 échantillons rendus négatifs par la technique Digène et retrouvés positifs HR par la technique Argène, tous ont été amplifiés à l'aide de la PCR nichée GP. Leur non-détection par la sonde HR Digene pourrait donc s'expliquer par une charge virale en dessous du seuil de

5000 copies de la technique Digene. Les échantillons n° 04019671 et 04019881 contenaient respectivement un HPV type 58 et 31. L'analyse de l'échantillon n°04018679 a mis en évidence un génotype 54 classifié BR d'après les travaux de Munoz (Munoz, 2003). Cependant, d'après l'algorithme d'interprétation de la technique Argène, il est classifié HR + BR alors que seule la sonde générique contient ce génotype. Toutefois, il est à noter que l'intensité de D.O. est très largement supérieure dans le puits correspondant à la sonde générique que dans les puits correspondant aux sondes HR et BR. De surcroît, l'électrophorégramme ne montre pas de mélange de souches.

Parmi les 3 échantillons typés HR par la technique Digene, 2 demeurent négatifs (n° 04017529 et 05000482) par la technique Argène et un est typé BR (n°04014481). Le séquençage du n°04017529 met en évidence un génotype 53 qui n'est théoriquement pas détecté par la sonde Digene HR. Cependant, le fabricant précise que sa sonde HR peut croiser avec les types 40, 53 et 66, ce qui expliquerait ce résultat. Ce génotype ayant été récemment classifié comme potentiellement à HR d'après les travaux de Munoz *et al* (Munoz, 2003), cette réaction croisée permet de cibler une patiente à risque et de la suivre ainsi plus attentivement, ce qui n'aurait pas été le cas si elle avait été dépistée avec la technique Argène dont la sonde générique n'a pas détecté ce génotype. Elle apparaît donc moins sensible mais mieux corrélée à la cytologie de cette patiente qui ne présente aucun signe de dysplasie. Quant au n°05000482, la technique Digene le détecte à la limite du seuil de positivité. La technique Argène ainsi que la PCR ne mettent en évidence aucun ADN d'HPV dans cet échantillon. Ce résultat illustre les limites de cette technique pour les ratios proches du seuil de positivité. Il faut rappeler que cette technique s'effectue en microplaques et que les puits dans lesquels on distribue les échantillons sont très proches les uns des autres. Ainsi, il est possible que des contaminations inter-puits surviennent lors des étapes de manipulation. D'après les données de la littérature, ces contaminations surviendraient dans moins de 3% des cas et concerneraient principalement les positifs faibles (ratio < 3) ou à la limite du seuil de positivité (Federschneider, 2004). Une autre étude a évoqué la possibilité de fausse positivité due à la présence d'un fort signal chimiluminescent dans les puits contigus (de Cremoux, 2003). Pour l'une ou l'autre hypothèse, notre échantillon entre tout à fait dans le cadre de ces causes de faux-positifs car 5 des 8 puits contigus contiennent des HP HR avec des valeurs de ratio comprises entre 3,23 et 2341. Pour l'échantillon n°04014481 typé BR par la technique Argène, il correspond à un génotype 39 considéré comme HR. Ce génotype n'étant pas contenu dans le panel de la sonde HR Argène mais dans celui de la sonde générique, il aurait dû être étiqueté générique. Cependant, l'analyse de l'électrophorégramme de séquence montre

qu'il existe une ou des souches minoritaires dans cet échantillon mais en trop faible proportion pour être analysable. Elle(s) pourrai(en)t correspondre au génotype BR qu'aurait détecté la sonde BR Argène.

Nous nous sommes également intéressés à 4 échantillons typés HR pour lesquels une double population HR/BR a été mise en évidence par la technique Argène et dont l'examen cytologique retrouvait une LSIL. Parmi ces échantillons, nous avons retrouvé 2 mélanges de souches (n°04014486 et 04015617), respectivement des mélanges 18/33 et 6/33, mais un seul présentant une double population HR/BR. La valeur de D.O. avec la sonde BR étant à la limite du seuil de positivité dans le cas du mélange de souches 18/33, il semblerait que ce résultat soit en faveur d'une fausse positivité due peut-être à une charge virale élevée comme en témoignent la valeur du ratio (302) et la forte positivité de la PCR MY.

Pour l'échantillon n°04017208, un génotype 6 (BR) a été retrouvé isolement alors que la technique Argène donnait comme résultat un double population HR/BR et la technique Digene un résultat positif en HR. La notice d'instruction du test Digene précise que les échantillons contenant un taux élevé d'ADN HPV 6 ou HPV 42 peuvent être faussement positifs avec la sonde HR. Cette notion n'est pas décrite pour le test Argène mais il est vraisemblable que cette hybridation croisée puisse également se produire.

Quant à l'échantillon n°04026748, seule la présence d'un génotype 18 (HR) a été mise en évidence par le séquençage. L'analyse de l'électrophorégramme ne montre pas de mélange de souches. L'hybridation avec la sonde BR Argène est une fausse positivité. Cependant, la présence de ce faux-positif BR ne perturbe pas l'interprétation clinique des résultats du test.

Comme nous l'avions précisé précédemment, 13 échantillons ont été classés dans les génériques par la technique Argène. Ils n'avaient pas pu être inclus dans le comparatif car la technique Digene ne possède pas de résultat équivalent. Parmi eux, 10 correspondent à des typages HR par la technique Digene. Pour 6 d'entre-eux (n° 04003803, 04013926, 04017389, 04023847, 04022058, 04024173), ils correspondent à des génotypes uniquement présents dans la sonde générique : on retrouve les génotypes 39, 53, 68 et 70 avec une particularité pour le génotype 70 qui n'est pas contenu dans la sonde générique mais qui se rapproche du génotype 39 sur le plan phylogénétique (Longuet, 1996) ce qui peut expliquer l'hybridation croisée. Les 4 autres échantillons HR vs générique (n° 04021652, 04023228, 04027318, 05000940) contiennent les génotypes 16, 33, 62 et 84. Pour les génotypes 16 et 33, la technique Argène aurait dû les détecter en HR et non pas en génériques car ils sont contenus

dans la sonde HR. Quant aux génotypes 62 et 84, seule une hybridation croisée avec un génotype contenu dans la sonde générique et la sonde HR Digene peut expliquer ces résultats. Trois échantillons étiquetés générique n'ont pas été détectés par la technique Digene. Ils avaient été sélectionnés pour cette comparaison en raison de la cytologie correspondante et/ou d'un résultat Digene proche de la valeur seuil. Deux échantillons (n° 03026971 et 04023808) correspondant à une lésion de bas grade (LSIL) contenaient respectivement un génotype 33 et un génotype 54. La technique Argène aurait du détecter le génotype 33 en HR et non pas en générique car il est contenu dans la sonde HR. Par contre, le génotype 54 est uniquement contenu dans la sonde générique. La technique Digene ne pouvait pas détecter le génotype 54 car il n'est pas représenté dans la sonde HR. Quant au génotype 33, on peut considérer que la sensibilité de la technique Argène est plus élevée ce qui peut s'expliquer par le fait qu'elle repose sur une amplification du génome viral avant l'étape d'hybridation. Le dernier échantillon (n°04016836) présentait une valeur de DO à la limite du seuil de positivité pour la sonde générique de la technique Argène et n'a pas pu être amplifié en PCR. Il s'agit donc d'un vrai négatif avec un probable bruit de fond pour la technique Argène.

A l'issue de l'interprétation de nos résultats, 3 points importants apparaissent.

Pour les résultats dont le ratio est compris entre 1 et 2, il faut impérativement vérifier les résultats des puits adjacents à l'aide du schéma de plaque de microtitration qui demeure le seul repère pour connaître l'emplacement de tous les échantillons. Dans le cas où l'échantillon faiblement positif serait au contact d'échantillons fortement positifs, il convient de tester à nouveau cet échantillon soit par HC2 soit par PCR avant de rendre un résultat définitif car il pourrait s'agir d'une contamination.

Un deuxième problème est celui de la réactivité croisée de la sonde HR HC2 avec certains types d'HPV non oncogènes : cela concernerait les types 11, 53, 61, 66, 67, 70, 71 et 81 (Castle, 2002). Cette réactivité croisée serait principalement due à la proximité phylogénétique des différents HPV impliqués. Dans notre étude, 2 génotypes 70 ont été retrouvés par typage moléculaire, alors qu'ils avaient été typés HR par Digene. C'est la proximité phylogénétique avec le génotype 39 inclus dans la sonde HR, qui a permis cette détection et ainsi provoqué une erreur de typage. De plus, le fabricant signale des hybridations croisées entre la sonde HR HC2 et les HPV 6 et 42 en cas de forte charge virale. C'est probablement le cas de notre échantillon 04017208 qui a été typé HR par Digene avec un typage moléculaire HPV 6.

Ainsi dans ces 2 cas, le risque principal de cette technique est de rendre un faux positif qui pourrait conduire le clinicien à envisager une colposcopie inutile.

Nous avons remarqué une plus faible sensibilité de la technique Digene par rapport à Argène pour 3 de nos échantillons présentant des HPV HR (génotypes 31, 33 et 58). Le résultat de la technique Digene était négatif, alors que la technique Argène était positive soit HR (2 cas) soit générique (1 cas). Cependant l'importance de cette meilleure sensibilité due à l'étape d'amplification est contrebalancée par le fait que la sonde HR Argène inclut moins de génotypes HR que celle de Digene et par la présence de la sonde générique, qui comme nous l'avons déjà fait remarqué, n'apporte aucune aide dans la stratégie de prise en charge des patientes.

Malgré ces différentes limites à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats du test Digene, il demeure un test très performant couplé au FCU dans le suivi de l'infection à HPV et des lésions précancéreuses du col de l'utérus, la persistance des lésions dysplasiques étant corrélées à la persistance des HPV HR (Ho, 1995).

4. Analyse des génotypes

L'analyse des génotypes détectés chez nos 23 patientes montre une répartition très différente des données de la littérature tant sur le plan du rapport HR sur BR que sur le plan de la fréquence de chaque génotype. Pour les génotypes étudiés, le rapport HR/BR est estimé à 1,5 tandis qu'une étude de prévalence menée en Italie a estimé ce rapport à environ 3,6 (Ronco, 2005). De plus, toutes les études s'accordent sur le fait qu'HPV 16 est largement majoritaire (au minimum 20% dans les études menées sur des patientes sans lésions cervicales) suivi par l'HPV 18, 45 et 59. Mais dans le cas présent, il est impossible d'estimer correctement cette répartition pour deux raisons : le panel de patientes « génotypées » est trop réduit pour déterminer une prévalence et le génotypage a été réalisé sur des patientes dont les résultats étaient discordants entre les techniques de dépistage. Il paraît donc évident que nous avons induit un biais de sélection au sein de l'ensemble des génotypes. A ce stade, il est donc impossible de faire un état des lieux précis concernant la répartition des génotypes dans le sud-ouest de la France. Afin d'avoir une meilleure vision de l'ensemble des génotypes, nous envisageons de génotyper toutes les patientes ayant un résultat positif HR au test de dépistage effectué en routine.

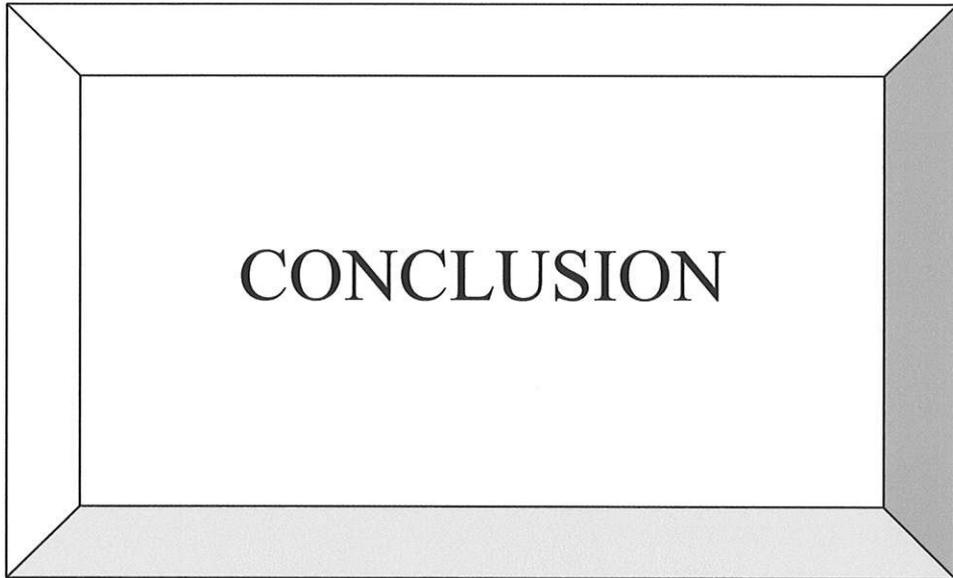
II. ETUDE DE PREVALENCE D'HPV CHEZ LES FEMMES ENCEINTES

La population étudiée comprend 139 patientes venues consulter au cours de leur premier trimestre de grossesse. La prévalence de l'infection à HPV dans cette population est de 13%. Ce résultat est proche de celui estimé pour la population féminine tous âges confondus en France (Boulangier, 2004). Dans cette étude, la moyenne d'âge des patientes enceintes présentant un résultat positif pour la détection d'HPV HR se situe à 28 ans +/- 10. Notre population aurait dû présenter une prévalence légèrement plus élevée compte tenu du pic d'incidence des infections à HPV qui se situe dans la tranche d'âge de nos patientes. Le rapport des génotypes HR sur BR est de 5 ce qui est supérieur aux données de la littérature. Ce résultat s'explique par le fait que nous n'effectuons plus le dépistage des HPV BR depuis mars 2004 ce qui fait introduit un biais d'analyse par rapport aux études qui détectent les HPV tous risques confondus.

Dans notre panel de patientes, on retrouve une majorité de génotypes 16, 31 et 33 qui font partie des génotypes les plus fréquemment rencontrés. Cependant, aucun génotype 18 et 45 n'ont été détectés. Ces 2 génotypes se situent habituellement, en terme de prévalence, entre le génotype 16 et les génotypes 31 et 33. Il est envisageable que notre population étudiée présente une répartition particulière des génotypes. Toutefois, avant d'arriver à cette conclusion, il est nécessaire d'inclure un nombre beaucoup plus important de patientes étant donné que la prévalence de l'infection à HPV est inférieure à 15%. Parmi ces 19 patientes, 14 ne présentaient aucun signe de lésions cervicales. Pour éviter un biais dû à l'interprétation des lames de frottis par un seul cytologiste, nous avons demandé une double lecture pour tous les frottis réalisés chez les patientes incluses dans le protocole. Notre population compte donc 73,6% de frottis cervico-utérins sans signe de dysplasie parmi les dépistages HPV positifs. Cette proportion très élevée permet d'expliquer que nous ne puissions avoir la même vision de la prévalence des différents génotypes que dans les lésions de haut grade. Il est intéressant de noter que toutes ces patientes ont bénéficié d'un frottis de type conventionnel dont la sensibilité est, comme nous l'avons déjà dit, inférieure à celle du frottis en phase liquide. Cependant, la technique cytologique utilisée ne peut à elle seule expliquer cette forte proportion de frottis normaux parmi les patientes porteuses d'un HPV. Une autre hypothèse est que, dans notre étude, les femmes sont incluses à l'âge de la prévalence maximale de l'infection à HPV mais ce n'est pas l'âge auquel on trouve le plus de lésions (Bosch, 2003).

L'intérêt de notre étude est qu'elle porte sur des femmes non sélectionnées qui sont à peine plus âgées que la population cible du vaccin prophylactique. Les vaccins actuels ciblent prioritairement les HPV 16 et 18 en accord avec les données épidémiologiques mondiales. Cependant, nos premiers résultats montrent la circulation de nombreux types d'HPV HR différents des HPV 16 et 18. Mais sont-ils aussi hautement oncogènes que les types 16 et 18 ? Afin de pouvoir mieux cerner ce problème et les besoins en terme de vaccination prophylactique, il est essentiel de pouvoir suivre ces patientes et de compléter ces données par l'inclusion d'autres patientes en âge de procréer en Haute-Vienne. De surcroît, parmi les génotypes oncogènes, tous n'ont pas le même potentiel de persistance et il a été montré pour les HPV 33 et 35 que des mutations au sein des protéines E6 et E7 peuvent favoriser la persistance (Gagnon, 2004). La distribution de ces variants au sein de la population sera également à surveiller.

Notre étude est encore insuffisante pour prédire l'efficacité des vaccins anti-HPV au sein de notre population. Il est donc impératif de connaître au mieux l'épidémiologie de cette infection virale afin de pouvoir adapter au plus juste les génotypes à inclure dans un vaccin multivalent.



La première partie de notre étude a permis de comparer la pertinence de 2 techniques de dépistage des HPV HR (technique de capture d'hybrides (Digene) vs technique d'amplification-hybridation (Argène)) en terme d'efficacité de dépistage de l'infection à HPV.

Notre étude a mis en évidence certaines difficultés rencontrées dans le diagnostic de l'infection à HPV HR telles que la détection des faibles charges virales, les réactions croisées et les fausse-positivités. Il est nécessaire de bien connaître ces limites afin de cibler les patientes à risque ou inversement éviter de sélectionner inutilement des patientes qui ne seraient pas à risque. Dans ces situations, il nous paraît utile de vérifier le résultat par typage moléculaire à l'aide d'une PCR consensus et éventuellement d'une PCR nichée en cas de faible charge virale.

En ce qui concerne l'épidémiologie des souches d'HPV, les résultats de notre étude ne sont que préliminaires. En effet, le typage moléculaire de la série de patientes incluses dans la comparaison de techniques a porté sur les résultats discordants. Ces résultats ne peuvent donc pas prétendre être représentatifs de l'épidémiologie réelle des souches d'HPV. Quant à la série de femmes enceintes, elle peut être intuitive sur la répartition des souches d'HPV en Limousin, mais il faut rappeler que c'est une série discontinue, les prélèvements n'ayant pu être réalisés que sur les patientes acceptant d'être incluses dans ce protocole. De ce fait, de nombreuses femmes enceintes ont échappé au dépistage et les résultats dont nous disposons ne sont qu'une vision partielle de l'épidémiologie réelle des souches d'HPV circulantes.

Dans un premier temps, nous projetons donc de typer par PCR et séquençage toutes les femmes de notre étude présentant un résultat HPV HR par la technique Digene. Parallèlement, l'inclusion de nouvelles patientes sera nécessaire au sein du protocole « femmes enceintes ». Ainsi, nous pourrions déterminer avec plus de précision l'épidémiologie des souches d'HPV HR dans notre région et prédire l'efficacité des futurs vaccins prophylactiques actuellement en développement.

ANNEXE 1. RÉSUMÉ DU SYSTÈME DE BETHESDA 2001

Extrait des recommandations Anaes 2002

QUALITÉ DU PRÉLÈVEMENT

- Satisfaisant pour évaluation
- Non satisfaisant pour évaluation (préciser la raison)

INTERPRÉTATION/RÉSULTAT

- Absence de lésion malpighienne intra-épithéliale ou de signe de malignité (*Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy*).

S'il y a lieu, préciser :

- présence de micro-organismes : *Trichomonas vaginalis* ; éléments mycéliens, par exemple évoquant le candida ; anomalies de la flore vaginale évoquant une vaginose bactérienne ; bactéries de type actinomyces ; modifications cellulaires évoquant un herpès simplex ;
- autres modifications non néoplasiques : modifications réactionnelles (inflammation, irradiation, ou présence d'un dispositif intra-utérin) ; présence de cellules glandulaires bénignes post-hystérectomie ; atrophie.

Anomalies des cellules malpighiennes :

- atypies des cellules malpighiennes (ASC) : de signification indéterminée (ASC-US) ou ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (ASC-H) ;
- lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade (LSIL), regroupant koïlocytes/dysplasie légère/CIN 1 ;
- lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (HSIL), regroupant dysplasies modérée et sévère, CIS/CIN 2 et CIN 3. Le cas échéant présence d'éléments faisant suspecter un processus invasif (sans autre précision) ;
- carcinome malpighien.

Anomalies des cellules glandulaires :

- atypies des cellules glandulaires (AGC) : endocervicales, endométriales ou sans autre précision (*Not Other Specified*) ;
- atypies des cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie : endocervicales ou sans autre précision (*Not Other Specified*) ;
- adénocarcinome endocervical *in situ* (AIS) ;
- adénocarcinome.

Autres (liste non limitative) :

- cellules endométriales chez une femme âgée de 40 ans ou plus.

Préciser si l'examen est automatisé et si la recherche des HPV a été réalisée.

Notes et recommandations concises, formulées en termes de suggestions, et si possible accompagnées de références.

BIBLIOGRAPHIE

Abma J. C., Sonenstein F. L. -Sexual activity and contraceptive practices among teenagers in the United States, 1988 and 1995.- Vital Health Stat 23, 2001, 1-79.

Akom E., Venne S. L'infection au virus du papillome humain. Institut National de Santé Publique du Québec. <http://www.inspq.qc.ca>. 2003.

Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. Recommandations pour la pratique clinique - Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal. 1998.

Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. Recommandations pour la pratique clinique - Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal. Actualisation 2002.

Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. Recommandations pour la pratique clinique - Evaluation de l'intérêt de la recherche des papillomavirus humains (HPV) dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. 2004.

Ault K. A., Giuliano A. R., Edwards R. P., *et al.* -A phase I study to evaluate a human papillomavirus (HPV) type 18 L1 VLP vaccine.- Vaccine, 2004, 22, 3004-3007.

Autillo-Touati A. -Cytologie cervicale. In: Aubin F, Prétet J L, Mouglin J L eds. Papillomavirus humains. Biologie et pathologie tumorale.- Paris: Editions TEC & DOC, 2003, p. 235-241.

Autillo-Touati A., Joannes M., d'Ercole C., *et al.* -HPV typing by in situ hybridization on cervical cytologic smears with ASCUS.- Acta Cytol, 1998, 42, 631-638.

Balmelli C., Roden R., Potts A., *et al.* -Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions.- J Virol, 1998, 72, 8220-8229.

Beby-Defaux A., Agius G. -Papillomaviridae. In: Huraux J M, Nicolas J C, Agut H, Peigue-Lafeuille H eds. Traité de Virologie médicale.- Paris: Estem, 2003, p. 267-273.

Bergeron C., Cartier I., Guldner L., *et al.* -Lésions précancéreuses et cancers du col de l'utérus diagnostiqués par le frottis cervical, Ile-de-France, enquête Crisap, 2002.- BEH, 2005, 2, 5-6.

Bosch F. X. -Epidémiologie des infections à HPV de type muqueux. In: Aubin F, Prétet J L, Mouglin J L eds. Papillomavirus humains. Biologie et pathologie tumorale.- Paris: Editions TEC & DOC, 2003, p. 335-357.

Bosch F. X., Manos M. M., Munoz N., *et al.* -Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group.- J Natl Cancer Inst, 1995, 87, 796-802.

Boulangier J. C., Sevestre H., Bauville E., *et al.* - Epidemiologie de l'infection à HPV.- Gynecol Obstet Fertil, 2004, 32, 218-223.

Bouvet J. P. -Immunité des muqueuses. In: Mege J L, Revillard J P, Raoult D eds. Immunité et infection. Concepts immunopathologiques et perspectives thérapeutiques.- Paris: Arnette, 1997, p. 27-38.

Bozon M. -A quel âge les femmes et les hommes commencent-ils leur vie sexuelle? Comparaison mondiale et évolution récente.- Population et Sociétés, 2003, 391, 1-4.

Breitburd F., Kirnbauer R., Hubbert N. L., *et al.* -Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection.- J Virol, 1995, 69, 3959-3963.

Brown D. R., Bryan J. T., Schroeder J. M., *et al.* -Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer.- J Infect Dis, 2001, 184, 1183-1186.

Carter J. J., Koutsky L. A., Hughes J. P., *et al.* -Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection.- J Infect Dis, 2000, 181, 1911-1919.

Castle P. E., Wheeler C. M., Solomon D., *et al.* -Interlaboratory reliability of Hybrid Capture 2.- Am J Clin Pathol, 2004, 122, 238-245.

Castle P. E., Schiffman M., Burk R. D., *et al.* -Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types.- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11, 1394-1399.

Chang M. H., Chen C. J., Lai M. S., *et al.* -Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group.- N Engl J Med, 1997, 336, 1855-1859.

Ciuffo G. -Innesto positivo con filtrato di verruca vulgare.- G Ital Mal Venereol, 1907, 48, 12-17.

Clavel C., Masure M., Putaud I., *et al.* -Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions.- J Clin Pathol, 1998, 51, 737-740.

Clavel C., Cucherousset J., Lorenzato M., *et al.* -Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high-grade cervical lesions.- Br J Cancer, 2004, 90, 1803-1808.

Connor N., Catchpole M., Rogers P. A., *et al.* -Sexually transmitted diseases among teenagers in England and Wales.- Commun Dis Rep CDR Rev, 1997, 7, R173-178.

Dalstein V., Prétet J. L., Mougin J. L. -Histoire naturelle de l'infection à HPV muqueux. In: Aubin F, Prétet J L, Mougin J L eds. Papillomavirus humains. Biologie et pathologie tumorale.- Paris: Editions TEC & DOC, 2003, p. 287-307.

de Cremoux P., Coste J., Sastre-Garau X., *et al.* -Efficiency of the hybrid capture 2 HPV DNA test in cervical cancer screening. A study by the French Society of Clinical Cytology.- Am J Clin Pathol, 2003, 120, 492-499.

de Roda Husman A. M., Walboomers J. M., van den Brule A. J., *et al.* -The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR.- J Gen Virol, 1995, 76, 1057-1062.

Deacon J. M., Evans C. D., Yule R., *et al.* -Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort.- Br J Cancer, 2000, 83, 1565-1572.

Douvier S., Dalac S. -Infections à papillomavirus.- Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses, 2004, 8-054-A-10, 19 p.

Dupuy C., Buzoni-Gatel D., Touze A., *et al.* -Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes.- J Virol, 1999, 73, 9063-9071.

El Mrini T., Arveux P., Gay C. -Estimation du coût de traitement du cancer du col de l'utérus.- Rev Epidemiol Santé, 1997, 45, 508-515.

Evans T. G., Bonnez W., Rose R. C., *et al.* -A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers.- J Infect Dis, 2001, 183, 1485-1493.

Exbrayat C. -Col de l'utérus. In: Remontet L, Buemi A, Velten M, Jouglà E, Estève J eds. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000.- Paris: Institut de Veille Sanitaire, 2003, p. 107-112.

Federschneider J. M., Yuan L., Brodsky J., *et al.* -The borderline or weakly positive Hybrid Capture II HPV test: a statistical and comparative (PCR) analysis.- Am J Obstet Gynecol, 2004, 191, 757-761.

Ferenczy A., Coutlee F., Franco E., *et al.* -Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments.- CMAJ, 2003, 169, 431-434.

Fife K. H., Wheeler C. M., Koutsky L. A., *et al.* -Dose-ranging studies of the safety and immunogenicity of human papillomavirus Type 11 and Type 16 virus-like particle candidate vaccines in young healthy women.- Vaccine, 2004, 22, 2943-2952.

Frazer I. H. -Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination.- Nat Rev Immunol, 2004, 4, 46-54.

- Gagnon S., Hankins C., Tremblay C., *et al.* -Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women.- *J Infect Dis*, 2004, 190, 1575-1585.
- Gissmann L., zur Hausen H. -Human papillomavirus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity.- *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73, 1310-1313.
- Hagensee M. E., Yaegashi N., Galloway D. A. -Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins.- *J Virol*, 1993, 67, 315-322.
- Harper D. M., Franco E. L., Wheeler C., *et al.* -Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial.- *Lancet*, 2004, 364, 1757-1765.
- Harro C. D., Pang Y. Y., Roden R. B., *et al.* -Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine.- *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93, 284-292.
- Hawes S. E., Critchlow C. W., Faye Niang M. A., *et al.* -Increased risk of high-grade cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical cancer among African women with human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections.- *J Infect Dis*, 2003, 188, 555-563.
- Hildesheim A., Wang S. S. -Host and viral genetics and risk of cervical cancer.- *Virus Res*, 2002, 89, 229-240.
- Ho G. Y., Burk R. D., Klein S., *et al.* -Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia.- *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87, 1365-1371.
- Hopfl R., Heim K., Christensen N., *et al.* -Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7.- *Lancet*, 2000, 356, 1985-1986.
- Howell L. P., Davis R. L., Belk T. I., *et al.* -The AutoCyte preparation system for gynecologic cytology.- *Acta Cytol*, 1998, 42, 171-177.
- Hughes J. P., Garnett G. P., Koutsky L. -The theoretical population-level impact of a prophylactic human papilloma virus vaccine.- *Epidemiology*, 2002, 13, 631-639.
- Husnjak K., Grce M., Magdic L., *et al.* -Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens.- *J Virol Methods*, 2000, 88, 125-134.
- Jones D. L., Munger K. -Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators.- *Semin Cancer Biol*, 1996, 7, 327-337.
- Klingelhutz A. J., Foster S. A., McDougall J. K. -Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16.- *Nature*, 1996, 380, 79-82.
- Koss L. G., Durfee G. R. -Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytic atypia.- *Ann N Y Sci*, 1956, 63, 1245-1261.

Koutsky L. A., Ault K. A., Wheeler C. M., *et al.* -A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine.- *N Engl J Med*, 2002, 347, 1645-1651.

Longuet M., Beaudenon S., Orth G. -Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39.- *J Clin Microbiol*, 1996, 34, 738-744.

Lorincz A. T., Reid R., Jenson A. B., *et al.* -Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types.- *Obstet Gynecol*, 1992, 79, 328-337.

Lowy D. R., Frazer I. H. -Chapter 16: Prophylactic human papillomavirus vaccines. In: Bosch F X, Schiffman M, Solomon D eds. *Futures directions in epidemiologic and preventive research on human papillomavirus and cancer.*- Oxford: J Natl Cancer Inst Monogr, 2003, p. 111-116.

Manos M. M., Ting Y., Wright D. K., *et al.* -Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus.- *Cancer Cells*, 1989, 7, 209-214.

Mao C., Koutsky L., Ault K. A., *et al.* -Prophylactic human papillomavirus (HPV) 16 virus-like-particle (VLP) vaccine prevents HPV16-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2-3. 44th International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.- Washington, D. C., 2004. Abstract G-1675a.

May M., Dong X. P., Beyer-Finkler E., *et al.* -The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1.- *Embo J*, 1994, 13, 1460-1466.

Miller K., Blumenthal P., Blanchard K. -Oral contraceptives and cervical cancer: critique of a recent review.- *Contraception*, 2004, 69, 347-351.

Monsonogo J., Autillo-Touati A., Bergeron C., *et al.* -Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-centre study.- *Br J Cancer*, 2001, 84, 360-366.

Moscicki A. B., Shiboski S., Hills N. K., *et al.* -Regression of low-grade squamous intraepithelial lesions in young women.- *Lancet*, 2004, 364, 1678-1683.

Munger K. -The molecular biology of cervical cancer.- *J Cell Biochem Suppl*, 1995, 23, 55-60.

Munoz N., Bosch F. X., de Sanjose S., *et al.* -Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.- *N Engl J Med*, 2003, 348, 518-527.

Nanda K., McCrory D. C., Myers E. R., *et al.* -Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review.- *Ann Intern Med*, 2000, 132, 810-819.

Nardelli-Haefliger D., Wirthner D., Schiller J. T., *et al.* -Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles.- *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95, 1128-1137.

Nicholls P. K., Moore P. F., Anderson D. M., *et al.* -Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes.- *Virology*, 2001, 283, 31-39.

Paraskevaidis E., Koliopoulos G., Alamanos Y., *et al.* -Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia.- *Obstet Gynecol*, 2001, 98, 833-836.

Payne J. F. -On the contagiousness of common warts.- *Br J Dermatol*, 1891, 3, 185-188.

Pinto L. A., Edwards J., Castle P. E., *et al.* -Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles.- *J Infect Dis*, 2003, 188, 327-338.

Preville X., Ladant D., Timmerman B., *et al.* -Eradication of established tumors by vaccination with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein.- *Cancer Res*, 2005, 65, 641-649.

Riethmuller D., Gay C., Bertrand X., *et al.* -Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction.- *Diagn Mol Pathol*, 1999, 8, 157-164.

Rigoni-Stern A. -Fatti statistici relativi alle malattie cancerose.- *Gior Servire Progr Pathol Terap*, 1842, 2, 507-517.

Roden R. B., Ling M., Wu T. C. -Vaccination to prevent and treat cervical cancer.- *Hum Pathol*, 2004, 35, 971-982.

Ronco G., Ghisetti V., Segnan N., *et al.* -Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy.- *Eur J Cancer*, 2005, 41, 297-305.

Rose R. C., White W. I., Li M., *et al.* -Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies.- *J Virol*, 1998, 72, 6151-6154.

Rose R. C., Lane C., Wilson S., *et al.* -Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies.- *Vaccine*, 1999, 17, 2129-2135.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. -DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.- *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74, 5463-5467.

Schiffman M., Castle P. E. -Human papillomavirus: epidemiology and public health.- *Arch Pathol Lab Med*, 2003, 127, 930-934.

Schiller J. T., Lowy D. R. -Human papillomavirus vaccines for cervical cancer prevention. In: Plotkin S A, Orenstein W A eds. *Vaccines*, 4th edition.- Philadelphia: Elsevier, 2004, p. 1259-1265.

Scott M., Nakagawa M., Moscicki A. B. -Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection.- *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8, 209-220.

Shope R. E. -Infectious papillomatosis of rabbits.- *J Exp Med*, 1933, 58, 607-624.

Sillman F. H., Sentovich S., Shaffer D. -Ano-genital neoplasia in renal transplant patients.- *Ann Transplant*, 1997, 2, 59-66.

Smith J. S., Green J., Berrington de Gonzalez A., *et al.* -Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review.- *Lancet*, 2003, 361, 1159-1167.

Solomon D., Schiffman M., Tarone R. -Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial.- *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93, 293-299.

Solomon D., Davey D., Kurman R., *et al.* -The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology.- *Jama*, 2002, 287, 2114-2119.

Strauss M. J., Bunting H., Melnick J. L. -Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas.- *J Invest Dermatol*, 1950, 15, 433-443.

Suzich J. A., Ghim S. J., Palmer-Hill F. J., *et al.* -Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas.- *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92, 11553-11557.

Taira A. V. -Evaluating human papillomavirus vaccination programs.- *Emerg Infect Dis*, 2004, 10, 1915-1923.

Tommasino M., Adamczewski J. P., Carlotti F., *et al.* -HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A.- *Oncogene*, 1993, 8, 195-202.

Villa L., Costa R., Petta C., *et al.* -A dose-ranging safety and immunogenicity study of a quadrivalent HPV (types 6/11/16/18) L1 VLP vaccine in women. 20th International Papillomavirus Conference.- Paris, Institut Pasteur, 2002. Abstract O099.

Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., *et al.* -Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.- *J Pathol*, 1999, 189, 12-19.

zur Hausen H. -Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types.- *Curr Top Microbiol Immunol*, 1994, 186, 131-156.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	10
GENERALITES	11
I. HISTORIQUE.....	12
II. STRUCTURE DU VIRION	13
III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION	16
1. Histoire naturelle de l'infection.....	16
2. Réponse immunitaire de l'hôte	18
IV. MECANISME D'ONCOGENESE.....	20
1. Mécanismes virologiques.....	20
2. Echappement à la réponse immunitaire	23
V. HISTOPATHOLOGIE DES LESIONS DU COL UTERIN	24
1. Le système Bethesda	24
2. Altérations cytologiques dues aux HPV.....	25
2.1. Lésions de bas grade (LSIL)	25
2.2. Lésions de haut grade (HSIL)	26
2.3. Carcinome malpighien	26
2.4. Atypies d'origine indéterminée : ASC-US et ASC-H.....	26
VI. EPIDEMIOLOGIE.....	27
1. Epidémiologie de l'infection génitale à HPV	27
2. Epidémiologie du cancer du col.....	29
VII. DETECTION DES HPV ET LESIONS CERVICALES ASSOCIEES	32
1. Les techniques de frottis cervicaux-utérins.....	32
1.1. Le frottis selon la méthode par étalement	32
1.2. Le frottis en milieu liquide	32
2. Diagnostic virologique de l'infection à HPV	33
2.1. La technique de capture d'hybrides : Hybrid Capture [®] 2 (HC2, Digene)	33
2.2. La Polymerase Chain Reaction ou PCR.....	34
2.3. Southern Blot.....	35
2.4. Hybridation in situ.....	36
3. Stratégie diagnostique actuelle.....	36
3.1. Place du frottis cervico-utérin	36
3.2. Intérêt du typage.....	37
3.3. Arbres décisionnels (ANAES 2002)	39
VIII. PRINCIPES THERAPEUTIQUES	41
1. Traitements locaux	41
1.1. 5-fluoro-uracile.....	41
1.2. Acide trichloroacétique	41
1.3. Interféron.....	41
1.4. Imiquimod (Aldara [®])	41
2. Traitements médicochirurgicaux.....	42
2.1. Méthodes destructrices.....	42
2.2. Méthodes de résection.....	42
IX. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES : APPROCHE VACCINALE	43
1. Vaccins prophylactiques	43
1.1. Principe.....	43
1.2. Premiers essais chez l'animal.....	44
1.3. Essais vaccinaux chez l'homme par voie parentérale : des résultats prometteurs	45

1.4. Stratégies vaccinales	46
2. Vaccins thérapeutiques.....	48
3. Vaccins combinés.....	50
INTRODUCTION A L'ETUDE EXPERIMENTALE	51
MATERIEL ET METHODES	54
I. MATERIEL	55
1. Patientes	55
2. Examen gynécologique et prélèvements	56
3. Types de prélèvements parvenus au laboratoire	56
II. METHODES	58
1. Hybrid Capture® 2 HPV Test.....	58
1.1. Principe.....	58
1.2. Critères de vérification de calibration du test.....	62
1.3. Calcul de la valeur seuil	63
1.4. Contrôle qualité.....	63
1.5. Interprétation des données.....	63
2. HPV Consensus (Argène)	64
2.1. Principe.....	64
2.2. Validation du test	69
2.3. Calcul de la valeur seuil	69
2.4. Interprétation des résultats	69
3. Amplification d'un fragment du gène <i>L1</i> par la PCR MY	70
4. Amplification d'un fragment du gène <i>L1</i> par la PCR nichée GP	70
5. Sensibilité des PCR MY et GP	71
6. Séquençage du gène <i>L1</i>	71
6.1. Principe.....	71
6.2. Réaction de séquence	72
6.3. Analyse des produits de séquence.....	72
7. Analyse statistique de la comparaison de techniques.....	72
RESULTATS	74
I. PREMIERE PARTIE : COMPARAISON DE TECHNIQUES DE DEPISTAGE	
VIROLOGIQUE DE L'INFECTION A HPV	75
1. Cytologie et dépistage virologique chez 94 patientes	75
2. Résultats de la technique Digene comparés aux résultats cytologiques.....	75
3. Résultats de la technique Argène comparés aux résultats cytologiques	77
4. Performances comparées des tests Digene et Argène	78
4.1. Résultats globaux	78
4.2. Comparaison des tests Digene et Argène.....	80
4.3. Pertinence comparée des 2 tests par rapport aux frottis.....	82
5. Amplification et séquençage du gène <i>L1</i> des patientes ayant des résultats discordants. .	82
5.1. Optimisation du protocole d'amplification du gène <i>L1</i>	83
5.2. Mise en évidence de la présence d'ADN viral dans les échantillons discordants.....	84
5.3. Analyse par typage moléculaire des résultats discordants, ou positifs HR/BR ou positifs avec la sonde générique.....	84
II. DEUXIEME PARTIE: EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A HPV CHEZ LES FEMMES ENCEINTES EN LIMOUSIN.....	90

DISCUSSION	93
I. PERFORMANCES ET PERTINENCE DE 2 METHODES DE DEPISTAGE DES HPV	
HR	94
1. Données cytologiques de notre étude.....	95
2. Performances comparées des 2 techniques de dépistage des HPV Digene et Argène	95
3. Interprétation des résultats discordants	97
3.1. Choix de la PCR.....	97
3.2. Génotypage des discordants	97
4. Analyse des génotypes	101
II. ETUDE DE PREVALENCE D'HPV CHEZ LES FEMMES ENCEINTES.....	102
CONCLUSION	104
ANNEXE	106
BIBLIOGRAPHIE	107

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 109

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

La persistance de papillomavirus humains (HPV) à haut risque est à l'origine du développement de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Il est donc essentiel de mettre en place des stratégies de dépistage efficaces. Dans ce contexte, nous avons comparé les performances et la pertinence de 2 techniques de dépistage d'HPV HR, une technique de capture d'hybrides (Digene) et une technique d'amplification-hybridation (Argène), sur une population de 94 patientes sélectionnées prioritairement sur une faible charge virale et la discordance éventuelle entre le résultat du test virologique et celui du frottis cervico-utérin. Nous avons ainsi mis en évidence les avantages et les difficultés d'interprétation de chacune des techniques. Nous avons montré l'excellente concordance des 2 techniques en dehors des valeurs proches du seuil de détection et nous avons également analysé les causes de discordance par typage moléculaire.

Nous avons étudié l'épidémiologie des souches d'HPV chez 139 femmes enceintes en Limousin. Dans cette population jeune, les résultats préliminaires du génotypage mettent en évidence une prévalence de 13% des HPV avec une répartition des génotypes divergeant de celle retrouvée dans d'autres études. Mais de nombreuses femmes enceintes ont échappé au dépistage et les résultats dont nous disposons ne sont qu'une vision partielle de l'épidémiologie réelle des souches d'HPV circulantes.

Genomic screening of human papillomavirus infection on cervical scrapes

High-risk HPV is recognised as necessary for the development of cervical cancer. HPV DNA testing is essential for an effective screening strategy. We have compared performance and pertinency of both HR HPV DNA test : Hybrid Capture 2 (Digene) and a polymerase chain reaction - hybridization assay (Argène). 94 women were selected on weak viral load and discordance between viral test and cytology results. Advantages and difficulties of interpretation were discussed for each test. Both test had nearly perfect agreement except for borderline or weakly positive values. Causes of discordance were analysed by molecular typing.

We studied epidemiology of HPV strain in a population of 139 pregnant women. In this population, HPV prevalence was 13% and first typing results showed a different type strain distribution with regard to other studies. But a lot of pregnant women passed out the screening so that present results are only a partial view of actual epidemiology of HPV strains.

DISCIPLINE : Médecine

MOTS-CLES : Papillomavirus Humain, dépistage, épidémiologie, vaccin

**LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIENE
CHRU DUPUYTREN
2 avenue Martin Luther King
87042 Limoges Cedex**