

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Ministère d'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Université SAAD DAHLAB - Blida - SOUMA



Université **Blida 1**
Faculté des **Sciences de la nature et de la vie**

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master
Spécialité : Sciences alimentaires

Sous le thème

*Mise au point et développement d'une technique d'extraction
de l'ADN par la silice et application pour le diagnostic des
Papillomavirus à partir des biopsies fraîches de l'ovaire.*

Présenté par : **Zidane Ferial**

Encadré par :

Pr. Lynda Boutekrabt (Promoteur interne)

Pr. MoulayMustapha Ennaji (Promoteur externe)

Soutenu publiquement le 28 / 10 / 2013 devant les membres de jury :

Pr. H. Achheb

MCB

Président

Pr. N. Bousbia

MCB

Pr. S. Fernane

MAA

} **Examineurs**

2012-2013

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À

*Mes parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour
et ma grande reconnaissance
envers vous.*

À

*Mon mari qui m'a toujours soutenu dans mes
Choix.*

À

*Ma belle-famille ;
À mes très chers frères*

et À

Toute la famille

Feriel qui vous aime

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères à :

Madame la doyenne de la faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université de Blida 1

Monsieur le Doyen de la faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia (FSTM)- Université Hassan II Mohammedia-Casablanca Maroc (UH2MC).

Monsieur le responsable du master en science alimentaire

Professeur Moulay Mustapha ENNAJI, coordonnateur du Master MSTV IVMA à la FSTM et encadrant, qui a accepté de m'accueillir en stage au sein de son laboratoire de virologie, microbiologie et qualité / éco-toxicologie et biodiversité (LVMQ ETB) Mohammedia Maroc je le remercie pour son aide précieuse ses conseils enrichissants, l'infrastructure nécessaire pour mener à bien ce travail et pour la documentation mise à ma disposition tout le long de ce projet.

Professeur Lynda Boutekrabt, promotrice de mon projet de fin d'étude, je la remercie également pour son soutien, son assistance et son suivi rigoureux qui m'ont aidés à mener à terme ce travail.

Au président et membres du jury: **Pr. H. Acheheb, Pr. Bousbia et le Pr. S. Fernane**, vous m'avez fait l'honneur d'accepter de bien vouloir juger ce modeste travail, veuillez trouver ici, l'expression de ma grande considération et mon profond respect.

Je tiens à remercier le personnels du laboratoire LVMQ ETB tout particulièrement un ami **Magloire Luc Anicet BOUMBA**, les mots me manque pour exprimer toute ma gratitude envers toi pour ton aide, ton appui et tes conseils qui m'ont été utiles pour mener à bien ce projet de fin d'étude. Et je te remercie aussi pour ta patience et ta gentillesse que dieu te le rendra.

J'aimerais également adresser mes amitiés et remerciements particulier à **Samira ZoaAssoumou, Ouafaa Hay hasnaoui, Fatima zohra Lahdachi et Rajaa Benhamama**, pour leurs accueils chaleureux leur aide, leur gentillesse et leur soutien tout au long de cette période.

Mes remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de Loin à l'élaboration de ce travail.

Résumé

Principale cause de mortalité dans le monde, le cancer de l’ovaire est multifactoriel. Plusieurs études ont montré un lien entre ce cancer et certains virus oncogènes, notamment le HPV. Ce virus est difficilement cultivable en routine et seules les techniques moléculaires dont la première étape nécessite une extraction de l’ADN viral permettent de poser son diagnostic.

Dans ce contexte, notre étude avait pour but de développer une technique d’extraction d’ADN à base de silice, pour une détection par PCR des HPV à partir de 40 échantillons de biopsies fraîches de l’ovaire des femmes marocaines atteintes du cancer de l’ovaire consultant au service de gynécologie du Centre Hospitalier Universitaire CHU Ibn Rochd à Casablanca, Maroc.

Nos résultats ont montré une bonne qualité d’ADN extrait avec un rendement de 65 à 83 μ g/ml et une pureté de 1,5 à 1,9 nm. Malgré un rendement moins important que celui extrait au phénol-chloroforme, la technique d’extraction d’ADN à base de silice reste une technique simple, rapide et relativement peu coûteuse tout en permettant d’avoir un extrait amplifiable par PCR sans inhibiteurs. L’ADN extrait par la méthode à base de silice a permis d’amplifier 5% d’échantillons pour l’HPV, au même titre que l’extrait d’ADN obtenu par la méthode de référence « phénol-chloroforme ».

Cette technique d’extraction à base de silice représente donc une alternative fiable pour son utilisation dans n’importe quel laboratoire de biologie moléculaire avec un simple équipement de base pour l’amplification de l’ADN des HPV.

Mots clés : Extraction de l’ADN, Silice, Phénol/chloroforme, HPV, Biopsies de l’ovaire

Abstract

Leading cause of death in the world, ovarian cancer is multifactorial. Several studies have shown a link between the cancer and some oncogenic viruses, including HPV. This virus is hardly cultivated in routine and only the molecular techniques which the first step requires extraction of viral DNA used to make the diagnosis.

In this context, our study has a goal to develop a DNA extraction technique based on silica, for PCR detection of HPV from 40 samples of fresh ovarian biopsies of Moroccan women with cancer of ovary consultant gynecology department of the University Hospital CHU Ibn Rochd in Casablanca, Morocco.

Our results have shown a good quality of DNA extracted with a yield of 65 to 83 μ g / ml and a purity of 1.5 to 1.9 nm. Despite a less important yield than the one of the phenol-chloroform extraction, the DNA extraction technique based on silica is simple, quick and relatively inexpensive which allow to have an extract amplifiable by PCR without inhibitors. The DNA extracted by the method based on silica allowed to amplify 5% of samples for HPV, as well as the DNA extract obtained by the reference method "phenol-chloroform".

This extraction technique based on silica represents a reliable alternative for use in any molecular biology laboratory with a simple basic equipment for amplification of HPV.

Keywords : DNA extraction, silica, phenol / chloroform, HPV, ovarian biopsies.

ملخص

السبب الرئيسي للوفاة في العالم، سرطان المبيض متعدد العوامل. وقد أظهرت العديد من الدراسات وجود علاقة بين هذا السرطان وبعض الفيروسات أنكجنيك، بما في ذلك فيروس الورم الحليمي البشري لا يزرع هذا الفيروس بسهولة في التقنيات الروتينية فقط في المرحلة الأولى للتقنيات الجزيئية التي تتطلب استخراج الحمض النووي الفيروسي تستخدم لجعل التشخيص.

في هذا السياق دراستنا قامت بتطوير تقنية استخلاص الحمض النووي بواسطة السيليكا وتقنية PCR للكشف على فيروس الورم الحليمي البشري من 40 عينة مأخوذة من خزعات جديد لنساء مغربية مصابة بسرطان المبيض تستشير بالمركز ألاستشفائي الجامعي ابن رشد بالدار البيضاء.المغرب.

قد أظهرت النتائج التي توصلنا إليها ان الحمض النووي المستخرج ذو نوعية جيدة بمرود $83\mu\text{g}$ إلى 65 ونقاء من 1,9nm إلى 1,5. وعلى الرغم من أقل مردود استخراجا لالفينول كلوروفورم، تبقى تقنية استخراج الحمض النووي على أساس السيليكا هي بسيطة وسريعة وغير مكلفة نسبيا بينما يسمح أن يكون مستخرجا سهل التضخيم بواسطة دون مثبطات . PCR

الحمض النووي النووي التي تم الحصول عليها بواسطة الأسلوب يعتمد على السيليكا سمح لتضخيم من عينات لفيروس الورم الحليمي البشري بنفس النسبة للاحمض النووي المستخلص من خلال طريقة مرجعية "فينول كلوروفورم".

هذا الأسلوب الذي يعتمد على استخراج السيليكا يمثل بديلا يمكن الاعتماد عليها للاستخدام في أي مختبر البيولوجيا الجزيئية مع المعدات الأساسية بسيطة للتضخيم الحمض النووي من فيروس الورم الحليمي البشري .

كلمات البحث ” استخراج الحمض النووي، والسليكا، والفينول كلوروفورم، فيروس الورم الحليمي البشري، الخزعات المبيض

Liste des abréviations

- **ADN**: Acide DesoxyRibonucléique
- **ARN**: AcideRibonucléique
- **ATP** : AdénosineTriPhosphate
- **BET** : Bromure d’Ethidium
- **Do** :Densité optique
- **Dntp** : Désoxynucléotide triphosphate
- **EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
- **HCL** : Chlorured’hydrogène
- **HPV**: Human Papilloma Virus
- **IST** : Infection sexuellement Transmissible
- **LRR** : Longue Région de régulation
- **PCR** : Polymerase chaine ionreact
- **pH** : potentiel Hydrique
- **pb** : paire de base
- **pK** : protéinase K
- **SDS** : Dodécyl Sulfate de Sodium
- **TBE** : Tris-Borate-EDTA
- **TE** : Tris-EDTA
- **U** : Unité
- **UV** : ultraviolet
- **V** : volts
- **W**: watts
- **FSTM** : Faculté des sciences et techniques de Mohammedia
- **LVMQ UTB** : Laboratoire de Virologie Microbiologie et qualité / éco-toxicologie et biodiversité
- **SiO₂** : Dioxyde de silicium
- **GuSCN** : Thiocyanate de guanidium
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des cancers féminins selon le nombre de population.....	3
Figure 2 : Localisation des ovaires.....	4
Figure 3 : Structure d'un ovaire sain.....	4
Figure 4 : Modèle tridimensionnel de la structure d'un papillomavirus humain.....	8
Figure 5 : Organisation génomique du HPV16.....	10
Figure 6 : Devenir des virus MPV après pénétration dans les cellules basales de l'épithélium.....	12
Figure 7 : Profil de migration des ADN extraient.....	26
Figure 8 : Profil électrophorétique après amplification du gène de la beta-globine.....	26
Figure 9 : Exemple d'un profil électrophorétique après une PCR MY.....	27
Figure 10 : Profil électrophorétique après une PCR GP.....	27

Liste des tableaux

Tableau I : Les différents virus oncogènes à ADN	6
Tableau II : Manifestation clinique des principaux types d'HPV cutanés et muqueux	8
Tableau III : Fonction des protéines virales de papillomavirus humain	9
Tableau IV : Séquence des amorces de la PCR bêta globine.....	21
Tableau V : Concentration et volume du mélange réactionnels de la PCR bêta-globine.....	22
Tableau VI : Séquence des amorces de la PCR MY et PCR GP	22
Tableau VII : Concentration et volume du mélange réactionnels de la PCR GP	23
Tableau VIII : Présentation des différentes caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée	24
Tableau IX : Modification apportées aux paramètres d'extraction d'ADN à base de silice	25
Tableau X : Comparaison des méthodes d'extractions et de purifications de l'ADN à partir des biopsies de l'ovaire	25
Tableau XI : Résultats des PCR nichées	28
Tableau XII : Tableau comparatif d'appréciation de quelque critère	28

Liste des annexes

Annexe 1 : Appareillage

Annexe 2 : Protocoles expérimentaux

Sommaire

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Sommaire	
Introduction générale.....	1
Partie bibliographique	
<i>Chapitre I : Cancer de l’ovaire</i>	3
Généralité.....	3
I.2. Rappel Anatomo-histologique de L’ovaire	4
I.2.1-Anatomie.....	4
I.2.2-Histologie	4
I.3. Anatomie pathologique de l’ovaire	5
I.4.Facteurs de risque	5
I.5. Symptômes et complications	6
I.6. Virus et cancer.....	6
<i>Chapitre II : présentation des papillomavirus</i>	7
II.1.Papillomavirus humain HPV	7
II.2.Classification.....	7
II.3.Organisation structural et génomique des HPV.....	8
II.4.Cycle de multiplication des HPV.....	10
II.5.Carcinogénèse	13
<i>Chapitre III : Diagnostic moléculaire des HPV</i>	14
III.1. Techniques de diagnostic moléculaire	14
III.2. Extraction d’ADN des HPV	15
III.2.1 Extraction à base de la silice.....	15
III.2.2 Historique de la technique	15
III.2.3 Principe de la technique.....	15

III.2.4 Avantages de la technique	16
Partie expérimentale	
Objectifs du travail	17
Matériel et méthodes.....	18
I. Lieux de travail.....	18
II. Matériel	18
II.1. Matériel biologique	18
II.2. Matériel non biologique.....	18
III. Méthodes	18
III.1. Extraction de l'ADN à partir des tissus congelés ovarien.....	18
III.1.1. Préparation des échantillons.....	18
III.2 Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait	20
III.3. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	21
III.4. Analyse de l'ADN et du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	23
Résultats et discussion	24
I. Résultats	24
I. 1. Caractéristique générale de la population étudiée.....	24
I. 2. Optimisation de la technique d'extraction de la silice	25
I. 3. Qualité et quantité d'ADN extrait.....	25
I. 3.1 Evaluation comparative des méthodes d'extractions et de purification de l'ADN à partir des biopsies de l'ovaire	25
I. 3.1.1 Evaluation quantitatifs de l'ADN extrait par les deux méthodes d'extractions utilisées	25
I. 3.1.2 Evaluation qualitative de l'ADN extrait par les deux méthodes d'extractions utilisées	26
I. 4. Mise en évidence de l'ADN des HPV par PCR.....	27
I. 5. Détection de l'ADN viral des HPV par PCR	28
I. 6. Comparaisons d'appréciations de critères adaptées dans les méthodes d'extractions de l'ADN testés.....	29
II. Discussion	29

Conclusion 31

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction générale

Introduction

Le cancer de l'ovaire constitue un réel problème de santé publique. Ce cancer est le 8e cancer le plus commun et la 7e cause la plus commune de décès par cancer chez la femme à l'échelle internationale. Dans plus de 35% des cas il n'est détecté qu'au stade IV de la maladie (stade de la formation des métastases) pour cela son pronostic reste très sombre d'où l'intérêt du diagnostic précoce et l'espoir que présentent les recherches en biologie moléculaire. Bon nombre des études épidémiologiques et moléculaires ont permis de mettre en évidence la place importante de certains types de virus en pathologie humaine et depuis un certain temps, quelques-unes ont pu établir une relation entre les papillomavirus qualifiés de haut risque et ce cancer [Wu et al., 2003 ;Giordano .,2008).Les papillomavirus sont des virus à ADN d'une vaste famille de plus de 200 types dont certains sont oncogènes. Ils provoquent des lésions précurseurs entraînant une dérégulation de la prolifération cellulaire, en particulier le contrôle de la phase G1-S et le gène suppresseur de tumeur p53 (D'Andrilli et al., 2010).

A l'heure actuelle ce virus reste non cultivable en routine et seules les méthodes en biologie moléculaire permettent le diagnostic de l'infection à HPV. Ces méthodes pour la plus part nécessitent une extraction de l'ADN. Malheureusement dans les pays en voies de développement notamment en Afrique, l'incidence du cancer de l'ovaire ne cesse d'augmenter à cause non seulement du manque de programme de dépistage et de personnel qualifié, mais également des laboratoires peu équipés. Il est donc difficile d'utiliser les techniques avancées en biologie moléculaire tel que l'extraction par les kits qui nécessite parfois un appareillage adapté, sophistiqué et à coût élevé.

Outre ces problèmes liés au coût et à l'appareillage, dans la majorité des kits d'extraction, le nombre d'échantillons exploitables est limité. D'où la nécessité pour certains laboratoire de développer leur propre technique manuelle dites « technique maison » adapté à la nature des échantillons traités dans leurs thématiques de recherche.

Face à cette difficulté, nous avons donc développer une nouvelle technique d'extraction d'ADN manuelle, simple, moins couteuse et rapide, pour la détection de l'ADN viral des HPV à partir d'échantillon de biopsies de l'ovaire.

Cette technique d'extraction à base de la silice a été surtout utilisée sur des échantillons de nature liquide comme le sang ou les urines par Boom et ces collaborateurs. Son utilisation manuelle dans les échantillons de nature solide comme les biopsies de l'ovaire nécessite la mise au point de certains mécanismes de prétraitement et de traitement du matériel biologique.

Notre étude a donc permis d'adapter le traitement des biopsies de l'ovaire à partir de la silice pour en extraire l'ADN et amplifier les HPV contribuant ainsi à la prévention au cancer de l'ovaire.

Partie

Bibliographique

Chapitre I : cancer de l’ovaire

I.1.Généralité :

Les cancers gynécologiques et mammaires sont des tumeurs malignes qui se développent aux dépens de l’appareil génital féminin et de la glande mammaire (Leyla, 2006), ils représentent un important problème de santé publique dans le monde, chaque année 4 millions d’individus meurent et 5 millions de nouveaux cas sont dépistés parmi lesquels 5% seulement seront totalement guéris (O.M.S. 2006). En Algérie, en 2013, près de 20.000 nouveaux cas de cancers gynécologique et mammaire sont recensés chaque année (Moujahed, 2013), parmi ces cancers, les plus fréquents sont les cancers du sein, largement en tête, suivis des cancers colorectaux, des cancers du corps utérin et les cancers ovariens qui occupent ainsi la cinquième place (Leyla, 2006). La distribution des cancers féminins selon Le nombre de population est reportée dans la **Figure 1** (Recrab, 2005).

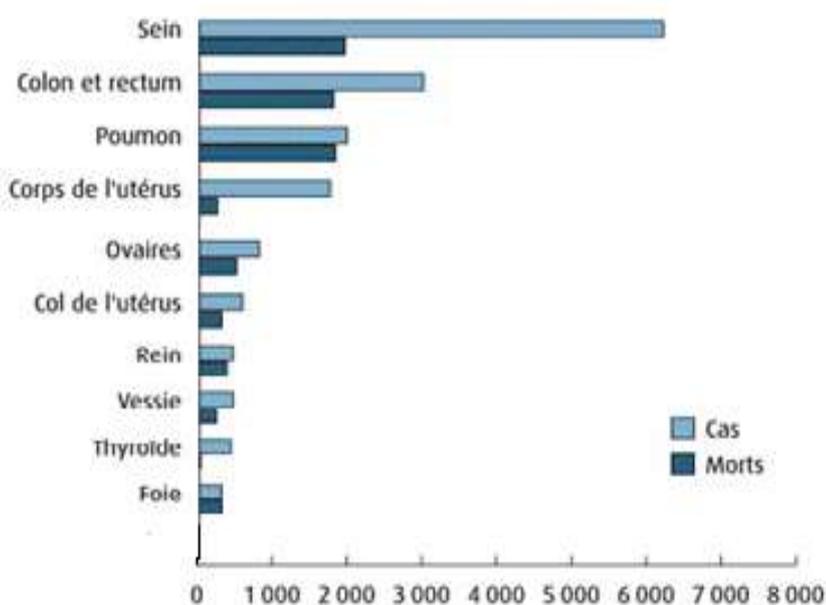


Figure 1: Distribution des cancers féminins selon le nombre de population (Recrab, 2005)

En outre le cancer de l’ovaire est une maladie qui se développe généralement à partir de revêtement de surface des ovaires. C’est un cancer grave car au moment du diagnostic, la tumeur s’est généralement propagée au-delà de l’ovaire il évolue sans signe d’alerte spécifiques, parfois une tumeur peut être bénigne touchant généralement des femmes jeunes ; il s’agit alors d’un kyste (masse solide non cancéreuse) qui ne prolifère pas mais qu’il est indispensable d’enlever par intervention chirurgicale s’il persiste ou s’il grossit. Une tumeur cancéreuse maligne atteint un ou les deux ovaires, il existe plusieurs sortes de cancers selon le type de cellule qui est à son origine : il s’agit le plus souvent d’un adénocarcinome (El ayed, 2010)

Les tumeurs de l’ovaire représentent un des problèmes les plus difficiles de la pathologie gynécologique sur le plan clinique, histologique, thérapeutique et pronostic (Lansac, 1989)

I.2. Rappel Anatomo-histologique de L'ovaire :

I.2.1-Anatomie

L'ovaire est une glande génitale féminine au nombre de deux, leur fonction est double: la production des ovules et la sécrétion hormonale. Les ovaires sont situés dans le petit bassin; l'un à droite et l'autre à gauche **Figure2**. Ils constituent avec les trompes ce qu'on appelle les annexes. Les ovaires sont de couleur blanche, rouge ou grisâtre de forme ovoïde et de volume variable selon les conditions physiologiques (activités génitales, grossesses, ménopause) ils pèsent 6 à 8 g et mesurent de long 2 cm de large et 1cm d'épaisseur (Diko, 2006).

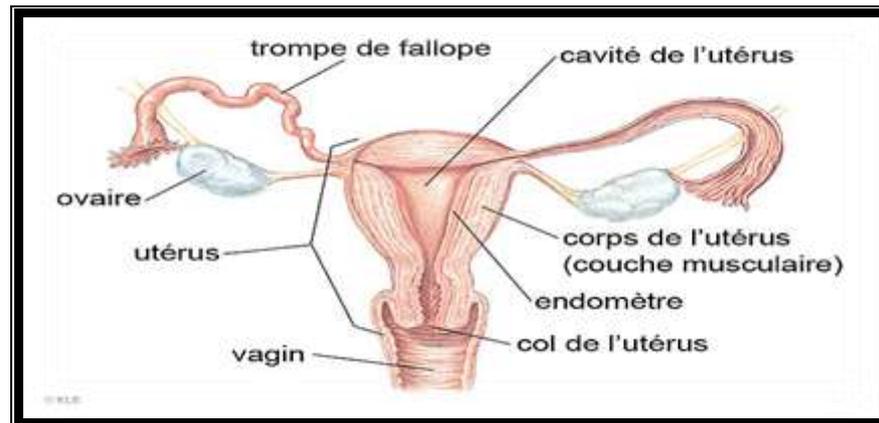


Figure 2: Localisation des ovaires

(http://www.liguecancer.ch/fr/a_propos_du_cancer/types_de_cancer/cancer_de_lovaire_/)

I.2.2-Histologie

Sur le plan histologique l'ovaire comprend deux zones :

- **la corticale** qui est d'épaisseur variable, elle est la zone fonctionnelle de l'ovaire, revêtue par l'épithélium et contient les éléments ovariens à des stades différents de leur évolution.

- **la médullaire** située au centre de l'ovaire, faite d'un tissu conjonctif lâche. Elle contient des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Coulard, 1980).

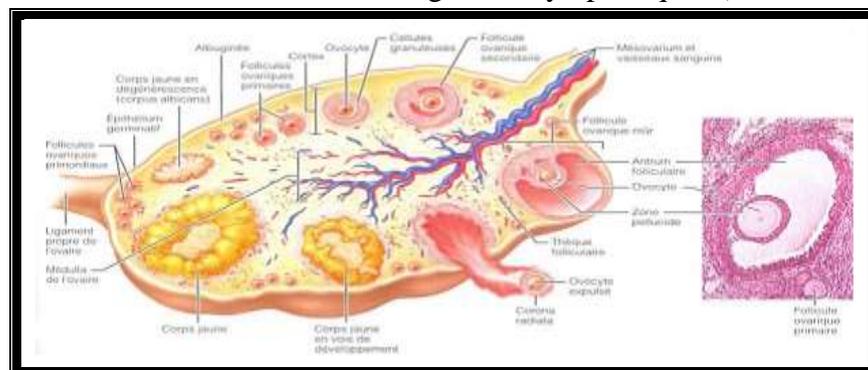


Figure 3: Structure d'un ovaire sain

(<http://app-asap.over-blog.com/article-structure-de-l-ovaire-43833787.html>)

I.3. Anatomie pathologique de l'ovaire :

Il arrive toutefois que les cellules cancéreuses se mettent à se diviser et à proliférer de manière anarchique. Des groupes de cellules peuvent alors former une masse appelée tumeur (figure I.3). L'examen Anato-pathologique des tumeurs de l'ovaire est absolument nécessaire car chaque forme histologique a son évolution propre. Il soulève des difficultés souvent insurmontables (Blanc et Serment, 1985). Il existe des tumeurs dites à malignité atténuée ou tumeurs borderline. Plusieurs classifications des tumeurs de l'ovaire ont été proposées. Nous adopterons la classification de l'O.M.S. Il existe trois principales formes de cancer de l'ovaire, selon le type de cellules de l'ovaire où le cancer prend naissance.

- Le cancer épithélial apparaît dans les cellules se trouvant sur la surface externe de l'ovaire ;
- Les tumeurs des cellules germinales se forment dans les cellules productrices d'ovules et touchent généralement les jeunes femmes. Ce type de tumeur peut même se développer chez des fillettes ; (Hauuyet al., 1990).
- Les tumeurs stromales se développent dans les cellules des tissus conjonctifs qui lient les différents éléments de l'ovaire ; (Cabane, 1986).

Les tumeurs de l'ovaire sont des tumeurs bénignes. Toutefois, ces dernières peuvent dégénérer en tumeurs malignes ou être malignes d'emblée. En règle générale la découverte du cancer de l'ovaire est souvent très tardive, en raison de l'absence de symptômes pendant une période de temps souvent longue. Les tumeurs ovariennes peuvent se propager à d'autres organes au cours d'un processus appelé métastase. Le cancer de l'ovaire peut métastaser de trois manières:

- L'invasion: la tumeur se développe suffisamment en taille pour pouvoir envahir les organes avoisinants
- La desquamation: les cellules cancéreuses se détachent de leur matrice centrale et vont assiéger les organes adjacents
- La dissémination: les cellules cancéreuses passent par le système lymphatique et atteignent les ganglions lymphatiques et d'autres organes du bassin, de l'abdomen et de la poitrine.

I.4. Facteurs de risque :

Le matériel génétique cellulaire subit régulièrement des altérations qui sont liées à l'âge, l'environnement (Colombo *et al.*, 2006) aux Facteurs inflammatoires, Facteur hormonaux et les facteurs génétique : Aujourd'hui 5 à 10% de l'ensemble des cancers de l'ovaire ont une origine génétique avec une transmission autosomique dominante, ainsi les femmes ayant des antécédents familiaux de cancer du sein et du côlon, peuvent avoir un plus grand risque de développement de cancer de l'ovaire (Pelucchi *et al.*, 2007).

Les mutations dans les gènes BRCA1 et ou BRCA2 sont impliquées dans les formes familiales et sont responsables de 90% des cancers de l'ovaire héréditaires. BRCA1 et BRCA2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs. Ils contrôlèrent la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Les risques de développement de cancer de l'ovaire ou du sein dépendent de la localisation des

mutations sur ces deux gènes avec une moyenne d'âge au diagnostic de 45 ans pour BRCA1 et plus de 50 ans pour BRCA2 (Russoet al., 2009).

I.5. Symptômes et complications:

Les symptômes pouvant être associés au cancer de l'ovaire sont: douleurs pelviennes (bassin), ballonnements ou une augmentation de la taille de l'abdomen, flatulences, malaise abdominal, fatigue, saignements vaginaux anormaux, maux de dos, perte d'appétit, perte ou prise de poids, besoin fréquent d'uriner, troubles intestinaux, douleurs pendant les rapports sexuels, sensation de satiété précoce, dérangement d'estomac, indigestion. Le cancer de l'ovaire atteint souvent un stade avancé avant qu'on le diagnostic principalement parce que ses symptômes sont rares dans les stades précoces et lorsqu'ils se produisent, ils peuvent être généraux et non spécifiques(Aubin, 2003)

I.6. Virus et cancer :

Six à vingt-cinq pour cent des cancers de l'ovaire sont des tumeurs ovariennes acystadénocarcinomes mucineux. Dans la majorité des cas (77 %), il s'agit d'une localisation ovarienne d'une tumeur digestive, la localisation primitive étant plus rare (23 %) (SeidmanJD ,et al 2003).Suivent les découvertes en virologie, en technologie de l'ADN et de l'ARN, puis la découverte des oncogènes. Chez l'homme, seules des associations entre virus et cancer ont été décrites, mais une transmission directement du cancer par un virus n'est pas connue (Dimitri, 2006).Deux types de virus ont été impliqués dans le déclenchement du cancer:

➤ **Les adénovirus ou virus à ADN**, dont certains sont impliqués dans la genèse de certains cancers, comme le virus simien SV-40 et le virus du polyome, les papillomavirus HPV, le virus EBV et le virus de l'hépatite B (tableau I).

➤ **Les rétrovirus ou virus à ARN**, à développement exclusivement cellulaire. Leur enzymologie particulière (transcriptase inverse) et leur lien avec les oncogènes en font un sujet d'étude intéressant en cancérologie. De nombreux rétrovirus tumorigènes possédant des gènes transformant v-onc, homologues de gènes cellulaires normaux c-onc, ont été identifiés. L'étude systématique des rétrovirus capables de transformer les cellules *in vitro* a permis d'identifier de nombreux oncogènes viraux correspondant chacun à la version un peu modifiée d'un oncogène cellulaire (Dimitri et al, 2006).

Tableau I : Les différents virus oncogènes à ADN (Dimitri et al, 2006)

Groupe taxonomique	Exemple	Mode d'infection	Cancer associés
<i>Papillomavirus</i>	HPV 16/18	Restrictive ou abortive	Papillomes-carcinomes
<i>Polyomavirus</i>	SV40	Abortive	Non
<i>Adénovirus</i>	Ad12 humain	Abortive	Non
<i>Herpesvirus</i>	EBV HHV8 CMV	Latente Latente Hit &run ?	Lymphome/carcinome Kaposi /lymphome Non prouvé
<i>Hepadnavirus</i>	HBV	Chronique	Hépatocarcinomes
Poxvirus	Virus fibrome shope	Chronique ?	Fibromes

Chapitre II : présentation des papillomavirus

II.1.Papillomavirus HPV :

Le cancer de l’ovaire constitue un problème de santé publique chez les femmes, ce dernier est dû à une infection au virus de l’hépatite B (HBV), virus d’Epstein-Barr (EBV) et au Papillomavirus humain (HPV), ce dernier l’infection est acquise par voie sexuelle, 70 à 80 % de la population vont être en contact avec l’un des virus HPV à haut risque (encore appelés HPV oncogènes).

Il existe en effet deux types d’HPV :

- les HPV à bas risque (HPV-BR), qui donnent essentiellement des condylomes exophytiques ou végétations vénériennes, c’est-à-dire des lésions externes
- les HPV à haut risque (HPV-HR), qui sont à l’origine d’infections de la filière génitale, infections du col, de la vulve ou du vagin mais aussi des infections de l’ovaire, ces dernières pouvant par la suite évoluer vers un cancer ovarien dans un très petit nombre des cas (Douvieret *al.*, 2004).

Ainsi, la majorité des gens se contaminent (d’une manière générale, tous les gens sexuellement actifs), puis, dans 90 % des cas, développent une immunité qui leur permet de se débarrasser spontanément du virus. Mais, dans 10 % des cas, le virus persiste et c’est la persistance d’un HPV à haut risque qui entraîne le développement d’une lésion précurseur du cancer, capable d’évoluer vers un cancer ovarien, Lorsque le virus persiste, il peut donner plusieurs types de lésions :

des dysplasies légères ou CIN1 (cervical intraepithelial neoplasia 1), qui vont régresser dans la majorité des cas mais peuvent aussi persister et évoluer vers des lésions de haut grade, et des dysplasies modérées à sévères ou CIN2/CIN3. Ces lésions régressent rarement spontanément et devront être traitées de façon plus active car elles peuvent évoluer vers un cancer (Option **Bio**, 2008)

II.2.Classification :

Leur classification, basée sur le génotype et l’analyse phylogénique, permet de les différencier en fonction de leur tropisme (cutanés ou muqueux), de leur propriété biologique et de leur potentiel oncogénique (bas risque et haut risque) (Coursaget P, 2006).

Tableau II : Manifestation cliniques des principaux types d'HPV cutanés et muqueux (Monsonogo J, 2007)

		Types d'HPV les Plus fréquents	types d'HPV les moins fréquents	Expression Clinique
HPV cutanés		1, 2, 3, 4, 10	26 à 29, 38, 41	Verrues plantaires
		5, 8	9, 10, 12, 14, 15, 17, 19 à 25	Epidermodysplasie Verruciforme
		5, 8, 14, 17, 20		Carcinomes épidermoïdes
HPV muqueux	HPV - BR	6, 11	42 à 45	-Condylomes acuminés -Papillomes laryngés, conjonctivaux, buccaux
	HPV - HR	16, 18	31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	-Cancer du col utérin et lésions précurseurs -Carcinomes : pénis, vulve, vagin, anus

II.3.Organisation structural et génomique des HPV :

Les papillomavirus sont de petit verus à ADN non enveloppés, dont la capsid e d'environ 55nm de diamètre, composée exclusivement de protéines virales, présentant une capsid e icosaédrique formée de 72 capsomères (Bouallaga.I, 2002).

Les particules virales contiennent une protéine majeur d'un poids moléculaire d'environ 54.000 Da, une protéine mineur d'environ 75.000 Da et quatre petit polypeptides correspondant a des histones cellulaires associées à l'ADN viral, pour former une structure analogue à celle de la chromatine (Baker.TS, 1991).

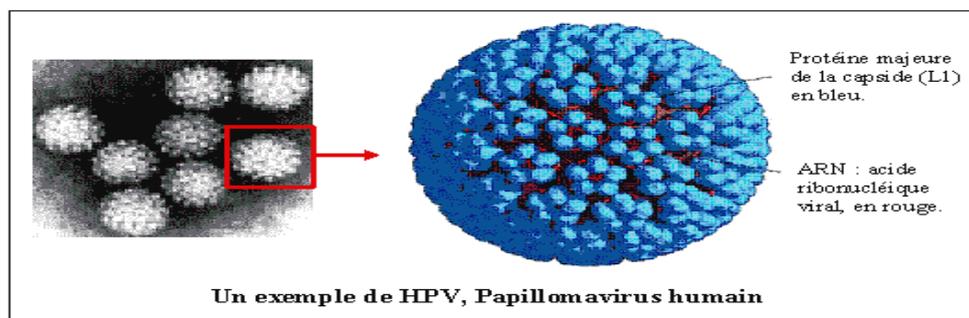


Figure 4: Modèle tridimensionnel de la structure d'un papillomavirus humain (<http://www.medicopedia.net/term/12740,1,xhtml>)

Leur famille est extrêmement large : 85 génotypes de papillomavirus infectant l'espèce humaine sont aujourd'hui caractérisés. Le génome des HPVs est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire de

8000 paires de bases (pb), circulaire, super enroulée et associée à des histones cellulaires. L'organisation de l'information génétique est compacte: un seul des brins est codant, mais les trois cadres de lecture sont utilisés souvent avec des chevauchements. Par définition, les gènes E1 à E7, indispensable à la transcription et à la réplication viral, font partie de la région dite précoce E, précédés par une longue région de régulation (LRR) et opposés aux gènes de capsid L1 et L2, appelés tardifs L (Bouallaga.I,2002).

➤ **Longue région de régulation LRR :**

Région non codante dont la taille s'échelonne entre 600 et 1000 pb en fonction du type du virus. Cette portion du génome comporte l'origine de réplication, des séquences d'amplification de la transcription d'ADN viral, ainsi que des séquences reconnues par des facteurs de transcription viraux (ex : protéine E₂) ou cellulaires (Figure 5).

Dans le cas des HPV génitaux, la LRR contient également des séquences capables de fixer des récepteurs des glucocorticoïdes, qui sont capables de moduler l'expression des gènes viraux (Turek.LP.al, 1994)

➤ **Région précoce (E) et région tardive (L) :**

La Région précoce (E) est subdivisée en 7 régions codantes (E1 à E7), la région tardive (L) est subdivisée en 2 régions codantes (L1 et L2) (Turek.LP.al, 1994), leurs fonctions sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau III : Fonction des protéines virales de papillomavirus humain(P.Mathevet,2002)

Protéines virales	Fonctions
Région précoce E	
E1	-Résponsable de la réplication extra chromosomique du génome viral. -Maintien à l'état épisomique dans les cellules infectées.
E2	-Régulation de la transcription des gènes précoces en particulier les oncogènes viraux E6 e E7.
E3 - E8	-Fonctions inconnues.
E4	-Maturation des particules virales.
E5	-Transformations cellulaires -Interfère avec la fonction de certains récepteurs de facteurs de croissance (EGF-RDGF-R)
E6 – E7	-Transformation cellulaire -Coopération avec un oncogène activé pour induire à une tumorigénicité. -Fixation des produits des gènes suppresseurs de tumeurs p53 (E6) Rb (E7).
Régions tardives	
L1	-Protéine majeur de la capsid. -Porte l'antigène spécifique du groupe des papillomavirus
L2	-Protéine mineure de la capsid.

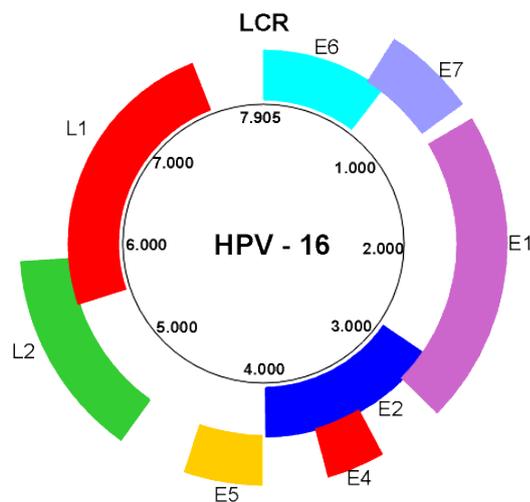


Figure 5: Organisation génomique du HPV16

(<https://www.google.com/search?q=organisationet-agents-infectieux>)

II.4.Cycle de multiplication des HPV :

Après transmission, les papillomavirus pénètrent dans les cellules de l'épithélium au niveau d'une lésion tissulaire ou d'un microtraumatisme.

Plus précisément, le cycle viral se déroule ainsi: il existe en réalité 3 cas d'infections

Le cas une infection productive contient deux phases : la phase non productive et la phase de maintenance

La phase non productive est une phase sans production de virions, elle débute par la fixation des HPV sur les récepteurs cellulaires des kératinocytes puis elles sont adsorbées par endocytose [Shafti, 2003] ces derniers fusionnent avec les endosomes à pH acide. Les virions plus ou moins dégradés sont relâchés dans le cytosol. La taille des capsides des HPV ne leur permet pas de diffuser passivement dans le cytosol. Elles doivent donc utiliser un processus actif impliquant le cytosquelette. Cette incapacité physique est résolu grâce à la présence des séquences de localisation nucléaire sur la protéine L1 et la protéine L2 et au désassemblage de la capside en capsomèrespermettant ainsi l'entrée du génome viral dans le noyau [Beard P et al, 1998]. Dès son entrée celui-ci subit une phase d'amplification, sous le contrôle des protéines précoces E1 et E2 seule les gènes précoces qui sont transcrit, jusqu'à atteindre un nombre de 50 à 100 copies d'ADN viral par cellule. Vient ensuite la phase de maintenance ou productive (production de virions infectieux), qui correspond au maintien d'un nombre constant de génomes d'HPV au fur et à mesure des divisions cellulaires, les cellules basales non infectées migrent vers les couches supra-basales où elles subissent un processus de différenciation. Elles arrêtent alors de proliférer, leur cycle cellulaire étant bloqué avant l'entrée en phase S. Au contraire, les cellules infectées subissent une prolifération intense, induite par les protéines virales E6 et E7 et le processus de différenciation est ainsi retardé. Au fur et à mesure que les cellules épithéliales se différencient, le génome viral est amplifié et induit la transcription du très grande quantité des gènes tardifs puis traduction de ces derniers en ARN codants pour les protéines de capside L1 et L2 qui rejoignent le noyau pour une encapsidation des génomes virales extra-chromosomique, a ce stade les virions infectieux sont formés, la muqueuse est alors très infectieuse. Les sujets développent des tumeurs bénignes appelées condylomes plans.

Par contre le 2eme cas d'infection est plus grave et la lésion est de haut grade on assiste à l'expression des gènes viraux E6 et E7. A ce stade, le contrôle intercellulaire (macrophages, immunité à médiation cellulaire) est perturbé. C'est alors qu'on constate l'intégration de l'ADN viral des HPV dits à risque au génome de la cellule hôte ainsi que l'absence de production de particules virales et ce phénomène est toujours associé à la cancérisation.

Dans le 3eme cas d'infection l'ADN viral ne se réplique pas, ne s'intègre pas, il persiste sous forme épisomale. On parle d'infections latentes asymptomatiques qui ne conduisent à aucune anomalie cytologique ou colposcopique mais les HPV peuvent reprendre leur cycle de réplication suite à un événement extérieur (Aubin, 2003).

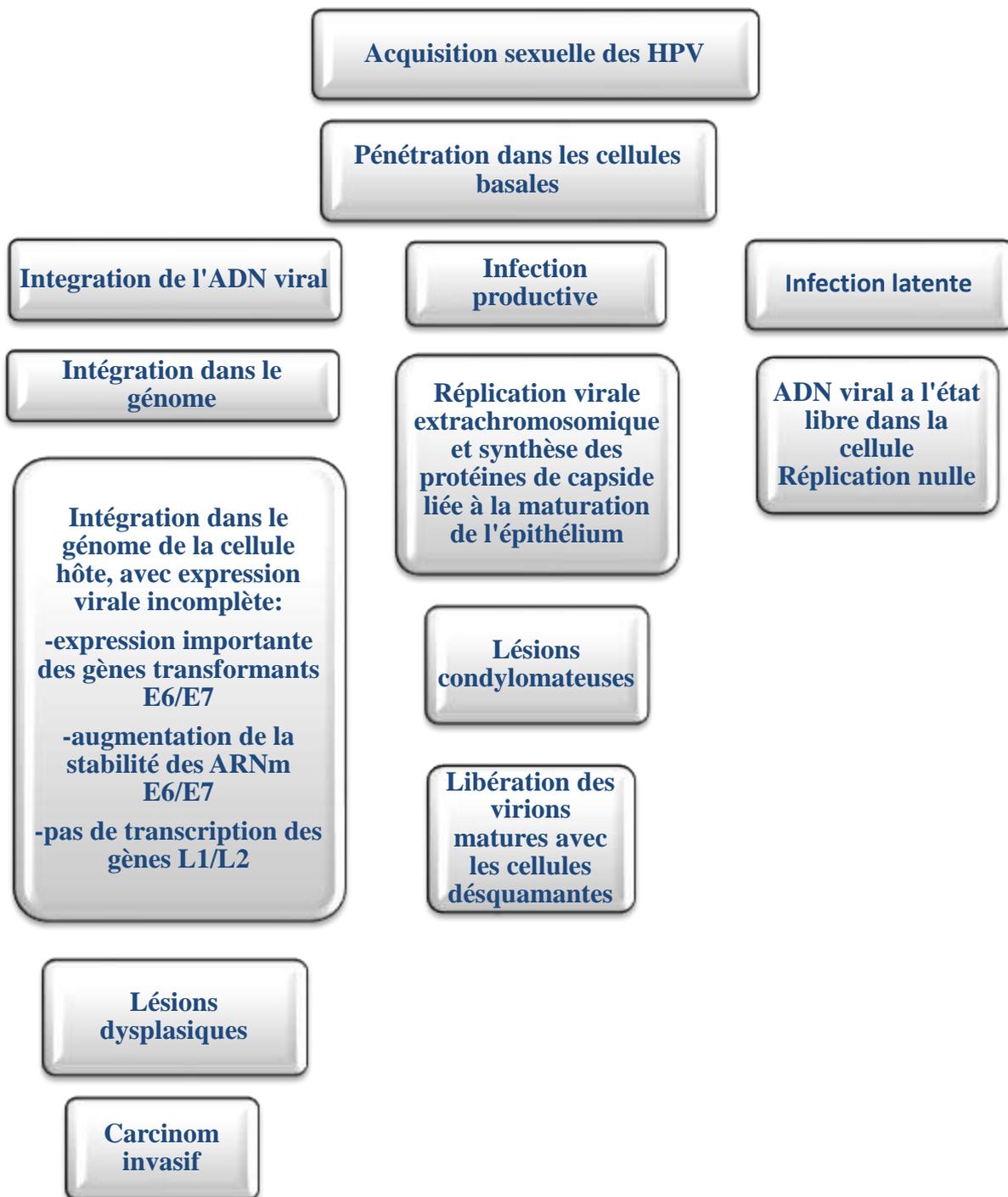


Figure 6: Devenir des virus HPV après pénétration dans les cellules basales de l'épithélium [Aubin, 2003].

II.5.Carcinogénèse :

La cancérisation nécessite l'intégration de l'ADN viral des HPV-HR au génome de la cellule hôte ainsi que l'expression de gènes viraux spécifiques.

L'intégration du génome des HPV dans celui de la cellule hôte est une étape cruciale, propre aux HPV-HR, leur génome passe le plus souvent d'une forme épisomale à une forme linéaire intégrée dans l'ADN de la cellule épithéliale hôte [J. Monsonego, 2007]. Lors de cette intégration du génome d'HPV, les gènes codant pour les protéines E6 et E7 sont toujours conservés et fonctionnels, tandis que la plupart des autres séquences virales codantes sont délétées ou non fonctionnelles. En particulier, l'inactivation de la protéine E2 (absence d'expression, protéine tronquée), qui est un répresseur transcriptionnel des protéines E6 et E7. Cette intégration est un événement «terminal» dans le cycle de ces virus, car une fois leur génome intégré, la multiplication virale ne peut plus avoir lieu [ENS, 2009]

L'onco-protéine E7 se lie avec une forte affinité aux protéines suppresseur de tumeur de la famille pRb. pRb est une protéine de régulation du cycle. Les formes hypophosphorylées de pRb agissent comme des inhibiteurs de la prolifération et empêchent l'entrée en phase S des cellules. Les protéines E7 des HPV à haut risque forment préférentiellement des complexes avec la forme hypophosphorylée de pRb. Cela conduit à l'inactivation fonctionnelle de pRb, au passage de G1/S, et à la progression dans la phase S.

La protéine E6 a la propriété d'interagir avec la protéine suppresseur de tumeur p53. Cette protéine fonctionne comme un intégrateur de signaux et peut percevoir un stress cellulaire tel que des agressions génotoxiques ou cytotoxiques. p53 est notamment impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN et retarde la progression du cycle des cellules dont l'ADN est altéré afin de permettre sa réparation. Si les lésions sont irréversibles, p53 peut initier la voie apoptotique conduisant à la mort cellulaire. E6 favorise la dégradation de p53, ce qui stimule la progression du cycle cellulaire

L'onco-protéine E6, en coopération avec E7, joue aussi un rôle important dans l'immortalisation et la transformation des cellules [Aubin et al, 2003]

Chapitre III : Diagnostic moléculaire des HPV

III.1. Techniques de diagnostic moléculaire :

Les techniques de virologie moléculaire sont destinées à mettre en évidence les acides nucléiques des virus pour le diagnostic des infections virales. De nombreux virus infectants l'homme sont souvent non cultivables et non détectable que par ces techniques moléculaires tel que le HPV.

Parmi ces techniques on distingue :

Réaction de polymérisation en chaîne PCR :

La PCR permet d'obtenir par répliation *in vitro* de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait par l'utilisation de l'ADN polymérase, en présence d'amorces spécifiques. Les PCR de détection de l'ADN viral des HPV utilisent des amorces universelles qui amplifie un grand nombre de génotypes (les plus utilisés sont MY09/MY11, GP5+/GP6+) amplifiant une séquence du gène L1 codant pour la protéine majeure de la capsid du virus. Pour le génotypage utilisant cette technique on peut réaliser :

- Les PCR spécifiques de type permettant une identification de types d'HPV par l'utilisation des amorces spécifiques correspondantes ;

Les PCR consensus et les PCR nichées qui permettent d'amplifier plusieurs types d'HPV simultanément dans une seule réaction. Les produits de PCR sont ensuite révélés par des techniques de séquençage, hybridation ou une digestion enzymatique précédant une migration électrophorétique. (Morgan et al., 2006)

Hybridation moléculaire :

C'est une détection ciblée de l'ADN des HPV en utilisant des sondes spécifiques à cet acide nucléique recherché. Les sondes peuvent être soit à ADN ou à ARN, marquées soit par éléments radioactifs (sondes chaudes), soit par des méthodes non radioactives (sondes froides), marquage à la biotine ou à la digoxigénine. Les étapes de cette technique comprennent une dénaturation de l'ADN double brin de l'échantillon étudié, suivi d'une hybridation en présence de la sonde par complémentarité. La révélation se fait selon le type du marquage de la sonde (autoradiographie ou immuno enzymologie) (Walker et al., 2001).

Cette hybridation est effectuée soit par le Southern Blot, qui comprend une digestion enzymatique de l'ADN puis une électrophorèse dont le produit est transféré sur une membrane et hybridé avec une sonde nucléique spécifique radio- marquée d'un ou plusieurs HPV. La méthode permet à la fois la mise en évidence du virus, le typage et aussi la mise en évidence de l'ADN viral. Une autre méthode d'hybridation existe : c'est l'hybridation *in situ*, qui consiste en une localisation d'une séquence de nucléotides dans l'ADN des HPV sur la base de l'affinité entre les bases azotés complémentaires.

Il existe des tests permettant la détection de l'ARNm des oncoprotéines E6 et E7 par l'utilisation de certains kits. Ces protéines sont des marqueurs de l'activité oncogénique des HPV et leur détection permet d'identifier le risque de développer un carcinome utérin chez les femmes (Jung et al., 2004).

III.2. Extraction d'ADN des HPV :

L'étape d'extraction des acides nucléiques est fondamentale puisque de sa qualité vont dépendre la qualité finale de la réaction et du résultat de ces techniques moléculaires. De nombreuses techniques d'extraction sont disponibles. L'extraction par le phénol chloroforme est la méthode normalement utilisée pour l'extraction de l'ADN viral des HPV. Son principe consiste à traiter le lysat cellulaire des échantillons par un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique. Le phénol est un puissant agent déprotéinisant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles et le chloroforme-alcool isoamylique permet d'éliminer les traces éventuelles du phénol de la phase aqueuse contenant l'ADN (Bienvenu et al, 1999). Cependant, cette technique est assez fastidieuse et nécessite la manipulation de produits toxiques malgré qu'elle donne d'excellents résultats. D'où vient la nécessité de l'utilisation d'une nouvelle technique rapide, fiable peu coûteuse et non toxique : c'est l'extraction des acides nucléiques par des colonnes de silice.

III.2.1 Extraction à base de la silice :

Cette extraction est une chromatographie d'adsorption sur colonne de silice. La fixation de l'ADN sur la silice fait intervenir des interactions dipôle-dipôle (interaction hydrogène). Elle est employée pour purifier les acides nucléiques, et plusieurs kits d'extraction basée sur elle sont commercialisés. (Tian et al., 2003)

La silice est un composé chimique (dioxyde de silicium) et un minéral de formule SiO_2 . Elle entre dans la composition de nombreux minéraux. La silice libre est également très abondante dans la nature, sous forme de quartz, de calcédoine et de terre de diatomée qui est la forme utilisé pour l'extraction des acides nucléiques. Ce composé minéral représente 60,6 % de la masse de la croûte terrestre continentale. (Rudnick et al., 2005)

III.2.2 Historique de la technique :

La méthode de l'extraction des acides nucléiques à base de la silice était inventée et développée par Willem R. Boom et al (Boom et al., 1990). Cependant, l'effet de précipitation des agents chaotropiques était déjà connu et signalé par Vogelstein et Gillespie en 1979 (Vogelstein et al., 1979) avant la mise au point de la méthode d'extraction des acides nucléiques par Boom. De ce fait, la contribution de Boom était d'optimiser la technique pour l'extraction à partir de matériel biologique complexe (fluides corporels, tissus d'organes, etc.) et fournir une procédure courte, peu dangereuse et moins cher.

III.2.3 Principe de la technique :

Le principe de cette technique est basé sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber les acides nucléiques en présence d'agents chaotropiques (thiocyanate de guanidium). Ces agents chaotropiques, attirent les molécules d'eau et permettent la fixation des acides nucléiques sur la silice. Les particules de silices sont disposées en colonne après un traitement adéquat et la séparation est opérée par centrifugation. Après un lavage alcoolique éliminant les inhibiteurs (sels et résidus), l'élution est réalisée à l'aide d'une solution aqueuse alcaline et peu saline (eau pure, Tris EDTA) (Melzak et al., 1996). De ce fait, l'ADN est lié aux particules de silice en présence de concentration élevée en sel et élué en concentration faible de ce dernier.

III.2.4 Avantages de la technique :

Parmi les avantages de la technique d'extraction de l'ADN des HPV à base de la silice, on distingue :

- Pas d'utilisation de solvants toxiques tels que le phénol ;
- Il n'est pas nécessaire de procéder à une précipitation alcoolique car l'ADN obtenu est déjà de bonne qualité et est de pureté élevée ;
- La méthode est rapide, moins coûteuse et s'applique à toute sorte de spécimens ;
- L'ADN obtenu à une taille de l'ordre de 20-30 kb et pouvant aller jusqu'à 50 kb.

Cependant, nous ne pouvons pas obtenir par cette technique les fragments supérieurs à 50 kb nécessaires aux expériences de Blotting ou de clonage ce qui constitue en général l'inconvénient majeur de cette technique. (Ameziane et al., 2005)

Partie expérimentale

Objectifs

Les HPV sont la cause la plus fréquente d'infection sexuellement transmissible, en Algérie et partout dans le monde. Ces virus semblent très largement impliqués dans la physiopathologie de nombreuses lésions épithéliales néoplasiques de tout l'appareil génital féminin.

Vue l'importance en santé publique que revêt les virus en pathologie humaine, il est nécessaire de développer des moyens pouvant contribuer à faire baisser le cout de leurs diagnostic. Cette baisse peut intervenir à plusieurs niveaux, dont l'extraction de l'ADN viral par des méthodes manuelle, rapide, non toxique et moins couteux.

Dans cette approche notre travail se fixé pour objectifs :

Objectif général :

La mise en place d'une technique simple, moins couteuse et non toxique pour l'extraction de l'ADN des HPV à base de la silice à partir des biopsies de l'ovaire.

Objectifs spécifiques :

- ❖ Evaluer la qualité de l'ADN extrait par la méthode à base de silice ;
- ❖ Comparer les résultats obtenus par la technique d'extraction d'ADN par le phénol-chloroforme et la technique d'extraction à base de silice.
- ❖ Evaluer l'aptitude de l'extrait d'ADN à être amplifié pour la détection des HPV

Matériel et méthodes

I. Lieux de travail :

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de

Virologie & Microbiologie et qualité/Eco toxicologie et Biodiversité, Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, Université Hassan II en collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd à Casablanca ; Maroc.

II. Matériel :

II.1. Matériel biologique :

Notre travail a porté sur 40 échantillons de biopsies de l'ovaire des femmes atteintes du cancer de l'ovaire diagnostiquées et traitées chirurgicalement au niveau de CHU Ibn Rochd à Casablanca

➤ **Prélèvements :**

Les biopsies de l'ovaire ont été prélevées chez les 40 patientes, au service de chirurgie. La conservation des biopsies a été faite dans des cryotubes, ces dernières ont été stockées dans une bonbonne contenant de l'azote liquide. Arrivés au laboratoire, les cryotubes sont retirés et conservés à -20 °C avant l'extraction de l'ADN.

II.2. Matériel non biologique :

Le matériel comporte les différents tampons, des solutions ainsi que les réactifs utilisés lors de l'extraction ou de l'amplification, sans oublier la verrerie ainsi que les appareils d'études représentés dans l'annexes I.

III. Méthodes

III.1. Extraction de l'ADN à partir des tissus congelés ovarien :

III.1.1. Préparation des échantillons :

L'émiettement des tissus commence par la réalisation de coupes fines à partir des biopsies congelées à -20°C à l'aide d'un scalpel. Ces coupes sont divisées en part égale puis mises, de façon stérile, dans deux tubes Eppendorf de 1,5 mL (un tube pour la méthode phénol chloroforme et l'autre tube pour la méthode de silice) pour chaque échantillon.

III.1.2. Méthode d'extraction de l'ADN par le phénol chloroforme alcool isoamylique :

➤ Lyse cellulaire

A partir des tubes destinés à l'extraction d'ADN par le phénol chloroforme, une digestion enzymatique a été réalisée par ajout 250 à 500 µL de tampon de lyse (10mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA ; 20mL (SDS) à 10%) selon la taille des biopsies additionné à 20 mg/mL de la protéinase K (Annexe 2). La solution est vortexée et les échantillons sont incubés à +37°C pendant une nuit ou 3h à 55°C pour assurer la digestion totale des cellules. Au lendemain la protéinase K est dénaturée à 100°C pendant 10 min

➤ Extraction et purification de l'ADN au phénol chloroforme

Le lysat obtenu après digestion est mélangé avec 500µl de phénol/chloroforme. Bien vortexer le mélange puis incubé à 50°C pendant 15 min. Une centrifugation de 15 min à 12.000 rpm, permet la formation de deux phases, une phase organique en bas et une phase aqueuse en haut contenant l'ADN, séparée entre les deux par une couche protéique. La phase aqueuse est prélevée prudemment sans entraîner la couche protéique puis transférée dans un nouveau tube dans lequel on ajoute 2/5e du volume récupéré d'acétate d'ammonium à 7,4M et 2 fois le volume récupéré d'éthanol absolu, le tout incubé toute une nuit à -20°C. Après centrifugation et rejet du surnageant, le culot d'ADN a été lavé dans l'éthanol 70% à froid avant d'être séché à 37°C pendant 15min puis réhydraté dans 20 à 50 µl d'eau stérile. L'ADN a été stocké à +4°C pendant une courte durée ou à -20°C avant utilisation (Annexe 2).

III.1.3.Méthode d'extraction de l'ADN par la silice :

➤ Lyse cellulaire

A partir des échantillons prétraités dans les mêmes conditions que ceux traités au phénol chloroforme, 400µl du tampon de lyse (GuSCN (tiocyanate de guanidinium), Tris-HCl 0,1M pH6,4, EDTA 0,2M pH8 et Triton X-100) (voir annexe 2) et 40µl de protéinase K sont mélangés dans les tubes des échantillons destinés à cette méthode, incubé à 55°C pendant 15 min. Juste après, la protéinase K est désactivée à 100°C pendant 15min. Après désactivation de la pK, 500µl du même tampon de lyse sans protéinase K sont ajoutés pour atteindre un volume d'environ 1 mL et laisser à température ambiante pendant 10 min.

➤ Extraction et purification de l'ADN

Après incubation à température ambiante 40µl de la suspension de silice (dioxyde de silicium, eau déminéralisée, HCL(32%, wt/vol pH2) (voir annexe 2) sont ajoutés sur les échantillons puis vortexer, centrifuger à 10000 rpm pendant 1 min.

L'étape ultérieure est celle du lavage qui est effectué par centrifugation à 10000rpm pendant 2 min.

Le lavage est ainsi effectué :

-deux fois par 1 ml du tampon de lavage (GuSCN et Tris-HCL 0,1M pH6,4) (voir annexe 2)

- deux fois par 1 ml de l'éthanol 70%, et

-une fois par 1 ml de l'acétone

les tubes sont après séchés couvercle ouvert à 56C° pendant 10min.

➤ Elution de l'ADN

L'élution de l'ADN s'est faite avec 50µl du tampon d'élution (Tris-HCL 10 mM, EDTA 0,1 Mm Ph8) (voir annexe 2), puis vortexer brièvement, incubé à 56C° pendant 10min et vortexer encore et une dernière centrifugation est lancée à 10000 rpm pendant 3 min au bout de laquelle le surnageant contenant l'ADN est récupéré par aspiration.

III.2 Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait

➤ La concentration de l'ADN a été déterminée par spectrophotométrie. Les différentes concentrations de l'ADN obtenu sont déterminées par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm et aussi de 280 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (smart spec 3000-BIORAD, USA). Une densité optique de 1 à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN double brin.

➤ Le degré de pureté de l'échantillon a été défini par le rapport des densités optiques 260 nm/280 nm qui doit être compris entre 1,7 et 1,9.

$$DEGRE\ DE\ PURETE = \frac{DO\ 260nm}{DO\ 280nm}$$

➤ Le rendement moyen de l'extraction de l'ADN est aussi calculé en réalisant le rapport de la quantité d'ADN obtenu et du volume initial de l'échantillon utilisé (400µl pour les échantillons de silice et 500µl pour les échantillons de phénol-chloroforme)

$$RENDEMENT = \frac{Quantité\ d'ADN\ obtenu}{Volume\ initial\ de\ l'échantillon}$$

- La taille des fragments d'acides nucléiques a été évaluée par une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1%. 10µl d'ADN ont été déposés dans chaque puits soumis à un courant de 100 V pendant 1h. Cette analyse permet, par ailleurs, d'observer une éventuelle dégradation de l'ADN survenue au cours de l'extraction.
- La rapidité. Le temps nécessaire pour réaliser une extraction a été déterminé : temps réel et temps de travail, simplicité, frais d'extraction, nocivité (Boom et al,1999).

III.3. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

III.3.1. Amplification du gène de la bêta-globine

Pour évaluer l'efficacité de notre extraction, la qualité de l'ADN et surtout l'absence des inhibiteurs de la PCR ont été vérifiés en exploitant le gène de β -globine car c'est un gène ubiquitaire et en amplifiant un fragment de 268pb à l'aide des amorces GH20/PC04 (Tableau IV) Le Mix était constitué de :

-Tampon PCR (100mM Tris-HCl, pH 8,3 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,01% w/v gélatine), la Taq polymérase (Promega, Madison USA), les 4 désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), les amorces PC04 et GH20 (amplifie un fragment du gène de 268 pb), le MgCl₂ et de l'eau pure (Cat.No.BIO-37080). Auquel était ajouté 1µl d'ADN à amplifier. Le volume final du mélange réactionnel était de 25 µl (Tableau V). Les conditions réactionnelles d'amplification étaient les suivantes : après une première dénaturation de la matrice à 95°C pendant 10 min ; s'ensuivaient 40 cycles réalisés en trois phases :
dénaturation 94°C pendant 1 min ; L'hybridation 55°C pendant 1 min ; L'élongation 72°C pendant 1 min et une étape d'élongation finale était effectuée à 72°C pendant 7min. Pour chaque série d'amplification, étaient réalisés :

-un contrôle négatif contenant le même mélange réactionnel mais où l'ADN est remplacé par de l'eau ultra pure la préparation du Mix était faite sous hotte Telstar cv-100 ai dans un bac à glace.

Tableau IVV : Séquence des amorces de la PCR bêta globine (Shikova et al, 2009)

Amorces	Séquences
PC04	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'
GH20	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'

Tableau V: Concentration et volume du mélange réactionnels de la PCR bêta-globine (Shikova et al, 2009)

Eléments	Concentration initiale	Volume prise pour 1 echantillon (µl)	Concentration finale
H2O qsq		14,85	
Tampon	X10	2,5	1X
Mgcl2	25Mm	2,5	250µM
dNTP	10Mm	2	800µM
Amorce PC04	10µM	1	0,4µM
Amorce GH20	10µM	1	0,4µM
Taq	5U /µl	0,15	0,0 3U/µl

*Le volume d'ADN prise était de 1 µl

*Le volume final était de 25µl.

III.3.2.Mise en évidence de l'ADN de L'HPV par PCR

La détection du virus HPV a été effectuée en premier lieu par une technique de PCR nichée utilisant deux couples d'amorces spécifiques, MY09/11 visant l'amplification d'une séquence de 450 bp du gène L1 codant pour la protéine majeure de capsid des HPV, et GP5+/6+ amplifiant le même fragment mais seulement 150pb

Tableau VI : Séquence des amorces de la PCR MY et PCR GP

Amorces	Séquences
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'
GP+5	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3
GP+6	5'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAA-3'

La PCR MY réalisée contenait pour chaque tube de réaction : 1µl d'ADN extrait de chaque échantillon et un volume de 24 µL de Mix contenant les mêmes réactifs que celle de la PCR bêta globine sauf l'utilisation des amorces (amorcesMY)

Cette réaction PCR démarre par une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 min, suivie de 40 cycles d'amplification comportant: une étape de

dénaturation à 94°C pendant 1min ; D'hybridation pendant 1min à 55°C ; D'extension à 72°C pendant 1 min ; Et enfin une élongation finale de 72°C pendant 7min.

En deuxième lieu la réalisation d'une PCR nichée est effectuée, mettant en avant le couples d'amorce spécifique(GP+5/+6) (Tableau VI). Ce couple amplifiait une séquence de 150 pb, pour augmenter la spécificité et la sensibilité de la méthode.

Un volume de 23µl utilisé pour le Mix, contenait les amorces GP+5 et les amorces GP+6(Tableau V) dont il était repartie dans chaque tube éppendorf auquel est ajouté 2µl du produit de la PCR MY donnant un volume final de 25 µl. Les conditions réactionnelles d'amplification étaient les suivantes : après une première dénaturation de la matrice à 95°C pendant 10 min ; s'ensuit 40 cycles réalisés en trois phases essentielles : la dénaturation 94°C pendant 1min ; L'hybridation 38°C pendant 1min ; L'élongation 72°C pendant 1min ; Et enfin une étape d'élongation finale est effectuée à 72°C pendant 7min.

Tableau VII : Concentration et volume du mélange réactionnels de la PCR GP

	Concentration initiale	Volume de prise en (µl) pour un échantillon	Concentration finale
H2O			
Tampon	X10	2,5	X1
Mgcl2	25Mm	1	1000µM
Dntp	10Mm	1	400µM
GP+5	10µM	0,5	0,2µM
GP+6	10µM	0,5	0,2µM
Taq	5U/µl	0,15	0,03U/µl

III.4. Analyse de l'ADN et du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :

L'ADN amplifié après PCR était analysé par électrophorèse réalisée sur gel d'agarose à 2% préparé avec un tampon TBE 1X (Tris-Borate-EDTA).

Un volume de 10µL du produit de la PCR amplifié et un volume de 4µl de marqueur de taille mélangés avec un tampon de charge (le green) sont déposés dans le gel immergé dans un tampon TBE 0,5X. La migration était effectuée dans les conditions suivantes: 100 V– 50 W pendant 25min. A l'issus de ce temps, le gel est transféré dans un bain de BET (bromure d'éthidium) pendant 10 min puis lavé avec de l'eau stérile avant la visualisation sous UV.

Résultats et discussion

I. Résultats

I.1 Caractéristique générale de la population étudiée :

La population étudiée portait sur 40 patientes toutes opérées pour le cancer de l'ovaire.

Le tableau VIII présente les différentes caractéristiques épidémiologiques de notre population.

Tableau VIII: Présentation des différentes caractéristiques épidémiologiques de la population étudié

Paramètres	Effectifs	Fréquence(%)
Age (ans)		
<25	3	7
[25-40[9	20
[40-55[25	57
[55-60[5	11
>60	2	6
Age de la 1ere Menstruation :		
<=14	39	89
>14	5	11
Antécédents viraux et gynéco mammaires		
Ras	32	94,11
Cancer du col	1	2,94
Tumeur du sein	1	2,94
Ménopause	19	43
Ménopausée	25	57
Non Ménopausée		
TOTAL	40	100

Dans l'échantillonnage étudié, les femmes dont l'âge est compris entre 40 et 55 ans sont les plus représentatives avec une fréquence de 57% (l'âge moyen des patientes était de 48,64 ans avec des extrémités allant de 25 ans à 70 ans). Plus de 89% d'entre elles avaient eu leur menstruation entre 12 et 14 ans. Près de 43% des femmes de cette étude étaient ménopausée alors que plus de 94% ne présentaient pas d'antécédents viraux ou gynéco mammaires.

I.2. Optimisation de la technique d'extraction de la silice :

Le principe de la technique de la silice repose sur la capacité du dioxyde de silicium (SiO₂) à adsorber l'ADN dans un environnement riche en sels. Par comparaison avec la technique de Boom sur des échantillons d'urines, le tableau IX montre les différents paramètres ayant été modifiés pour la mise au point de cette technique sur les échantillons de biopsies de l'ovaire en comparaison avec la technique de Boom.

Tableau IX: Modifications apportées aux paramètres d'extractions d'ADN à base de silice **B**

Paramètres	Notre technique	Boom
Protéinase K	200ul/mL de volume final	0
Volume Silice	30 µl	40 µl
Temps de centrifugation	1min	30 s

I.3. Qualité et quantité d'ADN extrait :

I.3.1 Evaluation comparative des méthodes d'extractions et de purification de l'ADN à partir des biopsies de l'ovaire :

I.3.1.1 Evaluation quantitatifs de l'ADN extrait par les deux méthodes d'extractions utilisées : Le tableau X regroupe les résultats comparatifs des deux méthodes utilisées.

Tableau X: Comparaison des méthodes d'extractions et de purification de l'ADN à partir des biopsies de l'ovaire

Méthode	Concentration ng/µl	Rapport DO260/280 nm	Rendement µg/ml
Phénol- chloroforme	373,1±156	1,77±0,13	74±9
Silice	210,4±101	1,76±0,18	52±2

Le rendement moyen de l'extraction de l'ADN a été calculé en réalisant le rapport de la quantité d'ADN obtenu et le volume initial des échantillons de biopsies. On remarque que la technique au phénol-chloroforme donnait un rendement plus élevé que la méthode utilisant la silice qui était de 65 à 83µg /ml et de 50 à 54µg/ml respectivement.

Le degré de pureté est obtenu en réalisant le rapport Do 260nm/Do 280nm et a été appréciable quelle que soit la méthode utilisée. Ce rapport qui varie entre 1,6 à 1,9 nmavec la méthode phénol-chloroforme est relativement élevé par rapport à celui de méthode de la silice au allant tour de 1,5 à 1,9 nm. La méthode phénol-chloroformeprésentait des concentrations modestement plus élevé qui étaient de 217,1 à 529,1 que la méthode à la silice qui varié de 109,4.à 311,4.

I.3.1.2 .Evaluation qualitative de l'ADN extrait par les deux méthodes d'extractions utilisées:

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% a été effectuée pour apprécier la qualité et l'intégrité de l'ADN extrait par la méthode phénol-chloroforme et par la méthode de silice (**figure 7**). De même pour apprécier l'absence d'inhibiteurs de PCR et la qualité des extraits, un fragment de 268 pb du gène beta-globine a été amplifié avec le couple d'amorce GH20/PC04, un exemple de profil électrophorétique sur gel d'agarose à 2% de 4 échantillons pris de chaque amplification bêta- globine d'ADN extrait par la technique à base de silice (1S à 4S) et phénol/chloroforme (1P à 4P) est représenté dans la **Figure 8**.

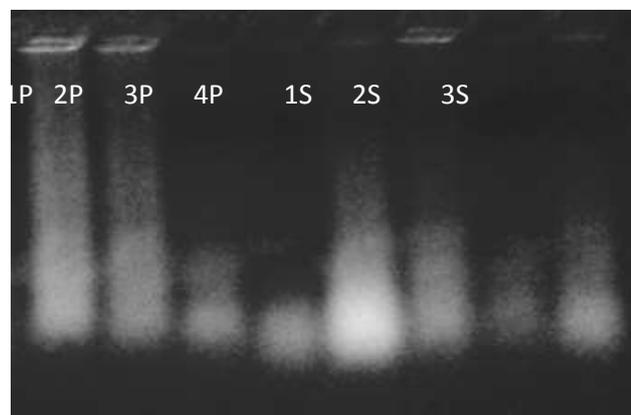


Figure 7: Profil de migration des ADN extraient (gel de 1% ; 1P, 2P, 3P, 4P : extraits d'ADN par la méthode phénol/chloroforme ; 1S, 2S, 3S, 4S : extraits d'ADN par la méthode à base de silice)

Dans l'ensemble l'ADN a bien été extrait des échantillons traités malgré la présence des smears qui traduisent une certaine dégradation de l'ADN.



Figure 8: Profil électrophorétique après amplification du gène de la bêta-globine (gel 2% ; M : marqueur de taille de 100pb)

Les 40 échantillons se sont révélés positifs quel que soit la méthode d'extraction utilisée. La présence de bandes témoigne de la bonne extraction de l'ADN et de l'absence d'inhibiteurs de PCR.

I.4. Mise en évidence de l'ADN des HPV par PCR

La détermination de l'ADN des HPV a été réalisée par PCR nichée. L'amplification d'un fragment de 450 pb du gène conservé L1 des HPV en utilisant les amorces MY09/11 s'est révélé négatif **figure 9** (exemple de profil électrophorétique comparatif des deux techniques sur gel d'agarose à 2% de quelques échantillons utilisés). Toutefois l'amplification en PCR nichée d'un fragment de 150 pb du même gène avec les amorces GP5+/6+ s'est révélé positif pour 2 échantillons de biopsies de l'ovaire, voir **figure 10** (profils électrophorétiques sur gel d'agarose à 2% des mêmes échantillons dont l'ADN était extré avec la méthode de silice et par le phénol/chloroforme).

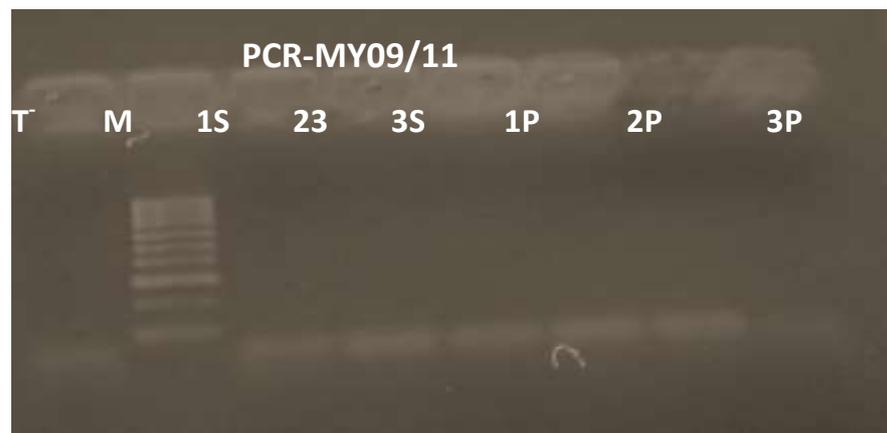


Figure 9: Exemple d'un profil électrophorétique après une PCR MY (gel d'agarose 2% ; M : marqueur de taille de 100pb ; T- : témoin négatif ; 1S, 2S, 3S : produit de PCR après extraction à base de silice ; 1P, 2P , 3P : produits des mêmes échantillons après extraction par phénol/chloroforme)

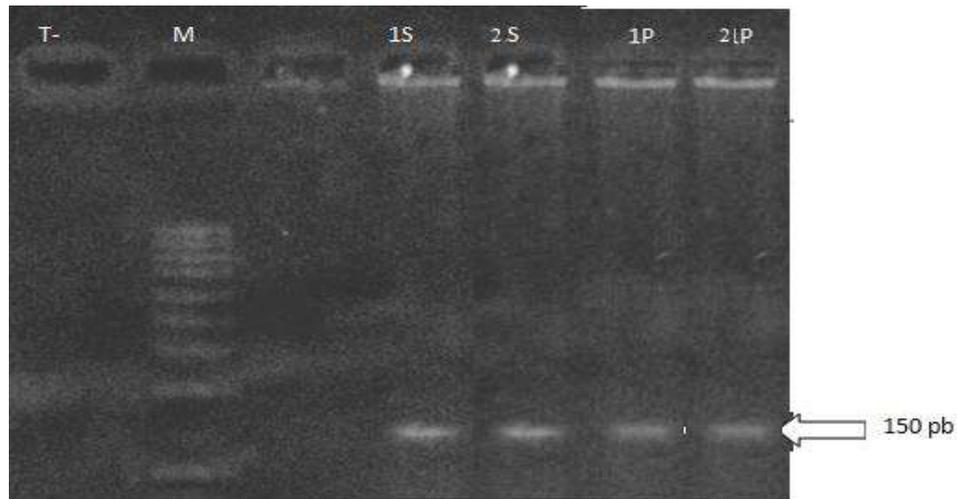


Figure 10: Profil de migration électrophorétique après une PCR GP (gel d’agarose 2% ; M : marqueur de taille de 100pb ; T- : témoin négatif ; 1S,2S ; 2P ,1P : produits de PCR GP05+/06+ de l’ADN extrait des mêmes échantillons extrait avec la méthode de silice et par le phénol/chloroforme respectivement).

I.5. Détection de l’ADN viral des HPV par PCR :

Le tableau XI présente l’ensemble des résultats de la détection des HPV comparativement aux techniques d’extraction.

Tableau XI: Résultats des PCR nichées

ADN extrait à la silice						ADN extrait au phénol/chloroforme					
PCR MY09/11			PCR GP05+/06+			PCR MY09/11			PCR GP05+/06+		
	Effectif	%		Effectif	%		Effectif	%		Effectif	%
Positif	0	0	Positif	2	5	Positif	0	0	Positif	2	5
Négatif	40	100	Négatif	38	95	Négatif	40	100	Négatif	38	95
Total	40	100	Total	40	100	Total	40	100	Total	40	100

Les résultats de la détection des HPV montrent que 5% (2 sur 40 patientes) des cas était positifs, présence HPV dans certains échantillons, quelque soit le type d’extraction utilisée.

I.6. Comparaisons d'appréciations de critères adaptées dans les méthodes d'extraction de l'ADN testés :

Le tableau XII présente une évaluation comparative selon quelques critères : temps, cout, degré de nocivité, simplicité et adaptabilité à la PCR .

Tableau VI: Tableau comparatif d'appréciation de quelques critères.

Critères	Extraction silice	Extraction phénol-chloroforme
Adapté à la PCR	+++	+++
Rapidité	+++	+
Simplicité	++	+
Praticabilité (toxicité, déchets)	+++	+
Economique	+++	+++

Le tableau XII montre quelques critères de performances entre les méthodes d'extraction à la silice et au phénol-chloroforme. Il en ressort que la méthode d'extraction des acides nucléique à base de silice est plus rapide et simple à réaliser, toute fois les deux méthodes son économique et présente une bonne adaptabilité à la PCR.

II. Discussion

Le cancer de l'ovaire occupe la première place dans la mortalité des cancers gynécologiques dans le monde (Cheneet *al.*, 2011), en raison d'un diagnostic presque toujours tardif, au stade de carcinose péritonéale où le volume de la tumeur primitive et de son extension intrapéritonéale sont considérables.

Plusieurs études ont montré que l'une des causes de ce cancer est l'altération de la protéine p53, protéine suppresseur de tumeur (Zhizhong et al., 2008; Giordano et al., 2008).

L'implication de certains virus dans le processus de cancérogenèse est déjà connue notamment dans le cancer du col utérin pour le papillomavirus ce dernier représentent un facteur étiologique de plus en plus soupçonnés de provoquer le cancer de l'ovaire, d'où l'hypothèse d'une étiologie virale.

Ce virus est réputé non cultivable et les techniques de biologie moléculaire demeurent les seuls outils fiables pour la détection de son ADN. Ainsi cette démarche passe par une extraction d'ADN viral qui doit être de bonne qualité et adapté la technique utilisée.

Le but de notre travail a été de développer une technique d'extraction d'ADN à base de la silice pour la recherche des HPV dans les biopsies de l'ovaire. Ce travail a comporté une étude comparative entre cette première technique et la méthode d'extraction de l'ADN par le phénol/chloroforme dite de référence. Ainsi qu'une amplification des extraits de l'ADN par la technique de PCR pour détecter la présence du virus HPV dans les échantillons analysés.

Notre population était constituée de femmes ménopausées dont la moyenne d'âge était de 40 ans qui avaient leurs menstruations à un âge non inquiétant et elles ne présentaient pas d'antécédents viraux ou gynéco mammaires.

La nature solide de notre matériel biologique a nécessité la prise en compte dans la composition du tampon de lyse d'un traitement supplémentaire par digestion enzymatique à la protéinase k. En effet, bien que le GuSCN soit un puissant agent chaotropique et un déprotéinisant à la fois, l'ajout de la PK était nécessaire pour dérouler l'ADN des histones cellulaires. Cet ajout marque une première différence avec la technique de Boom, utilisé sur les échantillons liquide. De même, nous avons constaté que l'utilisation de 40 μ L de SiO₂ comme Boom était de trop de façon que la récupération du surnageant était insuffisante pour la suite de notre travail et un dépôt inférieur à 30 μ l ne permettait pas d'adsorber tous l'ADN contenu dans l'échantillon suite à l'importance de notre culot cellulaire. D'où nous avons augmenté de 30 μ L le volume de la colonne à utiliser. Après évaluation sur gel d'agarose chaque fois notre extrait d'ADN obtenu, nous avons constaté que le temps de lavage pour éliminer les sels de guanidine, voire pour l'élution de l'ADN ne permettait pas d'obtenir un résultat optimal. Ce constat nous a amené d'augmenter pour notre technique le temps de centrifugation de 30seconde à 2 min par rapport à Boom.

Quelle que soit la méthode d'extraction et de purification des acides nucléiques utilisée, nous avons obtenu de l'ADN en qualité et en quantité suffisante pour réaliser avec sécurité plusieurs réactions de PCR.

La pureté est considérée comme satisfaisante avec les deux méthodes testées. Toutefois le rapport Do260/Do280 nm a été notamment plus élevé pour la technique utilisant le phénol-chloroforme , en revanche les concentrations en ADN obtenu avec la méthode entrant en jeux la silice sont nettement

plus faible par rapport à la méthode de référence. Parallèlement à l'évaluation proprement dite des deux techniques utilisées nous avons évalué d'autres critères de performance des techniques dans la réalisation de celle-ci, la technique d'extraction à base de silice présente quelques avantages supplémentaires par rapport à la technique de référence

- La rapidité est nettement meilleure, car le produit de l'extraction est obtenu en un seul jour comparé aux trois jours de la technique au phénol/chloroforme ;
- La simplicité est aussi meilleure, car les différentes étapes sont aisément réalisables par rapport au phénol/chloroforme ou l'étape de récupération de la phase aqueuse est très délicate et source de contamination avec la phase phénolique;
- La praticabilité : les réactifs utilisés dans cette technique sont moins toxiques que ceux consacrés pour la technique de phénol/chloroforme. (Boom et al., 1990)

Toutefois, la technique au phénol/chloroforme est peu économique car les réactifs sont moins coûteux et peuvent s'utiliser sur des longues périodes, alors que certains réactifs de la silice ne sont stables que trois semaines une fois préparés. Néanmoins, selon Boom le père de cette technique, elle est la moins chère par échantillon. (Boom et al., 1990)

Les différents échantillons d'ADN extraits par les deux méthodes testés ont très bien répondu à une série d'amplification par PCR, une PCR du gène de la bêta-globine a été effectuée. Nous avons observé une absence d'inhibiteurs et la présence des bandes montrant la bonne réalisation de la technique. Ce gène, étant ubiquitaire, est souvent utilisé pour l'évaluation de la qualité d'ADN extrait (Shikova et al, 2009).

Quant à la détermination de l'ADN viral en utilisant les couples d'amorces MY09/MY11 et GP 5+/GP6+ dans une PCR nichée nous avons observé une similitude sur les résultats obtenus. En effet, l'ADN extrait avec la silice a révélé les mêmes échantillons positifs que l'ADN extrait au phénol/chloroforme avec d'une fréquence de 5% (2 /40). Bien que l'objectif principal de cette étude n'était pas de rechercher les HPV dans les biopsies de l'ovaire ; le fait que nous ayons trouvé une présence de ce virus dans les échantillons traités, confirme dans le cas d'espèce certaines études sur la possible implication des HPV dans ce cancer comme l'a montré dans son étude Kuscu en 2005 (Kuscu et al.,2005) et d'autres encore (Lai et al 1992;Giordano et al.,2008). En revanche Anttila et ses collaborateurs en 1999 ainsi que Quirk 2006 (Anttila et al, 1999 ; Quirk et al 2006) n'ont pas établi de lien de cause à effet entre l'HPV et ce cancer. Toutefois, l'identification de l'ADN viral des HPV dans les tumeurs ovariennes, loin d'une implication formelle dans la genèse de ce cancer, pourrait n'être que la preuve d'une métastase du cancer du col utérin (Powell et al.,2002 ; Park et al., 2004).

Conclusion

Conclusion

Au regard des résultats que nous avons obtenu sur cette étude préliminaire relative à l'optimisation de la technique d'extraction d'ADN à base de silice sur des échantillons de biopsies de l'ovaire, cette méthode pourrait présenter une très bonne alternative qui garantit une excellente qualité de l'ADN extrait par rapport à la méthode phénol-chloroforme ou encore les kits d'extraction. Elle pourra être utilisée comme technique manuelle de base de biologie moléculaire sans nécessairement avoir un équipement de faste et sophistiqué. Cette technique est simple, rapide (un jour) et moins coûteuse que la méthode au phénol/chloroforme.

Par ailleurs, la présence d'HPV dans nos échantillons de biopsies de l'ovaire pourrait être la preuve qu'il existe une relation entre les HPV et le cancer de l'ovaire.

Nos résultats justifient les futures études pour confirmer le lien de causalité entre l'infection virale et le développement de ce cancer par typage des HPV 16 en suivant les modalités de la PCR spécifique ou la recherche d'autre virus présumer impliquer dans le cancer de l'ovaire pour cela il faut traiter une grande taille d'échantillons de biopsies de l'ovaire.

Partie références bibliographiques

Références bibliographiques

ACTIVITE DE L'O.M.S. 2006- Rapport biennal du Directeur Général page 218-225.

Ameziane N., Bogard M., Lamoril J. (2005) : Principe de la biologie moléculaire en biologie clinique, Paris : Elsevier Masson, p.251-265.

Anttila M., Syrjanen S., Ji H., Saarikoski S., and Syrjänen K. (1999): Failure to demonstrate human papillomavirus DNA in epithelial ovarian cancer by general primer PCR. *Gynecol Oncol* (72) :337–41

Article OptionBio | Lundi 10 novembre 2008 | n° 408.

Aubin F, Pretet JI, MOUGIN CH. Papillomavirus humains –Biologie et pathologie tumorale. Éditions EM inter, Éditions TEC & DOC, 2003

Babin E. Qualité de vie en oncologie, Application aux cancers des voies aéro-digestives supérieures 2005.

Baker TS, Gurda B. L., C. Raupp, R. Popa-Wagner, M. Naumer, N. H. Olson, R. Ng, R. McKenna, J. A. Kleinschmidt, and M. Agbandje-McKenna (1991 revisité 2012) Mapping a neutralizing epitope onto the capsid of adeno-associated virus serotype 8. *J. Virol.* (86):7739-7751.

Bienvenu T, C. Meunier, S. Bousquet, S. Chiron, L. Richard, A. Gautheret-Dejean, J.-F. Rouselle, D. Feldmann, (1999) : les techniques de l'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin. *Annales de Biologie Clinique*. 57, (1) : 77-84, Janvier- Février 1999, Pratique quotidienne.

Blanc B., Gamerre M., Martin P.M., Jouve M.P., Thomas M. et Serment H. Tumeurs non endocrines de l'ovaire. *Encycl. Med. Chir (Paris, France) Gynécologie*, 680 B(10): 11-1985, 22p.

Boom R, Sol C J, Salimans M M, Jansen C L, Wertheim-van Dillen P M and van der Noordaa J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *Clin. Microbiol.* 1990, 28(3):495.

Bouallaga I., Les papillomavirus et la régulation de la transcription. Institut Pasteur - Unité "Expression génétique et Maladies", Département de Biologie du Développement, Paris - France. 2002.

Cabane F., Bonenfant J.L. Ovaire. Anatomie pathologique principes de pathologie générale, spéciale et d'aétopathologie, 1986 ; 2ème éd. 1096-1112. *Cancer* (4): 757-68.

Chêne G., Penault-Llorca F., Raoelfils I., Bignon Y.J., Ray-Coquard I., Seffert P., and Dauplat J. (2011): La cancérogenèse ovarienne: théories actuelles et passes. *Gynécologie obstétrique & Fertilité* (39) :216-223
Coulard, R, Jacques Poirier. Précis d'Histologie Humaine. Presses Université Laval, 1980 - 752 pages

Colombo, N., T. Van Gorp, et al. (2006). "Ovarian cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* 60(2):159-179.

Coursaget P, Touze A. Les vaccins contre les papillomavirus. *Virologie*, 2006, (10) : 353-68

.D'Andrilli, G., Bovicelli, A., Giordano A. (2010). HPV vaccines: state of the art. *Journal of Cellular Physiology* 224, (3): pp. 567–847, ISSN 0021-9541

Dimitri, K. A., Wieland, S. F., Whitten-Bauer, C., Gerin, J. L., Chisari, F. V. & Yeager, M. (2006). Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* (22) : 843-850.

- Diko B. Etude épidémiologique, échographique et anatomopathologique des tumeurs de l'ovaire dans le Service de gynécologie et d'obstétrique du C.H.U. du Point « G ». 2006
- Douvier S, Dalac S (2004): Infections à papillomavirus Human papillomavirus .*EMC-Maladies Infectueuses*.(5) :235-261.
- El Ayed Mohamed Applications de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI à la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire, université Lille 1, 2010)
- ENS Lyon: Oncogénèse médiée par les papillomavirus. Janvier 2009 <http://biologie.ens-lyon.fr>.
- Giordano G, D'Adda T, Gnetti L, Froio E., Merisio C., and Melpignano M. (2008): Role of human papillomavirus in the development of epithelial ovarian neoplasms in Italian women. *J Obstet Gynaecol Res*(34): 210–7.
- Hauuy.MP, Musset D, Grenier P, Carette MF, Frija G, Desbleds MT, Girard P, Bigot JM, Lallemand D. 1990. Primary lung cancer staging: prospective comparative study of MR imaging with CT. *Radiology*. 1986 Sep;160(3):607–611.
- Jung, Hecht, M. L., Warren E., & Krieger, J. L. (2004). The Communication Theory of Identity: Development, theoretical perspective, and future directions. In W. B. Gudykunst (Ed.), *Theorizing about intercultural communication* (pp. 257-278). Newbury Park, CA: Sage.
- Kuscu E., Ozdemir B.H., Erkanli S., and Haberal A. (2005): HPV and p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* (26) : 642–5.
- Lansac Jacques , Pierre Lecomte et Henri Marret, Gynécologie pour le praticien, 1989.
- Lai C.H., Hsueh S., Lin C.Y., Huang M.Y., You G.B., Chang H.C., and Pao C.C.(1992): Human papillomavirus in benign and malignant ovarian and endometrial tissues. *Int J Gynecol Pathol* 11,210
- Leyla Bagna Maiga, Docteur d'état en médecine, Etude épidémiologique et histologique des cancers gynécologiques et mammaires à propos de 647 cas, FACULTÉ DE MÉDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE DE BAMAKO ,2006.
- Li, M, Beard. P and Estes Pa. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *Journal of virology*, 1998, 72(3) : 2160-7.
- Mathevet.P.(gynécologue obstétricien, Lyon), J.-L. Brun (gynécologue obstétricien, Bordeaux), R. Dachez (anatomie et cytologie pathologiques humaines, Paris), J.-L. Mergui (gynécologue obstétricien, Paris), Prévention du cancer du col de l'utérus 2007.
- Melzak, Kathryn A, Sherwood, Chris S.; Turner, Robin F.B. and Haynes, Charles A(1996): Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, August 1996, 181,(2): 635-644.
- Monson J. Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus. Éditions Springer, Paris, 2007.
- Morgan, D. and Sanz, C. 2006. Chimpanzee feeding ecology and comparisons with sympatric gorillas in the Goulougo Triangle, Republic of Congo. In: G. Hohmann, M.M. Robbins, and C. Boesch (eds.), Feeding

Ecology in Apes and Other Primates: Ecological, Physical and Behavioral Aspects, pp.97–122. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Park T.W., Zivanovic O., Theuerkauf I., Dürkop B., Hernando J.J., Simon M., Büttner R., and Kuhn W. (2004) : The diagnostic utility of human papillomavirus-testing in combination with immunohistochemistry in advanced gynaecologic pelvic tumours: a new diagnostic approach. *Int. J. Oncol* (24)829–836.

Pelucchi, C. And C. Galeone 2007. "Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies." *Am J ObstetGynecol* 196(1): 83 e81-87.

Powell J.L., Bock K.A., Gentry J.K., White W.C., and Ronnett B.M. (2002) : Metastatic endocervical adenocarcinoma presenting as a virilizing ovarian mass during pregnancy. *Obstet.Gynecol* (100): 1129–113

Quirk J.T., Kupinski J.M., and DiCioccio R.(2006): Analysis of ovarian tumors for the presence of human papillomavirus DNA. *JObstetGynaecol Res*(32): 202–5.

Russo.A and V. Calo 2009. "Hereditary ovarian cancer." *Crit Rev OncolHematol* 69(1):28-44.

Rudnick R. L et Gao S (2005) : « Composition of the Continental Crust », *Treatise on Geochemistry*, vol. 3: *The Crust*, Elsevier, 2005. pp.48,53.

Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J SurgPathol* 2003, (27):985–93.

Shikova. E, Todorava. I, Gandrev.G, KousevaDragreva.V, Detection and typing of human papillomavirus by PCR. 2009. *Biotechnol.EQ* : 877-880.

Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E et al. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *Journal of virology*, 2003, 77(24) : 13125-35

Tian B, Liu X, Yu C, Gao F, Luo Q, Xie S, Tu B, Zhaw Q. *chem. Commun.* (2002), 1186-1187. Doi:

10.1039/b202180. Vogelstein B, Pardoll, D.M, Coffey, D.S (1979): Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell*.1980 Nov ; 22 (1 Pt 1) :79–85.

Turek.LP, Ishiji, T., Lace, M.J., Parkkinen, S., Anderson, R.D., Haugen, T.H., Cripe, T.P, Xiao, J.H., Davidson, and I., Chambon, P. (1994). Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription.in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *The EMBO Journal* (11)2271-2281.

Walker F, Borne H, Darai E (2001): HPV et lésions cervicales, vaginales et vulvaires. *Le courrier de coloproctologie* (II) - n° 2 - juin 2001.

Wassila Benhamed, Cancers gynécologique et mammaire : 20.000 nouveaux cas chaque année, elmoudjahid.com/fr/actualites/26303, 2013.

Wu Q.J., Guo M., Lu Z.M., Li T., Qiao H.Z., and Ke Y. (2003): Detection of human papillomavirus-16 in ovarian malignancy. *Br J Cancer* (89) :672–5.

Zhizhong Zhang, Meilin Wang, Dongmei Wu, Miaomiao Wang, Na Tong, YuanyuanTian, Zhengdong Zhang *P53* codon 72 polymorphism contributes to breast cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies. 2008.

Sitographie :

<http://www.medicopedia.net/term/12740,1,xhtml>

<http://app-asap.over-blog.com/article-structure-de-l-ovaire-43833787.html>

[http://www.liguecancer.ch/fr/a_propos_du_cancer/types_de_cancer/cancer_de_lovaire_/](http://www.liguecancer.ch/fr/a_propos_du_cancer/types_de_cancer/cancer_de_lovaire/)

<https://www.google.com/search?q=organisationet-agents-infectieux>

Annexes

Annexe 1

Appareillages :



Spectromètre
(smartspec3000-BIORAD.)



Centrifugeuse (SIGMA 2K 5C.)



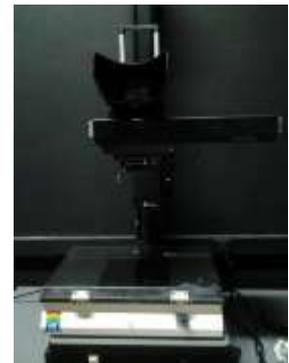
Vortex (Velqscientifica)



PCR System 2400 (gene
Amp Perkin Elmer)



Chaîne d'électrophorese (Bio
RAD)



Appareille UV
(Polaroid MP 4+
250V- 900W)



Incubateur (Bio block
scientific)



Autoclave (Systec VE-
7.5)



Hotte PSII (TELSTAR CV-
100)

Annexe 2

Protocole d'extraction d'ADN à base de la silice :

Réactifs nécessaires

Réactifs :

- ❖ Dioxyde de silicium SiO₂ : 60 g
- ❖ Eau déminéralisée : 1L+ 50mL
- ❖ HCl (32%) : 600µl+ 500µl
- ❖ Thiocyanate de guanidium (GuSCN) : 120g (L6); 120g (L2)
- ❖ Tris- HCl (0,1M) : 100ml
- ❖ Tris- HCl (10mM)- EDTA (1mM) : [x100]
- ❖ EDTA (0,2M): 22ml
- ❖ NaOH
- ❖ Triton X-100: 2,6g

Préparation de tampons

Tampon de lyse :

- ❖ Suspendre 120g de GuSCN dans 100ml de Tris-HCl 0,1M (pH 6,4).
- ❖ Ajouter 22ml d'EDTA 0,2M (pH 8) et 2,6 g de Triton X-100 à la solution de GuSCN.
- ❖ Homogénéiser la solution obtenue.

Tampon de lavage :

- ❖ Suspendre 120g de GuSCN dans 100ml de Tris- HCl 0,1 M (pH 6,4).
- ❖ Porter la suspension à une température comprise entre 60 et 65°C (Bain- Marie) sous agitation afin de faciliter la dissolution de la GuSCN.

Tampon d'élution:

- ❖ 10 mM Tris chlorhydrate-EDTA 1 mM (pH 8,0).

Préparation des fractions (colonne) de silice

- ❖ Suspendre dans un flacon cylindrique en verre 60g de dioxyde de silicium dans 500ml d'eau déminéralisée ;
- ❖ Laisser sédimenter les particules de silice pendant 24 heures à température ambiante ;
- ❖ Eliminer 430 ml de surnageant par aspiration et suspendre une autre fois le culot dans 430 mld'eau déminéralisée ;
- ❖ Après une autre étape de sédimentation (5 heures à température ambiante), éliminer 440 ml du surnageant par aspiration ;
- ❖ Ajouter 600 µl d'HCl (32%, wt/vol) au culot afin d'ajuster le pH à 2 ;
- ❖ Distribuer la suspension de silice dans des tubes en verre (4ml) fermés hermétiquement ;
- ❖ Stériliser les tubes contenant les particules de silice par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes ;
- ❖ La silice est stable 6 mois à température ambiante et à l'obscurité.

NB : la suspension de silice obtenue est suffisante pour 1500 tests de purification d'acide nucléique.

Protocole d'extraction phénol/chloroforme :

Première étape : digestion enzymatique

Pour cette digestion on ajoute dans un tube Eppendorff 250 à 500 µL de solution de lyse constituée du tampon de lyse (TL) + la protéinase K (PK) sur les biopsies (selon la taille). On incube les tubes scellés par para-film à 37°C toute une nuit (over night), ou bien à 55°C pendant 3h.

Après l'incubation, on procède à la dénaturation de la protéinase (PK) par un traitement thermique à 100°C pendant 10 minutes.

NB : si pas de lyse totale, on centrifuge et on récupère que le surnageant

Solution de lyse :

Mémoire MSA

Tampon de lyse	7mL
Protéinase K	70µL

Préparation du tampon de lyse :

SDS 10%	20mL
EDTA 0.2M.....	5mL
Tris HCl 1M pH 8	1mL
NaCl 5M	3mL
Eau stérile QSP.....	50mL

Deuxième étape : élimination des protéines :

Cette étape est réalisée par l'ajout de 500 µL du mélange Phénol Chloroforme alcool isoamylique (25 : 24 : 1 respectivement) qui permet de précipiter les protéines. Ensuite, les tubes sont bien vortexés puis, incubés à 50°C pendant 15 minutes.

Après centrifugation pendant 15 minutes à froid (4°C), le surnageant contenant l'ADN (phase aqueuse) est récupéré dans un nouveau tube Eppendorff, d'une façon délicate pour ne pas toucher la couche intermédiaire contenant les protéines.

Préparation de tris EDTA :

Préparation de phénol :

Mettre le phénol à 55°C pour le liquéfier et prendre 500 mL dans un flacon

Ajouter le même volume de Tris EDTA 1 M pH8

Chauffer pendant 30 minutes

Laisser séparer pendant 3 à 24h à 4°C

Enlever le surnageant

Ajouter 500 mL de Tris EDTA 0.1 M pH 8

Ajuster le pH de phénol à 7.5

Enlever le surnageant (Tris EDTA) en laissant le 1/3

Conserver à 4°C dans des bouteilles foncées

Préparation du chloroforme :

Chloroforme 480 mL

Alcool isoamylique 20 mL

Conserver le mélange dans une bouteille foncée à 4°C.

Reconstitution du phénol chloroforme alcool isoamylique

Phénol 500 mL

Chloroforme 480 mL

Alcool isoamylique 20 mL

Conserver le mélange dans une bouteille foncée à 4°C.

Troisième étape : purification de l'ADN

Elle est réalisée par l'ajout de :

l'Acétate d'Ammonium : 2/5 du volume de la phase aqueuse récupérée

l'éthanol absolue : 2 x du même volume récupéré

On procède à une incubation over night à -20°C. Le lendemain les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes puis, le surnageant est versé délicatement après avoir vérifié l'absence de méduses dans la solution d'ADN.

Préparation d'acétate d'ammonium 7.4 M

Acétate d'ammonium 57.81 g

Eau stérile 100 mL

La préparation est stérilisée par filtration puis, conservée à -20°C.

Quatrième étape : lavage et réhydratation de l'ADN

L'ADN est lavé des impuretés par ajout de 500 µL d'éthanol 70° (-20°C). Après 15 minutes de centrifugation, le surnageant est jeté et les tubes sont séchés couvercle ouvert à 37°C pendant 15

minutes. A la fin, le culot est hydraté dans de l'eau stérile (de 20 à 30 μL selon la taille du culot), puis stocké à -20°C pour utilisation ultérieure.

Protocole d'électrophorèse :

Préparation de gel d'agarose 2%

Agarose 2 g
Tris Borate EDTA (TBE 1X) 100 mL

Le mélange est chauffé pendant 2 minutes jusqu'à ébullition, puis refroidit sous un jet d'eau jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (55°C). On place ensuite un peigne dans le support de coulage du gel pour constituer les puits enfin, le gel est coulé jusqu'au tiers de la hauteur du peigne.

Préparation de TBE(5 X) :

Borate (acide borique) 27.5 g
Tris base..... 54 g
EDTA 0.5 M pH 820 mL
Eau QSP1000 mL

On le stérilise par autoclavage et on le conserve à température ambiante. Il faut qu'il soit claire, dépourvu de précipités

Dépôt de l'ADN dans les puits du gel :

Après sa solidification, le gel est placé dans la cuve contenant du (TBE) 0.5 x (tampon de migration). Le peigne est retiré délicatement du gel.

L'ADN (10 μL) est mélangé avec 2 μL du tampon de charge (Green Orange) et déposé délicatement dans les puits du gel.

Migration :

La migration se déroule pendant 45 minutes à 100V.

Révélation et Observation :

À l'issue du temps de migration, le gel est récupéré puis, placé dans un bain contenant du bromure d'éthidium (BET) qui est un agent s'intercalant entre les paires de bases. On laisse agir pendant 10 minutes puis, le gel est rincé avec de l'eau.

Enfin, le gel est visualisé sous UV. Les bandes apparaissent grâce à la fluorescence émise par le BET.

Reconstitution des amorces MY :

- Tube eppendorfe
- Amorces MY09, MY11
- Eau ultra pure
- Vortex
- incubateur

Y3=MY09 $T_m=64$

-Vortexer les amorces MY09 tube à l'envers

Un pipetage de 100 μ L des amorces MY09 déposé sur 1,78mL d'eau ultra pure

-Vortexer les amorces MY11 tube à l'envers

Y4=MY11 $T_m=60$

Un pipetage de 100 μ L des amorces MY11 déposé sur 1,52 mL d'eau ultra pure

-Incubation 15 min à température ambiante

-Vortexer 15 min

Reconstitution des 4 Dntp :

- Un tube eppendorffe
- Eau ultra pure
- DntpT , A, C, G

La concentration initiale de chaque Dntp est de :

T=100 mM

C= 100mM

A=100 mM

G= 100mM

Pour un volume totale de 100 μ L un prélèvement de 10 μ L de chaque Dntp dans un volume d'eau pure de 60 μ L a été effectué.