

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Cellulaire et Physiologie

Mémoire de Fin d'Etudes

Pour l'obtention du diplôme de "Master " en Biologie
Option : « Génétique Physiologie »

Thème

**DEPISTAGE DU HPV DANS LES LESIONS
CANCEREUSES ET PRECANCEREUSES DU COL
UTERIN PAR LE TEST HYBRID CAPTURE ® 2, PCR
AMPLICOR ® ET GENOTYPAGE.**

Réalisé par : M^{me} SOUAI-BENSAADA Nora

M^{me} AISSANI R.	M.A.A.	USDB	Président
M^{me} BENMANSOUR N.	M.A.A.	USDB	Examinatrice
M^{me} CHEKHMA A.	M.A.A.	USDB	Examinatrice
M^{me} KHALDOUN H.	M.A.A.	USDB	Promotrice
M^{me} SADOUKI N.	Ingénieur d'Etat en Biologie	IPA	Co-Promotrice
M^{me} MOHAMMEDI D.	M.A.(Chef Service)	IPA	Invitée d'honneur

Année Universitaire 2013/2014

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance vont particulièrement à :

- M^{me} KHALDOUN H. Maître Assistante Classe A à la faculté des Sciences Agro- Vétérinaires et Biologiques de l'Université de Blida pour avoir bien voulu diriger ce travail et pour tous ses conseils et ses orientations. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et déférence.*
- M^{me} AISSANI R. de la faculté des sciences Agro- Vétérinaires et Biologiques de l'Université de Blida qui nous a accordé l'honneur d'assurer la présidence du jury.*
- M^{me} CHEKHMAT A. de la faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques de l'Université de Blida pour avoir bien voulu accepté de juger ce travail.*
- M^{me} Benmanceur N. de la faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques de l'Université de Blida pour avoir bien voulu accepté de juger ce travail.*
- M^{me} Mohammedi D Responsable du laboratoire Herpes Virus Papillomavirus et Autres de l'Institut Pasteur d'Algérie pour m'avoir accepté et accueilli au sein du laboratoire.*
- Ma co-promotrice M^{me} SADOUKI N de l'institut Pasteur d'Algérie (Annexe : Sidi Fredj).pour avoir proposé le thème et surtout pour son accueil, ses conseils, sa gentillesse et serviabilité Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.*

- *Mme Seridi N à l'université Haouari Boumediene(USTHB), Pour m'avoir encouragé à poursuivre mes études en Master et aussi pour ses conseils et sa grande gentillesse.*
- *Mme BOUAOUNI Chef service de laboratoire de Biopathologie et Génétique de l'institut Pasteur d'Algérie pour sa gentillesse.*
- *M^r Mellouli Chef de service du Laboratoire Oncogenèse virale de l'Institut Pasteur d'Algérie (annexe sidi fredj) pour m'avoir accueilli au laboratoire.*
- *M^{me} BOUHADF EX RESPONSABLE DE Laboratoire BIOPATHOLOGIE ET Génétique de l'Institut Pasteur d'ALGERIE (annexe el hamma). Pour m'avoir permis de postuler pour un Master.*
- *M^{me} MAMMRI spécialiste à l'anatomie pathologie du laboratoire Biopathologie de l'Institut PATEUR EL HAMMA pour sa gentillesse,*
- *Mme Nedire chef service de formation de l'Institut pasteur de Daly Ibrahim pour m'avoir encouragé à réaliser cette thèse.*

Ma gratitude, mon respect et mes remerciements vont également aux biologistes du laboratoire de génétique de l'IPA, à Mlle SALHI Nawel et Mlle Yala Fella et à Mr OTSMANE Slimane pour leurs conseils et leurs encouragements durant toute la durée de mes thèses de Master I et II.

Un remerciement particulier et sincère à Mme HAROUZ FATMA et TAIBI FAIZA du personnel du L'Institut Pasteur de Sidi Fredj ; pour leur aide, leur encouragement.

Merci à tous



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes très cher parents : Nouari et Salîha que Je souhaite remercier tout particulièrement, qui m'ont toujours soutenue, même à distance, je vous aime très fort. Que Dieu vous accorde une santé prospère et une vie longue et heureuse.

A mon mari Aberaouf qui ma encourager et soutenu A tous les moments.

A mes chers petits, Maram et Khalîl.

A ma très chère sœur Samia ; merci pour les conseils et les encouragements.

A Mes frères : Abdelaziz, Ahmed, Abd elrahmen, Yacine , Réda ,Ali.

A mes belles mère Hakîma et Houria.

A mes nièces et neveux :Nour el houda, Amira ,Imen, Mouhamed el amine, Ibtissem, Anes, Raouane, Maroua ,Abd el samed ,Ayoub, Mouhamed.

Ames belles Sœurs : Amel, Nawel ,Akila, Ikram, Hayet, Souad.

Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour votre soutien sans faille tout au long de mes études. Trouvez ici l'expression de ma gratitude et ma reconnaissance.

A mes amie Trad fama zoha, Seffak Samira ,Kallech Rima, belouazded maya, Samia gouarir,Selmi Asma,Yacef.



Merci

à tous

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : CANCER DU COL DE L'UTERUS	03
I.1- Description anatomique et histologique	03
I.2- Lésions précancéreuses et cancéreuses	05
Chapitre II : PAPILOMAVIRUS HUMAINS (HPV).....	11
II.1- Biodiversité et pathologies associées	11
II.2- Structure et organisation génomique	12
II.3- Classification des HPV	13
II.4- Cycle de réplication	14
II.5- Les protéines virales et leur rôle dans la carcinogenèse	16
II.5.1- Rôle des Protéines E 1 à E 6	16
II.5.2- Le processus de carcinogenèse	17
II.6- Pouvoir pathogène	21
II.7- Mécanisme de transmission du HPV et facteurs de prédisposition	21
II.7.1- Mécanisme de transmission	21
II.7.2- Facteurs de prédisposition	22
II.8- Réponses immunitaires anti –HPV	23
II.9- Prévention	23

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre. I : MATERIEL ET METHODES	25
I.1- Matériel	26
I.1.1- Matériel biologique	26
I.1.2- Matériel non biologique	27
I.2- Méthodes	27
I.2.1 Hybrides captures 2 Digène	27
I.2.1.1 Principe	27
I.2.1.2 Protocole	27
I.2.2-Test PCR AMPLICOR HPV haut risque	30
I.2-2.1 Principe	30
I.2.2-2 Protocol.....	30
I.2.3LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test	33
I.2.3.1 Principe	33
I.2.3-2 Protocol	34
I.4 La RT-PCR qualitative E6 et E7	37
I.4.1 Principe	37
I.4.2 Protocol d'extraction de l'ARN Total	37
Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION	
II.1- Résultats	41

II.1.1- Résultats des patientes précancéreuses	42
II.1.2- Résultats des patientes cancéreuses	48
II.1.3- Résultats de la RT-PCR	51
II.2 Discussion	53
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	58
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59
ANNEXES	

Liste des tableaux

Tableau I : Equivalence entre les différentes classifications histologiques et cytologiques des lésions HPV-induites.

Tableau II : Terminologie utilisée dans les rapports d'examens cytologiques selon le système de Bethesda.

Tableau III : Rôle des protéines des papillomavirus à haut risque.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'appareil génital féminin et structure du col de l'utérus.

Figure 2 : Représentation schématique et histologique de la zone de jonction - pavimentocylindrique.

Figure 3 : Histoire naturelle du cancer du col.

Figure 4 : Aspect cytologique (rangé du haut) et colposcopique (rangé du bas) représentant un col utérin sain.

Figure 5 : Arbre phylogénétique des papillomavirus humains

Figure 6 : Organisation du génome d'HPV de type 16.

Figure 7: Représentation des principales étapes du cycle des Papillomavirus dans l'épithélium squameux.

Figure 8 : Schéma simplifié de la carcinogénèse induite par les papillomavirus de haut Risque.

Figure 9 : E6 et le cycle cellulaire

Figure 10 : E7 et le cycle cellulaire.

Figure 11 : Les VLP.

Figure12 : Dispositif de prélèvement.

Figure 13 : Hybridation de la sonde avec l'ADN.

Figure 14 : Transfert des échantillons de microtube vers microplaque.

Figure 15 : Ajout de l'anticorps antihybride conjugué à de la phosphatase alcaline (réactif de détection 1).

Figure 16 : ajout de substrat chimiluniscent (réactif de détection 2).

Figure 17 : Schéma Récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation du test Hybrid capture®2.

Figure 18 : à gauche représente l'ajout de l'échantillon dans le tube eppendorf et à droite représente la colonne CLM et tube d'éluion.

Figure 19 : ADN Amplifier.

Figure 20 : (A) :L'ajout de solution de dénaturation.une partie d'aliquote d'amplicons dénaturés HPV et β -globine (marqués á la biotine). (B) : Transférés d'Amplicon dans des puits distincts des microplaques (MWP) équipées de sondes HPV-HR ou de sondes

oligonucléotidiques spécifiques de la β -globine. (C) : Ajout de l'acide sulfurique (solution d'arrêt) dans tous les puits.

Figure 21 : La coloration final après l'ajout de solution d'arrêt.

Figure 22 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation du test d'amplification PCR.

Figure 23 : Bain marie sous agitation.

Figure 24 : La plaque avec les bandelettes dans le bain marie sous agitation

Figure 25 : La plaque avec les bandelettes sur l'agitateur de plaque.

Figure 26 : Séchage des bandelettes du génotypage en plaçant le guide de référence du test sur les bandelettes de génotypage.

Figure 27 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation du test de génotypage.

Figure 28 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation de l'extraction d'ARN jusqu'à RT-PCR.

Figure 29 : Etude des prélèvements de lésions précancéreuses.

Figure 30 : Répartition des 173 prélèvements de la lésion précancéreuse en fonction de l'âge.

Figure 31 : Répartition des femmes selon la parité.

Figure 32 : Répartition des patientes selon les techniques utilisées.

Figure 33 : Répartition des frottis réalisés confirmés ou non histologiquement.

Figure 34 : prévalence des HPV positifs dans les 173 prélèvements cervicaux.

Figure 35 : Répartition des génotypes dans les HPV-HR.

Figure 36 : Répartition des femmes HPV-HR en fonction de la prise de contraception.

Figure 37 : Répartition des femmes selon la durée de la prise des contraceptifs oraux.

Figure 38 : la prévalence HPV-HR dans les lésions précancéreuses.

Figure 39 : Répartition des 28 prélèvements cancéreux en fonction de l'âge.

Figure 40 : Répartition des patientes présentant un cancer du col selon la parité.

Figure 41 : Prévalence des HPV-HR positifs en fonction de la tranche d'âge.

Figure 42 : prévalence des HPV positifs dans les 28 prélèvements des patientes présentant un cancer du col.

Figure 43 : Prévalence des HPV-HR dans les cancers.

Figure 44 : Prévalence des génotypes d'HPV chez des patientes cancéreuses.

Figure 45 : la prévalence du papillomavirus humains dans les lésions précancéreuses et dans le cancer.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléiques.

Ac : Anticorps.

AGC : Atypie de cellules glandulaires pouvant être endocervicales ou endométriales ou sans autre indication.

AIS : Adénocarcinome endocervical in situ.

AP-1 : **Activator Protein 1** (facteurs de transcription).

ARF: Alternative Reading Frame.

ARN: Acide RiboNucléique

ASC : (**A**typical **S**quamous cells) :Atypies de cellules épithéliales.

ASC-H : (*Atypical Squamous Cell cannot exclude HSIL*).Atypies de cellules épithéliales ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliales de haut grade.

ASCUS : (*Atypical Squamous Cell of Indetermined Significance*). Atypies de cellules épithéliales.de signification indéterminée.

CDK : Cycline dépendante kinase.

CIN : Cervical Intra épithélial Neoplasia.

CK II : Caséine Kinase II.

CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité.

CR : Région Conservé.

E2F : Facteur de transcription.

FCV : Frottis Cervico- Vaginal.

HAS : Haute Autorité de santé.

HDAC : Histone Déacetylase.

HPV : Human Papillomavirus.

PV-HR : Papillomavirus humains à haut risque oncogène.

H-SIL : (**H**igh grade squamous intraepithelial lesions) ; lésion à risque élevé d'évolution vers un cancer invasif.

HSIL : Lésion malpighienne intra épithélial de haut grade.

LCR : Long control Region.

L-SIL : **L**ow grade squamous intraepithelial lesions (lésion à faible risque d'évolution vers un cancer invasif).

LSIL : Lésion malpighienne intra épithélial de bas grade.

mdm2 : Mouse double minute 2.

OMS : Organisation Mondial de la santé.

ORF : Open Reading Frame.

PRb : Protéine de rétinoblastome.

P53 : Protéine cellulaire de 53 kDa.

PAE: Poly Adenylation Early.

PAL: Poly Adenylation Late.

PCR : Polymérase Chain Réaction.

PDZ : Protéine à domaine Z.

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

RT-PCR : Reverse Transcriptase polymerase Chain Réaction.

SCC : Squamous Cell carcinoma.

SV-40 : Virus simien 40.

VLP : Virus like particule.

Glossaire

Cancer invasif du col de l'utérus : Au niveau de la muqueuse du col de l'utérus, quand les cellules cancéreuses ne dépassent pas une certaine limite (la membrane basale) on parle de

Cancer in situ : quand la membrane basale est franchie, on parle de cancer invasif (atteinte dans ce cas de structures voisines).

Cancer : désigne une prolifération anormale des cellules. Ainsi, presque tous les tissus de notre organisme peuvent être affectés par un dérèglement dans la division cellulaire dont les causes, les évolutions et les conséquences sont très diverses.

Carcinome : cancer de cellule épithéliale, par exemple, un cancer d'un tissu glandulaire prendra le nom d'adénocarcinome.

Clairance virale : élimination du virus par le système immunitaire. Cette élimination est associée à la régression des lésions éventuellement présentes (en dehors des lésions cancéreuses invasives).

Conisation : technique chirurgicale qui consiste en l'ablation d'un fragment du col de l'utérus en forme de cône.

Dysplasie : formation de cellules anormales que l'on retrouve entre autre, au cours des diverses étapes de formation des lésions préneoplasiques (dysplasies légère, modérées et sévères du col utérin).

Epithélium : terme associé aux cellules qui recouvre la surface externe du corps et cavités internes.

Incidence : nombre de nouveaux cas de patients atteints d'une maladie pendant une période donnée.

Néoplasie : signifié nouvelle « formation » s'applique à la fois aux formes bénignes et malignes.

Résumé

Le cancer du col utérin reste une cause importante de décès chez la femme dans les pays en voie de développement en raison principalement de l'échec à mettre en place un programme effectif de détection des lésions précancéreuses par frottis cervical.

Notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire herpes virus - papillomavirus et autres de l'Institut Pasteur d'Alger –département de virologie, annexe sidi Fredj durant une période de 6 mois, sur 226 échantillons de patientes présentant :

Des lésions précancéreuses (173 cas), un cancer cervical (28 cas) et celles ne présentant aucune infection du col (25 cas) (témoin).

Dans le cadre de ce travail nous avons utilisée 3 méthodes pour la détection et le génotypage du papillomavirus : les méthodes Hybride Capture II, Amplicor Roche, LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test de Roche.

La prévalence du HPV par le test PCR Amplicor est de 5,7% des cas des lésions précancéreuses et 80% dans les lésions cancéreuses.

Le génotype prédominant par le test Linear array Genotyping est le HPV 16 caractérisant la majorité des cancers (41% dans les carcinomes épidermoïdes et 66% dans les adénocarcinomes) tandis que Le couple HPV16 /HPV18 ont est détectés dans 70% des cas de cancer cervical.

La durée de la prise des contraceptifs oraux favorise l'évolution du cancer du col de l'utérus chez les femmes HPV positifs de ce fait les femmes prenant une contraception orale sur une longue durée (> 5 ans) 83.3% que chez les femmes prenant une contraception orale sur période plus courte (< 5ans) 16.7%.

Mots clés : HPV, Lésions précancéreuses, Lésions cancéreuses, Génotypage, PCR Amplicor, hybrid captur II, contraceptifs oraux.

ABSTRACT

The cervical cancer stays an important cause of death among women in developing countries mainly due to the failure to implement an effective program to detect precancerous cervical smear.

The study in the laboratory of virology of the Pasteur Institute of Algeria during 6 months.

The study concerned 226 samples of the patients with precancerous lesions (173 cases), cervical cancer (28 cases) and those having no cervical infection (25 cases).

As part of this work we used 3 methods for the detection and genotyping of HPV:

- Hybrid Capture II
- Amplicor Roche.
- Linear array HPV Genotyping.

Prevalence of the HPV is 5.7% of the cases of precancerous lesions and 80% in the cancerous lesions. (By PCR AMPLICOR method).

The dominant genotype is the HPV 16 characterizing the majority of cancer (41% in epidermoid carcinoma and 66% in adenocarcinoma). the couple HPV 16/HPV 18 has are detected in 70% of the cases of cervical cancer.

The duration of taking oral contraceptives promotes the progression of cervical cancer among women HPV-positive, thus the risk is higher in women taking oral contraceptives over a long period (more than 5 years) (83.3%) than in women taking oral contraceptives for a shorter period (less than 5 years) 16.7%.

Key words:

HPV, precancerous lesions, cancerous lesions, genotyping, PCR Amplicor, hybrid captur II, oral contraceptives

ملخص

يظل سرطان عنق الرحم السبب الرئيسي للوفاة الرئيسي عند النساء في البلدان النامية و يرجع ذلك إلى عدم تنفيذ برنامج فعال للكشف على آفات سابقة للتسرطن عن طريق مسحة عنق الرحم.

- قمنا بهذه الدراسة في مخبر فيروس (Herpes) و فيروس ورم الحليمي البشري (Papillomavirus) و أخريات ، بمعهد باستور بالجزائر فرع الفيروسات بسيدي فرج على مدى 06 أشهر.

- كجزء من هذا العمل استخدمنا ثلاث طرق للكشف و معرفة النمط الجيني لفيروس الورم الحليمي البشري:

● التقاط الهجين 2

● تفاعل البلمرة المتسلسل

● تقنية الكشف على النمط الجيني.

- شملت هذه الدراسة 226 عينة لمريضات لديهن:

● 173 حالة لديهن جروح ما قبل سرطانية.

● 25 حالة ليست لديهن أية أعراض

● 28 حالة لديهن جروح سرطانية

- معدل انتشار التهابات الفيروس الورم الحليمي البشري بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسلة يقدر بـ: 5.7% عند الجروح ما قبل السرطانية و80% عند الجروح السرطانية.

- النمط الوراثي السائد بتقنية كشف عن نمط الجيني هو نوع 16 للفيروس ورم الحليمي البشري هو الأبرز عند سرطانات :

(carcinome epidetmîdes %41)-

(Adéro carcinomes 66%) -

- لكن الثنائية و فيروس ورم الحليمي البشري 16 و 18 موجود في أكثر من 70% عند سرطان الرحم.

- مدة تناول أقراص منع الحمل عن طريق الفم ، تعزز تطور سرطان عنق الرحم عند النساء حاملات الفيروس و بالتالي خطر أعلى عند النساء اللواتي يتناولن حبوب لفترة طويلة أكثر من 5 سنوات (83.3%) و بالتالي اللواتي يتناولنها لفترة أقصر من 5 سنوات (16.7%).

الكلمات المفتاحية:

الفيروس الورم الحليمي ، جروح ما قبل سرطانية ، جروح سرطانية ، نمط الجيني ، تفاعل البلمرة المتسلسلة (PCR) ، و التقاط الهجين 2 ، أقراص منع الحمل.

INTRODUCTION

Introduction

De nombreux cancers sont en rapport avec les virus ; un récent rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 15% des cancers de tous types ont une étiologie virale. Les papillomavirus (HPV) sont très répandus chez l'homme, certains types de HPV sont associés au développement de cancers, en particulier le cancer du col de l'utérus. **(Segondy et Nicolas, 2008).**

Le cancer du col de l'utérus est une pathologie d'origine infectieuse. Le cancer du col est le second cancer le plus fréquent chez la femme avec près de 500 000 nouveaux cas annuels et environ 275 000 décès. Il est classé au deuxième rang des cancers chez la femme dans le monde en termes d'incidence et au premier rang en termes de mortalité, principalement dans les pays en voie de développement **(Dupont, 2008).**

L' HPV est un des facteurs permettant le développement du cancer du col utérin. Mais une période d'environ 10ans est nécessaire entre l'infection par le HPV à haut risque et le diagnostic du cancer invasif. A ce facteur sont associés d'autres facteurs liés à l'hôte ou liés au virus et qui sont incriminés dans l'apparition et l'évolution des lésions cervicales précancéreuses **(Stoler et Schiffman, 2001).**

La lente évolution des lésions précancéreuses permet de dépister ces lésions avant le stade invasif. L'efficacité du frottis Cervico-vaginal dans le dépistage des lésions cervicales n'est plus à prouver et cette technique a permis une forte diminution de l'incidence relative du cancer du col utérin depuis les années 1950 ; mais les limites de cette technique reste importante **(Stoler et Schiffman, 2001).**

Ce test s'est montré totalement insuffisant d'où l'intérêt de nouvelles méthodes performantes de biologie moléculaire dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses liées a la présence du HPV.

Actuellement, plusieurs tests de dépistage et génotypage tels que l'hybridation *in situ*, l'immunohistochimie, la PCR et la RT-PCR sont intéressantes aussi bien sur le plan de la sensibilité que de la reproductibilité.

Notre étude à été réalisée au niveau de laboratoire herpes virus - papillomavirus et autres de l'institut Pasteur d'Alger –département de virologie, annexe sidi fredj durant une période de 6 mois.

Les objectifs de ce travail sont :

- Etude de la prévalence du papillomavirus humain dans les lésions précancéreuses.
- Génotypage des HPV dans les cancers Epidermoide et dans les lésions précancéreuses.

- La mise en place de la RT-PCR pour l'étude de l'expression des gènes du papillomavirus

Ce manuscrit se subdivise en deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique présentant des généralités sur le cancer du col utérin et sur le papillomavirus humain.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale et est divisée en deux chapitres :
 - Le premier chapitre : porte sur la description du matériel utilisé ainsi que sur le protocole expérimental (matériel et méthodes).
 - Le deuxième chapitre présente les résultats obtenus suivis de leur discussion et enfin une conclusion.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : CANCER DU COL DE L'UTERUS

I.1- Description anatomique et histologique

Le col utérin est la partie la plus inférieure de l'utérus et met en communication le corps de l'utérus avec le vagin et l'extérieur. De forme conique, il mesure 2 à 3 cm de long et présente un orifice à bord régulier. Le col utérin est composé de deux parties : l'exocol et l'endocol (**Figure 1**) (**Dachez, 2008**).

- a) **L'exocol** : est la partie visible du col et s'étend jusqu'à la partie haute du vagin. Il est recouvert d'un épithélium malpighien non kératinisé composé de trois couches cellulaires : la couche profonde faite de cellules cubiques prolifératives dites cellules basales, la couche moyenne faite de cellules matures polyédriques riche en glycogène et la couche superficielle faites de cellules aplaties et vieillissantes, prêtes à desquamier. L'épithélium est séparé du stroma par une lame basale nécessaire au maintien de la structure. En sa partie centrale, l'exocol contient l'orifice externe (**Dachez, 2008**).
- b) **L'endocol** : est la partie qui relie l'orifice externe à l'isthme utérin. Il est recouvert d'un épithélium glandulaire simple, cylindrique, formé d'une seule couche cellulaire. Cet épithélium s'invagine dans le stroma sous-jacent formant ainsi des glandes endocervicales. Des cellules ciliées et des cellules muco-sécrétantes (produisant la glaire cervicale) sont retrouvées au sein de cet épithélium (**Dachez, 2008**).
- c) **La zone de jonction** : correspond à la zone de rencontre entre les deux épithéliums. C'est une zone de transition brusque entre l'épithélium malpighien de l'exocol et l'épithélium glandulaire de l'endocol. Cette région, appelée « jonction pavimento-cylindrique » est moins résistante aux agressions virales et aux HPV en particulier. Au cours de la période d'activité génitale, cette zone va être soumise à des modifications hormonales (cycles menstruels) et mécaniques (relations sexuelles, grossesses), qui vont aboutir à une tendance à l'éversion de l'épithélium glandulaire. La région éversée va subir une métaplasie malpighienne, c'est-à-dire la transformation de l'épithélium glandulaire en épithélium malpighien d'architecture normale : on parle alors de « **zone de transformation** ». C'est au niveau de cette zone que sera initiée la majorité des lésions cervicales (**Dachez, 2008**)

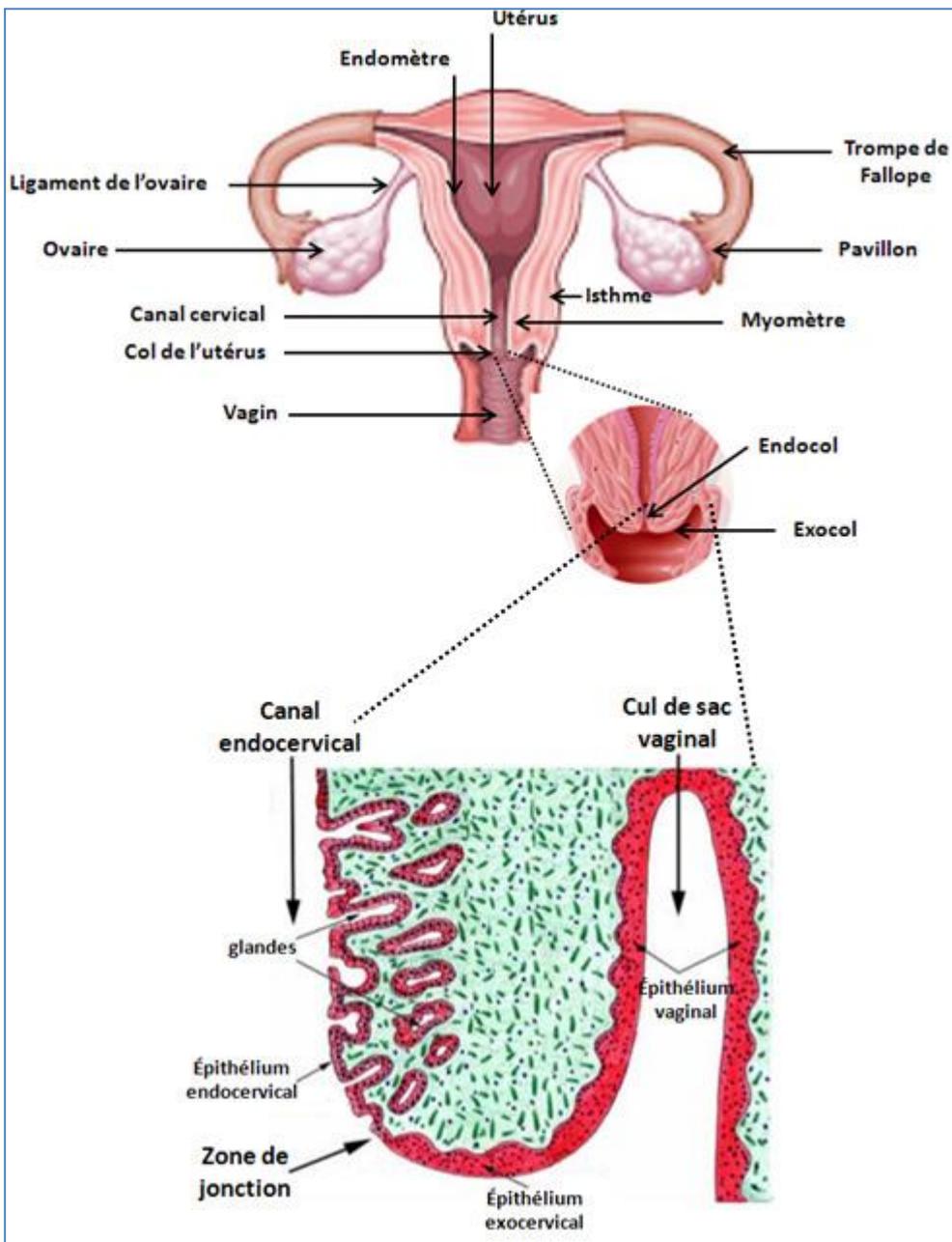


Figure 1: Représentation schématique de l'appareil génital féminin et structure du col de l'utérus (Aubin, 2003).

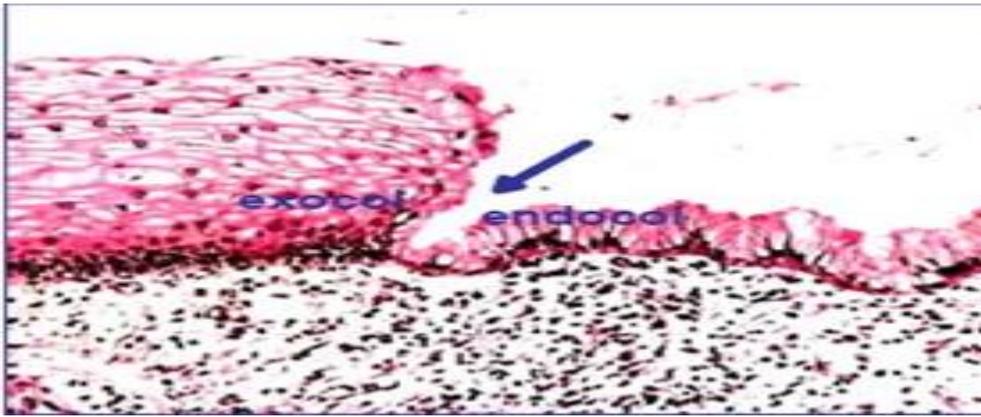


Figure 2 : Représentation histologique de la zone de jonction pavimento-cylindrique par la coloration Hématoxyline éosine (HE). Grossissement 40 (Les flèches bleues représentent la jonction pavimento cylindrique (Monnier et Benoit, 2007)).

I -2-Lésions précancéreuses

Les papillomavirus à haut risque (HPV-HR) vont favoriser le développement de lésions précancéreuses qui débutent le plus souvent à la zone de jonction et s'étendent plus rarement le long de l'exocol et du canal endocervical. Parmi les lésions liées à l'infection à HPV productive, les condylomes acuminés sont très fréquents mais n'entraînent aucun risque d'évolution vers une lésion précancéreuse. Les condylomes acuminés correspondent à des verrues bénignes dont l'aspect le plus fréquent ressemble à des « crêtes de coq ». Les autres types de lésions liées aux HPV correspondent à des lésions de bas grade comprenant les condylomes plans et les lésions CIN1 (CIN : *Cervical Intra épithélial Neoplasia*). (Dachez, 2008 et Aubin, 2003).

La dysplasie et le cancer du col de l'utérus sont des conséquences possibles de l'infection génitale par des types oncogènes d'HPV. Ce sont les types 16 et 18 dits à haut risque qui sont responsables de plus de 70 % de ces cancers dans le monde (Waboomers et al. 1999).

I-2-1-Histoire naturelle des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin

La connaissance de l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus est très importante dans la compréhension de cette pathologie, qui permet la mise en place des stratégies de dépistage.

C'est un processus lent précédé par plusieurs stades de lésions précancéreuses ou dysplasies (les néoplasies Cervicales intra-épithéliales ou CIN) faisant suite à la persistance de

l'infection génitale par HPV-HR. Certains stades sont facultatifs et d'autres sont nécessaires (CIN3) à l'apparition d'un cancer invasif.

Selon le degré d'atteinte dans l'épaisseur de l'épithélium endocervical, on peut caractériser les lésions par une classification histologique ou cytologique. (Melnikow, 1992)

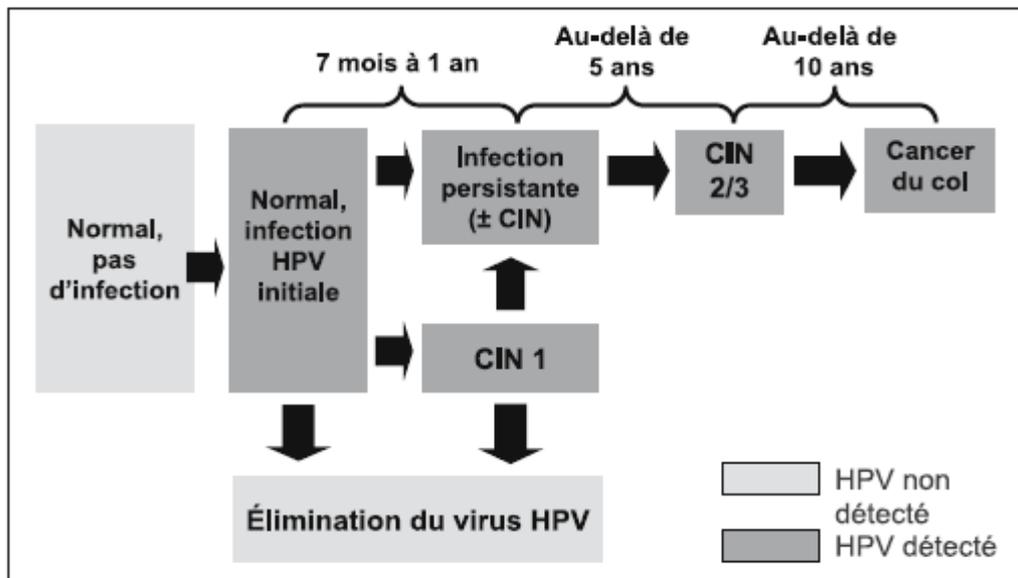


Figure 3: Histoire naturelle du cancer du col. (Monsonogo, 2006).

I-2-2-Epidémiologie

Le cancer du col est le second cancer le plus fréquent chez la femme avec près de 500.000 nouveaux cas annuels et environ 275 000 décès sont répertoriés chaque année à l'échelle mondiale. Plus de 80 % des cas de cancer du col surviennent dans les pays en développements. Les prévalences les plus élevées sont rapportées d'Afrique sub-saharienne, d'Amérique latine, des Caraïbes, de la Mélanésie et d'Asie centrale et du Sud-ouest. (Karly et al., 2008)

La majorité des cancers du col sont des carcinomes malpighiens. Les adénocarcinomes ne représentent qu'environ 10 %. Toutefois, la proportion des adénocarcinomes est plus élevée (jusqu'à 25 %) dans les pays industrialisés en raison de la prévention basée sur le dépistage cytologique. (Karly et al., 2008)

Depuis l'introduction du test de dépistage cytologique dans les années 40, l'incidence et la mortalité des carcinomes malpighiens a significativement diminué.

Cependant, malgré des programmes de dépistage étendu, les adénocarcinomes sont devenus plus fréquents, essentiellement chez les jeunes femmes. Cette situation reflète le

manque de sensibilité relative du test pour détecter les lésions précancéreuses des adénocarcinomes du col, par rapport aux lésions précancéreuses des carcinomes malpighiens **(Karly et al., 2008)**.

Le risque d'être atteint d'un cancer du col utérin au cours de la vie est estimé à 4% dans les pays en voie de développement et inférieur à 1% dans les pays industrialisés. **(Duport, 2008)**.

Pour pouvoir éradiquer ce cancer, il est indispensable d'augmenter la couverture de la population à dépister, d'améliorer la qualité des échantillons en développant par exemple le frottis en couche mince et la cytologie automatisée, d'optimiser le dépistage en proposant une recherche de papillomavirus', d'assurer une meilleure prise en charge des frottis anormaux et enfin, de surveiller attentivement les femmes traitées **(Mougin et al., 2001)**.

En Algérie, le cancer du col de l'utérus représente la deuxième cause de mortalité féminine après le cancer du sein, son incidence dans notre pays est de 13 cas pour 100 000 habitants, ce qui représente 3000 nouveaux cas chaque année. **(Maingon et al., 2005)**.

I-2-3- Classification des lésions précancéreuses :

➤ **La classification histologique de Ralph Richart** permet de distinguer trois grades de dysplasies établis en fonction de la hauteur de l'épithélium atteint et comportant les anomalies citées précédemment (Richart, 1975). Parmi ces pré-cancers, on distingue :

- les modifications ne dépassant pas le tiers inférieur de l'épithélium et qui correspondent à une CIN1 ou dysplasie légère,
- les modifications ne dépassant pas le tiers moyen de l'épithélium et qui correspondent à une CIN2 ou dysplasie modérée
- les modifications couvrant toute la hauteur de l'épithélium et qui correspondent à une CIN3 ou dysplasie sévère (carcinome *in situ*).

On distingue deux types de formes histologiques de cancers invasifs :

- le carcinome épidermoïdes ou SCC (*Squamous Cell Carcinoma*) qui représente 80 à 95% des formes de cancer du col utérin et qui se développe à partir de l'épithélium malpighien de l'exocol,
- l'adénocarcinome qui se développe à partir de la muqueuse de l'endocol **(Ismail et al., 1989)**.

- **La classification cytologique de Bethesda** : basée sur la classification de dysplasie classée en 2 groupes :
 - les lésions à faible risque d'évolution vers un cancer invasif (**low grade squamous intraepithelial lesions ou L-SIL**).
 - lésions à risque élevé (**High grade squamous intraepithelial lesions ou HSIL**) (N Gilimana, Eeckeles P, 2005).

Dans le cas d'une cytologie anormale, l'HAS (Haute Autorité de santé) recommande d'effectuer un examen colposcopique avec la réalisation d'une biopsie cervicale dirigée (si nécessaire) ou encore d'un curetage endocervical.

Des équivalences entre les classifications cytologiques et histologiques des lésions HPV-induites ont été établies (Ismail et al., 1989).

Ces équivalences sont résumées dans le tableau 1.

La terminologie utilisée dans les rapports d'examens cytologiques selon le système Bethesda est présentée dans le tableau 2.

Tableau I : Equivalence entre les différentes classifications histologiques et cytologiques des lésions HPV-induites (Monsonogo, 2007).

OMS (histologie)	Richart (1973) (histologie)	Richart (1990) (histologie)	Bethesda (2001) (cytologie)
Dysplasie légère	CIN1	CIN de bas grade	LSIL
Dysplasie moyenne	CIN2	CIN de haut grade	HSIL
Dysplasie sévère	CIN3	CIN de haut grade	HSIL

Tableau II : Terminologie utilisée dans les rapports d'examens cytologiques selon le système de Bethesda (Solomon et al., 2002).

Anomalies des cellules malpighiennes	
ASC (<i>Atypical Squamous Cells</i>)	Atypies de cellules épithéliales
ASCUS (<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>)	Atypies de cellules épithéliales de signification indéterminée
(ASC-H = <i>Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL</i>)	Atypies de cellules épithéliales ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade
LSIL (<i>Low grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)	Lésions malpighiennes intraépithéliales de bas grade regroupant les lésions à HPV, les condylomes, les dysplasies légères ou CIN1
HSIL (<i>High grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>)	Lésions malpighiennes intraépithéliales de haut grade regroupant les dysplasies modérées et sévères, CIN2, CIN3 et CIS (Carcinome <i>In Situ</i>)
Carcinome invasif du col utérin	
Anomalies des cellules glandulaires	
AGC (<i>Atypical Glandular Cells</i>)	Atypies des cellules glandulaires pouvant être endocervicales ou endométriales ou sans autre indication
Atypies de cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie	Atypies de cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie, soit endocervicale, soit sans autre indication,
AIS	Adénocarcinome endocervical <i>in situ</i>
adénocarcinome	Adénocarcinome soit endocervical, soit endométrial, soit extra-utérin, soit AIS

I-2-4-Les Moyens de diagnostic des lésions précancéreuses du col de l'utérus :

Pour évaluer les lésions épithéliales du col utérin trois examens complémentaires existent : la cytologie, la colposcopie et l'histologie.

La cytologie est une méthode non invasive qui consiste à prélever des cellules de l'épithélium muqueux à l'aide d'une cytobrosse par exfoliation et à les observer au microscope optique à l'immersion (x100).

L'utilisation de cette méthode de détection repose sur le fait que les cellules exfoliées que l'on observe sont représentatives de la lésion sous-jacente. Cette méthode de détection est simple, peu onéreuse et possède une spécificité élevée (90%).

Les prélèvements effectués au niveau du col de l'utérus sont interprétés après une coloration spécifique (Papanicolao) afin de déterminer le type d'anomalie et son degré.

Cependant le risque de faux négatifs reste important. En effet, seulement 51 % des CIN et des cancers seraient diagnostiqués par cette méthode. Afin de préciser le diagnostic, **une colposcopie** (examen du col de l'utérus au moyen d'un appareil optique grossissant et d'un éclairage puissant), peut être réalisé. Des outils de biologie moléculaire sont utilisés afin de détecter la présence de séquences d'ADN ou d'ARN messagers provenant des HPV dans les prélèvements. Ces tests ont l'avantage d'être plus sensibles et reproductibles. Seule l'analyse **histopathologique** d'une biopsie cervicale permet d'établir le diagnostic définitif et de définir le mode de traitement. Le traitement du cancer du col de l'utérus va dépendre du stade d'évolution de la maladie, de la taille de la tumeur, de l'âge de la patiente et de son état de santé générale.

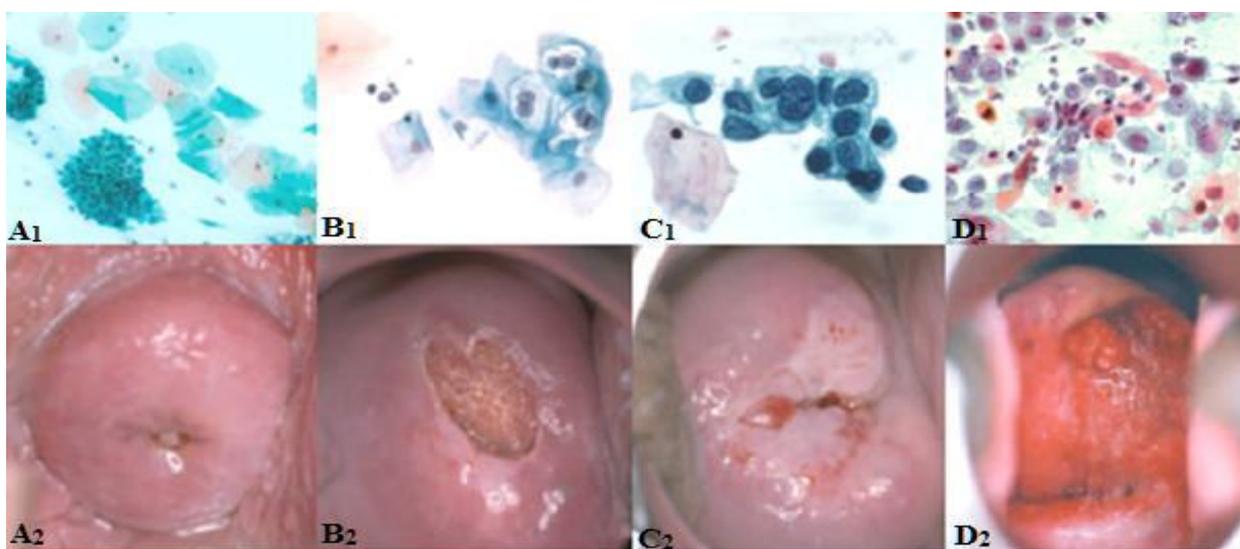


Figure 4 : Aspect cytologique (rangée du haut) et colposcopique (rangée du bas) représentant un col utérin sain (A1, A2), une lésion de bas grade (B1, B2), une lésion de haut grade (C1, C2), un cancer invasif (D1, D2) (Schiff et al., 2005).

Chapitre II : Papillomavirus humains

II-1. Biodiversité et pathologies associées

Les papillomavirus (du latin papilla, diminutif de papula signifiant bouton et du suffixe grec –ome désignant le caractère tumoral) sont responsables chez l’homme, d’une grande variété de lésions cutanées et des muqueuses rassemblées sous le nom de papillomes viraux (verruques cutanées et anogénitales, papillomes oraux et laryngés, épidermodysplasies verruciformes). Au cours de leur vie, 80 % des femmes sexuellement actives ont été ou sont infectées par un papillomavirus humains.(Baseman,ky, 2005).

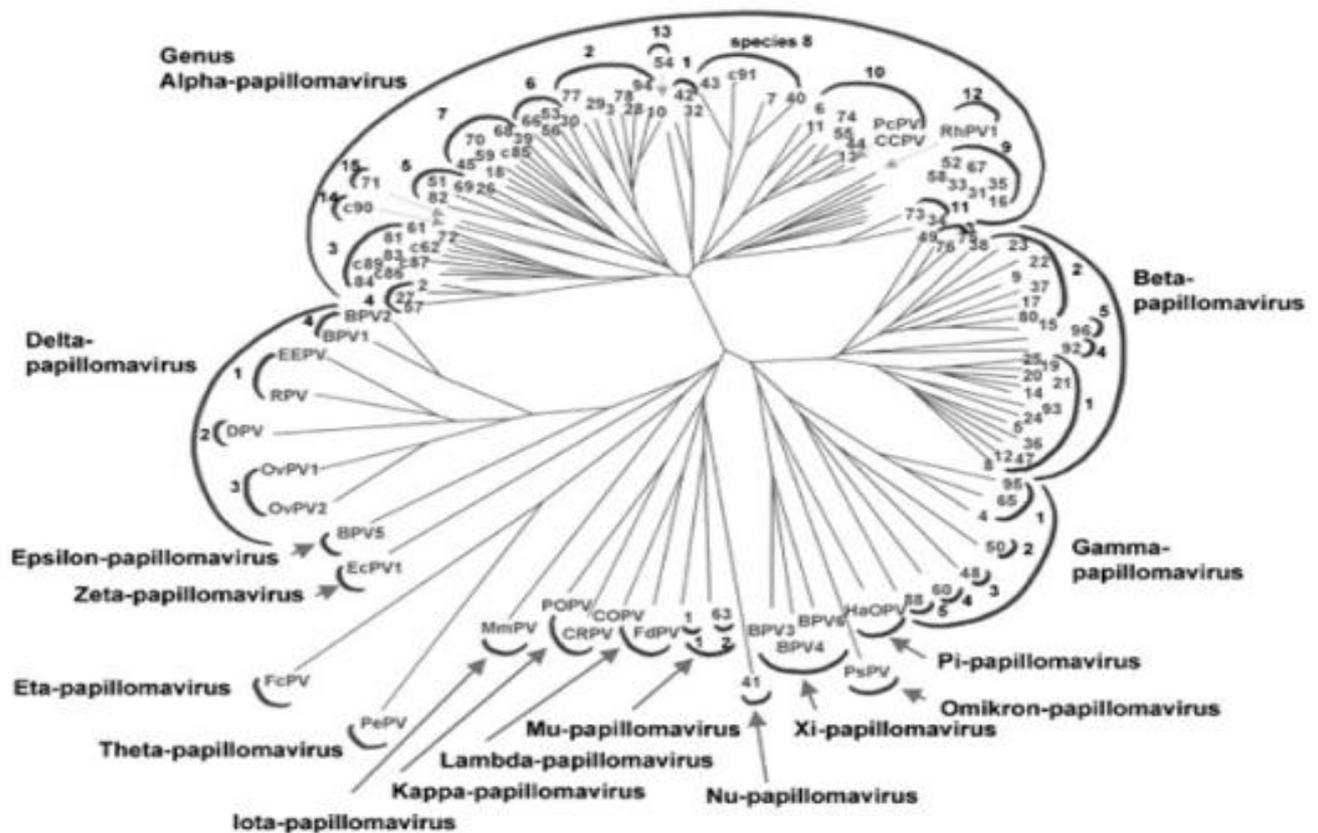


Figure 5 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences de la protéine de structure L1 de 118 Papillomavirus (De Villiers et al ., 2004).

Ainsi, un épithélium cervical peut être infecté par plus de quarante types d’HPV. Du fait de leur implication au niveau médical, les papillomavirus humains ont été très étudiés et plus de cent types ont pu être identifiés et séquencés à ce jour. (Bernard ,2005).

Approximativement 90 % des HPV caractérisés appartiennent aux genres alpha ou bêta. Les HPV sont classés en cinq groupes. Les HPV pouvant infecter le col de l'utérus appartiennent au groupe alpha qui comprend soixante membres. Les HPV de type bêta, gamma, Mu et Nu sont retrouvés principalement dans les infections cutanées.

II-2. Structure et organisation génomique :

Les papillomavirus sont des virus non enveloppés de la famille des *papillomaviridae*.

Leur capside icosaédrique d'un diamètre d'environ 55 nm est composée de soixante douze capsomères. (Burk ,1999).

Chaque capsomère est en fait un pentamère de la protéine majeure de capside L1. Le génome des HPV est constitué d'un ADN double brin circulaire d'environ 7900 Pb, (Figure 6).

L'analyse comparée des séquences nucléotidiques des papillomavirus de différentes espèces a révélé une organisation génétique commune en huit à dix cadres de lecture ouverts (ORF, *Open Reading Frame*) codant pour les protéines de type précoces ou tardives. Les gènes viraux sont transcrits sous la forme d'un messageur polycistronique, qui par des épissages alternatifs donne l'ensemble des protéines précoces et tardives. (Burk ,1999).

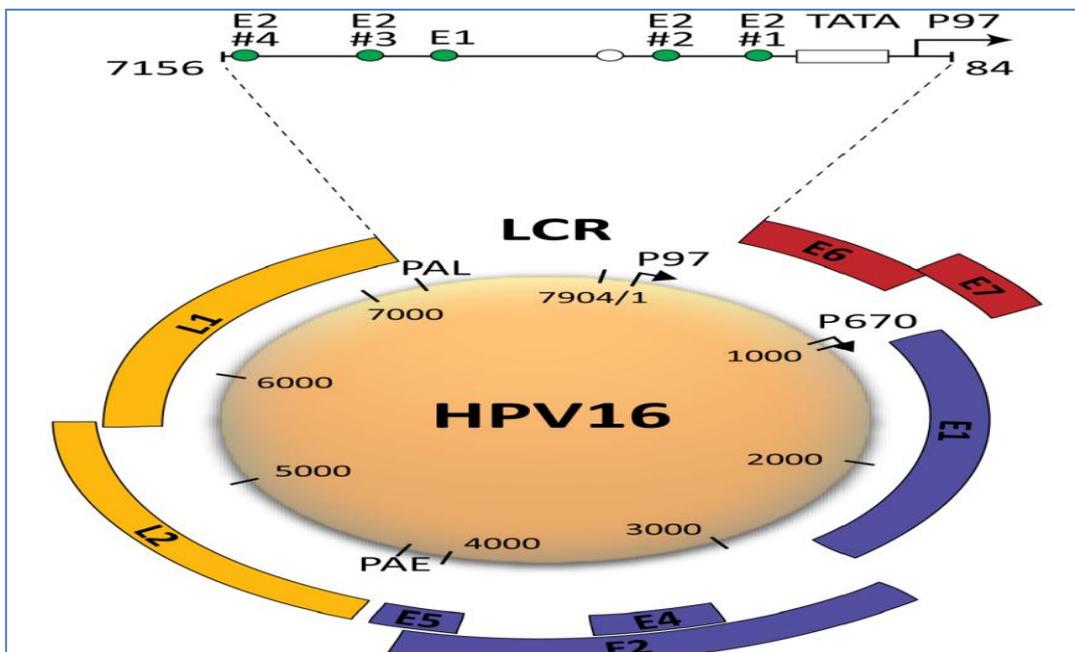


Figure 6 : Organisation génomique des HPV de type 16 (Burk ,1999).

Le génome d'HPV est une molécule d'ADN circulaire double brin de 7 900 pb. Il contient une région de régulation (LCR, *Long Control Region*) qui contient les éléments de

contrôle de la transcription et de la réplication et les cadres ouverts de lecture des gènes précoces (E) et tardifs (L). La région LCR est volontairement agrandie afin de faire apparaître les sites de fixations d'E2, E1 et Sp1 ainsi que le motif TATA du promoteur p97. (PAE : *PolyAdenylation Early*, PAL : *PolyAdenylation Late*).

Trois régions peuvent être individualisées au sein du génome :

1- une région précoce E (*Early*) qui contient les séquences codantes des protéines virales précoces (E1 à E7). Ces protéines vont jouer un rôle important dans la réplication et la transcription de l'ADN,

2-une région tardive L (*Late*) qui code pour les protéines structurales L1 et L2.

- une région non codante ou LCR (*Long Control Region*) qui comprend 400 à 1000 nucléotides. Elle contient l'origine de réplication virale, les séquences nécessaires à l'encapsidation, des séquences de régulation de la réplication et de la transcription (élément cis) ainsi que les promoteurs des gènes précoces (p97 pour HPV16 et p105 pour HPV18) et tardifs (p670 pour les HPV16 et HPV18). Le promoteur des gènes précoces va être actif constitutivement tandis que celui des gènes tardifs est activé selon le degré de différenciation de la cellule hôte. D'autres promoteurs secondaires ont pu être identifiés dans cette zone et joueraient un rôle dans le cycle viral (**Ozbun et Meyers, 1998**).

II-3-Classification des HPV

- Basée sur la séquence génomique

C'est la séquence nucléotidique du gène L1, codant pour la protéine majeure de capsid, qui sert de base à la classification des papillomavirus. Pour qu'un nouveau type d'HPV soit reconnu, il faut que le génome complet du virus ait été séquencé et que sa séquence L1 présente une divergence de plus de 10 % avec la séquence L1 du type connu le plus proche génétiquement. Une différence de 2 à 10 % définit l'appartenance à un sous-type et une différence de moins de 2 % définit un variant. (**De Villiers et al ., 2004**), Les différentes espèces sont regroupées en genres (alpha papillomavirus, beta-papillomavirus, etc.). L'appartenance à un même genre est définie par une homologie de séquence L1 supérieure à 60 %.

Les HPV se répartissent dans les genres alpha-papillomavirus, beta-papillomavirus, gamma-papillomavirus, mu-papillomavirus et nu-papillomavirus. La classification des HPV est présentée dans (Annexe 1)

-Basée sur le tropisme :

On distingue habituellement les types HPV à tropisme cutané et ceux à tropisme muqueux. Cette distinction n'est pas toujours absolue, certains types d'HPV n'ont pas un tropisme strict pour la peau ou les muqueuses (annexe 2). Les HPV à tropisme muqueux appartiennent au genre alpha-papillomavirus, alors que les HPV à tropisme cutané appartiennent essentiellement aux genres beta papillomavirus et gamma-papillomavirus ainsi qu'aux genres mu-papillomavirus et nu-papillomavirus (**Forslund ,2007**).

-Basée sur le potentiel oncogène :

La classification des HPV est présentée dans (Annexe 2), présente la répartition des principaux types d'HPV en fonction de leur potentiel oncogène (Annexe 2). Il est à noter que cette répartition ne prend en considération que les HPV à tropisme muqueux, cette classification est basée sur le risque de cancer du col de l'utérus associé à HPV. En ce qui concerne les HPV à tropisme cutané, il n'y a pas actuellement de classification en virus à bas risque ou haut risque, bien que certains types d'HPV cutanés soient indiscutablement associés au développement de carcinomes cutanés. (**Segondy, 2008**)

II-4-Cycle de réplication

Les HPV infectent les cellules épithéliales des couches basales des muqueuses ou des épidermes, Leur cycle de réplication est lié à la différenciation des kératinocytes.

Les particules virales infectieuses atteignent les cellules souches des couches basales suite à des microlésions de la muqueuse entraînant une rupture de l'épithélium stratifié, (**Zur Hausen ,2002**) Le virus est alors internalisé par endocytose puis décapsidé et l'ADN viral est transloqué au niveau du noyau de la cellule via la protéine mineure de capsid L2. Le génome viral est ainsi maintenu présent à un taux faible d'une centaine de copies sous forme d'épisomes, sans intégration dans le génome de la cellule hôte, grâce aux protéines précoces E1 et E2. (**Doorbar ,2005**)

La réplication du génome viral est liée à la réplication du génome cellulaire : le génome viral se réplique avec l'ADN cellulaire au cours de la phase S (**Doorbar ,2005**). Il s'agit **du cycle non productif**. Les cellules filles migrent ensuite vers la couche supra basale et entament le processus de différenciation. Les cellules supra basales infectées par l'HPV peuvent à nouveau entrer en cycle, contrairement aux cellules normales, et ainsi permettre la poursuite de la réplication de l'ADN viral (**Mougin et al., 2008**). Dans les couches les plus

superficielles, les protéines de capsid L1 et L2 permettent l'empaquetage de l'ADN viral, les virions ainsi formés sont libérés et peuvent infecter de nouvelles cellules.

C'est le cycle productif. Ce cycle est valable aussi bien pour les papillomavirus de haut risque que pour les papillomavirus de bas risque

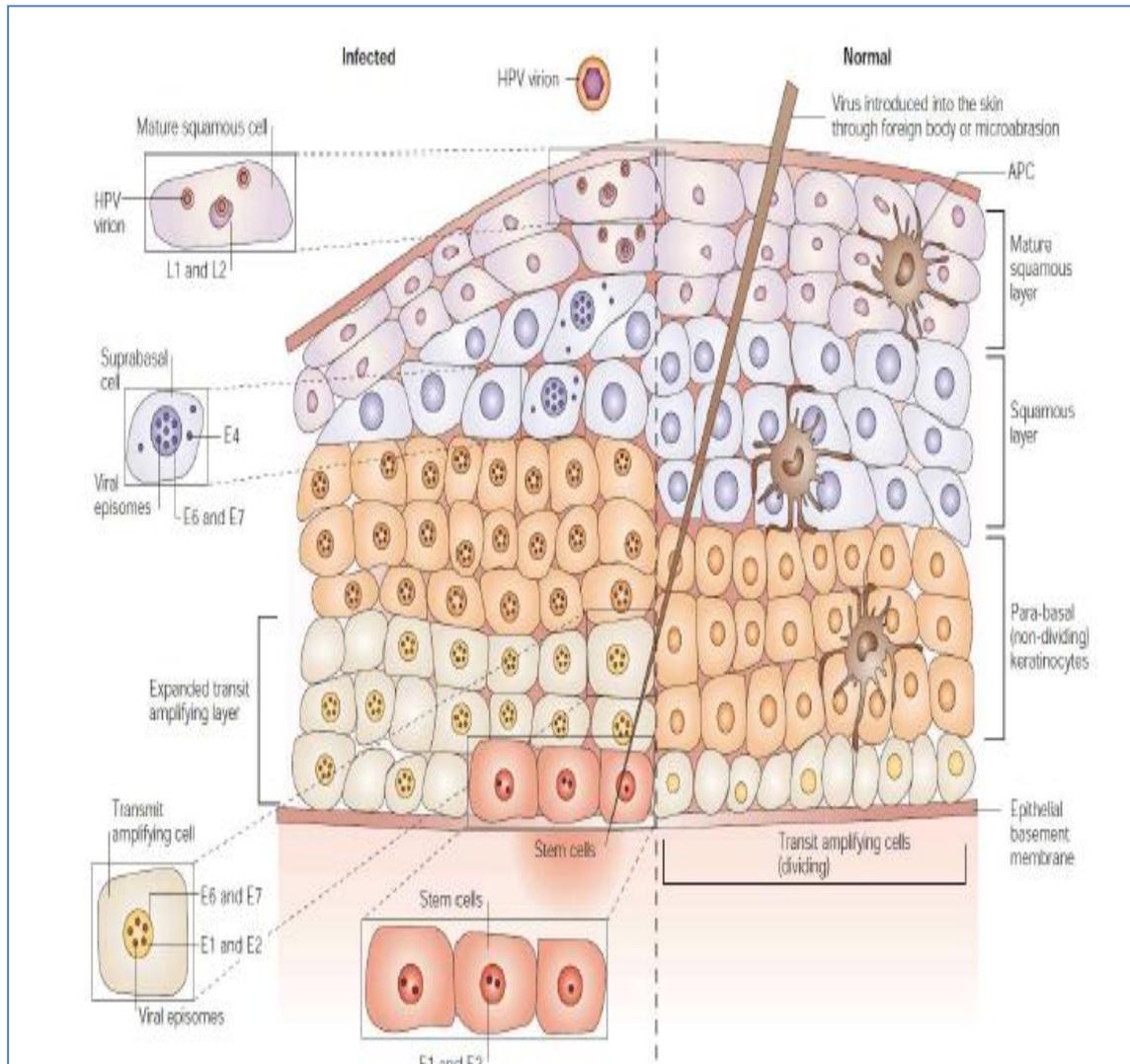


Figure 7 : Représentation des principales étapes du cycle des papillomavirus dans l'épithélium squameux.

En l'absence d'infection, les cellules filles issues des cellules souches épithéliales se divisent le long de la membrane basale et mûrissent verticalement à travers l'épithélium sans division supplémentaire (partie de droite). Après infection des cellules souches basales par l'HPV, les protéines virales précoces sont exprimées, les cellules filles entrent à nouveau en

division et se multiplient verticalement (partie de gauche). Dans les couches les plus superficielles, l'expression des protéines tardives structurales permet la formation et la libération des virions. (Frazer, 2004).

Sous l'action du système immunitaire, l'infection virale régresse le plus souvent (clairance virale) mais dans certains cas le virus peut persister soit à l'état latent sous forme d'épisomes soit sous forme intégrée au sein du génome cellulaire pour les papillomavirus muqueux de haut risque. La persistance du virus est le facteur de risque principal responsable de l'évolution vers la carcinogenèse.

II-5-Les protéines virales et leur rôle dans la carcinogenèse

II-5-1- Rôle d'E1 à E6

Les principales protéines précoces responsables de la carcinogénèse sont les protéines E5, E6 et E7. Les protéines E1, E2 et E4 jouent un rôle dans la réplication virale. Le rôle de toutes ces protéines est présenté sur le tableau 3.

Tableau III : rôle des protéines des papillomavirus à haut risque (Monsonogo.2006)

<i>Protéine</i>	<i>Fonction</i>
E1	Réplication de l'ADN viral
E2	Réplication, régulation de la transcription
E3	Pas de fonction connue
E4	Maturation des virions
E5	Stimulation de la prolifération cellulaire
E6	Protéine oncogène, favorise la dégradation de la protéine p53
E7	Protéine oncogène, favorise la dégradation de la protéine de susceptibilité au rétinoblastome pRb
E8	Pas de fonction connue
L1	Protéine majeure de capsid
L2	Protéine mineure de capsid

II-5-2 Le processus de carcinogénèse

Lors d'une infection persistante par un HPV à haut risque, la protéine E7 se lie aux protéines du rétinoblastome ce qui a pour conséquence une prolifération cellulaire aberrante, cette prolifération entraîne un stress au niveau de la cellule qui se traduit par l'activation de la protéine p53 qui est dégradée par l'intermédiaire de la protéine E6 des HR-HPV, ainsi la division cellulaire se poursuit et les dommages dans l'ADN ne sont plus réparés ce qui accentue encore davantage la prolifération cellulaire.

L'instabilité chromosomique engendrée peut entraîner une intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte. La cassure de l'ADN viral se fait au niveau du gène E2 dont un des rôles est de réprimer l'expression des protéines précoces E6 et E7. Ainsi, lors de l'intégration de l'ADN viral d'un papillomavirus de haut risque au sein du génome de la cellule hôte, il se produit une levée d'inhibition des protéines virales oncogènes E6 et E7 ce qui amplifie encore plus le processus d'oncogénèse et peut aboutir à un processus de transformation maligne des cellules (**figure 8**).

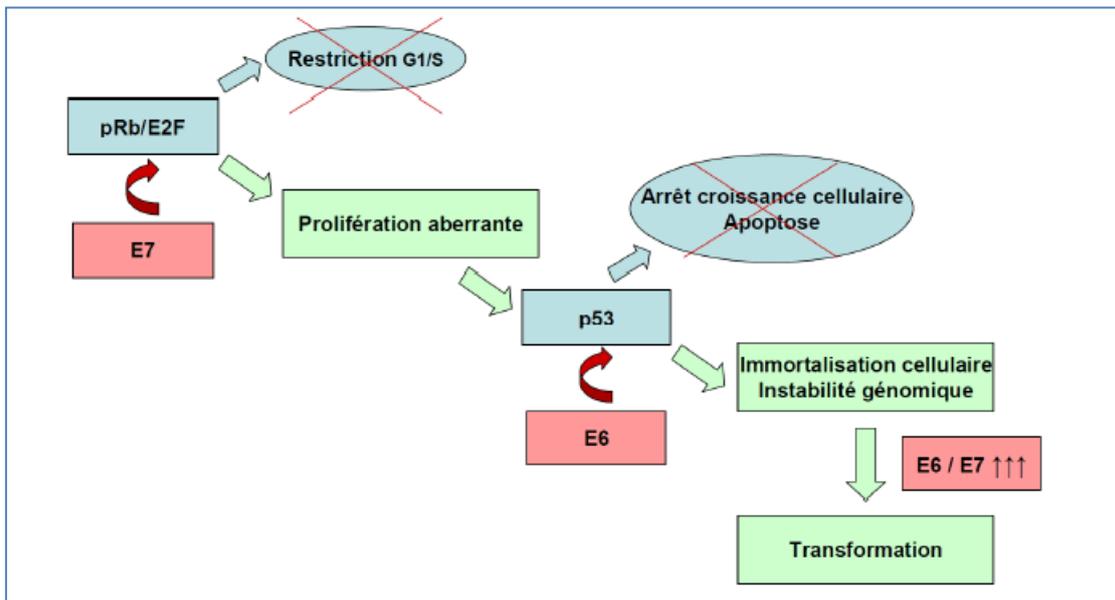


Figure 8 : Schéma simplifié de la carcinogénèse induite par les HR-HPV à haut Risque (Munger *et al.*, 2004)

-E6 et E7 sont des acteurs clés, ce sont des protéines oncogènes pouvant être surexprimées lors d'une infection par un papillomavirus de haut risque. Cette surexpression est responsable d'une perte de la régulation du cycle cellulaire et d'une immortalisation des cellules.

II-5-2-1 E6 et L'inactivation de p53

L'activité la plus étudiée d'E6 est sa capacité à provoquer la dégradation de la Protéine suppresseur de tumeur p53 (Scheffner *et al.*, 1990). A la différence de nombreux types de cancer, dans le cas du cancer du col utérin, le gène p53 est rarement muté (Hainaut *et al.*, 1998). Le premier mécanisme par lequel les HPV à haut risque inactivent p53 consiste en sa dégradation par le système du protéasome (Scheffner *et al.*, 1990). Normalement, le taux de p53 est régulé au sein de la cellule principalement par l'E3-ubiquitine ligase : mdm2 (Honda *et al.*, 1997). Cependant, en cas d'infection par HPV, cette dégradation se retrouve inhibée. E6 induit la dégradation de p53 en formant un complexe avec une autre ubiquitine ligase, E6AP (Huibregtse *et al.*, 1991; Scheffner *et al.*, 1993) qui seule n'est pas capable de lier p53 et de le dégrader (figure 9).

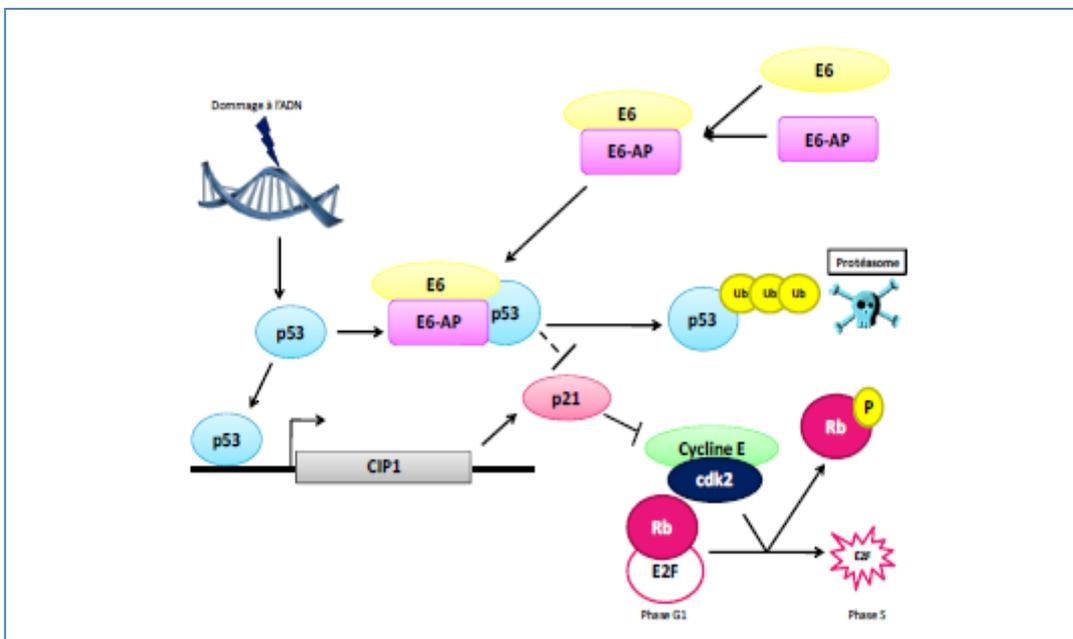


Figure 9 : E6 et cycle cellulaire (Scheffner *et al.*, 1990). L'interaction entre le complexe E6-E6AP et p53 conduit à la dégradation de cette dernière par le système du protéasome 26S. La réponse physiologique aux dommages à l'ADN est donc inhibée et la transcription de CIP1 n'est pas activée. Le facteur de transcription E2-F est libéré ce qui conduit au passage en phase S.

De manière intéressante les E6 de bas et de haut risque sont capables de lier la protéine p53 cependant les domaines avec lesquels elles interagissent sont différents. Alors que les deux types d'E6 peuvent se lier à l'extrémité C-terminale de p53, seuls les E6 à haut risque sont capables de se lier à la région cœur (ou *core domain*) de p53.

Cette interaction va être nécessaire à la dégradation (**Crook et al ., 1991**). L'ensemble de la protéine p53 au sein d'une cellule exprimant E6 à haut risque n'est cependant pas dégradée (**Cooper et al ., 2003**).

L'interaction d'E6 avec p53 empêche la liaison de p53 au niveau de séquences spécifiques de l'ADN. Le niveau d'inhibition va être corrélé à l'affinité de chaque type E6 pour p53. Ainsi, 16E6 présente un fort taux d'inhibition, 31E6 et 18E6 présentent des niveaux intermédiaires et 1E6 un niveau bas (Lechner and Laimins, 1994). Cette interaction induit un changement conformationnel de p53 ce qui conduit à une inhibition de sa liaison à l'ADN ou à une dissociation des complexes ADN-p53 déjà formés (**Thomas et al ., 1995**).

- **Le second mécanisme** par lequel E6 inhibe la voie de signalisation dépendante de p53 est sa séquestration au sein du cytoplasme. Celle-ci résulterait d'un masquage des signaux de localisation nucléaire au niveau C-terminal de p53 ou l'activation de son export (**Mantovani et Banks, 2001**).

- **Le troisième mécanisme** employé par E6 pour inhiber l'activité de p53 est un arrêt de la transactivation induite par p53 grâce à une interaction avec CBP/p300 (Patel et al., 1999) ou (**Kumar et al ., 2002**) l'histone acétyl transférase (hADA3). Suite à un dommage à l'ADN, p300 est connu pour acétyler p53 et de ce fait promouvoir son habilité à lier l'ADN (**Barlev et al ., 2001**).

Les protéines E6 lient p300 qui a pour conséquence d'inhiber l'acétylation de p53 (**Patel et al., 1999**). Les deux types d'E6 vont lier p300 bien que les E6 de haut risque semblent se lier avec plus d'affinité. Enfin, E6 inhiberait également l'activation de p53 en bloquant la voie de p14/ARF. (**Shamanin et al ., 2008**).

II-5-2-2 E7 et la dégradation de pRb et induction de la transcription dépendante d'E2F

La protéine E7 des HR-HPV est une oncoprotéine de 100 acides aminés capable de former une liaison de forte affinité avec les protéines du rétinoblastome (p Rb). Les E7 HR-HPV (HPV haut risque) et BR-HPV (HPV bas risque) vont être capables de lier pRB mais l'affinité sera beaucoup plus faible dans le cas des BR-HPV (**Jones, Thompson, Munger ,1997**).

La protéine pRb est une protéine suppresseur de tumeur active sous forme hypophosphorylée, forme sous laquelle elle est capable de se lier au facteur de transcription E2F et de le séquestrer, elle prévient ainsi l'entrée en phase S des cellules (**Demers et al ,1994**).Le complexe E2F/pRb agit comme un répresseur de transcription.

Au cours d'un cycle cellulaire normal, pRb est phosphorylée par les cyclines D1/CDK4 et E/CDK2 ce qui cause la dissociation pRb/E2F, le facteur de transcription E2F est libéré et active la transcription des gènes impliqués dans la poursuite du cycle cellulaire.

Au cours d'une infection par un HR-HPV, la protéine E7 peut se lier à pRb sous sa forme active hypophosphorylée, E7 empêche ainsi l'interaction E2F/pRb et donc l'inhibition du facteur de transcription E2F par pRb, E2F est alors exprimé de manière constitutive, le contrôle de la transition des phases G1/S est perdu et le cycle cellulaire n'est plus contrôlé ce qui aboutit à une prolifération cellulaire aberrante (Bates S *et al.*, 1998). De plus, E7 stimule la dégradation de pRb via le protéasome ce qui amplifie le phénomène de prolifération cellulaire (figure 10).

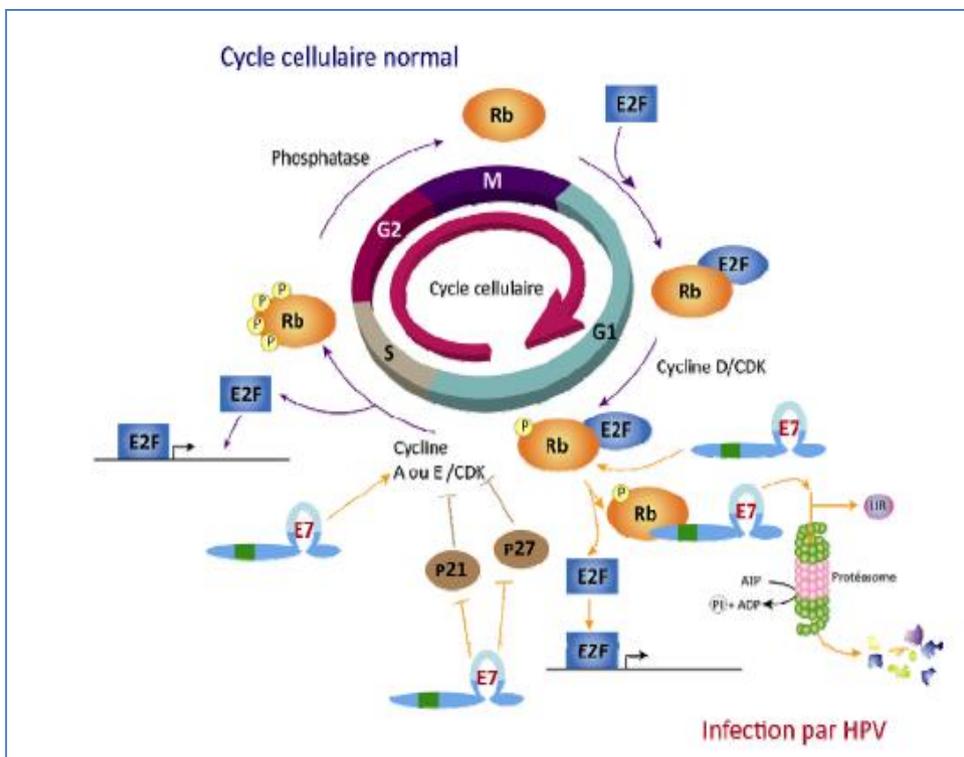


Figure 10 : E7 et cycle cellulaire (Almonte *et al.*,2008).

Au sein des cellules saines, la progression du cycle cellulaire est régulée par la protéine pRb sous sa forme hypophosphorylée qui est capable d'interagir avec le facteur de transcription E2F. Lors de la phase G1, la protéine Rb est progressivement phosphorylée par les kinases dépendantes des cyclines (CDK).

Une fois hypophosphorylée, pRb ne peut plus lier E2F. Le facteur de transcription ainsi libéré et active la transcription des gènes impliqués dans la poursuite du cycle cellulaire. Au sein des cellules infectées par HPV, E7 interagit avec pRb sous forme hypophosphorylée et empêche la liaison à E2F. E2F est active de manière constitutive et le cycle cellulaire n'est

plus soumis à un contrôle. Cette activation est de plus renforcée par la stabilisation des complexes cyclines A et E/ CDK et par l'inhibition de CDK p21 et p27. (**Almonte et al., 2008**)

II-6-Pouvoir pathogène :

Le pouvoir oncogène des HR-HPV a été mis en évidence au début des années 80 par Harald zur Hausen qui a reçu en 2008 le Prix Nobel de Médecine pour cette découverte. (**Zur Hausen, 1983**).

Les HR-HPV sont considérés comme responsables de plus de 95% des cancers du col de l'utérus (**Castellsague, 2008**) mais il faut savoir que l'infection par le papillomavirus est une cause nécessaire mais non suffisante au cancer, d'autres facteurs interviennent (âge, Immunodépression, multiparité, contraceptifs oraux et tabac) (**Almonte et al., 2008 ; Munger et Howley, 2009**) et vont influencer sur la Clairance ou la persistance des HPV (**Ganguly et Parihar, 2009**).

Les papillomavirus humains sont également impliqués dans certains cancers de la Sphère génitale externe (pénis, vulve, vagin) et dans les cancers de l'anus où, comme dans le cancer du col de l'utérus, les génotypes les plus souvent incriminés sont les HPV oncogènes 16 et 18. (**Parkin et Bray, 2006**)

II-7-Mécanisme de transmission du HPV et facteurs de prédisposition

II-7-1Mécanisme de transmission

Le papillomavirus humain se transmet par :

- **contact direct** (contact intime peau à peau, auto-inoculation par le grattage ...).
- **contact indirect** (objets et surfaces contaminés).

L'infection à HPV peut toucher la région ano-génitale de toute personne ayant une activité sexuelle (les femmes et les hommes de tout âge ; les hétérosexuels et les homosexuels).

Chez la femme, cette région comprend la vulve, le col de l'utérus et l'anus. Chez l'homme, cette région inclut le pénis, le scrotum et l'anus.

Le pouvoir pathogène des papillomavirus humains dépend du statut immunitaire de la personne infectée : les déficits immunitaires favorisent ce type d'infection (immunodépression congénitale, transplantations, VIH, traitements immuno-suppresseurs) (**Yeni, 2010**).

- Il existe au moment de l'accouchement des possibilités de **transmission du HPV de la mère au nouveau-né**. Toutefois, le risque de développement de lésions cliniques de type papillomatose laryngée de l'enfant est faible. Ce risque justifie un traitement des condylomes

acuminés chez la femme enceinte mais ne constitue pas une indication pour une césarienne prophylactique systématique (**Monsonogo, 1988**)

- **Transmission intra-utérine** : ce mécanisme semble peu fréquent. Il existe toutefois quelques observations de condylomes acuminés péri-anaux congénitaux, de papillomatose laryngée existant apparemment dès leur naissance et de papillomatose respiratoire apparue chez des enfants nés par césarienne avant la rupture des membranes. L'ADN des papillomavirus a également été détecté dans les muqueuses conjonctives de nouveau-nés. Une infection hématogène transplacentaire paraît peu probable, car les HPV ont un développement local muqueux ou cutané et ne semblent pas se disséminer par voie sanguine.

- **Transmission post-natale** : une contamination du nourrisson ou du jeune enfant suivie du développement d'une papillomatose respiratoire par une personne ou par un objet infecté ne peut pas être exclue.

II 7-2 Facteurs de prédisposition

De nombreux facteurs exogènes et endogènes jouent un rôle dans les étapes d'initiation, de promotion et de progression tumorale. (**Denis et al., 2008**).

- **Le tabagisme actif** : il engendre une immunodépression locale et favorise l'évolution vers le cancer.

- **Immunodépression** : les femmes immunodéprimées ont un plus grand risque de Développer des lésions dysplasiques (**Yeni, 2010**). Ceci est notamment observé chez les patientes VIH positives où la progression des lésions est d'autant plus importante que le nombre de lymphocytes CD4 est faible.

- **Prédisposition génétique** : la mutation de la protéine p53 est un facteur de risque familial. De plus, certaines prédispositions génétiques, notamment au niveau du système HLA particulièrement impliqué dans les mécanismes de défenses de l'organisme, augmenteraient le risque de développer un cancer.

- **Multiparité** : liée aux traumatismes lors de l'accouchement mais également aux modifications hormonales et immunologiques pendant la grossesse, l'exposition secondaire de l'endocol à l'environnement vaginal favorise la métaplasie et le développement des HPV.

Une autre infection sexuellement transmissible (ou antécédents de lésions génitales ou des IST chez le partenaire) telle que les Chlamydiae, l'herpès simplex de type 2 ou le VIH pourraient constituer des cofacteurs de promotion des lésions dysplasiques (**Denis et al., 2008 ; Thomas et al., 2001**).

II-8- Réponses immunitaires anti-HPV

Les cellules infectées par les HPV peuvent présenter à la surface des antigènes viraux sous forme de peptides de petite taille (de 8 à 11 acides aminés) associés aux molécules HLA de classe I, ou des peptides de plus grande taille (13 à 25 acides aminés) associés aux molécules HLA de classe II.

Les cellules de Langherans, présentes au sein de l'épithélium malpighien, sont des cellules présentatrices de l'antigène. Elles ont la capacité de fixer les particules virales entières grâce aux récepteurs des HPV qu'elles présentent à leur surface (**Price et al ., 1997; Frazer et al., 1999**) et peuvent internaliser les particules virales (**Lenz et al., 2001; Da Silva et al., 2001**). Elles peuvent alors migrer jusqu'aux organes lymphoïdes et stimuler le système immunitaire lymphocytaire T. Les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ peuvent migrer à leur tour jusqu'aux cellules infectées. La reconnaissance entre cellules infectées et lymphocytes T est favorisée par la synthèse d'IFN- γ qui permet d'augmenter l'expression des molécules HLA de classe I et II à la surface des cellules infectées. Les lymphocytes T peuvent alors détruire les cellules cibles :

- soit par cytotoxicité directe,
- soit par l'interaction de la molécule Fas-L présente sur les lymphocytes T et de la molécule Fas présente sur les cellules infectées ou tumorales,
- soit par action de cytokines telles que le TNF- α , synthétisées par les lymphocytes T.

L'analyse de l'activité lymphocytaire anti-HPV sur des lésions bénignes, précancéreuses et cancéreuses du col utérin a montré que la réponse lymphocytaire T CD4+ est davantage présente au cours des infections asymptomatiques et des lésions de bas grade qu'au cours des CIN3 et disparaît lors de l'évolution vers le cancer invasif. A l'inverse, une prédominance de lymphocytes T CD8+ est observée dans l'épithélium des CIN ainsi que dans la tumeur et le chorion des cancers invasifs (**Tsukui et al ., 1996; Monsonego, 2007**).

II-9-Prévention

Le vaccin prophylactique consiste en l'induction d'anticorps neutralisants contre les protéines de la capsid L1 et L2 de différents types de HPV par l'administration de particules virales vides (sans ADN) appelées « Virus Like Particules » (VLP) (**figure 11**), reproduisant exactement les épitopes de capsid (**Riethmuller et Seilles, 2000**).

Deux vaccins préventifs contre l'infection à HPV, retrouvée dans 70% des cancers du col utérin, sont disponibles: Gardasil ® actif vis-à-vis des infections à HPV 16, 18, 6, 11 et

Cervarix ® actif contre HPV 16 et 18. L'immunité conférée dure au moins cinq ans. Le vaccin est efficace chez l'adolescente non infectée par le HPV s'il est administré avant le premier rapport sexuel. Le vaccin ne paraît pas efficace pour les autres génotypes (autres que ceux du vaccin), ni pour les femmes déjà infectées. (Yeni, 2010).

Si le développement des vaccins à visée prophylactique est basé sur l'induction d'une immunité humorale avec production d'anticorps neutralisants, celui des vaccins thérapeutiques repose sur l'induction d'une immunité cellulaire dirigée contre les cellules exprimant les oncoprotéines virales, en particulier.

Le vaccin thérapeutique vise à faire régresser les infections persistantes et leur évolution en cancer invasif. Mais il n'existe aucun traitement permettant la guérison d'une infection à papillomavirus. La destruction des lésions visibles peut cependant être faite de manière plus ou moins simple. Le traitement des verrues fait appel à la cryothérapie à l'azote liquide, à l'acide salicylique voire à la chirurgie. Les condylomes sont traités par coagulation, cryothérapie, laser à CO2 ; la Conisation est utilisée devant une dysplasie ou un carcinome du col utérin. Les papillomes laryngés sont traités par chirurgie et interféron. Après le traitement, il se peut que le virus soit toujours présent même si les condylomes ont disparu. Il est donc important de surveiller la réapparition des lésions pendant plusieurs mois après la résection (Riethmuller et Seilles, 2000).

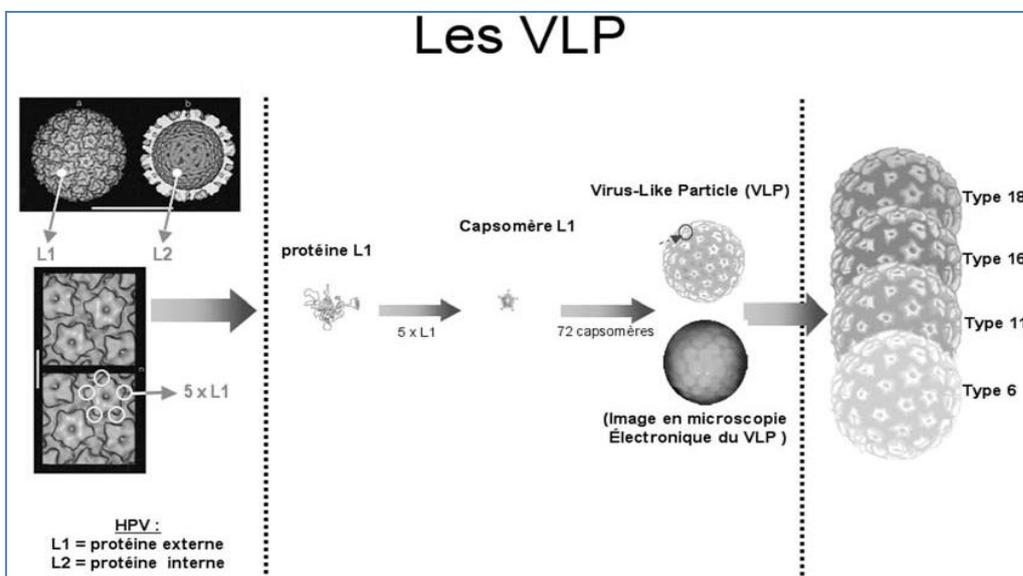


Figure 11 : Les VLP (Virus like Protéine) (Monsonego, 2007).

PARTIE

EXPERIMENTALE

La présente étude porte sur la recherche du Papillomavirus chez les femmes présentant des lésions cancéreuses et précancéreuses du col de l'utérus. Le travail a été réalisé durant la période allant du mois d'avril jusqu'au mois de septembre 2014, en collaboration avec le laboratoire de Herpes virus/ papillomavirus et autres (service de virologie humaine de l'Institut Pasteur d'Algérie annexe de Sidi Fredj).

Notre échantillonnage provient :

- des prélèvements des patientes adressées au laboratoire dans le cadre d'un dépistage ou d'un suivi de lésion précancéreuses.
- de patientes présentant un cancer épidermoïde du col utérin récolté au CPMC (Centre Pierre et Marie Curie) CHU Mustapha.

L'objectif de notre étude prospective est :

- la mise en évidence de l'ADN des papillomavirus humains à haut risque oncogène dans les lésions cervicales précancéreuses par les techniques de biologie moléculaire.
- Génotypage du Papillomavirus dans le cancer épidermoïde et dans les lésions précancéreuses.
- Une introduction à la RT-PCR pour l'étude de l'expression des gènes du papillomavirus.

MATERIEL

ET

METHODES

I.1- Matériel

Population étudiée

Notre étude a porté sur (226) prélèvements cervicaux de patients âgés de 23ans à 84ans avec une moyenne d'âge de 51ans

Ces prélèvements ont été effectués chez :

- 173 patientes adressées au laboratoire par différents services de gynécologie obstétrique dans le cadre d'un dépistage ou du suivi de lésions précancéreuses.
- 28 patientes présentant un cancer Epidermoïde du col utérin proviennent du service de chirurgie femme du Centre Pierre et Marie Curie (CPMC) CHU Mustapha.
- 25 prélèvements ont été effectués chez des femmes ne présentant aucune pathologie du col connue et ayant consulté dans un centre de planning familial.

I.1.1- Prélèvements

Le **matériel biologique** est constitué d'un prélèvement cytologique cervical contenant les cellules de 3 zones du col de l'utérus (exocol, endocol et jonction pavimenteux-cylindrique)

L'ensemble des prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une cytobrosse et conservé dans deux systèmes de récoltes différents :

Un milieu de transport fourni par Digène (Hybrid Capture II cervical sampler) et celui fourni par Roche (Preserv Cyto) (figure 12). Ces deux derniers sont fournis aux patientes par le laboratoire avec une fiche de renseignement (Annexe 3).



Figure 12 : Dispositif de prélèvement : **A :** Milieu et cytobrosse (Digène). **B :** Milieu et cytobrosse (Roche).

Les échantillons reçus au laboratoire sont enregistrés puis conservés à -20°C jusqu'à leurs manipulations (durée de conservation plusieurs mois).

I.1.2- Matériel non biologique

a) **Matériel de laboratoire** : dans l' (Annexe 4).

b) **Les Réactifs** :

Dans un 1^{er} temps nous avons utilisé deux techniques de biologie moléculaires en alternance selon la disponibilité des réactifs de l'ADN de papillomavirus humain à haut risque oncogène dans les lésions cervicales précancéreuses : ces deux techniques sont :

- Hybride capture[®]2 de Digène.
- AmpliCor[®]HPV test de ROCHE.

Les échantillons retrouvés positifs ont été génotypés par le test :

- LINEAR ARRAY HPV Genotyping tests de ROCHE.

La recherche de l'ARNm par la technique RT-PCR (Reverse Transcriptase-polymérase chaîne réaction).

I.2 METHODES

I.2.1 Hybrides captures 2 Digène :

I.2.1.1 Principe :

Cette technique détecte les acides nucléiques (ADN) cibles directement par hybridation en solution. C'est une méthode immuno-capture en phase liquide.

L'hybridation de l'ADN de l'échantillon avec des sondes ARN complémentaires spécifiques de 13 génotypes HPV-HR : (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, et 68), l'hybrides (ADN/ ARN) reconnus par des anticorps anti-hybrides avec amplification de signal par chimiluminescences.

I.2.1.2 Protocol

a) Dénaturation : Les échantillons des cellules cervicales contenant les cellules de 3 zones du col de l'utérus (exocol, endocol et jonction pavimenteux-cylindrique) sont dénaturés grâce à l'ajout d'un réactif de dénaturation (NaOH).

b) Hybridation Des sondes ARN complémentaires sont ajoutées à 75 µL de l'échantillon dénaturé, une incubation à 65°C pendant 60 min permet l'hybridation entre l'ADN viral s'il existe et la sonde complémentaire (figure 13)



Figure 13 : Hybridation de la sonde avec l'ADN

- c) **Capture des hybrides** : Transférer le contenu entier de chaque microtube dans le fond des cupules d'une microplaque (figure 14), recouverte d'anticorps anti hybrides (ARN/ADN). Couvrir la microplaque d'une feuille adhésive. Après 60 minutes d'incubation sous agitation rotative à 1100 rpm, permettra la capture des hybrides formés.

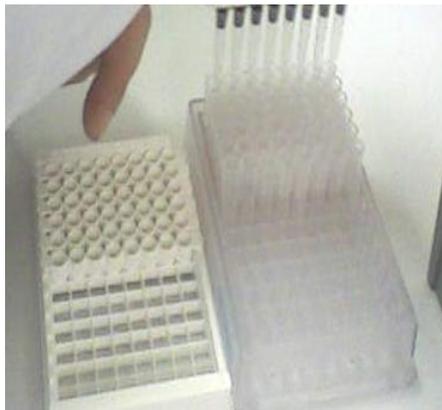


Figure 14 : Transfert des échantillons de microtubes vers microplaque.

- c) **Détection des hybrides** : elle se fait en deux étapes :
- Ajouter à chaque cupule le **1^{er} réactif de détection** : les anticorps anti hybride (ARN/ADN) conjugués à la phosphatase alcaline (figure 15) et incuber à température ambiante pendant 30 à 45 min. Ensuite, la plaque est vidée et lavée 6 fois.
 - Ajouter 75µl du **2^{ème} réactif de détection** composé de substrat CDP-StarTM et d'Emerald II à chaque cupule (figure 16), la microplaque est ainsi incubée à température ambiante pendant 15 à 30 min à l'obscurité
 - (Annexe 5) : les réactifs pour hybride capture[®] 2.



Figure 15: Ajout de l'anticorps anti-hybride conjugué à de la phosphatase alcaline.(Réactif de détection 1)

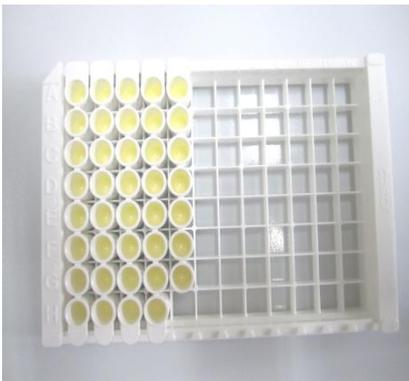


Figure 16 : ajout de substrat chimilunescent (Réactif de détection 2)

- Les résultats sont traités par un logiciel installé dans un système informatique. l'intensité du signal chimiluminiscent émis est mesurés par un luminomètre (DML 2000) et les résultats sont obtenus et interprétés à l'aide du logiciel DMS 2.0.

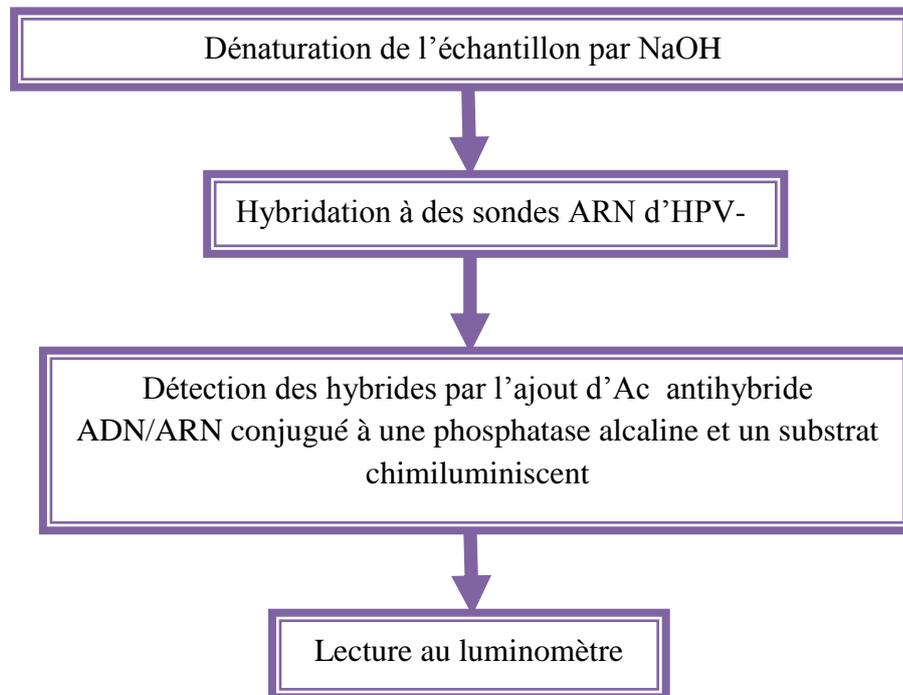


Figure 17 : Schéma Récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation du test Hybrid capture®2.

I.2.2 Test PCR AMPLICOR HPV haut risque :

I.2.2.1 Principe : Le test HPV Amplicor[®] est un test qualitatif in vitro. il permet l'amplification simultanée de l'ADN cible HPV et de l'ADN β globine (témoin cellulaire).

Le mélange réactionnel actif contient des paires d'amorces pour l'ADN provenant des 13 géotypes HPV-HR (HPV types **16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59** et **68**) et l'ADN β -globine. **Annexe 7** Les réactifs pour test Amplicor HPV

I.2.2.2 Protocol

Le test Amplicor comporte 4 étapes :

- Préparation des échantillons.
- Amplification de l'ADN cible par PCR à l'aide une amorce spécifique complémentaire du HPV.
- Hybridation des produits amplifiés à des sondes oligonucléotidiques.
- Détection des produits amplifiés.

NB : Pour éviter les problèmes de contamination, il faut utiliser plusieurs pièces distinctes pour effectuer l'ensemble des manipulations.

a) L'extraction et la purification de l'ADN :

L'ADN du HPV est libéré par lyse d'échantillon de cellule cervicale en présence d'un tampon de lyse constitué de l'EDTA et SDS ainsi que de la protéine K qui permet la destruction des membranes cellulaires et la dénaturation des protéines contenue dans les cellules notamment celles qui sont liées à l'ADN. L'extraction de l'ADN se fait sur colonne contenant un gel de silice chargé positivement qui permettra la capture des acides nucléiques chargé négativement, l'élution dans un nouveau tube eppendorf permettre de récupérer l'ADN purifié après plusieurs lavages et un séchage de la colonne.

L'ADN ainsi récupérer pourra être directement amplifié par PCR ou conservé à -20° C jusqu'à son utilisation.



Figure 18 : A gauche : représente l'ajout de l'échantillon dans le tube eppendorf et à droite représente la colonne **CLM** et tube d'élution.

b) Amplification par PCR :

Une séquence nucléotidique de 165 pb située dans la région L1 polymorphe du génome HPV est amplifiée par un pool d'amorces contenu dans le mélange réactionnel, conçu pour amplifier l'ADN de 13 génotypes haut risque (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, et 68). Une paire d'amorces supplémentaires ciblent le gène de la β -globine humaine (amplicon de 268 pb) utilisé comme contrôle de l'adéquation de l'extraction et de l'amplification des cellules.

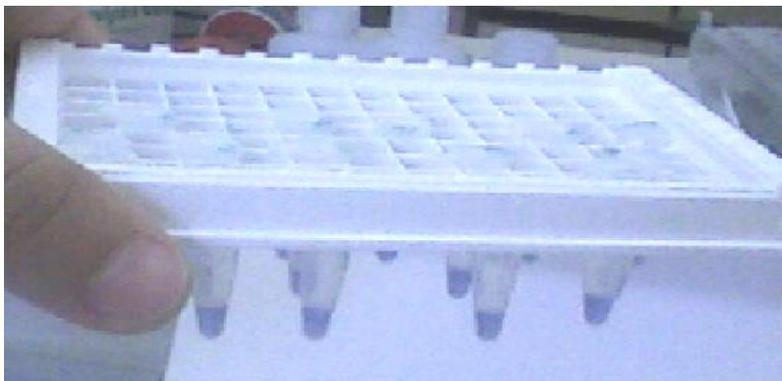


Figure 19 : ADN Amplifier

d) L'hybridation :

Une dénaturation chimique des amplicons HPV et β -globine est réalisée par l'ajout de la solution de dénaturation. Une partie aliquote d'amplicons dénaturés HPV et β -globine (marqués à la biotine) sont transférés dans des puits distincts des microplaques (MWP) équipées de sondes HPV-HR ou de sondes oligonucléotidiques spécifiques de la β -globine.

e) La détection :

La détection des hybrides est réalisée après lavage qui permet d'éliminer tout ce qui n'est pas fixé. Un conjugué avidine couplé à une peroxydase est ajouté. Il se fixe sur les amplicons biotinilés eux mêmes hybridés à la sonde (HPV-HR ou β -globine) immobilisées sur la plaque.

Une réaction colorimétrique est obtenue par l'ajout d'un substrat chromogène. La lecture de la densité optique est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm après l'arrêt de la réaction.

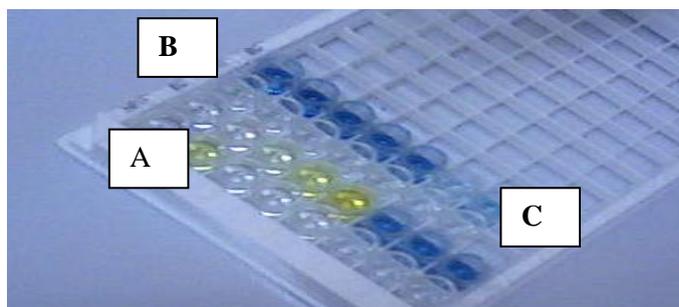


Figure 20 : (A) :l'ajout de solution de dénaturation(amplicons dénaturés) HPV et β -globine (marqués à la biotine). (B) : Transférés d'Amplicon dans des puits distincts des microplaques (MWP) équipées de sondes HPV-HR ou de sondes oligonucléotidiques spécifiques de la β – globine. (C) : Ajout de l'acide sulfurique dans tous les puits

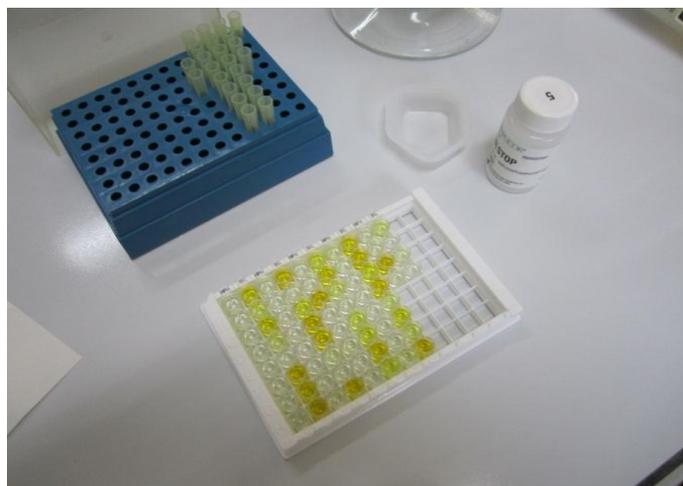


Figure 21: La coloration finale après l'ajout de solution d'arrêt.

Voir (Annexe 6) les réactifs Pour test Amplicor HPV

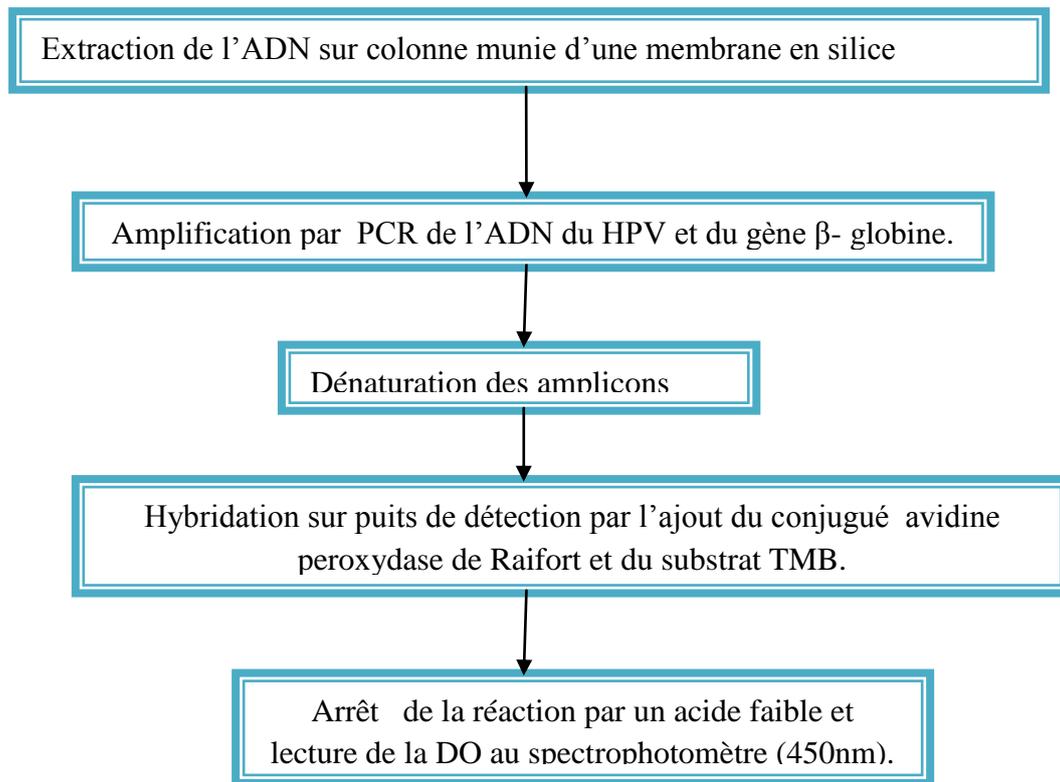


Figure 22: schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation du test d'amplification PCR.

I.2.3 Génotypage : LINEAR ARRAY HPV Gentyping Test de ROCHE :

I.2.3.1 Principe de technique :

Le test de génotypage LINEAR ARRAY HPV est un test qualitatif in vitro qui permet la détection et l'identification des génotypes HPV présents dans l'échantillon analysé.

Ce test peut détecter 37 génotypes d'ADN de HPV anogénitaux:

6, 11,16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84. Dans les cellules du col de l'utérus rassemblées dans la solution PreservCyt®. Il comporte 4 procédés principaux :

- Préparation des échantillons
- Amplification par PCR.
- Hybridation des produits amplifiés à des sondes oligonucléotidiques présentes dans des bandelettes de génotypage.
- Détection par coloration des produits amplifiés liés aux différentes sondes.

I.2.3.2 Protocol

- a) **Extraction:** Même Procédures que la PCR AMPLICOR®.
- b) **Amplification :** Même procédures que la PCR AMPLICOR®.
- c) **Hybridation**
 - Suite à l'amplification par PCR, le HPV et l'amplicon de β -globine sont chimiquement dénaturés pour former l'ADN monocaténaire par l'ajout de solution de dénaturation.
 - Les aliquots de l'amplicon dénaturé sont ensuite transférés au puits approprié de la plaque de typage contenant le tampon d'hybridation et unique bandelette de génotypage LINEAR ARRAY HPV recouverte des lignes de sonde de HPV et β globine.
 - L'amplicon marqué à la biotine sera hybridé avec des sondes oligonucléotidiques seulement si l'amplicon contient la séquence correspondante de la sonde complémentaire.



Figure 23 : Bain marie sous agitation



Figure 24: Plaque avec les bandelettes dans le bain marie sous agitation

d) Réaction de détection

- Suite à la réaction d'hybridation, les bandelettes sont rigoureusement nettoyées pour enlever toute substance non liée.
- Le conjugué de Streptavidine-peroxydase se lie à l'amplicon marqué à la biotine hybridé aux sondes oligonucléotidiques sur la bandelette.
- Des lavages successifs avec le tampon de lavage pour enlever tout conjugué non lié.
- Ajouter la solution de détection (substrat TMB : Tétra Méthyle Benzidine) à chaque bandelette
- Les bandelettes sont retirées des puits et laissées sécher pendant au moins 60 min à température ambiante avant de procéder à l'interprétation des résultats.



Figure 25 : la plaque avec les bandelettes sur l'agitateur de plaque

e) Interprétation des résultats

Les bandelettes de génotypage sont interprétées en plaçant le guide de référence du test sur les bandelettes de génotypage. Les résultats du génotypage sont validés que si :

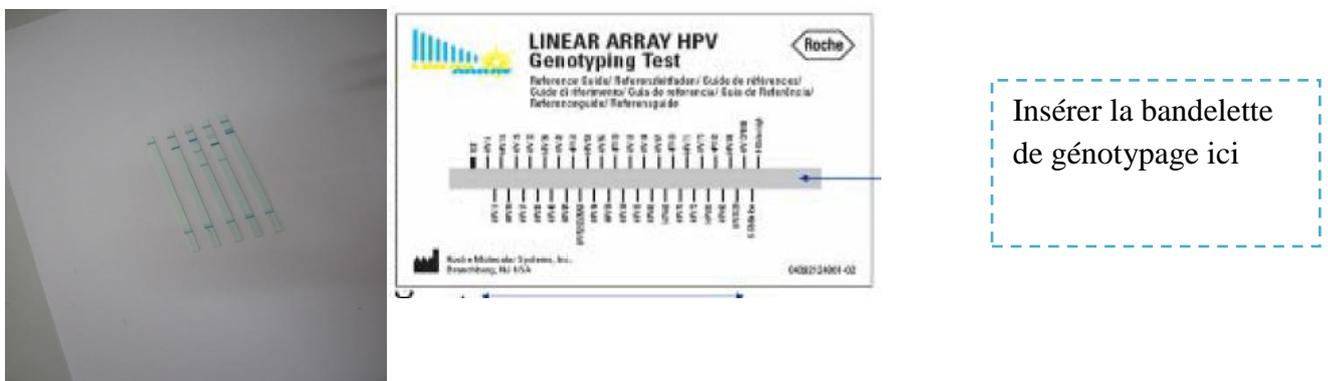


Figure 26 : séchage les bandelettes de génotypage puis en plaçant le guide de référence du test sur les bandelettes de génotypage

- ✓ -le témoin négatif ne laisse pas apparaître une bande positive.

- ✓ Le témoin positif donne un résultat positif interprété comme : HPV 16, β globine faible et β globine élevé.

Si ces deux résultats ne sont pas obtenus, la série entière est incorrecte.

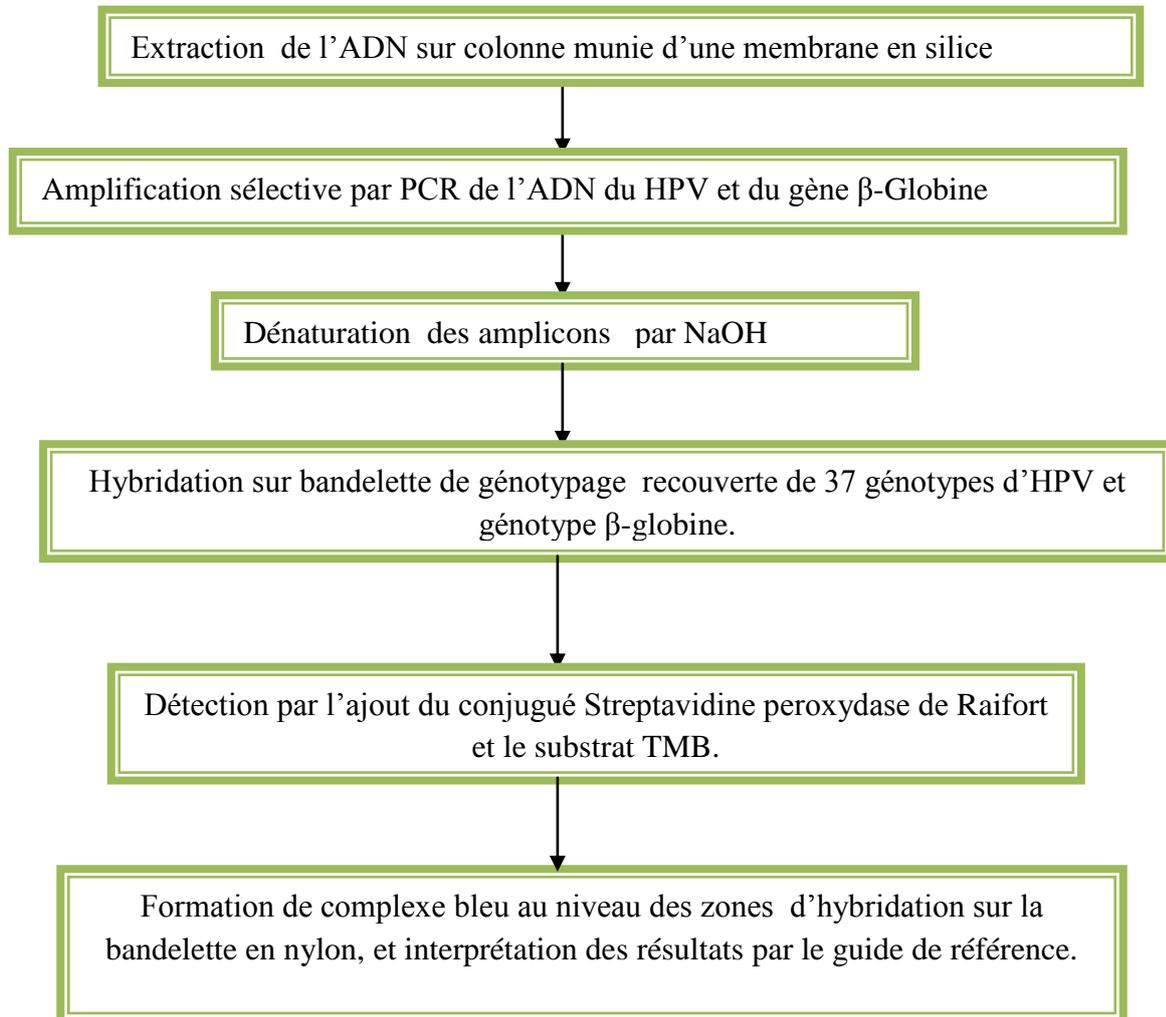


Figure 27: schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation du test de génotypage.

Voir (Annexe 7) : les réactifs de génotypage.

I.2.4 La RT-PCR qualitative E6 et E7 :

I.2.4.1 Principe

La transcription reverse (RT) est un processus dans lequel l'ARN monocaténaire est transcrit en ADN complémentaire (ADNc). Le couplage de la PCR à une étape de transcription inverse constitue la RT/PCR. La RT/PCR est une technique qualitative adaptée à l'étude directe des génomes viraux et des ARNm (Sagana, 2012).

Cette technique utilise les amorces oligo dt, Rnasine (RNase inhibiteur). Au cours des extractions d'ARN, une contamination par l'ADN peut parfois intervenir.

On traite l'ARN par une Dnase avant transcription inverse.

I.2.4.2 Avantage de la technique :

L'avantage de la technique réside en sa spécificité et son pouvoir de cibler les facteurs de risque plus spécifique comme E6 et E7 ; et de confirmer la persistance de l'expression des protéines oncogène virales dans les cellules humaines. Alors la recherche d'ADN HPV montre uniquement la présence du virus sans prouver l'activité oncogénique.

I.2.4.3 Protocol d'extraction de l'ARN Total

a) Préparation de l'échantillon :

- Mettez 1 ml de l'échantillon dans un tube de 2 ml eppendorf.
- Centrifuger 12000x g à 4°C pendant 10 mn.
- Récupérer le culot et ajouter 1ml de TRI Reagent (Sigma)
- Mélanger par plusieurs pipetages.

b) Phase de séparation :

Pour assurer la dissociation complète de complexes nucléoprotéiques laisser à température ambiante 5 min.

Ajouter 200ul de chloroforme.

Vortexez 15".

Incuber 15 min à température ambiante.

Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 15 min.

On obtient 3 phases :

phase organique rouge contient les protéines

Interphase contient l'ADN.

Phase aqueuse non colorer contient l'ARN.

c) Isolation de l'ARN :

Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube.

Ajouter 500ul de 2-propanol par 1 mL de TRI Reagent(Sigma).

Laisser à température ambiante pendant 10 min.

Centrifuger 10 min à 12000g à 4°C.

Formation d'un culot d'ARN.

Retirez le surnageant et laver le culot d'ARN 1 ml d'éthanol à 75 °.

Vortexez, centrifugé pendant 5 min à 7500 g pendant 5 min à 4°C.

NB:

Si le culot d'ARN flottes centrifuger à 12000g pendant 5 min.

On peut aussi conserver l'ARN dans l'éthanol à - 20°C pendant une année ou une semaine à 4 °C.

Séchez brièvement le culot d'ARN pendant 5-10 min sur un bloc chauffant .ne pas le séchez totalement car il devient très difficile à redissoudre.

d) DNASE APRES L'EXTRACTION D'ARN :

Tout le matériel est passé aux UV 5 mn.

Toutes les opérations ont lieu sous hotte, on utilise des pointes cotonnées, de l'eau stérile 2X, des gants .les enzymes sont sortis du congélateur à la dernière minute et gardés dans des bacs congelés.

Dans la glace :

d'alcool 75 ° préparé avec l'eau stérile 2X .

-Centrifugation 30 mn à 13000 rpm.

-le surnageant est éliminé délicatement et le culot séché sous hotte.

Sur 50 ug d'ARN on ajoute :

41 ul eau stérile 1X

2ul Rnasine (RNASE inhibiteur) Proméga.

5 ul tampon DNase (Stratagène.)

Incubé 60 mn à 37°C.

-50 ul de mélange phénol, chloroforme, alcool iso amylique équilibré A PH 4.

-Agitation forte 30 sec (sans retourner le tube risque fuite)

-puis 10 mn dans la glace en agitant régulièrement.

-centrifuger 20 mn à 12000 rpm.

On récupère la phase supérieure S1.

-Sur la phase phénolique on ajoute 20 ul d'eau, agité, centrifugé 20 mn à 12000rpm.

-La phase supérieure récupérée est ajoutée à S1, le volume évalué mesurer la quantité dans le tube.

-Précipitation par acétate Na 3M(concentration finale 0.3 M) et 2volume d'alcool absolu.

- Après précipitation on peut estimer à 35 ug la quantité d'ARN on prélève 5 ug en homogénéisant bien la suspension
- Ajouter 200ul d'alcool 75°.
- Centrifugation 30 mn à 13000 t /mn.
- Séchez le culot, reprendre dans 5ul d'eau stérile.
- prendre la DO 1ul pour 500 ul d'eau.
- A partir de ce dosage faire une PCR avec 0.8 ug à 1 ug d'ARN pour vérifier l'absence d'ADN.
- A partir de ces vérifications on peut enchaîner sur une RT-PCR

e) Préparation de gel d'agarose à 1% :

1gr d'agarose dans 100 ml de TAE (tris EDTA acide acétique) (1X) puis on ajoute 5 ul de bromure d'éthidium BET (10 ug / mL)

Après séchage coulez le gel d'agarose.

Déposé les 10 échantillons avec les marqueurs de tailles (15 ul par réactions) et 1 ul de tampon de charge.

Laissé maigrir pendant 3/4 heures.

Remarque :

Présence de bande pour les 10 échantillons.

f) RT-PCR :

Tout le matériel est passé aux UV 5 mn.

Toutes les opérations ont lieu sous hotte, on utilise des pointes cotonnées de l'eau stérile 2X, des gants .les enzymes sont sortis du congélateur à la dernière minute et gardés dans des bacs congelés.

-A partir de l'ARN purifier par Dnase.

-Sur 5 ug on ajoute 200 ul d'alcool 75 ° stérile et on centrifuge à 13000 rpm pendant 30 mn.

-éliminer le surnagent et l'ARN est séché sous hotte.

+ 15 ul H₂O Stérile 2X.

+ 2 ul oligo d T primer.

-incuber 5 mn à 70°C, mettre dans la glace .l'ARN est allongé.

+8 ul de tampon 5 X.

+4 ul de DTT.

+ 8 ul de d NTP.

+ 2 ul de Rnasine.

-Incuber 2 mn à 45°C.

- +1 ul super script
 - Incuber 50 mn à 45°C.
 - Pour stopper la réaction 15mn à 70 °C.
 - Pour éliminer l'ARN non transformé en c DNA + 1.5ul de Rnase H.
 - Incuber 30 mn à 37 °C.
- Le c DNA est prêt, le garder congeler à -20°C ou à -80°C.
- NB** : Pour la PCR on utilise 5ul d'ADNc.

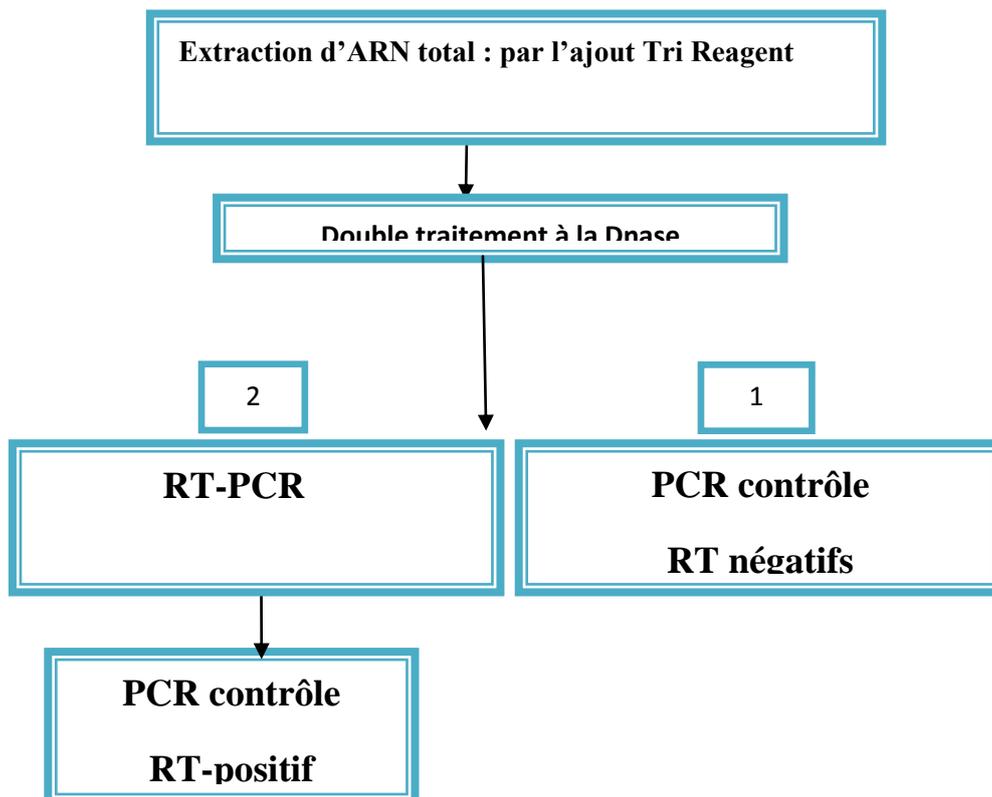


Figure 28 : schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour la réalisation de l'extraction d'ARN jusqu'à RT-PCR.

Préparation de gel d'agarose à 1% :

1gr d'agarose dans 100 ml de TAE (tris EDTA Acide acétique) (1X) puis on ajoute 5 ul de bromure d'éthidium BET (10 ug / ml)

Après séchage coulez le gel d'agarose.

Déposée les 10 échantillons avec les marqueurs de tailles (15 ul par réactions) et 1 ul de tampon de charge, laissée maigrir pendant 3/4 heure.

Remarque : Présence des bandes pour les 10 échantillons.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

Dans le cadre de ce travail nous allons présenter les résultats suivants :

- L'évaluation de l'apport du test HPV dans l'étude des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin chez la femme en parallèle avec une population témoin.

Un total de 226 prélèvements a été analysé :

Il s'agit de 173 prélèvements de patientes présentant des lésions précancéreuses, 28 présentant des lésions cancéreuses et 25 ne présentant aucune pathologie du col connu, recruté au centre de planning familial du CHU Mustapha.

- La recherche du génotype majoritaire présent dans les lésions cancéreuses et précancéreuses.
- Enfin l'introduction de la mise en place de la technique d'étude de l'expression des gènes HPV par méthode RT-PCR.

II.1 Résultats de L'évaluation de l'apport du test HPV dans les lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin

II.1.1 Résultats des patientes Précancéreuses :

L'étude des 173 prélèvements (dont 17 sont exclus) de lésions précancéreuses s'est déroulée selon le schéma représenté ci-dessous (**figure 29**)

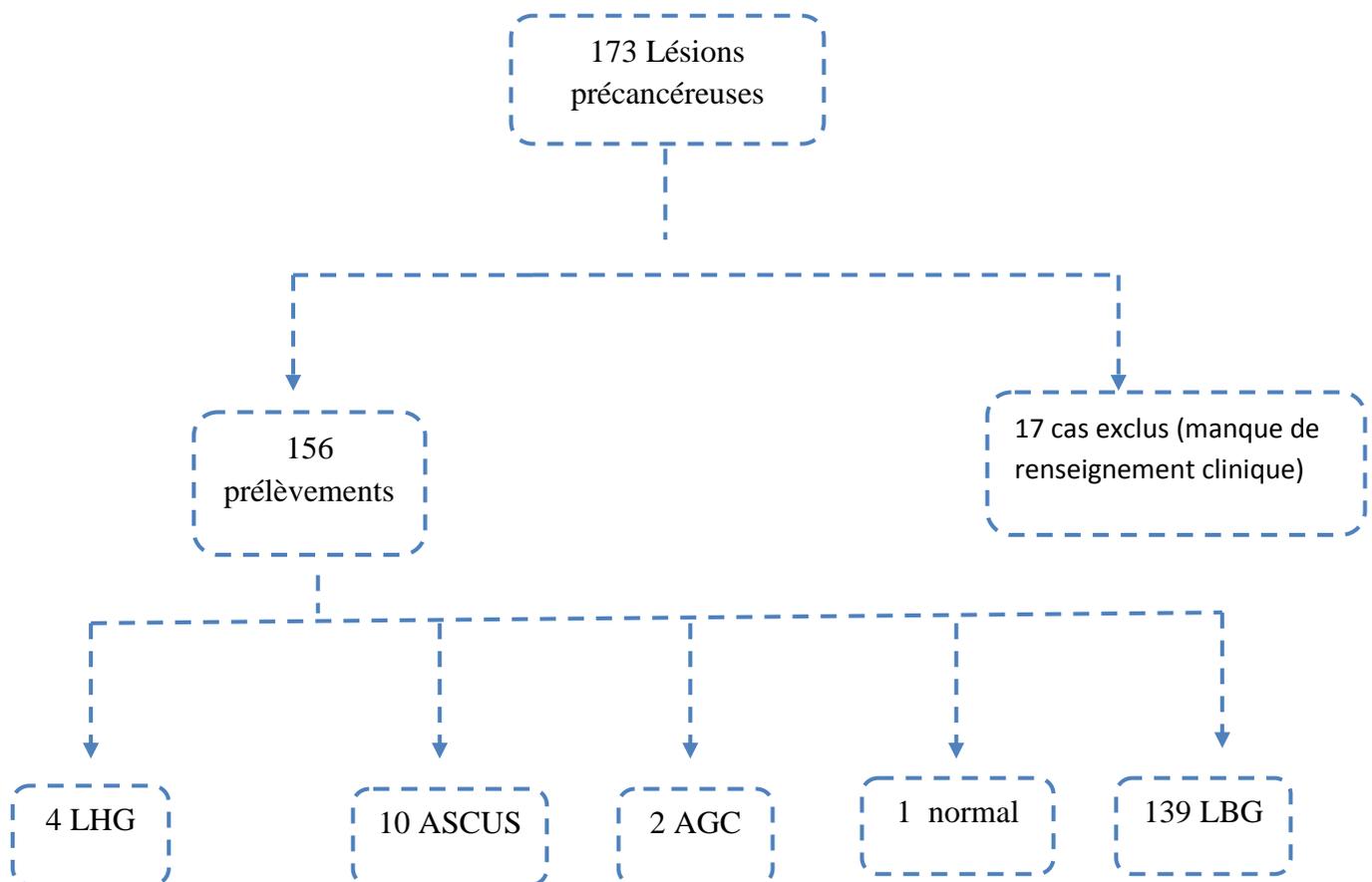


Figure 29 : Echantillonnage des lésions précancéreuses.

LBG : lésion bas grade, **LHG** : lésion haut grade, **AGC** : Atypie Glandulaire Cellulaire, **ASCUS** : Atypies de cellules épithéliales.de signification indéterminée.

II.1.1.1 Répartition des patientes selon l'âge

Nos patientes âgées de 23 à 70 ans, avec une moyenne d'âge de 47 ans, sont répartis par tranches d'âge de 5ans. Nous avons noté que la majorité des femmes sont âgées entre 35 et

55ans avec un pic entre 40-45ans 20%. Toutes fois le pourcentage des femmes âgées de plus 65ans ne dépasse pas 2%. (**Figure 30**)

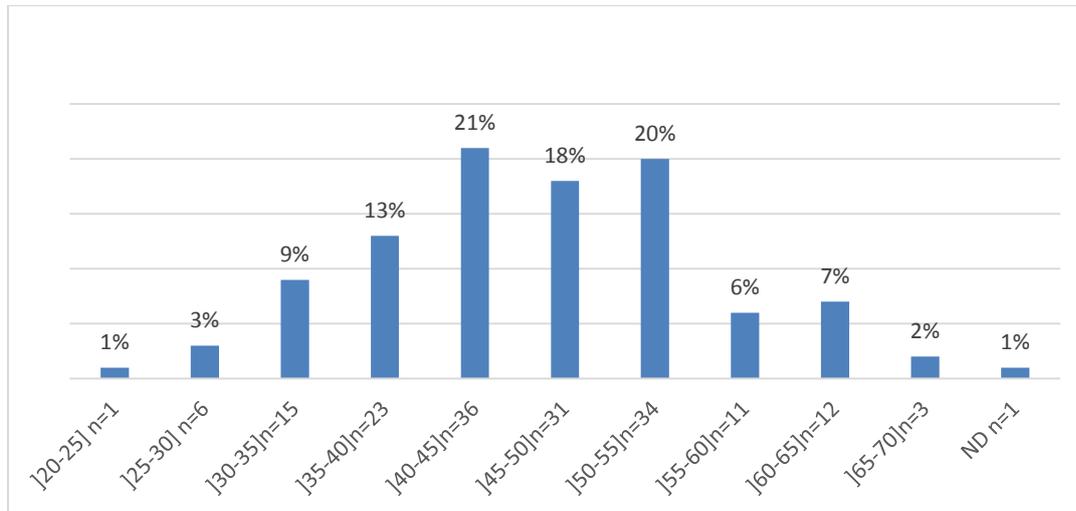


Figure 30: Répartition des 173 prélèvements de la lésion précancéreuse en fonction de l'âge.

II.1.1.2 Répartition des patientes selon la parité

La Répartition des patientes est en moyenne de 4 enfants, nous avons remarqué que la majorité des femmes 65% ont plus de 3 enfants et seulement 5% des femmes n'avaient pas d'enfants (**figure 31**).

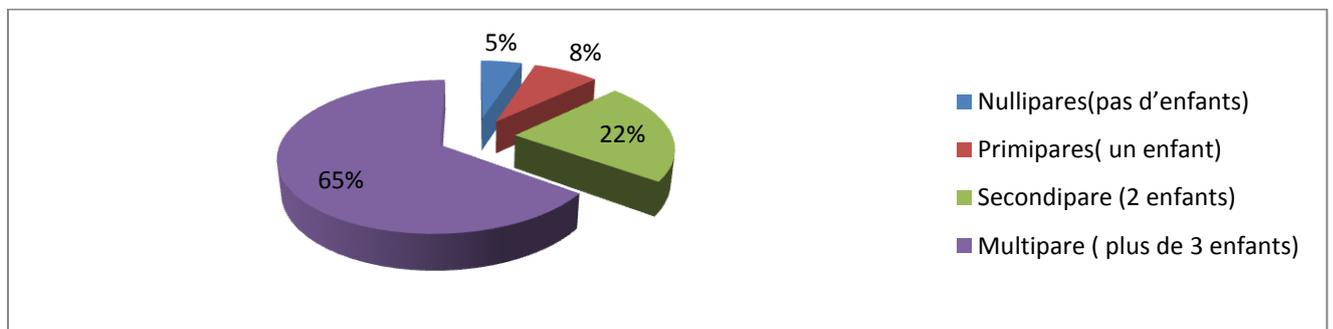


Figure 31 : Répartition des femmes selon la parité.

II.1.1-3 Répartition des patientes selon les techniques utilisées

Le diagnostique du HPV a été réalisé par deux testes, par PCR Amplicor (ROCHE) dans 87.60% des cas et par Hybrid Capture II (Digène) dans 12.4% des cas (**figure 32**).

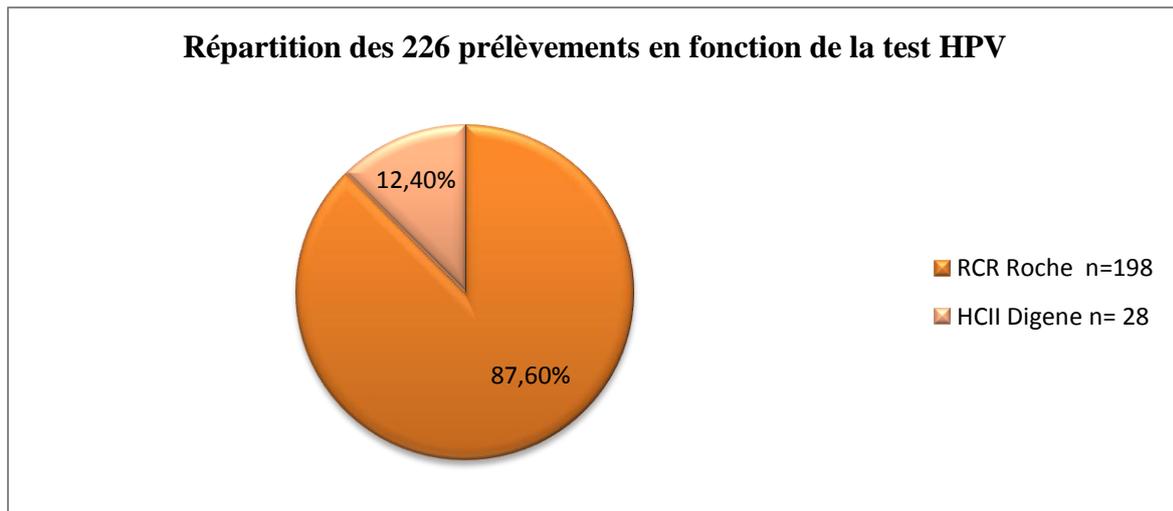


Figure 32 : Répartition des patientes selon le test HPV.

II.1.1.4 Répartition des frottis selon l'examen histologique

Parmi les 173 prélèvements chez les patientes ayant des lésions précancéreuses 76% (n=132) ont eu un examen cytologique sans confirmation histologique (frottis normal) et 24% (n=41) sont confirmés par un examen histologique (frottis anormal). **figure (33)**

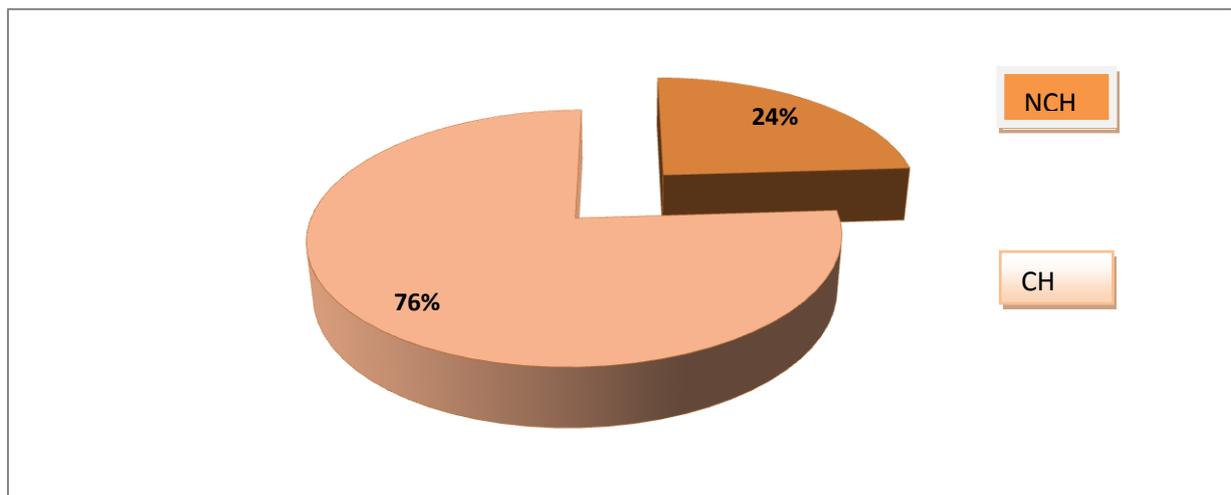


Figure 33 : Répartition des frottis réalisé confirmé ou non histologiquement.

(NCH : non confirmé histologiquement, CH : confirmé histologique).

II.1.1.5 Prévalence des HPV-HR dans les lésions précancéreuses

La recherche des HPV-HR oncogène a été effectuée pour les 173 prélèvements, les résultats montrent que les HPV -HR n'ont été détecté que dans 5.7% (n=09) de l'ensemble des prélèvements (**figure 34**).

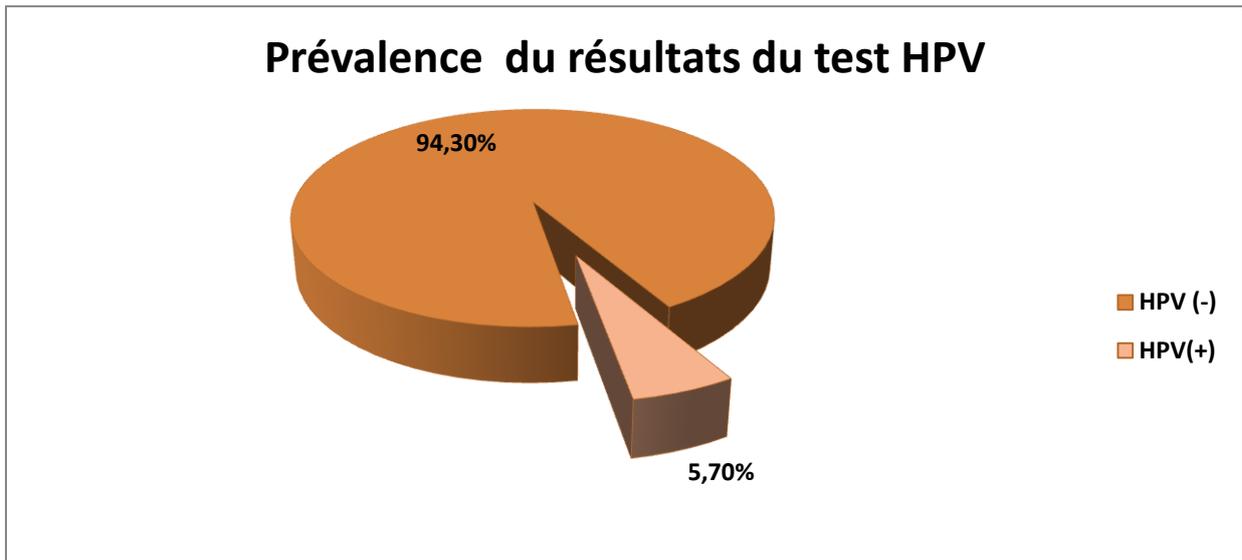


Figure 34 : prévalence des HPV positifs dans les prélèvements cervicaux

III.1.1.6. Prévalence des HPV-HR positifs en fonction de la tranche d'âge

66.77% des femmes HPV-HR appartiennent à la tranche d'âge comprise entre 35-50ans (**figure 35**).

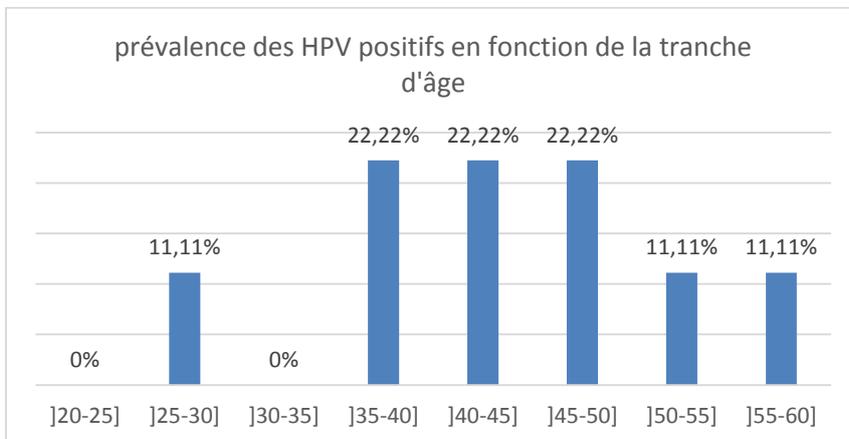


Figure 35 : Prévalence des HPV-HR positifs en fonction de la tranche d'âge.

II.1.1.7 Prévalence des génotypes détectées dans les lésions précancéreuses

Nous avons remarqué que le génotype HPV31, HPV 31/51 est dominant (37%) dans les lésions précancéreuses par rapport aux autres génotypes (35, 39, 11,81). Dans 13% des cas le génotype était indéterminé (**figure 36**).

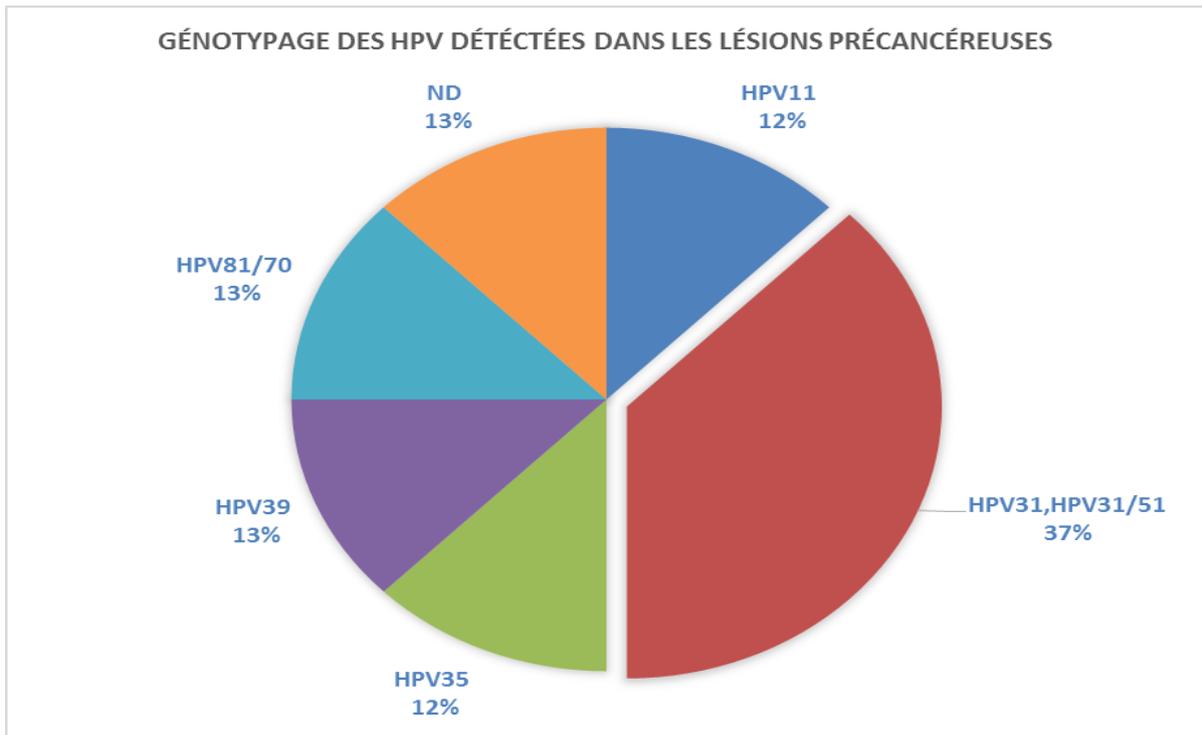


Figure 36 : Répartition des génotypes des HPV-HR

II.1.1.8 Répartition des femmes HPV-HR en fonction de la prise de contraception orale

La répartition des 9 patientes retrouvées HPV positif selon la prise de contraception orale a montré que 88,90% des patientes ont été sous contraception orale (**figure 37**).

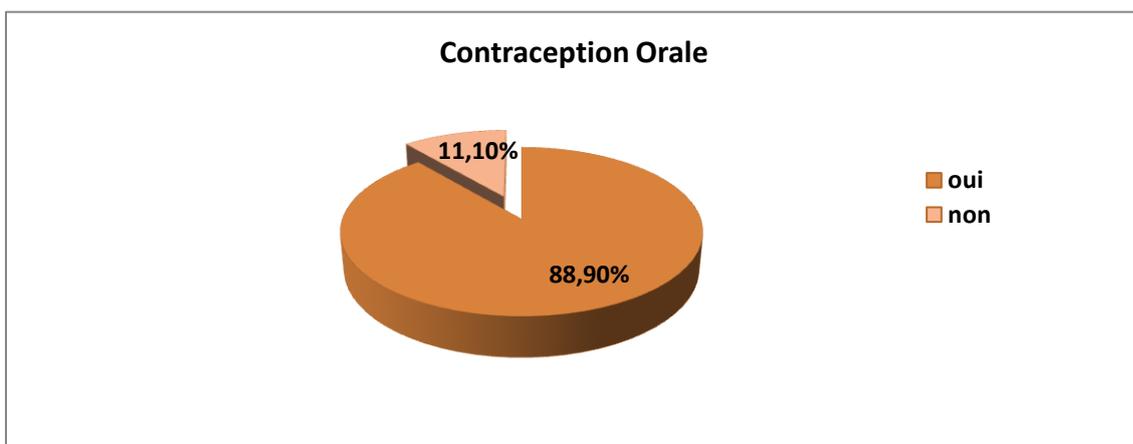


Figure 37 : Répartition des femmes HPV-HR en fonction de la prise de contraception.

II.1.1.9 Répartition d'HPV positif selon la durée de la prise des contraceptifs oraux

Pour compléter notre étude nous sommes intéressée à établir la relation entre la durée de la prise des contraceptifs oraux et le risque d'infection par l'HPV.

Nous avons remarqué que le risque est plus élevé chez les femmes prenant une contraception orale sur une longue durée (> 5 ans) 83.3% que chez les femmes prenant une contraception orale sur période plus courte (< 5ans) 16.7% (**figure 38**).

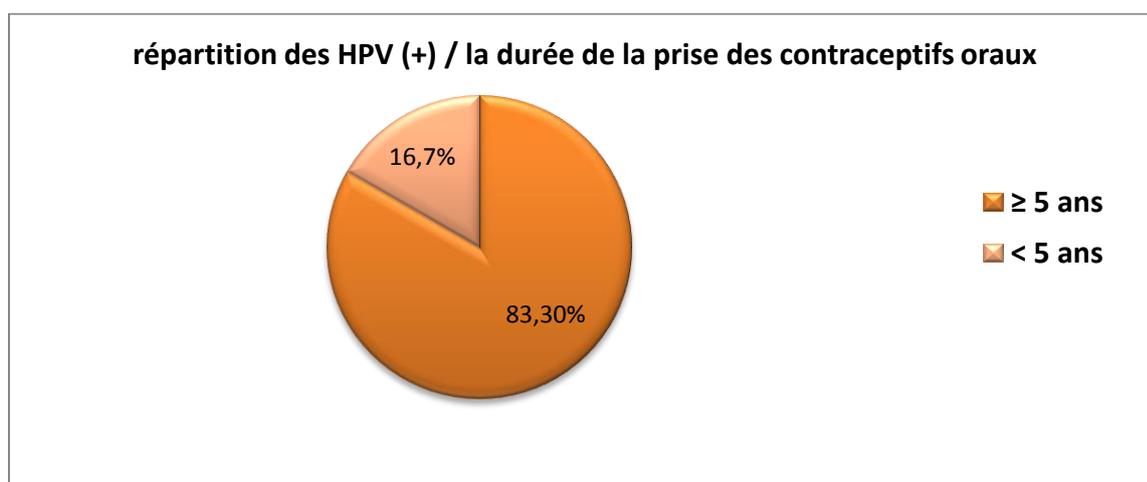


Figure 38: Répartition des femmes selon la durée de la prise des contraceptifs oraux

II.1.1.10 Prévalence HPV dans les lésions précancéreuses

D'après nos résultats, le test HPV n'a été retrouvé positif que dans 6.42% des lésions bas grade, alors il est absent dans les lésions de haut grade et dans les atypies cellulaires (AGC et ASCUS) (**figure 39**).

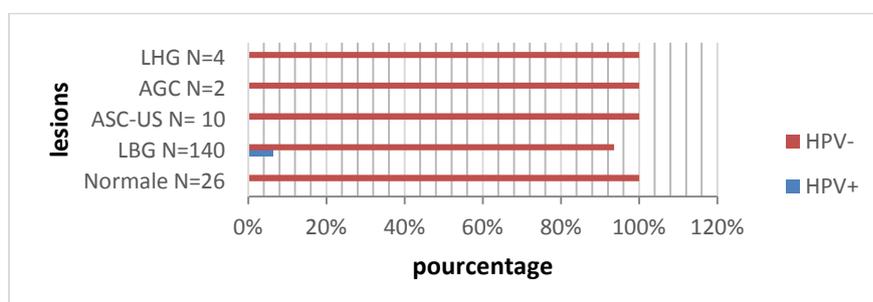


Figure 39 : Prévalence HPV dans les lésions précancéreuses (LBG : Lésion Bas Grade, LHG : Lésion Haut Grade, AGC : Atypie Glandulaire cellulaire, ASCUS : Atypies de Cellules Epithéliales de Signification Indéterminée.)

II.1.2 Résultats des patientes cancéreuses

L'étude a été effectuée sur 28 patientes présentant un cancer du col utérin répartie en :

- 22 carcinomes Epidermoïde.
- 5 adénocarcinomes
- 1 carcinome in situ.

II.1.2.1 Répartition des patientes selon l'âge

Les patientes présentant un cancer du col utérin sont âgées de 38 à 84 ans et sont répartie en tranche d'âges de 5ans.

Nous avons noté que la majorité des femmes (25%) sont âgées entre 45 et 50 ans, cependant, la proportion des femmes jeunes âgées entre 35et 40ans est faible, elle est de l'ordre de 4%, ainsi que pour celles dont l'âge est entre 80 et 85ans (**figure 40**).

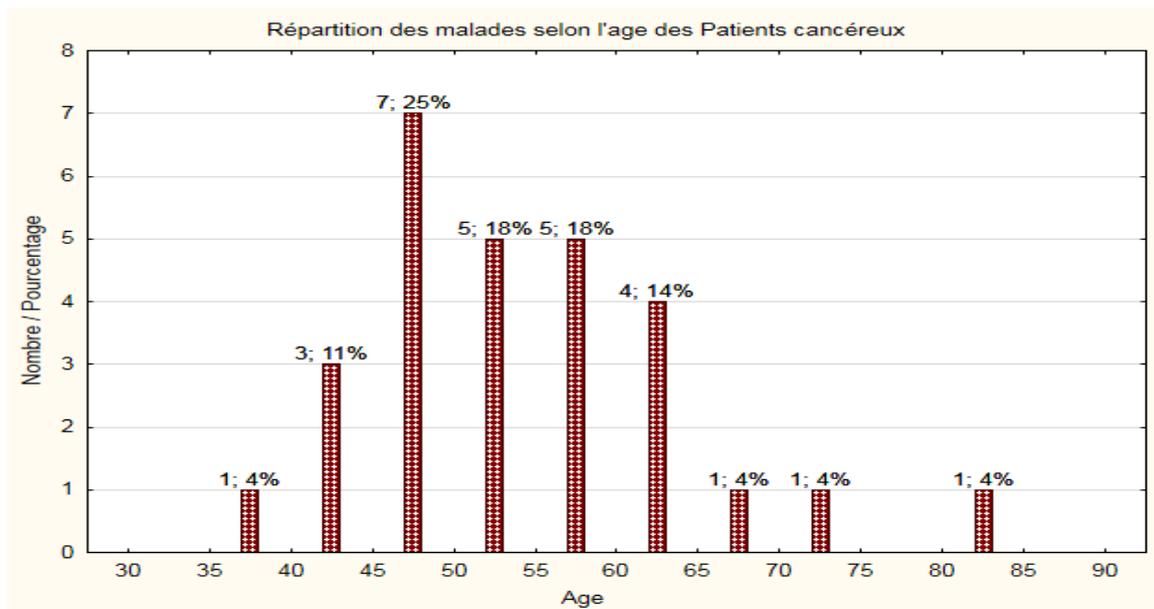


Figure 40 : Répartition des 28 prélèvements cancéreux en fonction de l'âge

II.1.2.2. Répartition des patientes présentant un cancer du col selon la parité

Les patientes étudiées avaient en moyenne 4 enfants, nous avons remarqué que la majorité des femmes présentant un cancer du col utérin (57,14%) ont plus de 3 enfants, et seulement 10,72% n'avaient pas d'enfants. (**Figure 41**)

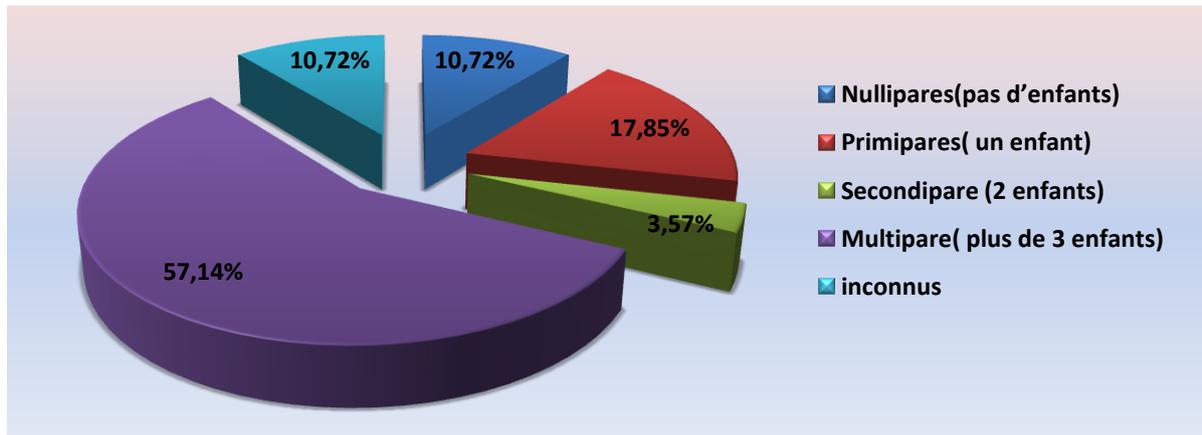


Figure 41 : Répartition des patientes présentant un cancer du col selon la parité.

II.1.2.3 Prévalence des résultats du test HPV dans les lésions cancéreuses

La recherche des HPV-HR oncogène a été effectuée dans 28 prélèvements des patientes présentant un cancer du col utérin, les résultats montrent que les HPV –HR a été détecté dans 82,14 % de l'ensemble des prélèvements. Alors qu'il est négatif dans 17,85 % des cas.

(figure 42).

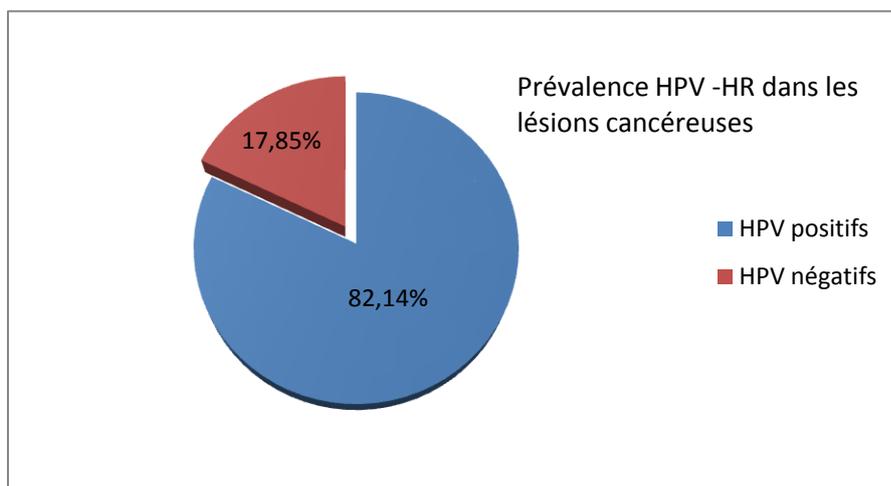


Figure 42 : prévalence des HPV positifs dans les 28 prélèvements des patientes présentant un cancer du col.

II.1.2.4 La prévalence de HPV en fonction du type de cancer

La recherche des HPV-HR oncogène a été effectuée dans 28 prélèvements, les résultats montrent que les HPV –HR a été détecté dans 89.5% des cancers épidermoïdes et 62.5% des adénocarcinomes et dans 100% des carcinomes in situ (**figure 43**).

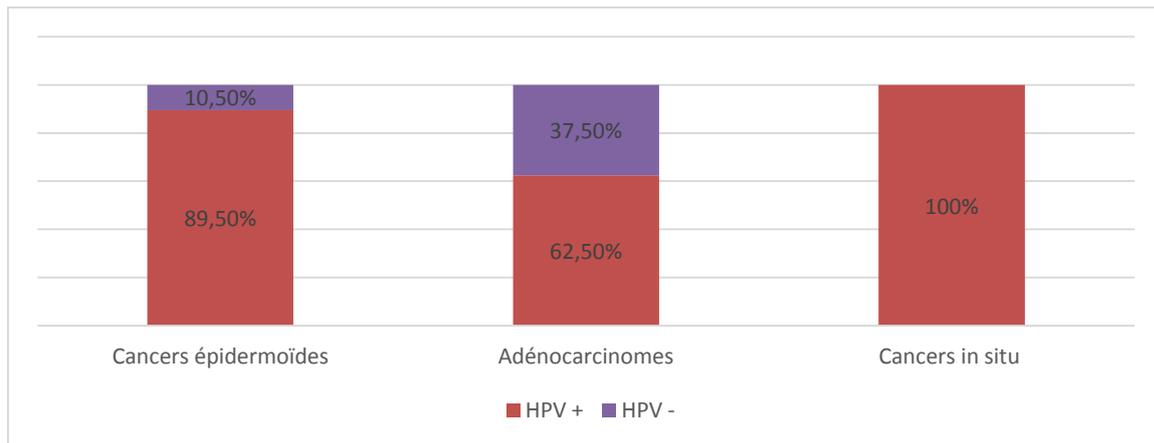


Figure 43 : Prévalence des HPV-HR dans les cancers

II.1.2.5 Prévalence des génotypes HPV :

Les résultats obtenus par le LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test pour les 23 prélèvements positifs au test HPV indiquent que le génotype HPV 16 et HPV 18 sont majoritaires (70%) des cas .HPV 16 présent 41% et le génotype 18 d'HPV 29% des cas. Le reste des génotypes (HPV 45,58 et 83) représente 30% des cas (**figure 44**).

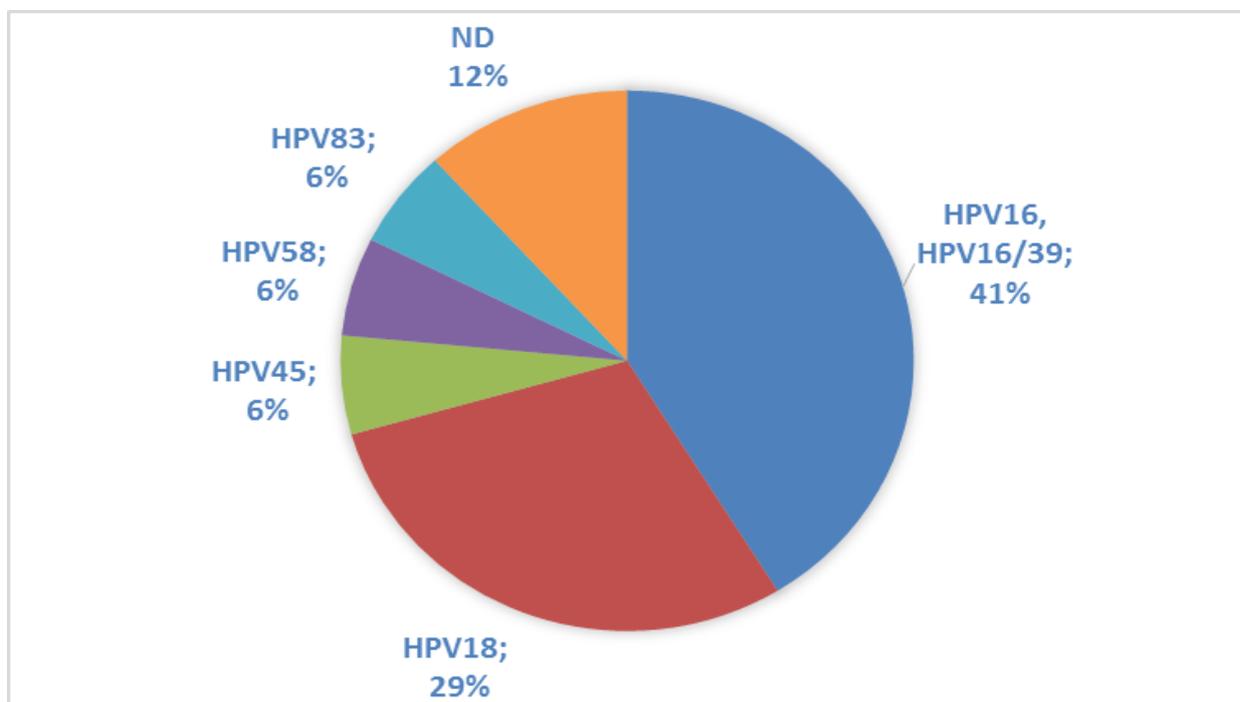


Figure 44 : Prévalence des génotypes d'HPV chez des patientes cancéreuses.

II-2.2 Résultats de RT-PCR :

Pour la mise en place de RT-PCR, nous avons analysée 10 biopsies de patientes présentant un cancer épidermoïde du col utérin qui sont HPV positives par la technique PCR « ROCHE ».

II.1.3.1 Extraction d'ARN

L'ARN a été extrait par la méthode utilisant TRI REAGENT(Sigma).

La DO (densité optique) à 260nm et la concentration des ARN extrait ont été mesuré au spectrophotomètre UV. Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau VI: Représente la DO à 260 nm et la concentration des ARN extrait dans les 10 biopsies

N° Biopsie	DO à 260nm	La concentration en ug/ul	Rapport
Biopsie 1	0.0126	2.487	1.6
Biopsie 2	0.036	0.704	1.6
Biopsie 3	0.046	0.735	1.6
Biopsie 4	0.045	0.831	1.7
Biopsie 5	0.097	1.8	1.6
Biopsie 6	0.076	1.4	1.7
Biopsie 7	0.014	0.118	1.7
Biopsie 8	0.190	3.7	1.6
Biopsie 9	0.044	0.836	1.675
Biopsie 10	0.019	0.249	1.9

- . Le rendement de l'extraction est très satisfaisant, il rapproche de 4ug /ml d'ARN extrait dans la biopsie N°8.
- L'extraction de bonne qualité puisque le rapport de pureté est retrouvé dans l'intervalle 1.6-2

II.1.3.2 Traitement des extraits d'ARN par la Dnase pour éliminer les impuretés par l'ADN.

-**Résultats de la PCR de contrôle** : une amplification par utilisation de primer GP5/GP6 est réalisée sans reverse transcriptase pour vérifier que les échantillons sont exempts d'ADN.

-vérification de la présence ou de l'absence de l'ADN par gel d'Agarose à 1%.

Les résultats de la PCR de control après traitement des extraits par la DNase montrent une présence de bandes d'ADN dans les 10 prélèvements traités, nous notons que nous avons utilisé des réactifs datés de 2007.les même bandes persistent après un double traitement à la DNase.

Nous n'avons pu avoir d'autres réactifs plus récents. Il nous a été de ce fait impossible de poursuivre notre travail sur la mise en place de la technique RT-PCR pour la mise en évidence des ARNm des gènes E6/E7.

II.3 Discussion

Le cancer du col utérin est l'un des rares cancers humains évitables, du fait qu'il soit précédé de lésions précancéreuses. Ces dernières peuvent évoluer vers la malignité en 10 à 15 ans. Le diagnostic très précoce et le traitement de ces lésions rend en principe le développement de ce cancer impossible.

Les frottis cervicaux utérins (FCU) ont permis de réduire considérablement le taux de ce cancer malgré ces limites.

De nombreux travaux ont démontré que la prévention du cancer du col de l'utérus dépend essentiellement de la détection précoce des HPV à haut risque oncogène dans les lésions précancéreuses.

Dans le cadre de ce travail nous allons essayer d'élucider l'apport du test HPV dans le diagnostic et le suivi des lésions précancéreuses par :

- L'étude de la prévalence du HPV dans les lésions précancéreuses et cancéreuses.
- Le génotypage des HPV dans le cancer épidermoïde et dans les lésions précancéreuses.
- Des essais de mise en place de la RT-PCR pour l'étude de l'expression des gènes oncogènes.
-

➤ Lésions précancéreuses

Les patientes âgées de 23 à 84 ans avec une moyenne d'âge de 47 ans pour les patientes présentant des lésions précancéreuses et 55 ans pour les patientes cancéreuses. Elles proviennent essentiellement de la région d'Alger.

Cette étude a été réalisée selon la disponibilité des réactifs par deux techniques en alternance pour la détection des HPV à haut risque oncogène. 28 cas soit 12,4% des cas ont été réalisés par le test Hybrid capture II de Digène et 198 cas soit 87,6% des cas ont été réalisés par le test PCR Amplicor Roche.

Une étude comparative a été effectuée au laboratoire sur 367 prélèvements. Cette étude a révélé une concordance entre ces deux techniques dans plus de 96% des cas (**Sadouki , 2010**). Des résultats similaires ont été décrits par des auteurs européens et nord américains (**Corozzi 2007 ; Halfon 2007 ; Sandri 2006**).

Le pourcentage des femmes âgées de 20 à 25 ans est faible et ne présente que 1% de notre étude, ceci pourrait être expliqué par le fait que cette population ne soit pas concernée par le programme de dépistage car la majorité de ces femmes vont éliminer spontanément l'HPV grâce à l'intervention du système immunitaire et le test HPV n'est réalisé que s'il existe des signes évocateurs de lésion du col utérin.

La majorité d'entre elles sont âgées entre 35 à 55 ans avec un pic soit 21% entre 40 et 45 ans et cela est dû au fait que le dépistage cible les femmes de plus de 35 ans qui ont tendance à garder l'infection à HPV.

Dans notre travail la détection de l'ADN HPV a été réalisée dans le cadre d'un dépistage secondaire c'est-à-dire en deuxième intention après une cytologie (FCV) ou une histologie.

La prévalence du HPV-HR a été évaluée à 5.7%. Ce résultat est similaire à celui retrouvé par **Kraiba et Zoubir en 2011**(5%) et par **Herrero en 2002** (7.6%).

La majorité des femmes étudiées soit 65% avaient plus de 3 enfants (multiparité) et seulement 5% n'avaient pas d'enfant, ceci confirme les observations de différents auteurs (**Munoz et al., 2002**) et (**Autier et al.,1996**)et (**Denis et al., 2008**)et (**Thomas et al .,2001**).

La multiparité liée aux traumatismes lors de l'accouchement mais également aux modifications hormonales et immunologiques pendant la grossesse, l'exposition secondaire de l'endocol à l'environnement vaginal favorise la métaplasie et le développement des HPV (**Denis et al., 2008 ; Thomas ., et al .,2001**).

Le rôle de la prise de contraceptifs oraux et son implication dans le développement des infections à HPV a été observé dans nos résultats HPV positifs a été retrouvé chez 11.1% des patientes sous contraception orale et présentant une infection dont 83.33% des patientes l'ont utilisé pendant plus de 5 ans. La plupart des études confirment que l'emploi de contraceptifs oraux à long terme pourrait augmenter le risque de développer un cancer du col chez les femmes HPV positives comme le montre les résultats de (**Green et al ., 2007**).

D'après (**Chaouki et al., 1998**), l'usage prolongé de la contraception orale pendant au moins 5 ans semble être un cofacteur qui multiplie par quatre le risque de cancer du col de l'utérus chez les femmes HPV positives. Ceci suggère que la contraception orale pourrait promouvoir certaines étapes de l'histoire naturelle de l'infection à HPV.

- **Etude de la prévalence du papillomavirus humains dans les lésions précancéreuses et dans le cancer :**

Nous représentons dans la figure ci-dessous un schéma récapitulatif de la prévalence de l'HPV –HR dans l'ensemble des prélèvements étudiés (226 cas)

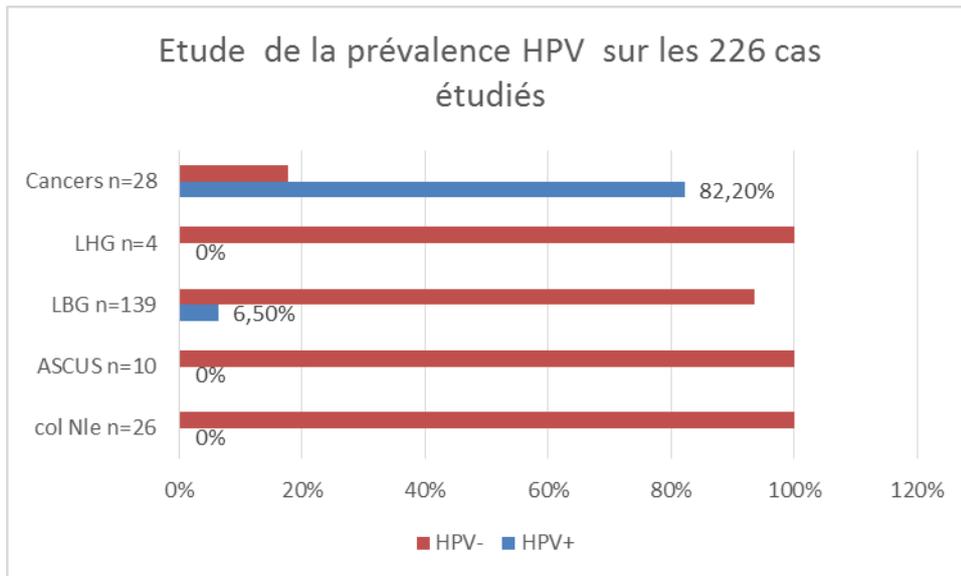


Figure 45 : prévalence HPV-HR en fonction du stade cytologique dans les 226 cas étudiés.

Sur la totalité des examens et sans tenir compte des paramètres retenus, la prévalence d'HPV à haut risque oncogène dans les lésions précancéreuses a été évaluée à 5,7% soit 9 / 156 cas. Ce résultat se rapproche de 4.6% des cas retrouvé en 2010 par **Hammouda et al.**

Sur les 9 prélèvements présentant un test HPV positif, le génotypage a révélé la prédominance de l'HPV 31, 37% des cas, ceci rejoint les données rapporté par le Dr **Hammouda** en 2010 sur la population générale ou elle a révélé la prédominance de ce génotype.

En tenant compte du stade cytologique de la lésion précancéreuse, l'HPV HR a été retrouvé dans plus de 82% dans les cancers et dans 6.5 % dans les Lésions bas grade (LBG).

Il est à noter l'absence totale de ce virus dans les atypies cellulaire et dans les 4 lésions haut grade (LHG).

Selon d'autre étude effectuées au sein du laboratoire et publiées dans les archives de l'institut pasteur d'Algérie (2009 /2010), sur 724prélèvements recueillis entre 2005 et 2007, 89,2-89,7% d'HPV HR ont été détecté dans les LHG. Selon la littérature plus de 80% des lésions haut grade sont associé à l'HPV HR (**Boulangier et al., 2004**). Cette discordance entre nos résultats et ceux rapportés dans la littérature peut être expliquée par :

- Une mauvaise reproductibilité inter observateurs et inter laboratoire malgré l'utilisation du système de Bethesda 2001 pour la classification des lésions, d'où la possible existence de faux positifs cytologique (Stoler et Shiffman, 2001).effectivement nos 4 prélèvement haut grade correspondent à des CIN2 et selon la littérature cette population est très controversé.
- Ou par l'ancienneté du frottis, en effet dans certains cas le frottis cervicovaginal et le prélèvement cytologique ont été effectué à des moments différents ; la patiente présentée effectivement des lésions de haut grade au moment de la réalisation du frottis qui ont régressé

- A ces deux éléments qui pourraient justifier la faible prévalence du HPV –HR dans nos résultats dans les lésions de haut grade, s’ajoute la possible présence dans le prélèvement cervical d’un génotype non détecté par la technique utilisée.

Nous observons également l’absence de ce virus dans les 10 ASCUS étudié. Le test HPV est particulièrement intéressant pour les lésions ASCUS car elles peuvent abriter des lésions de haut grade qu’il est important de diagnostiquer.

Lésions cancéreuses

La prévalence d’HPV-HR dans le cancer du col de l’utérus, a été mise en évidence dans 79% des cas. Sa répartition en fonction du type de cancer a révélé 89.5% d’HPV HR dans les cancers épidermoïdes, 62.5% des cas dans les adénocarcinomes et 100% des cas dans les cancers in situ.

Plusieurs études effectuées en Algérie depuis 1985 ont montré cette fréquente association: 73%, 92,8%, 92,3%, 97,7% ont été retrouvés respectivement par (**S. Megueni, 1992**), (**J. Benyakoub, 1997**), (**Sadouki, 2010**), (**Hammouda, 2004**). Des pourcentages beaucoup plus élevés sont rapportés dans la littérature, ils atteignent 99,7% des cas (**Walboomers et al., 1999**).

Pour ce qui est de la distribution des génotypes d’HPV dans la population des cancers étudiés :

L’HPV 16 est clairement le génotype prédominant dans le cancer du col de l’utérus.

Il est présent dans 41% des cancers épidermoïde et 66,7% des adénocarcinomes.

Cette situation est observée dans pratiquement toutes les régions du monde, même si la proportion du cancer cervicale attribuable à l’HPV 16 varie significativement d’une région à l’autre.

En effet, selon les résultats retrouvés par la méta analyse effectuée par (**Ciuffort, 2005**) : 50%, 52%, 63% et 62% sont détectés respectivement en Afrique, Amérique du sud et centrale, l’Amérique du nord et l’Europe.

Les résultats de cette étude révèlent que le taux d’HPV 16 observé en Afrique est inférieur à celui retrouvé en Amérique et en Europe. Cependant nos résultats ainsi que ceux de Hammouda rejoignent ceux de ces deux continents.

Le second génotype oncogène mis en évidence dans notre étude est l’HPV 18 avec une fréquence de 29% des cas. les autres types oncogènes détectés dans notre étude sont nettement moins importantes que celle d’HPV 16 et 18.

Ces deux virus, HPV16 et18 à eux seuls sont retrouvés dans70% des cas.

Les autres types d’HPV oncogènes sont associés au cancer du col de l’utérus dans 3 seulement 30% des cas étudiés.

Ces données confirment l'intérêt d'introduire le vaccin HPV type spécifique qui permettrait vraisemblablement de réduire le taux de cancers du col en Algérie, dans le cas où la cancérogenèse reste limitée principalement aux HPV16 et 18.

Dans l'hypothèse d'un gradient cancérigène de différents génotypes, il conviendrait dans les vaccins de génération future de prendre en compte les autres types HPV oncogènes. Ceci afin d'éviter un glissement de prévalences, lorsque celles des génotypes 16 et 18 auront été réduites par la vaccination (**Dr Lena Edelman, 2006**).

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVE

Conclusion et perspective

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail portent sur un total de 226 prélèvements, aussi bien dans l'étude des lésions précancéreuses que dans le cancer.

La prévalence du portage du HPV à haut risque oncogène dans les lésions cervicales précancéreuses est de 5,7%. Seulement 6,4% des lésions bas grade ont été retrouvées positives pour l'HPV HR, avec une prédominance de l'HPV 31.

Notre étude prospective de courte durée (six mois) et sur un nombre d'échantillons réduit, ne permet pas de donner une estimation de la prévalence du portage du HPV HR dans les lésions cervicales précancéreuses chez la femme Algérienne.

Nos résultats montrent que cette prévalence est d'environ 80% chez les patientes présentant des lésions cancéreuses. L'HPV16 est le génotype prédominant retrouvé dans 41% des cancers épidermoïdes et 66% des adénocarcinomes, alors que le couple HPV16/HPV18 est retrouvé dans 70% des cas. Ces données sont importantes pour l'introduction d'une éventuelle prévention du cancer du col.

Par manque de réactifs nous n'avons malheureusement pas pu aboutir à la mise en place de la technique RT PCR pour l'étude de l'expression des oncogènes du papillomavirus. Afin d'étudier son rôle et son intérêt dans le diagnostic des lésions précancéreuses du cancer utérin.

L'ensemble des techniques utilisées dans le cadre de ce travail mettent en évidence l'ADN du HPV HR. La détection de cet ADN indique uniquement la présence du virus sans prouver l'activité oncogène.

Les nouveaux concepts qui permettent de cibler les facteurs de risque plus spécifiques (E6, E7) tel que la détection des ARNm confirme la persistance de l'expression des protéines oncogènes virales dans les cellules humaines, fournissant ainsi aux cliniciens une meilleure valeur pronostic comparés aux tests ADN et permettant ainsi une meilleure prise en charge du malade.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Almonte M., Albero G., Molano M., Carcamo C., Garcia P. J. et Perez G,(2008),Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 26 Suppl 11:L16-36.
- Aubin, F,(2003), Papillomavirus humains: biologie et pathologie tumorale (Tec & Doc Lavoisier ;134 :94-9.
- Autier P., Coibion M et al.,(1996).Transformation zone location and intraepithelial neoplasie of cervix uterin.Br J Cancer ; 74 :488-90
- Baseman JG, Koutsky LA,(2005), The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S16-24.
- Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH,(1998), p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395:124-5.
- Bernard HU, (2005), The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S1-6.
- Boulanger J.C.,Sevestre H.,Bauville E.,Ghigli C.,Harlicot J.P.,Gonrdy J,(2004) Epidémiologie de l'infection à HPV. *Gyn.Obst.Fert.* 32 : 218-233.
- Burk RD,(1999), Human papillomavirus and the risk of cervical cancer. 34:103-11.
- Castellsague X, 2008, Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 110:S4-7.
- Chaouki N,Bosch FX,Muniz N et al.,(1998),The viral origin of cervical cancer in Rebt,Morocco.Int J Cancer 75:546-54
- Clavel C,Masure M, Bory J P,Putaud I, Mangeon Jean C , Larenzato M ,Nazeyrollas P,Gabrid R, Quereux C,Birembout P.,(2001),Human papillomavirus testing in primary sceening for detection of high grade cervical lesion : a study of 7932 women ,Br J Cancer 84:1616-23
- Cooper K, Evans M, Mount S, (2003), Biology and evolution of cervical squamous intraepithelial lesions: a hypothesis with diagnostic prognostic implications. *Adv Anat Pathol* 10:200-3.
- Crook T, Tidy JA, Vousden KH, (1991), Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67:547-56.

- Dachez R, (2008), Le cancer du col de l'utérus (Presses Universitaires de France - PUF).
- De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., and Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomavirus. *Virology* 324: 17–27.
- Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA, (1994), Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4382-6.
- DENIS F., HANZ S., ALAIN S, (2008), Clairance, persistance et récidence de l'infection à Papillomavirus. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*. 36 (4) : 430-440.
- Doorbar J, (2005), The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.*, 32:S7-15.
- Duport N , (2008), Données épidémiologiques sur le cancer du col de l'utérus –Etat des connaissances –actualisations -Institut de veille sanitaire : 1-30.
- Forslund O, (2007), Genetic diversity of cutaneous human papillomavirus, *J. Gen. Virol.* 88 : 2662-2669.
- Frazer I. H, (2004), Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 4:46-54.
- Ganguly N. et Parihar S. P, (2009), Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* , 34:113-23.
- Green J.(2007).Cancer Epidemiology Unit, University of Oxford, Royaume-Uni et l'équipe De la collaboration internationale des études épidémiologiques du cancer du col de l'utérus. *The Lancet* Volume 370, Numéro 9599
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R,(1998), IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26:205-13.
- Hammouda D., Gary M, Clifford., Sophie Pallardy., AYYAch G., Chékiri Asma., Boudrich A,(2010), Human papillomavirus infection in a population-based sample of women in Algiers, Algeria. *Inter J of cancer*
- Herrero ., Castle P., Schiffman M et , (2005), Epidemiologic profile of type specific human papillomavirus infection and cervical Neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 191:1796-807

- Honda R., Tanaka H., Yasuda H,(1997), Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420:25-7
- Huibregtse JM., Scheffner M., Howley PM,(1991), A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* 10:4129-35
- Ismail, S.M., Colclough, A.B., Dinnen, J.S., Eakins, D., Evans, D.M., Gradwell, E., O'Sullivan, J.P., Summerell, J.M., and Newcombe, R.G, (1989), Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ* 298, 707–710.
- Jones DL., Thompson DA., Munger K,(1997), Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* 239:97-107.
- Kraiba R., Zoubir H,(2011), Intérêt du test HPV à haut risqué dans le dépistage primaire,Service de cytologie, Centre Pierre et Marie Curie.
- Karly LOUIEA B., Marie-Noelle Didelotc., Audray Damayc., Nicolas Nagotc., Philippe Mayaub, Michel Segondyc ,(2008), Papillomavirus humains (HPV) et cancers associés: aspects épidémiologiques. revue francophone des laboratoires 405 :37
- Kumar A., Zhao Y., Meng G., Zeng M., Srinivasan S., Delmolino LM., Gao Q., Dimri G., Weber GF., Wazer DE., Band H, Band V ,(2002), Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 22:5801-12.
- Mantovani F., Banks L,(2001), The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20:7874-87.
- Melnikow J.,Nuovvo.,Willan A.,R,Chan B K.,Howell, L P,(1992),Naturel history of cervical squamous intraepithelial lesions : a meta-analysis.*obst.Gyn*,40 :742-35. 5
- Monnier Sylvain-Benoit, (2007), statut viral et l'immunité muqueuse,des marqueurs prédictifs de l'histoire naturelle des lésions cervicales associées aux HPV :29.
- Monsonego, J, (1988), Dysplasies du col utérin et Papillomavirus humains : 181.
- Monsonego, J,(2006), Infections à papillomavirus: état de connaissance pratiques et prévention vaccinale , 6.7.18.

- Monsonego, J, (2007), *Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus* (Springer) ,443
- Mougin C., Nicolier M., et Decrion-Barthod A.-Z,(2008) HPV et cancers, mécanismes de l'oncogenèse. *Revue Francophone des Laboratoires.*:35-42.
- Mougin C., Dalstein,J.L., L.Prétet.,C.Gay.,J.P.Schaal.,D.Riethmuller, (2001) ,Epidémiologie des infections cervicales à papillomavirus: 1018.
- Munger K., et Howley P. M, (2009), Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89:213-28.
- Munger K., Baldwin A., Edwards K. M., Hayakawa H., Nguyen C. L., Owens M., et al, (2004), Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* , 78:11451-60.
- Munoz N., Franceschi S,Bosetti C et al, (2002),Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer : The IARC multicentric case control study. *Lancet* 359:1093-101
- Ozbun MA., Meyers C.,(1998), Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 72:2715-22.
- Parkin D. M. et Bray F,(2006), The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*24 Suppl 3:S3/11-25.
- Patel D., Huang SM., Baglia LA., McCance DJ.,(1999), The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo J* 18:5061-72.
- Riethmuller D., Seilles E, (2000), Immune response of the female genital tract mucosa and mechanisms of papillomavirus counteractions. Immunité muqueuse du tractus génital féminin et mécanismes d'évasion des papillomavirus. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 29(8): 729-740.
- Sadouki N., Djediat B., Khidri A., Mezali H., Bandoui Dj., Harrouz F., Graba A., Bouguermuh A (2007-2008). Génotypage du papillomavirus en Algérie chez des patients prises en charge dans un service de chirurgie. *Archives inst. Pasteur Algérie* 66. 61-74

- Segondy M, (2008), Classification des papillomavirus (HPV) *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* - SEPTEMBRE-OCTOBRE - N°405 :24.
- Segondy M,J.C Nicholas,(2008),Papillomavirus N° 405:21
- Scheffner M., Werness BA., Huibregtse JM., Levine AJ., Howley PM,(1990), The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129-36.
- Shamanin VA., Sekaric P., Androphy EJ,(2008), hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells. *J Virol* 82:3912-20.
- Shiff Man,M.,Casle,PE.(2005),The promise of global cervical cancer prevention *N Engl J Med*,353,2101-04..
- Stoler M H., Schiffman M, (2001),Interobserver reproductibility of cervical cytologic and histologic interpretations : realistic estimates from the ASCUS-LSIL triage study, *jama* 285 ,1500-5
- Solomon D., Davey D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., Jr, et al, (2002), The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287, 2114–2119.
- Thomas D.B., RAY R.M., KUYPERS J., KIVIAT N., KOETSAWANG A., ASHLEY R.L., QIN Q., KOETSA-WANG S,(2001), Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *Am J Epidemiol.*; 153(8), 740-8.
- Thomas M., Massimi P., Jenkins J., Banks L,(1995), HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 10:261-8.
- Waboomers J.K., jakobs.,M., Manos M.,Bosch F.x.,Kummer J.A.,Sah K.V.,Snijders P.j.,Peto J.,Munoz N,(1999), Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.*J.Pathol*, 189 :12-91.
- YENI P,(2010), Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH; recommandations du groupe d'experts. *La documentation française*, Paris : 417.

- Zur Hausen H,(2002), Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application,Nat Rev Cancer 2(5):342-50
- Zur Hausen H,(1983),Similarities of papillomavirus infections with tumor promoters. *Princess Takamatsu Symp.* , 14:147-52.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Tableau I – Classification des HPV (d'après de Villiers et al. [1]).				
Genre	Espèce	Type principal	Autre types	Commentaires
Alpha-papillomavirus	1	HPV 32	HPV 42	Bas risque, lésions orales ou génitales
	2	HPV 10	HPV 3, 28, 29, 78, 94	Bas risque, lésions cutanées, parfois muqueuses
	3	HPV 61	HPV 62, 72, 81, 83, 84, 86, 87, 89	Bas risque, lésions muqueuses
	4	HPV 2	HPV 27, 57	Verrues vulgaires
	5	HPV 26	HPV 51, 69, 82	Haut risque, lésions muqueuses
	6	HPV 53	HPV 30, 56, 66	Haut risque, lésions muqueuses
	7	HPV 18	HPV 39, 45, 59, 68, 70, 85	Haut risque, lésions muqueuses
	8	HPV 7	HPV 40, 43, 91	Bas risque lésions cutanées et muqueuses
	9	HPV 16	HPV 31, 33, 35, 52, 58, 67	Haut risque, lésions muqueuses
	10	HPV 6	HPV 11, 13, 44, 74	Bas risque, condylo- mes acuminés, papillo- matose laryngée
	11	HPV 34	HPV 73	Haut risque, lésions muqueuses
	12	RhPV 1		Papillomavirus singe Rhésus
	13	HPV 54		Bas risque, lésions muqueuses
	14	HPV 90		Bas risque, lésions muqueuses
	15	HPV 71		Bas risque, lésions muqueuses
	1	HPV 5	HPV 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25, 36, 47, 83	Lésions cutanées, généralement bénignes. Lésions parfois malignes: épidermo-dysplasie verruciforme, Immunodéprimés

Beta-papillomavirus	2	HPV 9	HPV 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80	Lésions cutanées, généralement bénignes. Lésions parfois malignes: épidermodysplasie verruqueuse, Immunodéprimés
	3	HPV 49	HPV 75, 76	Lésions cutanées bénignes
	4	HPV 92		Lésions cutanées pré-cancéreuses et cancéreuses
	5	HPV 96		Lésions cutanées pré-cancéreuses et cancéreuses
Gamma-papillomavirus	1	HPV 4	HPV 65, 95	Lésions cutanées
	2	HPV 48		Lésions cutanées
	3	HPV 50		Lésions cutanées
	4	HPV 60		Lésions cutanées
	5	HPV 88		Lésions cutanées
Mu-papillomavirus	1	HPV 1		Verrues vulgaires, plantaires
	2	HPV 63		Verrues vulgaires, plantaires
Nu-papillomavirus	1	HPV 41		Lésions cutanées, retrouvé dans carcinomes cutanés

ANNEXE 2 : A) classification basé sur le tropisme et B) classification selon leur potentiel oncogène.

A

Tableau II – Distribution des types d'HPV selon leur tropisme.

Tropisme	Types
Cutané	1, 2, 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 36, 37, 38, 41, 47, 48, 49, 50, 57, 60, 63, 65, 75, 76, 80, 88, 92, 93, 95, 96
Muqueux	6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90
Mixte	3, 7, 10, 28, 29, 40, 43, 78, 91, 94

(d'après de Villiers et al. [1])

B

Tableau III – Classification des HPV ano-génitaux selon leur potentiel oncogène.

Classification	Types
Haut risque	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Haut risque probable	26, 53, 66, 68, 73, 82
Bas risque	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

Les HPV ano-génitaux non représentés dans le tableau sont considérés à risque indéterminé. (d'après Muñoz et al. [3, 4])

ANNEXE 4 :

Matériels de laboratoire

- Agitateur magnétique.
- Agitateur pour plaque : Thermolyne Maxi-mix III type 65800
- Bain marie. marque LKB , BROMMA,2209
- Bain marie avec agitation.
- Balance : SARTORIUS 1207 MP2
- Centrifugeuse : EPPENDORF
- Centrifugeuse SIGMA
- Congélateur à -20°C, -80°C.
- Etuve à 37°C : marque JOUAN
- Embout pour micropipette.
- Hotte à flux laminaire.
- Hotte pour PCR
- Générateur/
- Luminomètre: Digene DML2000
- Micropipettes multicanaux.
- Portoirs
- Pompe à vide DOA-V137-EN
- Spectrophotomètre Marque PHAMACIA BIOTECH GENE QUANT II
- Thermocycleur : Techno TC -312
- Verreries de laboratoire.
- Vortex Heidolph type DSG 302.

ANNEXE 5 :

Digène Hybride capture ® 2 HPV test :

Les Réactifs :

Composition du kit	Composition	ROLE
Indicateur coloré	0.05 % p /v d'azide de sodium	Permet de visualiser le changement de couleur .
Réactif de dénaturation	Solution diluée d'hydroxyde de sodium (NaOH)	Permet la Dénaturation de l'ADN.
Diluant de sonde	Solution tamponnée Avec 0.05 % p /v d'azide de sodium	Pour diluer la sonde 1/25
Sonde HPV à haut risque	Sonde ARN des 13 HPV-HR en solution tamponnée	Formation des hybrides ADN HPV /ARN stable
Contrôle de qualité HPV-BR	5 pg/ ml (500000 copie /ml) d'ADN HPV 6 avec 0.05 % P/V d'azide de sodium	Pour valider nos résultats.
Contrôle de qualité HPV-HR	5 pg/ ml (500000 copie /ml) d'ADN HPV 16 avec 0.05 % P/V d'azide de sodium	
Calibrateur négatifs	ADN porteur en milieu de transport des échantillons (STM) avec 0.05% p/v d'azide de sodium	Utilisé pour s'assurer de la bonne lecture par le logiciel afin de valider la réaction.
Calibrateur HPV-HR	1 pg/ml d'ADN HPV 16 porteur en milieu de transport des échantillons (STM) avec 0.05% p /v d'azide de sodium.	
Microplaque de capture	Revêtue d'anticorps anti-hybrides ARN /ADN	Capture des hybrides ARN/AND
Réactif de detection 1	Anticorps antihybride ARN/AND conjugués à la phosphatase alcalin en solution tamponnée avec 0.05 % p/v	Le substrat chimiluminiscent est clivé par phosphatase alcaline liée aux hybrides ce qui conduit à l'émission d'une radiation mesuré par le luminomètre.
Réactif de detection 2	CPD-star avec EMERLAND 2(substrat chimilunèscent)	
Tampon de lavage concentré	1.5 % p/v d'azide de sodium	Permet de retirer le réactif de détection 1.

ANNEXE 6 :

LE KIT AMPLICOR®HPV TEST DE ROCHE POUR 50 TEST :

	Composition du kit	Composition	ROLE
	CAR (ARN porteur)	ARN de synthèse lyophilisé	composant qui se lie l'ARN permettant son élimination
Le kit d'extraction	PK (protéinase K)	Une enzyme	Utilisé pour lyse cellulaire, activé température élevé .
	AVE	eau sans RNase <0.09% d'azide de sodium	tampon de d'élution
	AW2	Tampon de tri-HCL <0.09 % d'azide de sodium	Tampon de lavage
	ATL	❖ EDTA <10% DE SDS	Tampon de lyse tissulaire.
	AL	❖ <50 % d'hydro chlorure de guanidine	Tampon de lyse
	CLM (colonne) et ELT (tube de récupération de l'éluat).	❖ CLM contenant une membrane de silice	La membrane de silice chargée positivement permet la rétention de l'ADN
Le kit HPV CONTROLS		❖ Tampon tris-HCL. ❖ EDTA. ❖ <0.0001 % d'ADN plasmidique	
	HPV (+) C	❖ Non infectieux (d'origine microbienne) contenant une séquence d'HPV 16. ❖ < 0.0001 % D'ADN plasmidique non infectieux contenant des séquences de β-globine humaine.	Témoin HPV +
	HPV (-) C	❖ Tampon tris-HCL. ❖ EDTA. ❖ 0.05 % d'azide de sodium	Témoin HPV -

		<ul style="list-style-type: none"> ❖ <0.002 % POLY Ra RNA synthèse 	
Le kit d'amplification	HPV MMX (master mix linear array HPV)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ TAMPON DE TRIS CHLORURE DE POTASSIUM. ❖ < 0.001 ADN polymérase. ❖ Ampli taq gold d'origine microbienne) ❖ <0.001 % enzyme Ampérase (uracile N-glycosylase). ❖ <0.05% d'azide de sodium. ❖ <1% tween 20. 	Permettent l'amplification et la synthèse d'un nouveau brin d'ADN.
	HPV Mgcl 2 (chlorure de magnésium HPV)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ <1% de chlorure de magnésium. ❖ Colorant amarante ❖ 0.05% D'AZIDE de sodium 	Active l'enzyme ADN polymérase Ampli Taq
Le kit d'hybridation	HPV MWP	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Microplaque avec des puits revêtus de sondes d'ADN HPV. 	Permet l'hybridation ADN HPV / sonde.
	B globine MWP	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Microplaque avec des puits revêtus de sondes d'ADN de β globine 	Permet l'hybridation ADN β globine /sonde.
	[1] DN : solution de dénaturation	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 1.6% d'hydroxyde de sodium. ❖ EDTA. ❖ Bleu de thymol 	Détruit l'ampérase résiduelle et dénature l'amplicon HPV et β globine.
	[2] HPV HYB : tampon d'hybridation HPV	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Solution de phosphate de sodium ❖ < 0.2 % solubilisant ❖ <25 % de thiocyanate de sodium 	Permet l'hybridation des AND simple brin.

Le kit de detection	[3]AV-HRP conjugué avidine – peroxydase de raifort	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Tampon de tris HCL ❖ < 0.001% de conjugué avidine ❖ peroxydase de raifort ❖ Gammaglobuline bovine ❖ 0.1% de phénol. ❖ 1% de proclin ® 150. 	Se lie aux amplicons marqué à la biotine
	[4]SUB A (substrat A)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Solution de citrate ❖ 0.01% de peroxyde d'hydrogène. ❖ 0.1% de proclin ® 	
	[5]SUB B (substrat B)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 0.1% de 3,3',5,5' Tétra méthyle benzidine (TMB). ❖ 40% Diméthyle Formamide (DMF) 	
	[5] stop	<ul style="list-style-type: none"> ❖ 4.9% d'acide sulfurique (acide faible) 	Permet l'arrêt de la réaction
	10X WB (concentré de lavage)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ <2% de tampon de phosphate ❖ <9% de Na cl ❖ <2% de détergent ❖ 0.5% de conservateur de proclin ®150 	Tampon de lavage permet de retirer ce qui n'a pas été hybridé

ANNEXE 7 :

LES REACTIFS de test LINEAR ARRAY GENOTYPING TEST DE ROCHE :

Les composants du kits :		Composition	Rôle
Kit d'extraction (même que celui de la PCR Amplicor)		Même composition que le kit Amplicor ® HPV test ROCHE.	Même rôle
Kit de contrôle (même que celui de la PCR Amplicor)		Même composition que le kit Amplicor ® HPV test ROCHE	Même rôle
Kit d'amplification (même que celui de la PCR Amplicor)		Même composition que le kit Amplicor ® HPV test ROCHE	Même rôle
Kit de détection	DN	Même composition que DN Amplicor	Même rôle
	SDS (sulfate dodécile sodium)	❖ 20 % de sodium lauryl sulfate (SDS) ❖ 1% de conservateur Proclin ®150.	Tampon de lavage
	SSPE (SSPE concentré)	❖ Solution de phosphate de sodium ❖ Chlorite de sodium EDTA ❖ 1% de conservateur Proclin ®150	Tampon de lavage
	SA-HRP (conjugué de Streptavidine peroxydase de raifort)	❖ Tampon ACES-CHLORITE DE sodium ❖ 1% de conservateur proclin ®150	Clive le substrat
	CIT (citrate concentré)	Solution de citrate	Tampon de lavage
	SUB A (substrat A)	❖ Solution de citrate ❖ 0.01% Peroxyde d'hydrogène. ❖ 0.1% de conservateur PROCLIN ®150	
	SUB A (substrat B)	0.1% 3.3'5.5'tetramethyle benzidine (TMB) 40%dimethyle Formamide (DMF)	Clive le conjugué et donne une coloration sur les bandelettes permettant leurs lecture.