

ANNÉE 2013

N° 075

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 13 Novembre 2013

Par REISER Justine

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février 2012

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Le test HPV urinaire proposé comme alternative au frottis cervico-utérin : étude pilote
dans le département du Maine et Loire**

Composition du jury

Président : **Mme le Pr Virginie FERRE**

Membres du jury : **Mme le Dr Alexandra DUCANCELLE**
 Mme le Pr Françoise LUNEL-FABIANI
 Mme le Dr Anne-Sophie LE DUC-BANASZUK
 Mr le Dr Nicolas PAILLOCHER

Remerciements

A Madame le Professeur Virginie FERRE

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que présidente du jury.

A Madame le Docteur Alexandra DUCANCELLE

Je vous remercie d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail de thèse et de m'avoir proposé de participer à ce passionnant projet. Un grand merci pour votre aide, votre réactivité et votre disponibilité qui m'ont permis de mener ce travail à bien et dans les temps.

A Madame le Professeur Françoise LUNEL-FABIANI

Je vous remercie de votre présence en tant que membre du jury et d'avoir pris le temps de juger mon travail.

A Madame le Docteur Anne-Sophie LE DUC-BANASZUK

Je vous remercie de m'avoir accompagnée dans ce travail et d'avoir toujours répondu clairement et rapidement à mes questions.

A Monsieur le Docteur Nicolas PAILLOCHER

Je vous remercie de juger ce travail en tant que clinicien. Merci pour le temps que vous m'accordez en faisant partie de ce jury.

A Monsieur le Professeur Francis LARRA

Cette étude a été possible grâce au financement de la Ligue Départementale contre le Cancer. Merci pour la confiance que vous avez accordée à ce projet.

A Adeline PIVERT et Céline CAMBON

Merci de m'avoir aidée à enregistrer les prélèvements quand ils arrivaient par caisses pleines ! Merci Adeline d'avoir toujours fait en sorte que je ne manque pas de réactifs.

Aux techniciens du laboratoire de Virologie du CHU d'Angers

Je vous remercie pour votre accueil sympathique. Merci de m'avoir laissée monopoliser la paillasse du pré-analytique quand j'enregistrais mes centaines de prélèvements et que je préparais mes aliquots. Merci de m'avoir aidée dans la prise en main du m2000 et merci pour la place que vous m'avez laissée dans vos frigos !

Table des matières

1	INTRODUCTION	9
2	GENERALITES	10
2.1	Structure du virus	10
2.2	Classification.....	11
2.3	Epidémiologie des infections à HPV	12
2.4	Physiopathologie.....	14
2.4.1	Infection latente	14
2.4.2	Infection productive	14
2.4.3	Infection transformante.....	15
2.5	Histoire naturelle de l'infection à HPV	16
2.5.1	Clairance immunitaire.....	16
2.5.2	Persistence et évolution possible vers un cancer.....	16
2.6	Réponse immune	17
2.6.1	Réponse cellulaire.....	17
2.6.2	Réponse humorale.....	18
2.6.3	Echappement au système immunitaire.....	19
2.7	Diagnostic biologique des infections à HPV	19
2.7.1	Détection de l'ADN HPV : tests HPV de dépistage.....	20
2.7.1.1	Hybridation en phase liquide ou Hybrid Capture® 2 (HC2, Qiagen)	20
2.7.1.2	PCR	21
2.7.2	Génotypage des HPV	22
2.7.2.1	Génotypage par séquençage	22
2.7.2.2	Génotypage par hybridation moléculaire inverse : Line Probe Assay	23
2.7.2.3	Génotypage par puce à ADN.....	24
2.7.2.4	Génotypage par technologie d'array en suspension : Luminex®.....	26
2.7.2.5	Génotypage par capture d'hybrides.....	26
2.7.3	Techniques combinées : dépistage + génotypage 16/18.....	27
2.7.4	Détection des ARNm des protéines E6 et E7.....	27
2.8	Epidémiologie du cancer du col de l'utérus	28
2.9	Prévention du cancer du col utérin.....	29
2.9.1	Dépistage.....	29
2.9.2	Vaccination préventive contre les HPV	32
2.9.2.1	Principe du vaccin	33
2.9.2.2	Recommandations vaccinales.....	34
3	CONTEXTE ET DESCRIPTION DE L'ETUDE	35
4	MATERIELS ET METHODES	37
4.1	Population étudiée	37
4.2	Modalités de recrutement	37

4.3	Chronologie et récapitulatif du projet.....	38
4.4	Méthode de détection des HPV dans les urines	38
4.4.1	Principe biologique de la technique	39
4.4.2	Traitement des échantillons	39
4.4.3	Extraction.....	40
4.4.4	Assemblage de la plaque de réaction (plaque de PCR).....	40
4.4.5	Amplification	40
4.4.6	Détection.....	41
4.4.7	Rendu des résultats	41
4.4.8	Validation de la série.....	41
4.5	Questionnaire sur les motifs de refus du FCU.....	42
5	RESULTATS	43
5.1	Taux de participation.....	43
5.1.1	Premier envoi : 55-65 ans	43
5.1.2	Deuxième envoi : 40-54 ans.....	44
5.1.3	Au total.....	46
5.2	HPV : prévalence et génotypage	48
5.2.1	Prévalence	48
5.2.1.1	55-65 ans	48
5.2.1.2	40-54 ans	48
5.2.1.3	Au total.....	49
5.2.2	Problèmes techniques.....	49
5.2.3	Distribution des génotypes d'HPV	50
5.3	Suivi des femmes HPV+	51
5.4	Analyse des questionnaires de motifs de refus du FCU chez les femmes ayant renvoyé un prélèvement.....	53
6	DISCUSSION	58
7	CONCLUSION.....	65
	ANNEXES.....	66
	BIBLIOGRAPHIE	72

Table des figures

Figure 1 : Génome du virus.....	10
Figure 2 : Classification des papillomavirus humains et animaux sur la base de la séquence codant la protéine L1	11
Figure 3 : Classification des HPV en fonction de leur tropisme et de leur potentiel oncogène	12
Figure 4 : Répartition globale des HPV oncogènes dans le cancer du col utérin.....	13
Figure 5 : Infection productive à HPV	15
Figure 6 : Koïlocytes	15
Figure 7 : Histoire naturelle de l'infection à HPV.....	17
Figure 8 : Infection à HPV : réponse immunitaire	19
Figure 9 : Principe de l'hybridation en phase liquide.....	21
Figure 10 : Principe de détection immuno-enzymatique des amplicons HPV	22
Figure 11 : Principe de génotypage par hybridation inverse sur bandelettes	23
Figure 12 : Bandelette du kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Innogenetics).....	24
Figure 13 : Principe de génotypage par hybridation inverse sur puces à ADN.....	25
Figure 14 : Principe du génotypage par technique Luminex®.....	26
Figure 15 : Épidémiologie de l'infection par les HPV génitaux chez la femme en fonction de l'âge ..	28
Figure 16 : Mentions à faire figurer sur un compte-rendu de FCU selon le système de Bethesda 2001	30
Figure 17 : Conduite à tenir devant un frottis ASC-US ou ASC-H	31
Figure 18 : Conduite à tenir devant un frottis LSIL	31
Figure 19 : Conduite à tenir devant un frottis HSIL.....	32
Figure 20 : Synthèse des VLP	33
Figure 21 : Chronologie du projet	38
Figure 22 : Récapitulatif du projet.....	38
Figure 23 : Détail des réponses reçues sur les 1940 courriers de départ (55-65 ans).....	44
Figure 24 : Détail des réponses reçues sur les 3000 courriers de départ (40-54 ans).....	46
Figure 25 : Taux de réponse avec et sans prélèvement pour les deux tranches d'âge.....	46
Figure 26 : Détail des prélèvements reçus pour les deux tranches d'âge	47
Figure 27 : Détail des réponses reçues sans prélèvement pour les deux tranches d'âge	48
Figure 28 : Distribution des génotypes.....	50
Figure 29 : Suivi des femmes HPV+, résultat des frottis	52
Figure 30 : Réponses à la question « connaissiez-vous le cancer du col de l'utérus ? »	53
Figure 31 : Réponses à la question « saviez-vous qu'il est recommandé de réaliser un dépistage de ce cancer par un frottis cervico-utérin ? »	54
Figure 32 : Réponses à la question « avez-vous déjà fait ce frottis ? »	55
Figure 33 : Motifs de refus du frottis (en % des réponses).....	56
Figure 34 : Motifs de refus des incitations de Cap Santé à réaliser un FCU (en % des réponses).....	57

Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des deux vaccins anti-HPV actuellement disponibles en France	33
Tableau 2 : Détail des 73 réponses reçues sans prélèvement (55-65ans)	44
Tableau 3 : Détail des 73 réponses reçues sans prélèvement (40-54 ans)	45
Tableau 4 : Prévalence HPV chez les 55-65 ans	48
Tableau 5 : Prévalence HPV chez les 40-54 ans	49
Tableau 6 : Prévalence HPV pour les deux tranches d'âge	49
Tableau 7 : Détail du suivi des femmes HPV+ (génotype retrouvé, cytologie, histologie)	51
Tableau 8 : Réponses à la question « connaissiez-vous le cancer du col de l'utérus ? »	53
Tableau 9 : Réponses à la question « saviez-vous qu'il est recommandé de réaliser un dépistage de ce cancer par un frottis cervico-utérin ? »	54
Tableau 10 : Réponses à la question « avez-vous déjà fait ce frottis ? »	55
Tableau 11 : Motifs de refus du frottis	56
Tableau 12 : Motifs de refus des incitations de Cap Santé à réaliser un FCU	57
Tableau 13 : Comparaison des principaux avantages et inconvénients de l'utilisation du test HPV dans le dépistage du cancer du col de l'utérus par rapport au frottis cervicovaginal	58

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (aujourd'hui HAS)

ARNm : Acide Ribonucléique messager

ASC-H : Atypical Squamous Cells-cannot exclude High-grade squamous intraepithelial lesion = atypies des cellules malpighiennes ne permettant pas d'exclure une lésion intraépithéliale de haut grade

ASC-US : Atypical Squamous Cells of Unknown Significance = atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia = néoplasie cervicale intraépithéliale

CMU : Couverture Maladie Universelle

CMU-C : CMU-Complémentaire

FCU : Frottis Cervico-Utérin

FDA : Food and Drug Administration

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

HAS : Haute Autorité de Santé

HC : Hybrid Capture

HLA : Human Leukocyte Antigens = antigènes des leucocytes humains ou complexe majeur d'histocompatibilité

HPV : Human Papillomavirus

HPV BR : Human Papillomavirus à Bas Risque oncogène

HPV HR : Human Papillomavirus à Haut Risque oncogène

HSIL : High-grade Squamous Intraepithelial Lesion = lésions malpighiennes intraépithéliales de haut grade

IC : Intervalle de Confiance

InVS : Institut de Veille Sanitaire

LCR : Long Control Region

LSIL : Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion = lésions malpighiennes intraépithéliales de bas grade

MSA : Mutualité Sociale Agricole

NASBA : Nucleic Acid Sequence Based Amplification)

NC : Nombre de Cycles

ORL : Otorhinolaryngé

PAL : Phosphatase Alcaline

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR TR : PCR en Temps Réel

TMA : Transcription Mediated Amplification

URCAM : Unions Régionales des Caisses d'Assurance Maladie

URR : Upstream Regulatory Region

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLP : Virus-Like Particle = pseudoparticule virale

VPN : Valeur Prédictive Négative

1 Introduction

Les papillomavirus sont des petits virus que l'on retrouve chez l'Homme ainsi que chez de nombreux mammifères avec une spécificité d'espèce étroite.

Chez l'Homme on parle de Human Papillomavirus ou HPV.

Ce sont des virus épithéliotropes qui sont responsables d'infections fréquentes de la peau et des muqueuses le plus souvent bénignes et transitoires (verrues, condylomes) mais aussi parfois de lésions cancéreuses notamment au niveau du col de l'utérus, de l'anus ou encore de l'œsophage.

L'essor de la biologie moléculaire a révolutionné le diagnostic virologique des infections à HPV en révélant notamment l'existence de plus de 100 génotypes chez l'Homme et en permettant leur classification en HPV cutanés ou muqueux, à haut risque ou à bas risque oncogène en fonction de leur implication dans diverses manifestations cliniques.

C'est dans le contexte des pathologies à risque d'évolution maligne que la détection des HPV, et notamment des HPV à haut risque oncogène, est intéressante. De nombreux tests détectant l'ADN viral ont d'ailleurs été développés dans le cadre du dépistage du cancer du col de l'utérus, le virus étant alors impliqué dans 99% des cas.

Ces tests sont basés sur différentes techniques de biologie moléculaire : hybridation en phase liquide, PCR, hybridation moléculaire inverse...

Actuellement, le test HPV, réalisé sur un prélèvement cervical, est indiqué dans le dépistage du cancer du col de l'utérus, pour le triage des frottis indéterminés ASC-US (Atypical Squamous Cells of Unknown Significance). Leur utilisation en première intention ou bien associée à la réalisation d'un frottis cervico-utérin fait l'objet de nombreuses études car ces tests seraient plus sensibles que le FCU. De plus, afin d'élargir la couverture de dépistage du cancer du col, il serait intéressant de pouvoir proposer la réalisation de ces tests sur d'autres types de prélèvements, plus faciles à recueillir et/ou mieux acceptés que les prélèvements cervicaux qui sont, à ce jour, la référence.

L'étude que nous avons menée avait pour but de mesurer l'adhésion des femmes à un test HPV urinaire par rapport au frottis cervico-utérin et de connaître les freins à la réalisation du frottis. Ce test pourrait représenter une alternative au FCU pour les femmes qui y sont réfractaires ce qui permettrait d'étendre le taux de couverture de dépistage du cancer du col de l'utérus.

2 Généralités

2.1 Structure du virus

Les papillomavirus sont des virus non enveloppés appartenant à la famille des *Papillomaviridae*. Il existe plus de 200 types de papillomavirus capables d'infecter l'Homme mais également de nombreux Mammifères, avec une spécificité d'espèce étroite. Chez l'Homme, on parle de Human Papillomavirus ou HPV.

Ce sont des virus de petite taille, constitués d'un génome d'environ 8000 paires de base dont un seul brin est codant ainsi que d'une capside icosaédrique formée de 72 capsomères et mesurant 45 à 55 nm de diamètre. Le génome des HPV est constitué d'un ADN bicaténaire circulaire codant 8 à 9 protéines selon les génotypes.

On distingue 3 régions dans ce génome :

- Une région régulatrice dite LCR (Long Control Region) ou URR (Upstream Regulatory Region)
- Une région E (Early) codant plusieurs protéines dites précoces (E1, E2, E4, E5, E6, E7 ± E8). Ce sont des protéines non structurales impliquées dans la réplication virale, la transcription et la transformation cellulaire.
- Une région L (Late) codant les protéines structurales (L1 et L2) qui forment la capside. L1 est la protéine majeure de capside et L2 la protéine mineure.

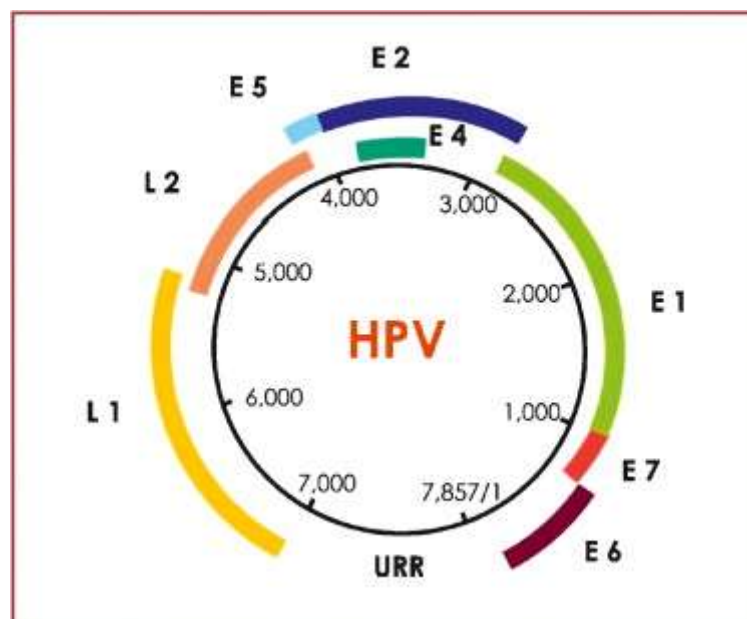


Figure 1 : Génome du virus (1)

2.2 Classification

On peut classer les papillomavirus en fonction de leurs caractéristiques génétiques (2).

La classification des papillomavirus est alors fondée sur la séquence nucléotidique de la région codant la protéine L1, région la plus conservée du génome.

Les différents papillomavirus ont un degré d'homologie génomique de 40%. Ils sont divisés en genres qui présentent un degré d'homologie <60% de la séquence L1. On distingue cinq genres d'HPV (α , β , γ , μ , ν) et sept genres de papillomavirus animaux. Les genres sont eux-mêmes divisés en espèces (60 à 70% d'homologie) et en types (71 à 89% d'homologie). Enfin, il existe des variants au sein des types. Ces variants présentent moins de 2% de divergence entre eux (Fig.2).

On peut également classer les papillomavirus en fonction de leur tropisme et de leur potentiel oncogène (Fig.3). On différencie ainsi les papillomavirus à tropisme cutané responsables de verrues cutanées et ceux à tropisme muqueux responsables de lésions au niveau des muqueuses (génitales ou non) et parmi lesquels on distingue :

- Les HPV de bas risque oncogène (HPV BR), ne présentant pas de risque avéré d'évolution maligne, responsables par exemple des condylomes acuminés.
- Les HPV de haut risque oncogène (HPV HR), responsable de lésions pré-cancéreuses et cancéreuses.

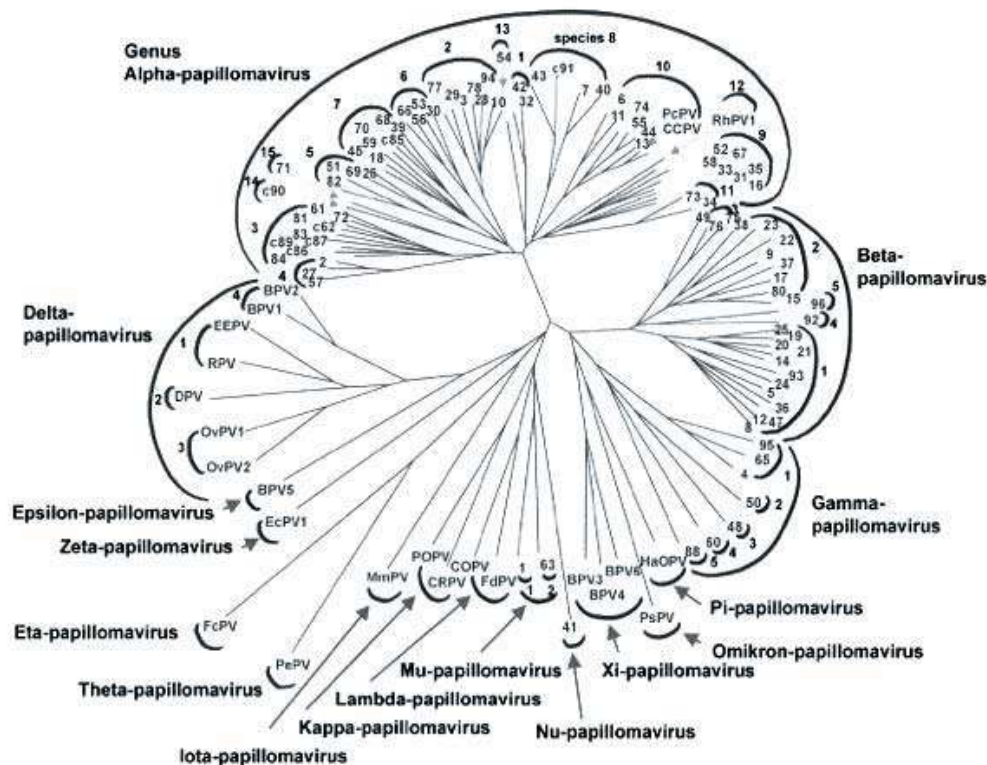


Figure 2 : Classification des papillomavirus humains et animaux sur la base de la séquence codant la protéine L1 (3)

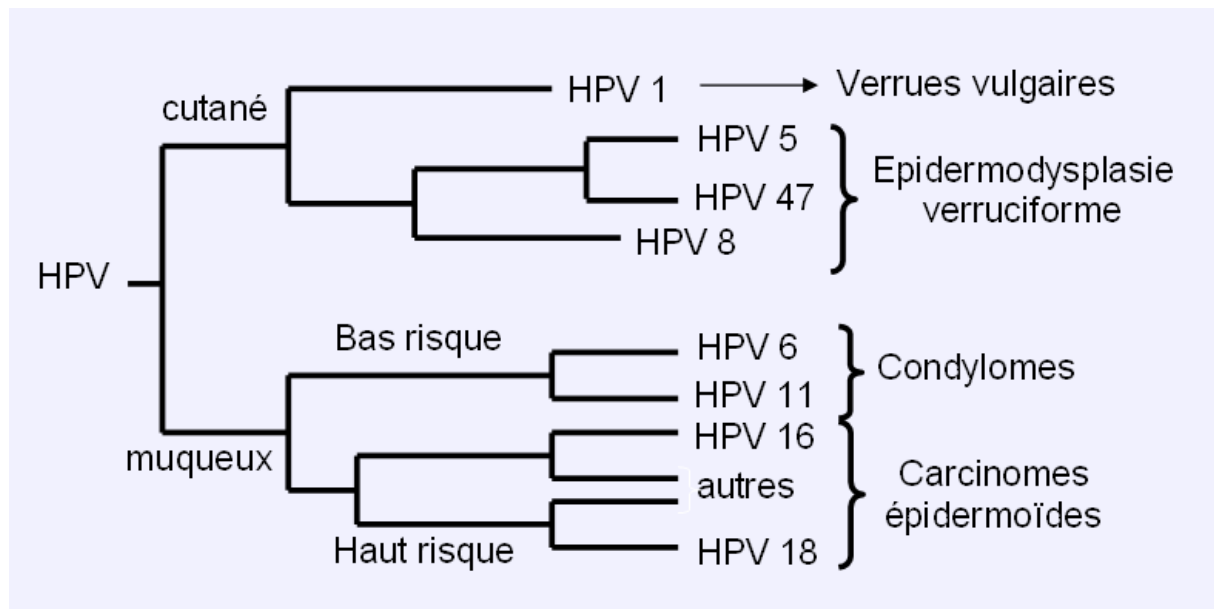


Figure 3 : Classification des HPV en fonction de leur tropisme et de leur potentiel oncogène

2.3 Épidémiologie des infections à HPV

Les infections à HPV sont ubiquitaires. On trouve des HPV cutanés ou muqueux chez tous les individus et ce, le plus souvent de manière tout à fait inapparente. La transmission peut être directe (peau à peau, muqueuse à muqueuse) ou indirecte par l'intermédiaire d'objets contaminés. En effet, l'HPV étant un virus nu, il résiste dans le milieu extérieur.

Les HPV cutanés peuvent être responsables :

- De verrues de morphologie et de localisation variables en fonction du génotype
- D'épidermodysplasie verruciforme : maladie génétique rare impliquant les gènes EVER1 et EVER2 et se manifestant par des lésions cutanées diffuses consistant en macules squameuses et papules. Ces lésions peuvent se transformer en cancers cutanés généralement en zones photo-exposées.

Les HPV muqueux peuvent infecter les muqueuses ano-génitale mais également ORL et oculaire. Dans ce cas, les HPV peuvent être responsables de papillomes, d'hyperplasie épithéliale focale orale ou encore de papillomatose orale floride et sont associés à 20 à 25% des cancers des voies aéro-digestives supérieures.

Un autre mode de transmission du virus est la transmission verticale de la mère à l'enfant lors de l'accouchement. Dans le cas d'HPV BR, on peut observer une papillomatose laryngée juvénile qui se manifeste par une détresse respiratoire ou une papillomatose récurrente. Des HPV HR peuvent également être transmis. L'infection est alors le plus souvent transitoire mais elle peut parfois persister et même être associée à la survenue d'un cancer oropharyngé (3).

L'infection par les HPV muqueux génitaux est la plus fréquente des infections sexuellement transmissibles. Elle peut être responsable de condylomes acuminés ou verrues génitales qui sont en général bénins. Les HPV ano-génitaux peuvent également être impliqués dans des lésions précancéreuses et cancéreuses principalement au niveau du col de l'utérus mais aussi de l'anus, du vagin ou encore du pénis. Ce sont les HPV HR qui sont à l'origine de la transformation cancéreuse, les HPV BR quant à eux, sont impliqués dans les lésions bénignes.

Plusieurs espèces d'HPV peuvent être transmises simultanément ou successivement, les co-infections sont donc courantes et il est possible d'être co-infecté par un HPV BR et un HPV HR.

Nous allons nous intéresser ici aux infections des voies sexuelles et plus précisément chez les femmes. On observe un pic d'infection lors des premiers rapports. En effet, en France, environ 30% des jeunes femmes de 20-25 ans sont porteuses d'un HPV au niveau cervical. La prévalence diminue ensuite du fait de la clairance immunitaire du virus pour atteindre environ 10% au-delà de 30-35 ans (4). On observe ensuite un second pic de moindre importance chez la femme ménopausée. Les hommes peuvent également être infectés notamment au niveau pénien, ce sont donc des vecteurs majeurs d'HPV génitaux. Une revue de la littérature a toutefois montré que la prévalence de l'infection est globalement plus faible chez l'homme que chez la femme (5).

Concernant la distribution génotypique des HPV, en France, les HPV HR 16 et 18 sont responsables à eux seuls d'environ 70% des cancers du col (Fig. 4) et de plus de 60% des lésions CIN 3. Parmi les HPV BR, ce sont les génotypes 6 et 11 qui sont les plus impliqués puisqu'on les retrouve dans plus de 85% des condylomes ano-génitaux (6).

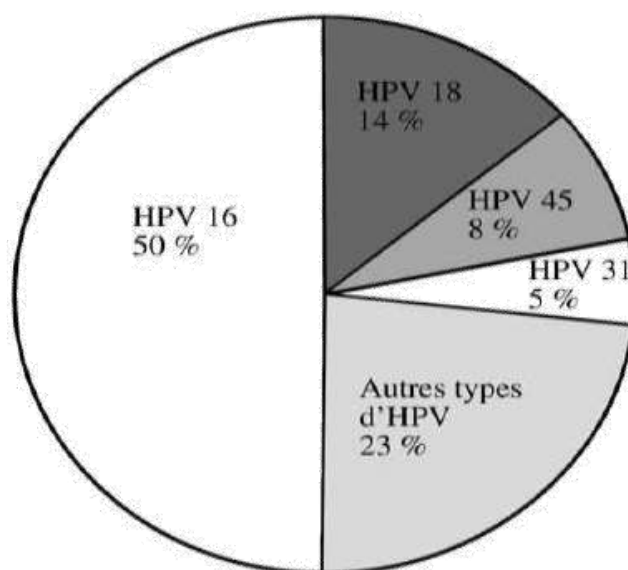


Figure 4 : Répartition globale des HPV oncogènes dans le cancer du col utérin (7)

2.4 Physiopathologie

Les Papillomavirus ont un tropisme pour les épithéliums malpighiens qu'ils pénètrent par les cellules basales suite à une brèche. Ils peuvent également infecter leurs cellules cibles directement au niveau de la jonction entre l'exocol et l'endocol. Cette zone présente d'une part, une fragilité mécanique car elle est composée d'une couche unique de cellules basales et d'autre part, une fragilité immunitaire, elle constitue donc un site privilégié pour l'infection à HPV. Le contact virion-cellule se ferait par l'intermédiaire des héparanes sulfates puis le virus pénétrerait dans la cellule par un mécanisme d'endocytose médiée par les vésicules à clathrine ou par les cavéoles. Une fois dans la cellule, le génome est libéré et transporté vers le noyau (8). Le cycle viral est dépendant du stade de différenciation des cellules épithéliales. Ce sont les cellules indifférenciées de la couche basale qui sont initialement infectées. Celles-ci ont la particularité d'être en phase active de diffusion cellulaire. Elles migrent ensuite au niveau des couches supérieures et perdent progressivement leur noyau. Elles entament alors un processus de différenciation où la synthèse d'ADN cellulaire est stoppée.

On distingue trois types d'infection en fonction de l'expression des gènes viraux dans les cellules infectées : l'infection latente, l'infection productive et l'infection transformante.

2.4.1 Infection latente

L'ADN persiste à l'état latent, il ne se réplique pas et ne s'intègre pas. L'infection est asymptomatique dans la majorité des cas et aucune anomalie n'est détectée.

2.4.2 Infection productive

L'infection productive aboutit à la libération de virus à la surface de l'épithélium.

Le cycle de réplication virale est étroitement lié à la différenciation cellulaire. Ainsi, au niveau des couches basale et suprabasale, seules les protéines précoces sont exprimées, ce qui permet la réplication virale. Celle-ci a lieu dans les cellules en cycle, au cours de la phase S, et elle nécessite l'action des protéines E1 et E2 ainsi que des protéines cellulaires. Elle aboutit à la synthèse de 50 à 100 épisomes par cellule. Les protéines E6 et E7 assurent le maintien des cellules basales et suprabasales en phase de synthèse d'ADN (phase S), indispensable au cycle viral. Les protéines de capsid (L1, L2) ne sont produites qu'en fin de cycle par les cellules différenciées (kératinocytes), proches de la surface. L'assemblage des virions ainsi que l'encapsidation de l'ADN viral sont alors possibles et les virus sont libérés par les cellules qui desquament en surface de l'épithélium (Fig.5).

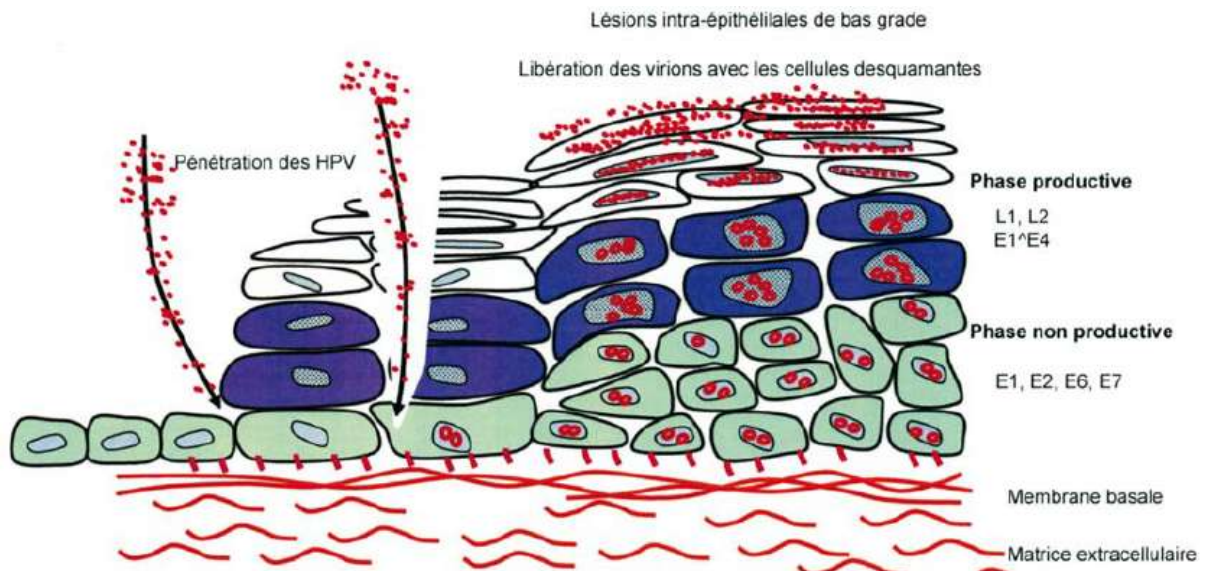


Figure 5 : Infection productive à HPV (8)

Les cellules dans lesquelles a lieu une réplication complète du virus présentent un effet cytopathogène caractéristique : la koïlocytose (Fig.6). Les koïlocytes sont des cellules épithéliales de grande taille présentant, autour de leur noyau, une vacuole qui repousse le cytoplasme à la périphérie. Ils sont fréquemment binucléés. On peut les observer sur frottis cervico-utérin.

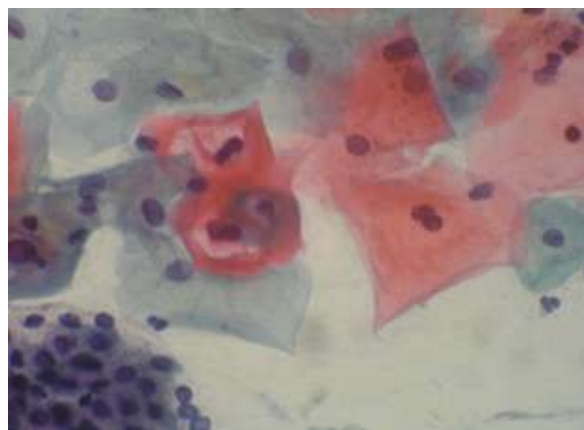


Figure 6 : Koïlocytes

2.4.3 Infection transformante

L'infection transformante aboutit à des lésions malignes.

On retrouve le génome viral dans près de 100% des cancers du col utérin. Celui-ci est généralement intégré au génome cellulaire. Cette intégration, observable uniquement pour les HPV HR, interrompt le plus souvent le gène E2 qui code pour une protéine répresseur transcriptionnel ce qui entraîne une dérégulation de la transcription des gènes E6 et E7 qui sont alors surexprimés. Or, ces protéines se lient respectivement aux protéines p53 et pRB qui sont des protéines suppresseurs de tumeurs. E6 et E7 interagissent également avec d'autres facteurs de régulation de la multiplication ou de la

différenciation cellulaires. L'expression à haut niveau de ces protéines entraîne l'immortalisation et la transformation des cellules infectées.

2.5 Histoire naturelle de l'infection à HPV

Bien que l'HPV puisse provoquer des lésions cancéreuses, il est à noter que l'infection évolue la plupart du temps vers la guérison. En effet, on observe une clairance spontanée du virus dans environ 80% des cas et une persistance du virus dans 20% des cas (Fig.7).

2.5.1 Clairance immunitaire

L'infection à HPV évolue naturellement vers la clairance spontanée du virus et donc, vers la guérison. On observe une clairance virale en trois à six mois pour les HPV BR et en 12 à 18 mois pour les HPV HR (9).

Dans le cas d'un portage transitoire, le risque de progression vers des lésions cancéreuses est nul. C'est la persistance du virus et non l'infection par HPV en elle-même qui représente un facteur de risque de développement de lésions malignes.

2.5.2 Persistance et évolution possible vers un cancer

Parfois, le virus persiste. Dans ce cas, il peut entraîner des néoplasies intraépithéliales de bas grade puis de haut grade voire dans certains cas directement de haut grade (10).

Les lésions précancéreuses évoluent généralement lentement. Il existe une période d'environ 10 ans entre l'infection par un HPV HR et le diagnostic du cancer invasif.

Différents types de lésions précèdent le cancer :

- Les dysplasies de bas grade LSIL comprenant les CIN 1 (dysplasie légère) et les condylomes plans
- Les dysplasies de haut grade HSIL comprenant les CIN 2 (dysplasie modérée) et 3 (dysplasie sévère ou carcinome in situ)

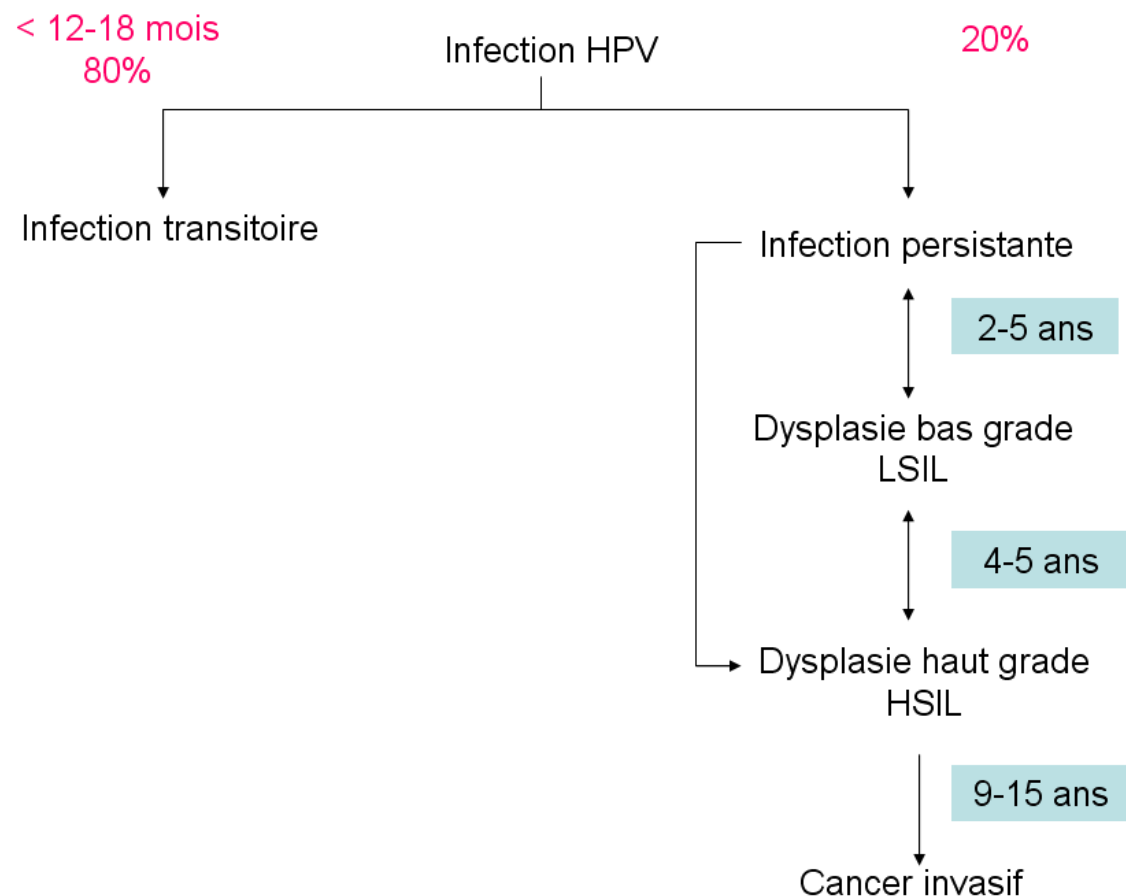


Figure 7 : Histoire naturelle de l'infection à HPV

De nombreux facteurs ont une influence sur la clairance ou la persistance du virus. Certains facteurs sont liés au virus (génotype, charge virale...) et d'autres à l'hôte ceux-ci pouvant être génétiques ou acquis (groupe HLA, statut immunitaire, multiparité, tabagisme...) (9).

2.6 Réponse immune

2.6.1 Réponse cellulaire

L'immunité cellulaire, via les lymphocytes T, a un rôle majeur dans la régression de l'infection à HPV et la prévention des réinfections avec un même génotype (Fig.8).

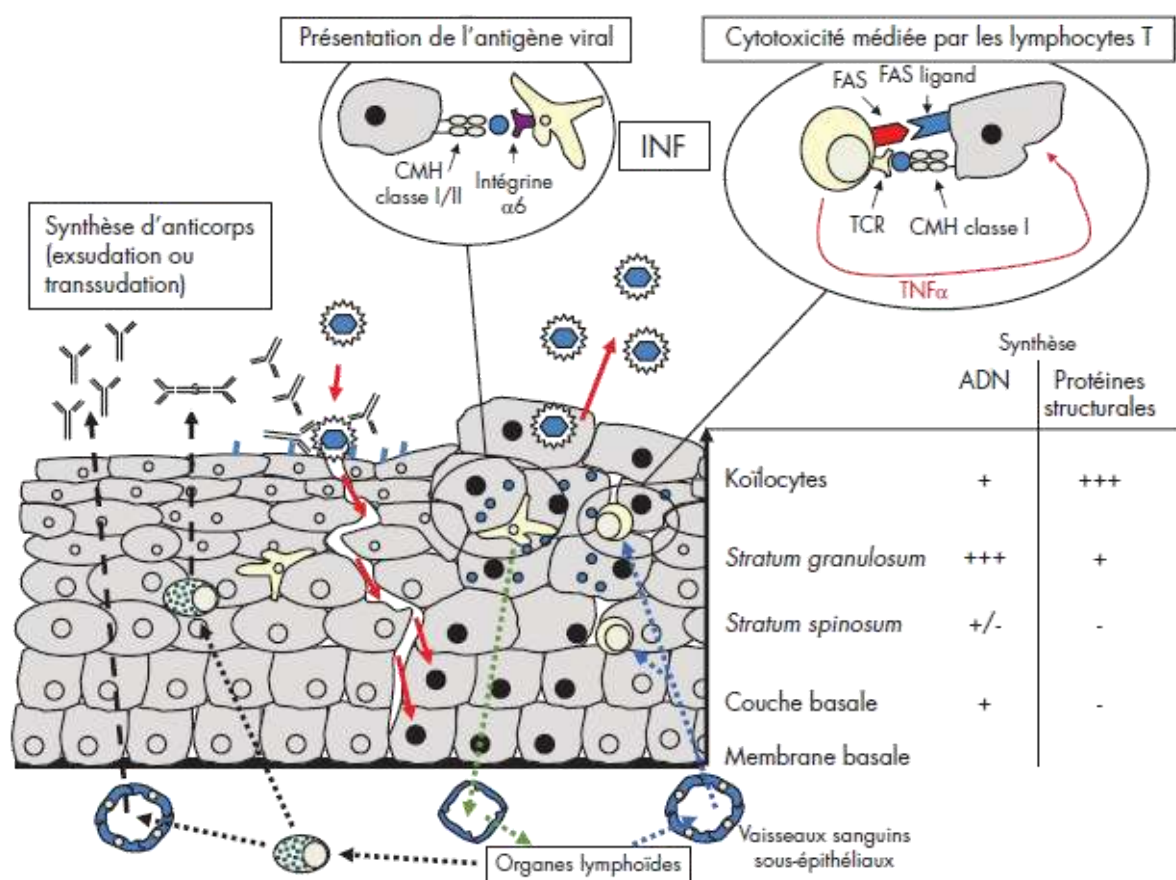
Dans les lésions cancéreuses, on n'observe pas ou peu de réponse cytotoxique. En revanche, la régression des lésions est associée à une réponse cytotoxique et T helper intense. Cette réponse cellulaire est dirigée contre les protéines E1, E2, E6, E7 et L2 (11).

La persistance et la fréquence accrues des infections à HPV HR mais également des infections bénignes chez les patients ayant des défenses immunitaires cellulaires altérées de façon physiologique (grossesse, ménopause) ou acquise (VIH, transplantation), illustrent l'importance de cette réponse

cellulaire. Ainsi, on observe une co-infection VIH/HPV chez plus de 50% des patientes séropositives pour le VIH (12).

2.6.2 Réponse humorale

La réponse humorale prévient l'infection de nouveaux sites et les réinfections grâce à la synthèse d'anticorps neutralisants (Fig.8). Cette réponse est peu intense. Elle est dirigée essentiellement contre la protéine virale L1 mais également contre les protéines E6, E7, E2 et L2. Les anticorps synthétisés bloquent les sites de fixation du virus au niveau de la muqueuse qu'ils atteignent par transsudation ou par exsudation à partir du plasma.



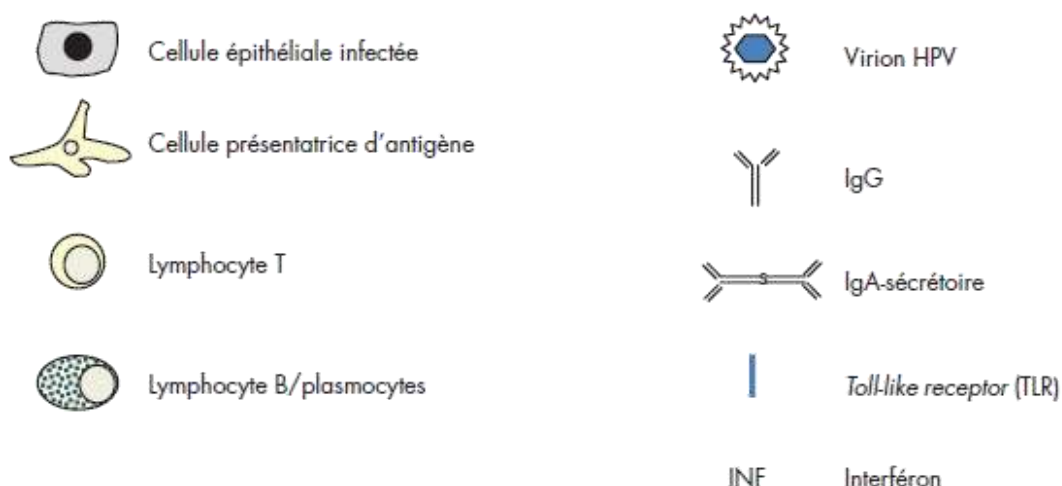


Figure 8 : Infection à HPV : réponse immunitaire (3)

2.6.3 Echappement au système immunitaire

Bien qu'on observe une réponse immunitaire à la suite d'une infection à HPV, celle-ci est peu efficace. En effet, les kératinocytes sont de mauvaises cellules présentatrices d'antigènes et les cellules dendritiques sont peu nombreuses. De plus, le virus est peu exposé au système immunitaire car le cycle viral se déroule au niveau intraépithélial et il est peu lytique. Les protéines virales sont produites en faible quantité et les virions sont relargués uniquement en surface de l'épithélium, on n'observe donc pas de virémie. De ce fait, la production de cytokines pro-inflammatoires est très faible voire inexistante, favorisant ainsi un état de tolérance immunitaire. Les protéines E6 et E7 jouent aussi un rôle dans l'échappement immunologique en diminuant l'expression des récepteurs de surface de type TLR 9 (Toll Like Receptor 9) qui reconnaissent les ADN viraux et bactériens. E6 et E7 inhibent également le système interféron. La protéine E5 quant à elle diminue la présentation des antigènes par les molécules HLA de classe II. Tous ces phénomènes concourent à l'échappement du virus au système immunitaire ce qui favorise l'installation et la persistance de l'infection (13).

2.7 Diagnostic biologique des infections à HPV

C'est l'essor de la biologie moléculaire qui a révolutionné le diagnostic virologique des infections à HPV car l'isolement viral en culture cellulaire est très difficile et il n'existe pas de tests sérologiques commercialisés. La biologie moléculaire a en effet permis de comprendre l'implication des différents génotypes de HPV dans leurs diverses manifestations cliniques ce qui a permis de les classer en HPV cutanés ou muqueux, à haut risque ou à bas risque oncogène.

Les différents tests développés peuvent être répartis en techniques de dépistage, qui reposent sur la détection de plusieurs HPV HR sans distinction de génotype et en techniques de génotypage, qui permettent la détection spécifique de différents types d'HPV.

La détection des HPV est intéressante pour les pathologies à risque d'évolution maligne. La majorité des tests HPV ont d'ailleurs été développés dans le cadre du dépistage du cancer du col de l'utérus. La détection du virus dans ce contexte semble d'autant plus intéressante que le dépistage actuel, basé uniquement sur le frottis a montré ses limites notamment en terme de sensibilité. La détection de l'ADN viral s'avère supérieure sur ce point.

Selon la HAS, le dépistage repose actuellement sur l'examen cytologique d'un frottis cervico-utérin (FCU) chez les femmes de 25 à 65 ans. Cet examen doit être réalisé tous les trois ans après deux frottis normaux espacés d'un an. La HAS recommande le dépistage des HPV HR dans le triage des frottis indéterminé (ASC-US), en complément de la cytologie. Cette stratégie permet de détecter plus précocement les lésions CIN2, 3 et cancéreuses (14,15).

Les techniques de détection des HPV au niveau du col de l'utérus sont réalisables sur les milieux de cytologie utilisés pour les frottis en phase liquide, ou bien sur le milieu de transport dans lequel a été déchargé la cytobrosse ayant servi au recueil de cellules cervicales dans le cas d'un frottis conventionnel.

Des études ont été menées pour démontrer la fiabilité de ces tests sur d'autres types de prélèvements notamment les autoprélèvements vaginaux ou encore les urines dans le but d'étendre la couverture de dépistage.

Dans le cadre de la détection du virus pour d'autres sites anatomiques que le col utérin (anus, voies aérodigestives supérieures, peau), les différents tests HPV peuvent être réalisés sur des biopsies effectuées en zones lésionnelles.

2.7.1 Détection de l'ADN HPV : tests HPV de dépistage

2.7.1.1 Hybridation en phase liquide ou Hybrid Capture® 2 (HC2, Qiagen)

Ce test repose sur la détection en microplaque de l'ADN viral à l'aide d'un mélange de sondes ARN. Les hybrides ARN/ADN sont capturés sur une phase solide (microplaque) tapissée d'anticorps anti-ARN/ADN conjugués à une enzyme (PAL, phosphatase alcaline). En présence d'un substrat chimioluminescent, la PAL déclenche une émission de lumière détectée par un luminomètre (Fig.9).

Ce test se pratique à partir d'un prélèvement endo-cervical. Un kit de prélèvement comprenant un milieu de transport pour virus et une cytobrosse est fourni avec le test. Il permet la détection de 13 HPV HR : HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68. Le rendu du résultat est qualitatif : présence ou non d'un HPV à haut risque oncogène.

Ce test est recommandé par la HAS (France) et par la FDA (USA) pour le triage des ASC-US. Son seuil de positivité est de 1 pg/ ml (5000 copies de génome), il a une sensibilité de détection des lésions CIN 3 supérieure à 95%, une valeur prédictive négative élevée (99%) et on observe une excellente corrélation intra- et interlaboratoire ($k > 0,80$). Il reste toutefois moins sensible que la PCR.

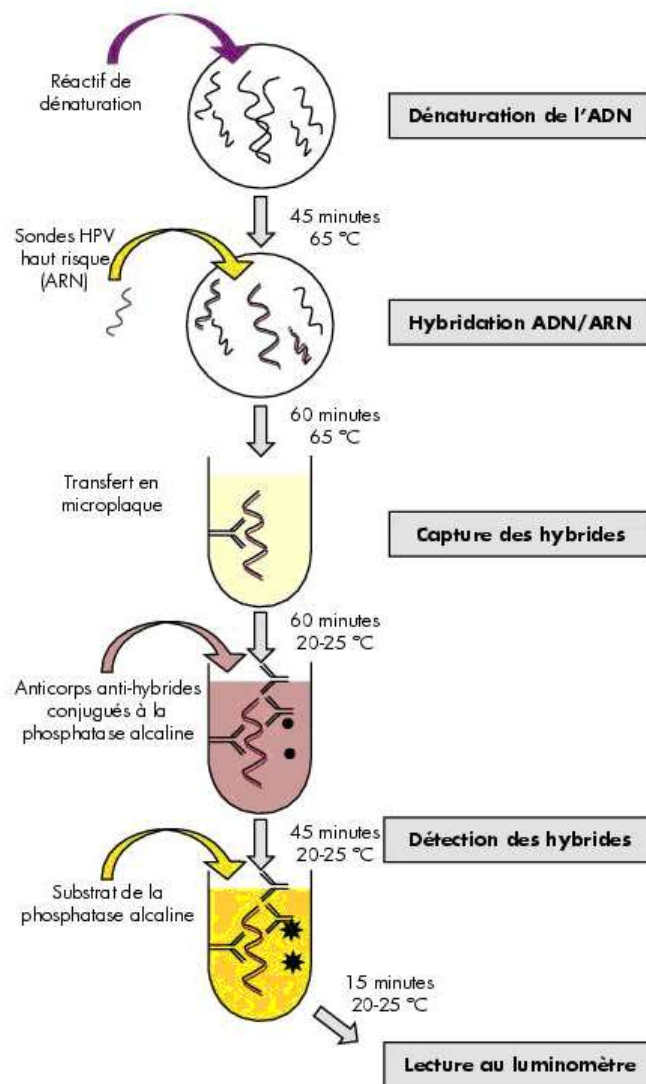


Figure 9 : Principe de l'hybridation en phase liquide (16)

2.7.1.2 PCR

Différentes PCR consensus ont été mises au point pour amplifier des HPV HR et BR. Les amorces utilisées s'hybrident au niveau du gène L1 de la protéine majeure de capsid. Les principales amorces consensus utilisées sont : MY09/MY11, GP5+/GP6+, PGMY09/PGMY11 et SPF10. Le résultat obtenu est qualitatif (présence ou non du virus). Pour typer le virus détecté, il faudra procéder à un séquençage ou une hybridation après amplification.

Le test Amplicor HPV (Roche Diagnostic) utilise cette technique. Il permet de détecter les mêmes génotypes que le test HC2.

L'ADN est d'abord extrait, puis un fragment d'environ 165 pb du gène L1 est amplifié grâce à des amorces biotinylées (PGMY09/PGMY11). Parallèlement, un fragment de 268 pb du gène de la β -globine est amplifié. Celui-ci sert de contrôle interne et permet de contrôler la qualité du prélèvement (cellularité suffisante) et de l'extraction. Les amplicons s'hybrident ensuite à des sondes spécifiques

d'HPV HR et de β -globine présents dans des microplaques. La détection s'effectue par chimiluminescence (Fig.10).

La sensibilité de ce test est de 480 copies/mL. Des études comparatives ont montré une bonne concordance entre ce test et le test HC2 avec une sensibilité supérieure pour le test Amplicor HPV®. Le fabricant (Roche) évalue la sensibilité de ce test à 93% et sa spécificité de 95%.

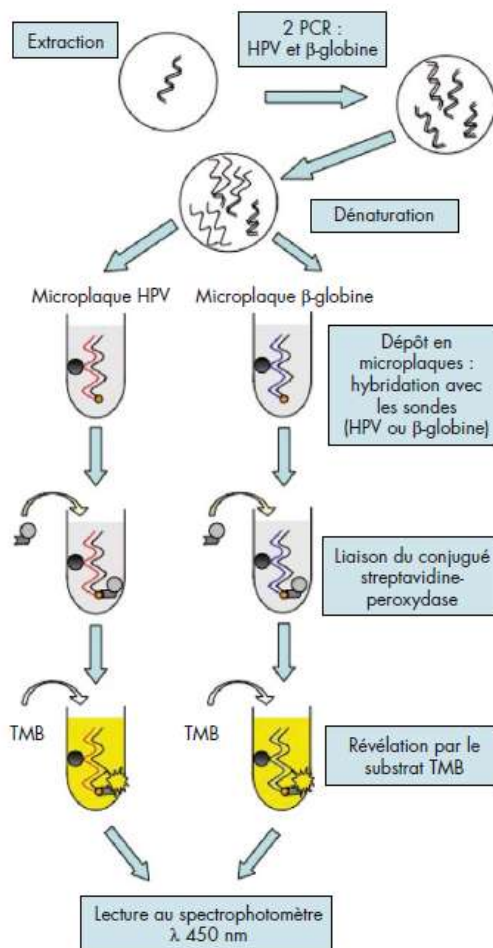


Figure 10 : Principe de détection immuno-enzymatique des amplicons HPV (16)

2.7.2 Génomotypage des HPV

Le génotypage repose sur une technique d'amplification par PCR suivie d'une technique de révélation. Les techniques de génotypage permettent de préciser quel(s) génotypes est(sont) présent(s) dans l'échantillon et ainsi de détecter les infections multiples.

2.7.2.1 Génomotypage par séquençage

C'est la méthode de référence. Généralement, la région utilisée est située sur le gène codant la protéine L1. L'analyse des chromatogrammes et l'alignement des séquences obtenues avec des séquences de référence permettent de détecter le génotype en présence. Le principal inconvénient de cette technique

est la difficulté d'interprétation des résultats en cas de co-infection car on obtient alors des chromatogrammes qui se chevauchent. De plus, son utilisation en routine est fastidieuse.

2.7.2.2 Génotypage par hybridation moléculaire inverse : Line Probe Assay

Une PCR est réalisée avec des amorces biotinylées. Les amplicons ainsi obtenus sont ensuite hybridés sur une bandelette de cellulose sur laquelle sont fixés des oligonucléotides spécifiques des différents génotypes d'HPV. Ces sondes sont immobilisées en bandes parallèles sur les bandelettes. Après hybridation et lavage, la streptavidine marquée à la PAL est rajoutée et vient se fixer sur la biotine. L'ajout de substrat en fin de réaction permet le développement d'un précipité coloré visualisé par une bande (Fig.11).

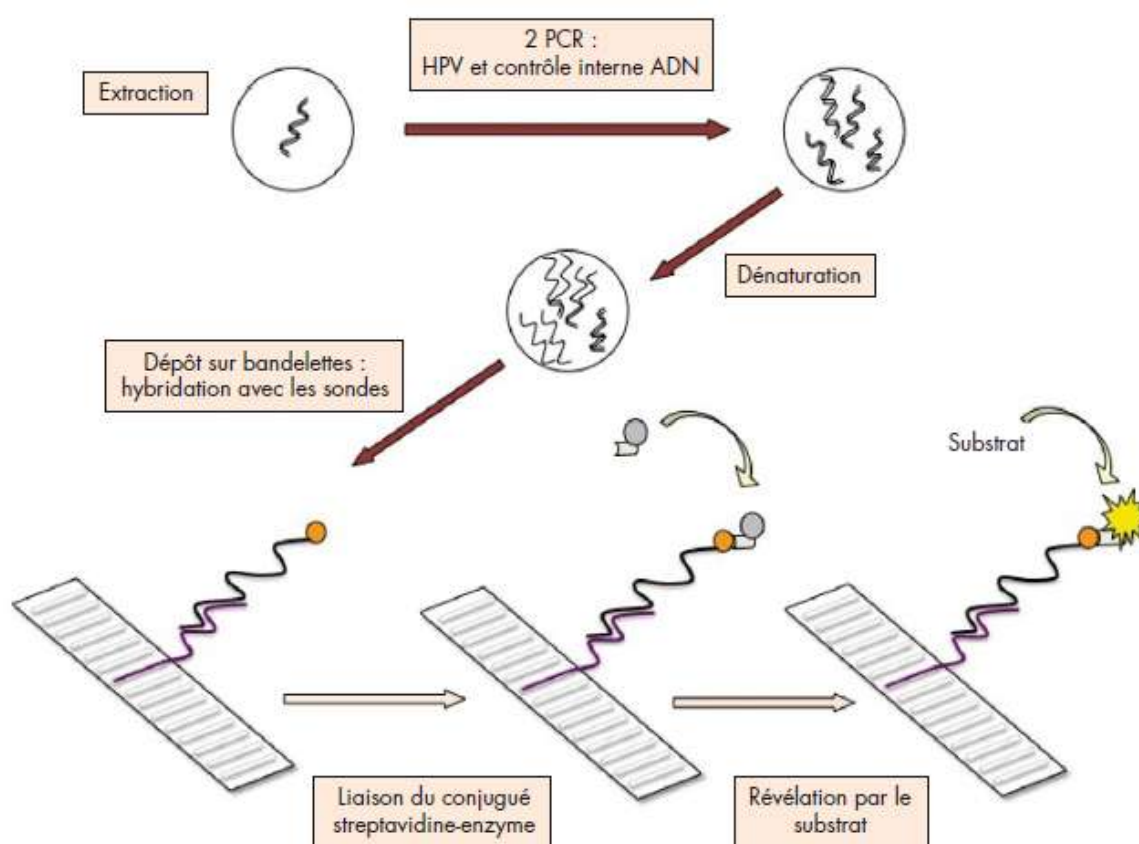


Figure 11 : Principe de génotypage par hybridation inverse sur bandelettes (16)

Les tests INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*® (Innogenetics)(Fig.12), Linear Array® HPV Genotyping test® (Roche Diagnostics) et Digene HPV Genotyping RH Test® (Qiagen) utilisent cette technologie.

Le premier permet la détection de 28 génotypes d'HPV dont 15 à haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 3 potentiellement à haut risque (26, 53, 66), 7 à bas risque (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) et 3 types non classés (69, 71, 74).

La région amplifiée pour ce test est un fragment de 65 pb du gène codant L1 (amorces SPF10). Le gène HLA-DPB1 sert de contrôle interne. Les étapes d'hybridation et de lecture peuvent être automatisées et le fabricant évalue la sensibilité de son test à 97% et sa spécificité à 90,5%.

Un nouveau kit va être commercialisé d'ici fin 2013 : INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* II®. Ce dernier comporte un nouveau jeu de sondes SPF10 permettant la détection d'un plus large panel de génotypes et réduisant le risque de détection de génotypes non typables par rapport à l'INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*®.

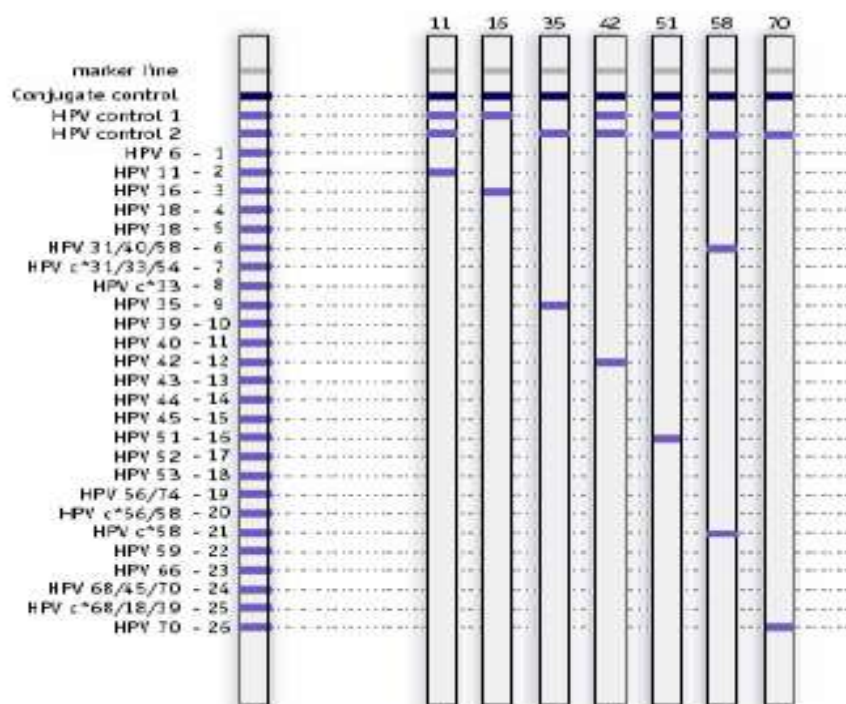


Figure 12 : Bandelette du kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Innogenetics)

Le test Linear Array® HPV Genotyping test® (Roche Diagnostics) permet le génotypage du ou des HPV détecté(s) suite à un test de dépistage Amplicor HPV (Roche Diagnostics). La région amplifiée est un fragment de 450 pb de L1 (amorces PGMY09/PGMY11).

Ce test permet la détection de 37 types d'HPV dont 13 types d'HPV à haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) et 24 types à bas risque (6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP108) et le contrôle interne utilisé est la β -globine.

Pour le test Digene HPV Genotyping RH Test® (Qiagen), le gène L1 est amplifié grâce aux amorces GP5+/GP6+. Ce test permet de génotyper 13 HPV HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) et 5 HPV potentiellement oncogènes (26, 53, 66, 73, 82).

2.7.2.3 Génotypage par puce à ADN

Le principe de cette technologie ressemble à celui de l'hybridation inverse sur bandelettes mais les sondes spécifiques sont fixées sur des supports différents. Celles-ci sont fixées sous forme de spots sur

divers supports (lame en verre ou en plastique, fond de tube tronqué) de tailles différentes (macro- ou microarrays). Les amorces utilisées pour l'amplification peuvent être biotinylées, la révélation se fait alors par colorimétrie, ou fluorescentes, dans ce cas, la révélation se fait par fluorimétrie. Cette étape de révélation est automatisée.

Le laboratoire Greiner Bio-One commercialise un kit utilisant cette technique de biologie moléculaire permettant un génotypage rapide : le test PapilloCheck®. Dans ce test, c'est la région E1 qui est amplifiée grâce à des amorces fluorescentes.

Ce kit permet le génotypage simultané de 24 génotypes de papillomavirus ano-génitaux : 14 à haut risque (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), 4 HPV potentiellement à haut risque (53, 70, 73, 82) et 6 à bas risque (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44).

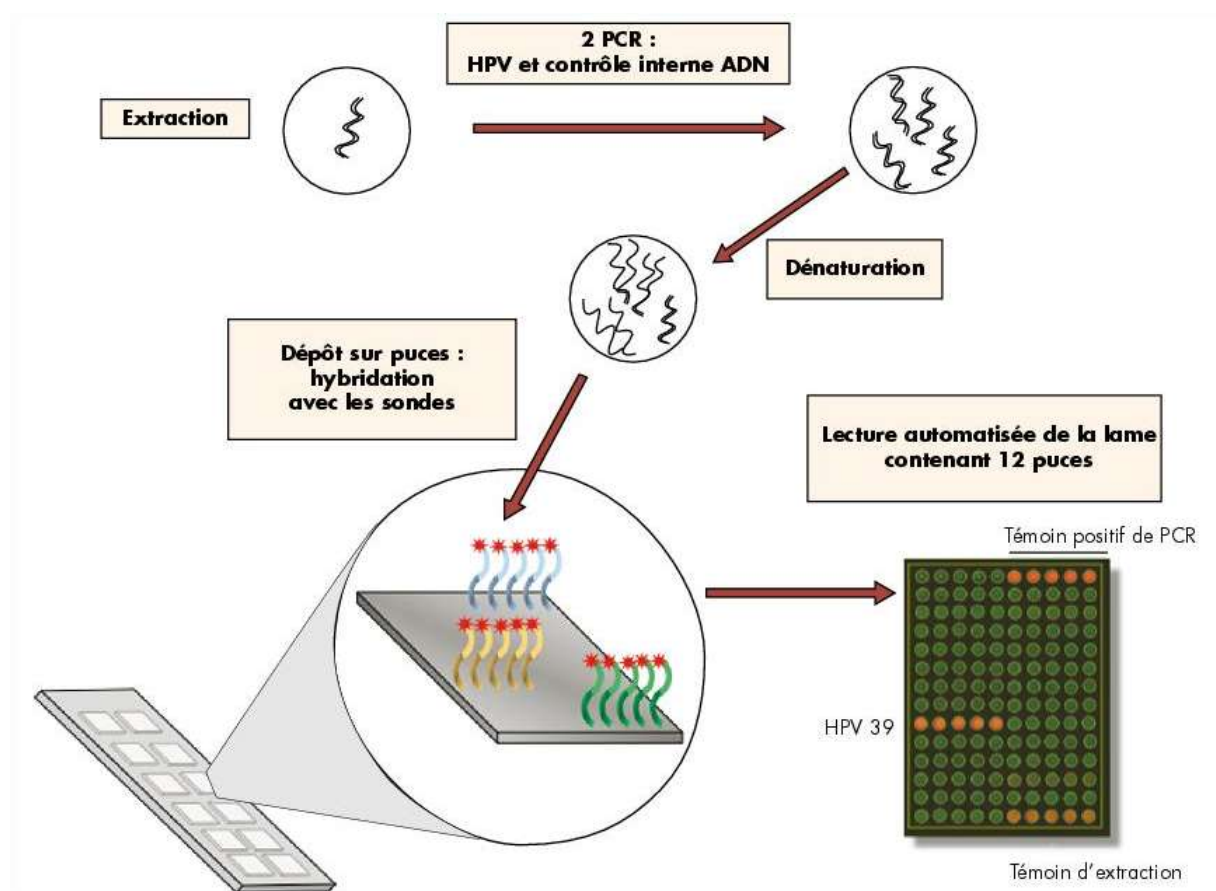


Figure 13 : Principe de génotypage par hybridation inverse sur puces à ADN (16)

Genomica commercialise également un test basé sur cette technologie : le test CLART HPV2®. Le gène L1 est amplifié grâce à des amorces biotinylées et l'hybridation se fait sur fond de tube tronqué : une puce est placée au fond du tube.

Ce kit permet le génotypage de 35 HPV dont 20 HPV HR et potentiellement à haut risque (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 85) et 15 HPV BR (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84, 89).

2.7.2.4 Génométypage par technologie d'array en suspension : Luminex®

Il s'agit d'une technique utilisant la cytométrie de flux. Des sondes spécifiques de chaque génotype sont fixées sur des microbilles de polystyrène elles-mêmes marquées par un fluorophore spécifique pour chaque type. Les amplicons obtenus par PCR sont marqués par un autre fluorophore. Deux lasers permettent ensuite de détecter les amplicons par cytométrie de flux.

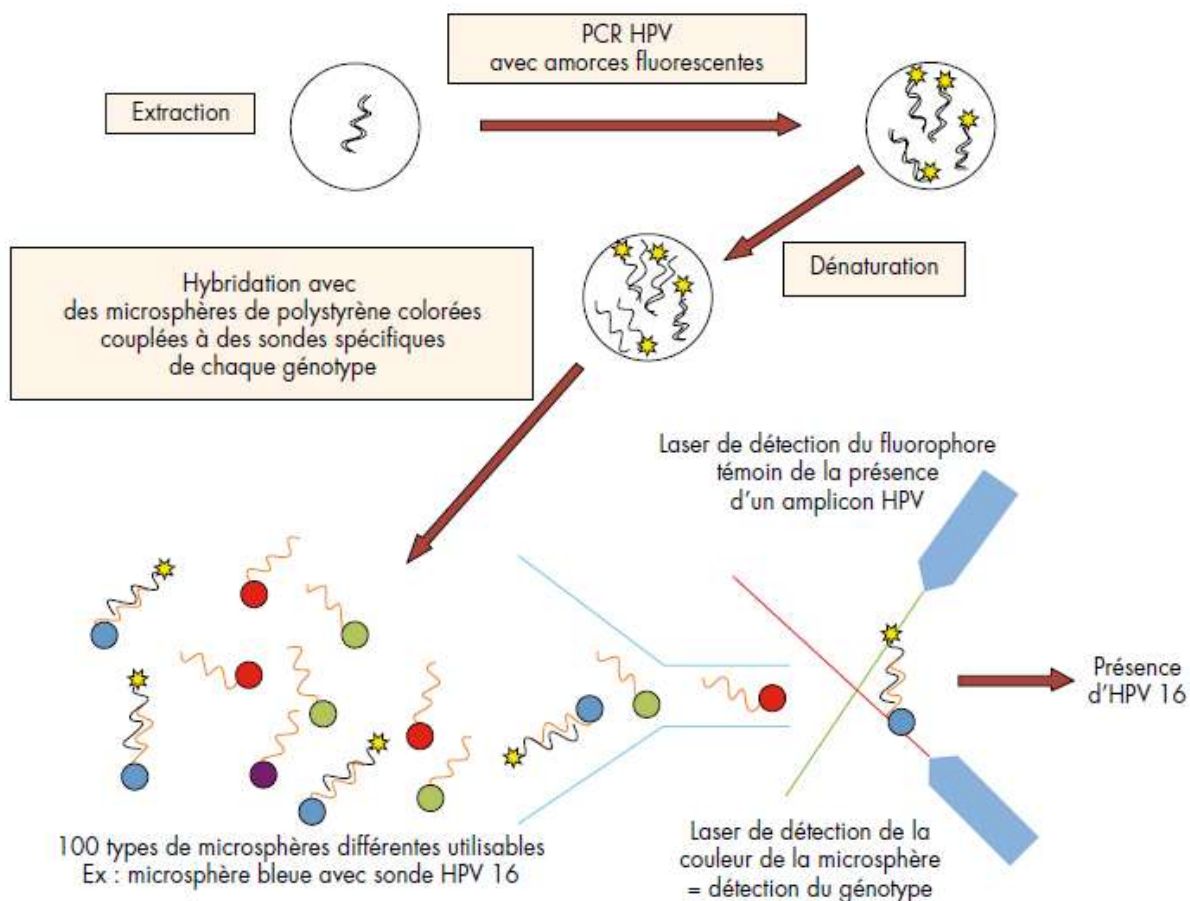


Figure 14 : Principe du génotypage par technique Luminex® (16)

Qiagen commercialise un test utilisant cette technologie : Digene HPV Genotyping LQ Test®. Le gène L1 est amplifié grâce aux amorces GP5+/GP6+.

Ce kit permet la détection de 13 HPV HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) et 5 HPV potentiellement à haut risque (26, 53, 66, 73, 82). Ce test permet d'analyser 96 échantillons en une heure.

2.7.2.5 Génométypage par capture d'hybrides

Le test Digene HPV Genotyping PS Test® (Qiagen) permet de génotyper les HPV 16, 18 et 45 grâce à trois sondes différentes à partir des échantillons préalablement détectés HPV positifs avec le test de dépistage HC2. Ce test a une sensibilité analytique comparable à celle du test HC2.

2.7.3 Techniques combinées : dépistage + génotypage 16/18

Certaines techniques permettent de dépister un panel d'HPV HR ($\pm$ BR) et de génotyper les HPV 16 et 18 simultanément, ces derniers étant les plus fréquemment impliqués dans le cancer du col de l'utérus. Ces tests permettent de surcroît de déceler les infections multiples HPV 16 + 18 ou HPV 16/18 + autre HPV HR.

Seegene commercialise le test Seeplex HPV4 ACE Screening® utilisant cette technologie. Dans un premier temps, l'amplification est réalisée grâce à une PCR très spécifique utilisant des amorces de spécificité augmentée (PCR DPO). La détection se fait ensuite par électrophorèse sur gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire automatisée.

Cette technique permet la détection et le génotypage des HPV 16 et 18 ainsi que la détection de 16 autres types d'HPV HR ou potentiellement HR sans distinction de type (26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82) et de 2 types d'HPV BR (6 et 11).

Abbott commercialise également un test combiné : le test Abbott Real Time High Risk HPV® qui utilise une technique de PCR en temps réel qualitative. Ce test, permet le génotypage des HPV 16, 18 et la détection de 12 autres HPV HR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68) simultanément grâce à trois sondes marquées par des fluorophores différents : une sonde spécifique d'HPV 16, une spécifique d'HPV 18 et une spécifique du panel des 12 autres HPV HR. La séquence cible du virus est un fragment d'environ 150 pb de la région L1.

Ce test est entièrement automatisé et est donc adapté aux grandes séries avec un délai de rendu des résultats rapide (environ 4h pour une série de 48 échantillons). Les performances cliniques de cette technique sont semblables au test HC2 et la sensibilité de détection des CIN3 et des cancers est supérieure à 98%.

Roche commercialise également un kit de PCR en temps réel entièrement automatisée : Cobas 4800 HPV test. Ce test détecte les mêmes génotypes que la technique Abbott et permet également le génotypage des HPV 16 et 18.

2.7.4 Détection des ARNm des protéines E6 et E7

Le diagnostic d'infection génitale à HPV peut également se faire par recherche d'ARNm viral. Ce test est basé sur la détection, après amplification, des ARNm des oncoprotéines E6 et E7 des HPV à haut risque oncogène dans les cellules humaines. Leur présence confirme l'expression des protéines oncogènes dans les cellules. Ces transcrits sont donc des marqueurs prédictifs de l'activité oncogénique des HPV et l'on peut ainsi identifier les femmes à risque de développer des lésions cancéreuses. D'après différentes études, ces tests présenteraient une VPP et une spécificité supérieures aux tests ADN (17).

Le laboratoire Biomérieux commercialise le test NucliSENS EasyQ HPV® utilisant cette technologie. Les ARNm des protéines E6 et E7 sont d'abord extraits puis amplifiés par NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), technologie permettant l'amplification des ARN à température constante grâce à trois enzymes : une transcriptase inverse, une ARN polymérase et une RNase. La détection des ARNm est ensuite réalisée en temps réel à l'aide de sondes fluorescentes.

Ce kit permet la détection et le typage des HPV 16, 18, 31, 33 et 45. La qualité d'extraction et de conservation des ARN est vérifiée grâce à un contrôle interne ciblant l'ARN humain ubiquitaire U1A.

Gen-Probe commercialise un test permettant la détection des ARNm E6/E7 de 14 types d'HPV HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) : le test APTIMA HPV Assay®. L'amplification repose la technologie TMA (Transcription Mediated Amplification) dont le principe est proche du NASBA puisqu'il repose également sur une amplification isotherme mais avec seulement deux enzymes : la transcriptase inverse et l'ARN polymérase T7. Les amplicons sont ensuite détectés grâce à des sondes chimioluminescentes.

2.8 Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

En 2002, au niveau mondial, le cancer du col de l'utérus était le 2^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme, avec d'importantes différences géographiques (18). Aujourd'hui, en France, il est placé au 12^{ème} rang des cancers de la femme en terme de fréquence et au 13^{ème} rang en terme de mortalité (19).

On note une incidence croissante des cancers du col de l'utérus chez la femme âgée de 20 ans jusqu'à environ 40 ans, puis, cette incidence diminue jusqu'à 50 ans et stagne au-delà. L'âge médian au moment du diagnostic est de 51 ans (20)(Fig.15).

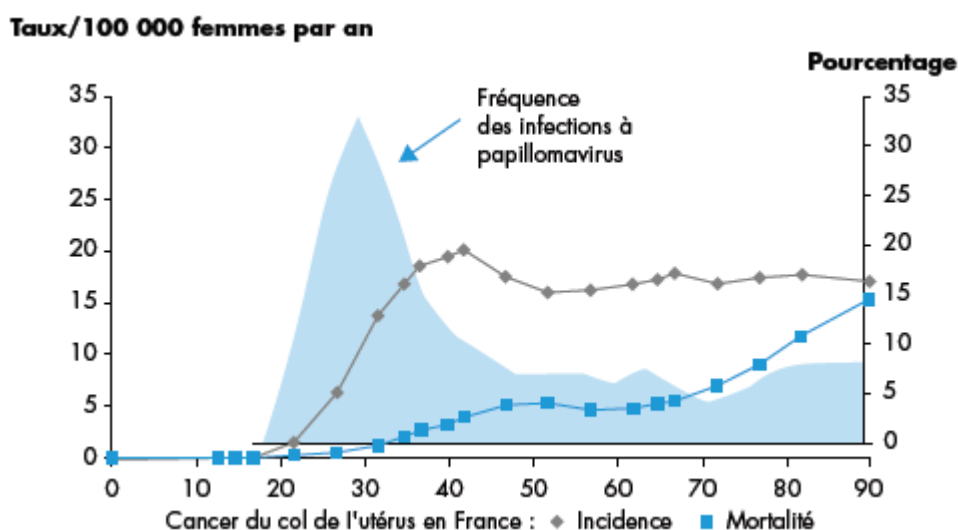


Figure 15 : Épidémiologie de l'infection par les HPV génitaux chez la femme en fonction de l'âge (3)

La clairance spontanée du virus dans la majorité des cas ainsi que la lente évolution des lésions précancéreuses explique que malgré la forte prévalence de l'infection à HPV chez la femme jeune, les cancers du col sont pratiquement inexistants et les CIN plutôt rares dans cette population. Ainsi, bien que la prévalence de l'infection à HPV soit de 30 à 35 % chez les femmes de 20-25 ans, les atypies koilocytaires sont observées chez 4% d'entre elles (21).

On observe chaque année une diminution de l'incidence en partie expliquée par le développement du dépistage individuel par frottis cervico-utérin. D'autre part, la mortalité décroît également d'année en année et ce, grâce à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique mais aussi du dépistage qui permet la détection de lésions précancéreuses à un stade précoce (18).

2.9 Prévention du cancer du col utérin

La prévention du cancer du col de l'utérus comprend : le dépistage, qui permet de détecter les lésions précancéreuses et cancéreuses existantes, et la vaccination, qui vise à éviter l'infection par les virus HPV 16 et 18 à l'origine de ce cancer.

2.9.1 Dépistage

Le cancer du col de l'utérus est un cancer de très bon pronostic lorsqu'il est détecté et traité à un stade précoce. En effet, le taux de survie relative à 5 ans est alors de 91,5 % d'où la nécessité de détecter le plus précocement possible des lésions précancéreuses ou cancéreuses du col (18).

Comme vu précédemment, la HAS recommande la réalisation d'un FCU tous les trois ans après deux frottis normaux espacés d'un an, chez toutes les femmes de 25 à 65 ans. Ce frottis peut être pratiqué par un gynécologue, un médecin généraliste ou, depuis 2009, par une sage-femme. Il consiste à prélever des cellules cervicales à l'aide d'une brosse ou d'une spatule. Le prélèvement est ensuite soit étalé directement sur une lame de verre (frottis conventionnel) soit placé dans un flacon rempli d'un liquide de conservation cellulaire (frottis en couche mince) à partir duquel des étalements sur lame de verre seront réalisés. Dans les deux cas, les lames sont fixées, colorées puis analysées par un anatomo-cytopathologiste.

L'interprétation du FCU se base actuellement sur le système de Bethesda 2001 (Fig.16).

1. QUALITE DU PRELEVEMENT ☐ Satisfaisant pour évaluation ☐ Non satisfaisant pour évaluation (préciser la raison)
2. INTERPRETATION /RESULTAT ☐ Absence de lésion malpighienne intra-épithéliale ou de signe de malignité (frottis normaux, modifications non néoplasiques) (s'il y a lieu, préciser) ☐ Anomalies des cellules malpighiennes ☐ ASC-US ☐ ASC-H ☐ LSIL ☐ HSIL. Le cas échéant : présence d'éléments faisant suspecter une invasion ☐ Carcinome épidermoïde ☐ Anomalies des cellules glandulaires ☐ AGC endocervicales, endométriales ou sans autre précision ☐ AGC en faveur d'une néoplasie : endocervicales ou sans autre précision ☐ Adénocarcinome endocervical in situ ☐ Adénocarcinome : endocol, endométrial, extra-utérin ou sans autre précision ☐ Autres ☐ Cellules endométriales chez une femme âgée de 40 ans ou plus.
3. (PRECISIONS, NOTES ET RECOMMANDATIONS) ☐ Préciser si l'examen est automatisé et si la recherche des HPV a été réalisée. ☐ Notes et recommandations concises, formulées en termes de suggestions, et si possible accompagnées de références.

Figure 16 : Mentions à faire figurer sur un compte-rendu de FCU selon le système de Bethesda 2001

En 2002, l'ANAES (aujourd'hui HAS) a publié des recommandations sur la conduite à tenir en cas de frottis anormaux :

- En cas de frottis ASC-H (CIN 2, CIN 3 dans 40 % des cas, exceptionnellement cancer invasif), une colposcopie est réalisée d'emblée (Fig.17).
- En cas de frottis ASC-US (CIN 2, CIN 3 dans 5 à 10 % des cas, exceptionnellement cancer invasif), plusieurs alternatives sont possibles : soit une colposcopie d'emblée, soit un frottis de contrôle 6 mois plus tard, ou bien, une recherche d'HPV à haut risque oncogène (Fig.17).
- En cas de LSIL, deux options sont envisagées : soit une cytologie de contrôle à 4-6 mois, soit une colposcopie (Fig.18).
- En cas de HSIL, une colposcopie est réalisée d'emblée (Fig.19).

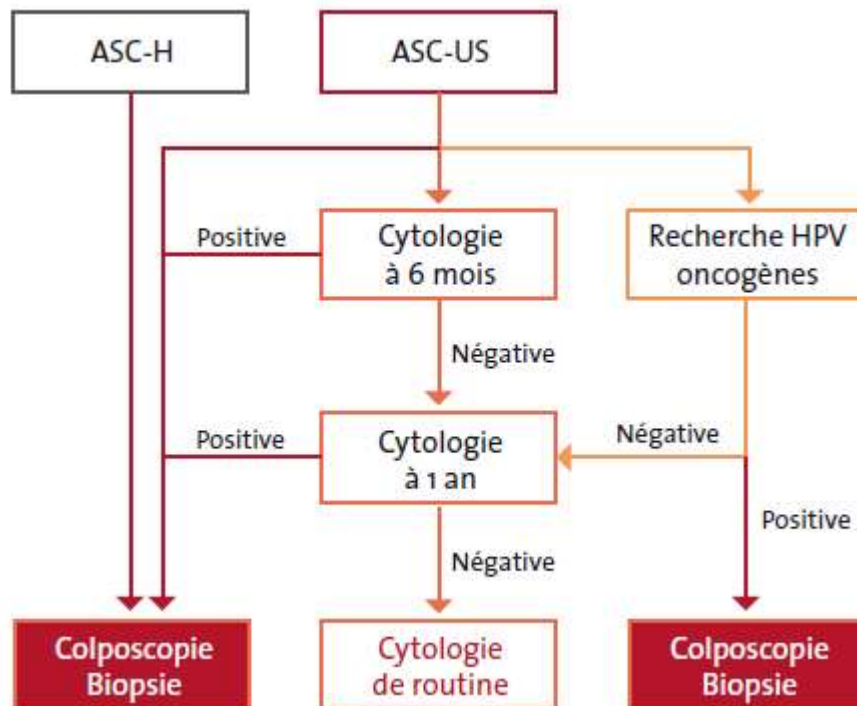


Figure 17 : Conduite à tenir devant un frottis ASC-US ou ASC-H (22)

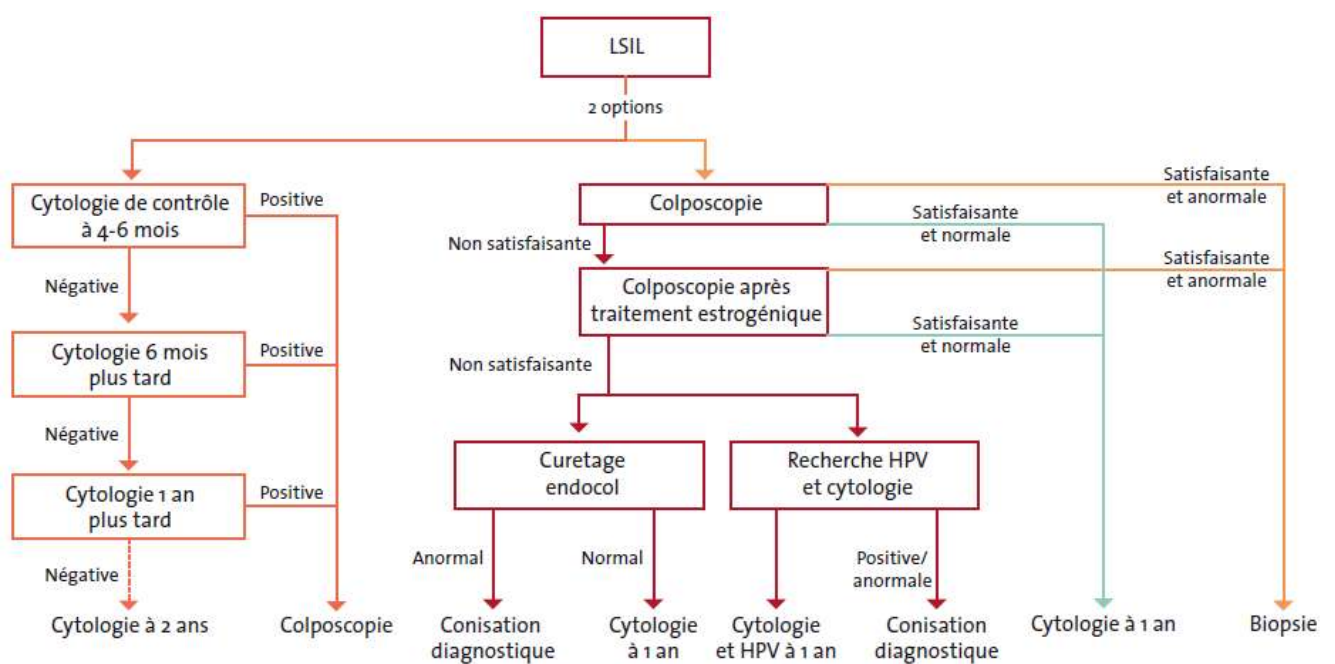


Figure 18 : Conduite à tenir devant un frottis LSIL (22)

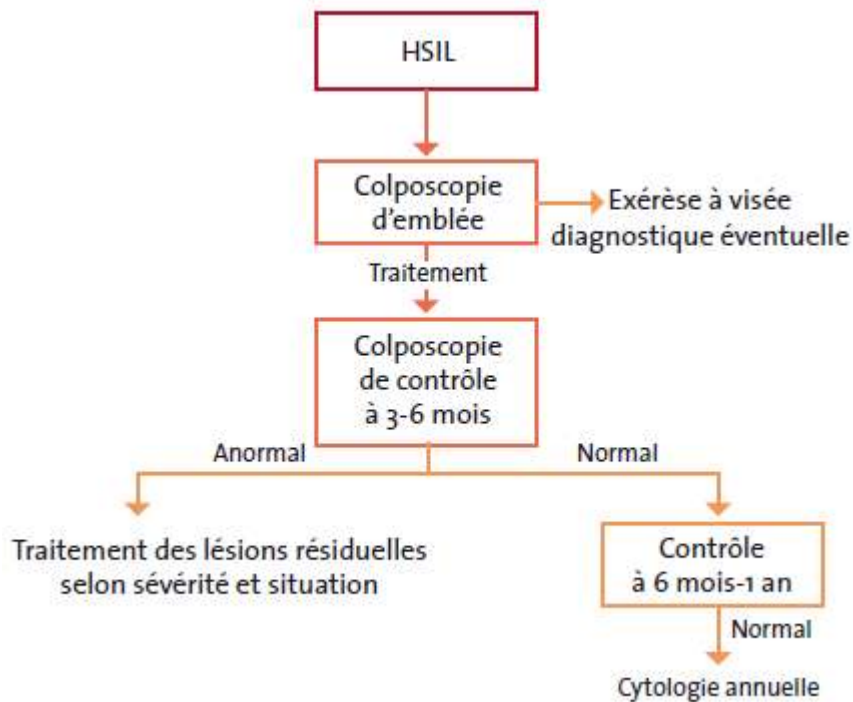


Figure 19 : Conduite à tenir devant un frottis HSIL (22)

Aujourd'hui, il n'existe pas de programme national de dépistage intégré du cancer du col de l'utérus. Il s'agit donc d'un dépistage individuel spontané. Le taux global de couverture de ce dépistage chez les femmes de 25 à 65 ans est estimé à environ 57% sur les dix dernières années mais il existe des disparités en fonction des catégories d'âge et du contexte socio-économique. Ainsi, les femmes de plus de 55 ans et celles disposant d'un faible revenu, bénéficiant de la CMU complémentaire, ou ayant un niveau d'études inférieur au baccalauréat, sont moins souvent dépistées (23).

A ce jour, 13 départements ont mis en place un programme de dépistage intégré afin d'augmenter le taux de couverture du dépistage (Bas-Rhin, Haut-Rhin, Isère, Martinique, Allier, Cantal, Haute-Loire, Puy-de-Dôme, Cher, Indre-et-Loire, Maine-et-Loire, La Réunion et Val-de-Marne).

2.9.2 Vaccination préventive contre les HPV

Le fait que le cancer du col de l'utérus soit corrélé dans 99% des cas à la présence d'un HPV oncogène a rendu envisageable la réalisation d'un vaccin anti-HPV. Ce vaccin a pour but de prévenir les infections à HPV en général mais aussi et surtout, le cancer du col.

Les HPV-HR 16 et 18 sont responsables d'environ 70% des cancers du col et les génotypes 6 et 11 sont impliqués dans plus de 85% des condylomes ano-génitaux.

Ces chiffres justifient le choix des valences contenues dans les deux vaccins prophylactiques actuellement sur le marché en France (Tableau 1) qui sont :

- Le Cervarix® (GSK): vaccin papillomavirus bivalent contenant les valences 16 et 18
- Le Gardasil® (Sanofi-Pasteur-MSD) : vaccin papillomavirus quadrivalent contenant les valences 16, 18 mais aussi 6 et 11

Bien qu'ils ne couvrent pas la totalité des génotypes impliqués dans les lésions génitales, ces deux vaccins permettraient néanmoins d'en prévenir la majorité. Le dépistage par FCU reste donc indispensable car environ 30% des HPV oncogènes ne sont pas couverts par ces vaccins.

	Gardasil®	Cervarix®
HPV cibles	16, 18, 6, 11	16, 18
Production	levures (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	baculovirus
Adjuvant	hydroxyde d'aluminium	ASO4 (hydroxyde d'aluminium + MPL)
Schéma d'administration	trois injections IM sur six mois (0-2-6)	trois injections IM sur six mois (0-1-6)

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des deux vaccins anti-HPV actuellement disponibles en France

2.9.2.1 Principe du vaccin

L'HPV étant très difficilement cultivable *in vitro*, l'utilisation de virus atténués ou inactivés dans le cadre d'un vaccin n'était pas envisageable. Le vaccin prophylactique contre le papillomavirus repose donc sur un autre principe, celui des pseudoparticules virales (VLP ou Virus-Like Pseudoparticles).

La protéine majeure de capsid L1 est produite par génie génétique après introduction du gène L1 dans des levures ou des baculovirus. Lorsqu'elle est produite en grande quantité, cette protéine est capable de s'autoassembler en capsomères, constitués de 5 protéines L1 et ces capsomères s'assemblent à leur tour pour former des pseudoparticules virales (Fig.19). La morphologie de ces VLP est très proche de celle du virus. Elles sont ainsi capables d'induire la synthèse de hauts titres d'anticorps neutralisants. Ces anticorps sont dirigés contre des épitopes conformationnels de la protéine virale L1.

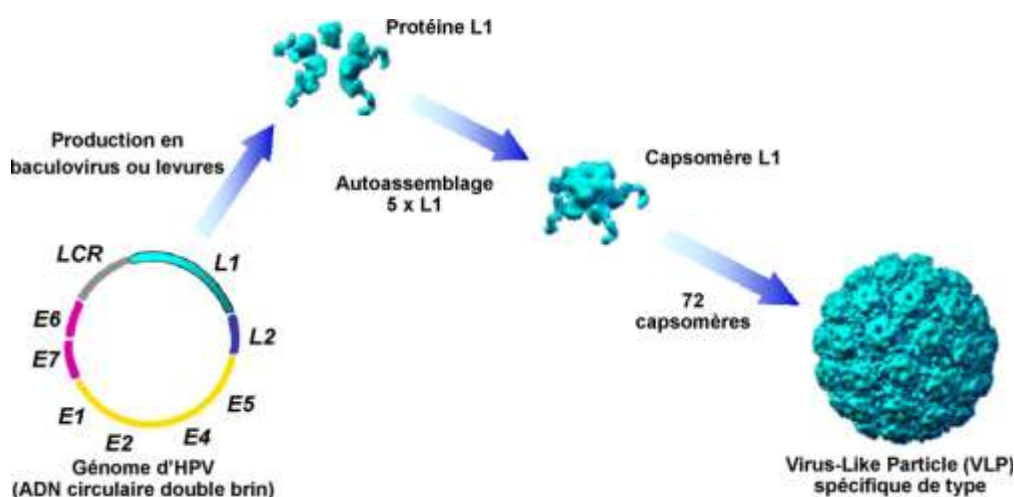


Figure 20 : Synthèse des VLP

Des études ont montré que les taux d'anticorps sériques induits par les VLP étaient au moins aussi importants que ceux induits suite à une infection naturelle (24,25).

Une partie des IgG produites atteignent la muqueuse génitale par transsudation à partir du plasma. Des titres élevés d'anticorps sériques sont donc nécessaires afin d'assurer la protection de la muqueuse génitale.

L'intensité de la réponse humorale varie cependant en fonction de la valence et de l'âge des patients vaccinés. Ainsi, on obtient une meilleure immunogénicité vis-à-vis de l'HPV 16. La réponse immunitaire est également meilleure chez les 10-15 ans que les femmes de 16 à 23 ans (26).

Un grand avantage de ce type de vaccins est qu'il n'y a aucun risque de transformation tumorale puisque les particules injectées ne contiennent pas d'ADN viral. En revanche, ces VLP ne confèrent pas une immunité croisée entre les différents génotypes d'HPV. Il faut donc introduire dans le vaccin autant de valences que de génotypes contre lesquels on veut protéger le patient (27).

2.9.2.2 Recommandations vaccinales

La vaccination étant d'autant plus efficace que les jeunes filles n'ont pas encore été exposées au risque d'infection par le HPV, le Haut Conseil de la santé publique a récemment révisé ses recommandations concernant la vaccination contre le HPV. La vaccination est maintenant recommandée pour toutes les jeunes filles de 11 à 14 ans. Un rattrapage est recommandé pour les jeunes filles et jeunes femmes entre 15 et 19 ans révolus (28).

3 Contexte et description de l'étude

Les pistes de recherche pour améliorer le dépistage de cancer du col doivent s'orienter sur des méthodes qui permettent non seulement d'augmenter la couverture actuelle du dépistage mais aussi de diminuer et de comprendre les inégalités d'accès et de recours au dépistage. Deux pistes sont actuellement en cours de réflexion : l'organisation du dépistage du cancer du col et la place de l'autoprélèvement.

Le dépistage intégré a été mis en place dans 13 départements français, dont le Maine et Loire. Selon une évaluation de l'InVS, celui-ci a permis d'améliorer le dépistage par le frottis dans les quatre départements pilotes (Isère, Martinique, Bas-Rhin, Haut-Rhin).

Dans le Maine-et-Loire, le dépistage intégré du cancer du col de l'utérus a commencé en janvier 2010. Il est assuré par Cap Santé 49 qui est une structure départementale de gestion chargée de la mise en œuvre et de l'évaluation des dépistages organisés des cancers du sein, du col de l'utérus et colorectal. Leur stratégie est d'envoyer un courrier d'incitation à la réalisation d'un frottis aux femmes âgées de 25 à 65 ans qui n'auraient pas réalisé cet examen depuis plus de 3 ans. S'il n'est toujours pas fait au bout de 9 mois, une relance est envoyée.

Concernant l'autoprélèvement, plusieurs études ont comparé l'adhésion des femmes aux méthodes de dépistage par frottis ou par autoprélèvement (écouvillonnage, tampon vaginal, lavage vaginal...) : elles semblent montrer une meilleure compliance des femmes à l'autoprélèvement notamment chez celles qui refusent le frottis (29,30).

Les urines pourraient représenter un prélèvement de choix de par la facilité de leur recueil. Il semble donc intéressant de pouvoir proposer un test HPV dans les urines dans la mesure où la détection du HPV dans cette matrice soit satisfaisante.

C'est dans ce contexte que le laboratoire de virologie du CHU d'Angers, en partenariat avec Cap Santé 49, La Ligue Départementale contre le Cancer et La Poste, a mis en place une étude d'acceptabilité d'un test HPV urinaire chez les femmes ne souhaitant pas bénéficier du dépistage classique par le frottis cervico-utérin comme examen d'orientation dans le dépistage intégré du cancer du col de l'utérus dans le Maine-et-Loire.

Les objectifs principaux de ce projet étaient :

- De mesurer l'adhésion des femmes au test HPV urinaire par rapport au frottis cervico-utérin
- De proposer une alternative au dépistage classique par frottis dans le cadre du dépistage intégré du cancer du col utérin mis en place dans le département du Maine et Loire
- De connaître les freins à la réalisation d'un frottis grâce à un questionnaire rempli par les femmes qui refusent le frottis.

Les objectifs secondaires étaient :

- D'évaluer l'apport du test HPV urinaire en complément du dépistage classique par le frottis quand ce dernier est en échec (non-satisfaisant ou irréalisable)
- De connaître la prévalence du portage urinaire du papillomavirus dans une population ciblée.

4 Matériels et méthodes

4.1 Population étudiée

La liste des femmes ciblées a été établie par Cap santé 49 auprès des 26 caisses d'assurance maladie : femmes de 25 à 65 ans du Maine-et-Loire, n'ayant pas eu de frottis depuis plus de 3 ans (sur la base du remboursement P55 et de la date des résultats de frottis par les médecins pathologistes).

Sur la base d'un taux de participation au frottis de 63% en Maine et Loire (2005-2006-2007 : données des caisses d'assurance maladie), 89 727 femmes n'avaient pas réalisé de frottis sur la période 2005-2007 dans notre département (données URCAM : nombre de femmes couvertes par le régime général, la MSA, le régime des professions indépendantes).

Toutes les femmes suivies dans les centres hospitaliers ou les centres de planification familiale ont toutes été invitées par manque d'information sur les fichiers d'Assurance Maladie.

Les patientes ayant un suivi régulier par frottis, les patientes ayant subi une hystérectomie totale, les patientes non affiliées à une caisse d'assurance maladie et les patientes ne souhaitant pas participer à l'étude ont été exclues de l'étude.

4.2 Modalités de recrutement

5000 femmes ne souhaitant pas bénéficier d'un frottis après deux courriers d'incitation au frottis espacés de 9 mois ont reçu une note d'information sur la possibilité de faire un prélèvement urinaire pour évaluer une nouvelle méthode de dépistage du cancer du col (annexe 1). Cette note était accompagnée d'un questionnaire pour préciser les motifs de refus du frottis (annexe 2), d'un consentement à signer par la patiente en cas de réalisation du test HPV urinaire (annexe 3) et d'un kit de prélèvement urinaire avec le mode opératoire pour la réalisation du prélèvement à domicile (annexe 4).

Le prélèvement d'urine devait ensuite être transmis par voie postale (enveloppe Lettre Max adapté aux prélèvements biologiques et fournie dans le courrier d'envoi) au laboratoire de virologie du CHU d'Angers.

En novembre 2012, un premier envoi a été effectué à 2000 femmes âgées de 55 à 65 ans. Puis 3000 courriers ont été envoyés en janvier 2013 à des femmes de 40 à 54 ans.

4.3 Chronologie et récapitulatif du projet



Figure 21 : Chronologie du projet

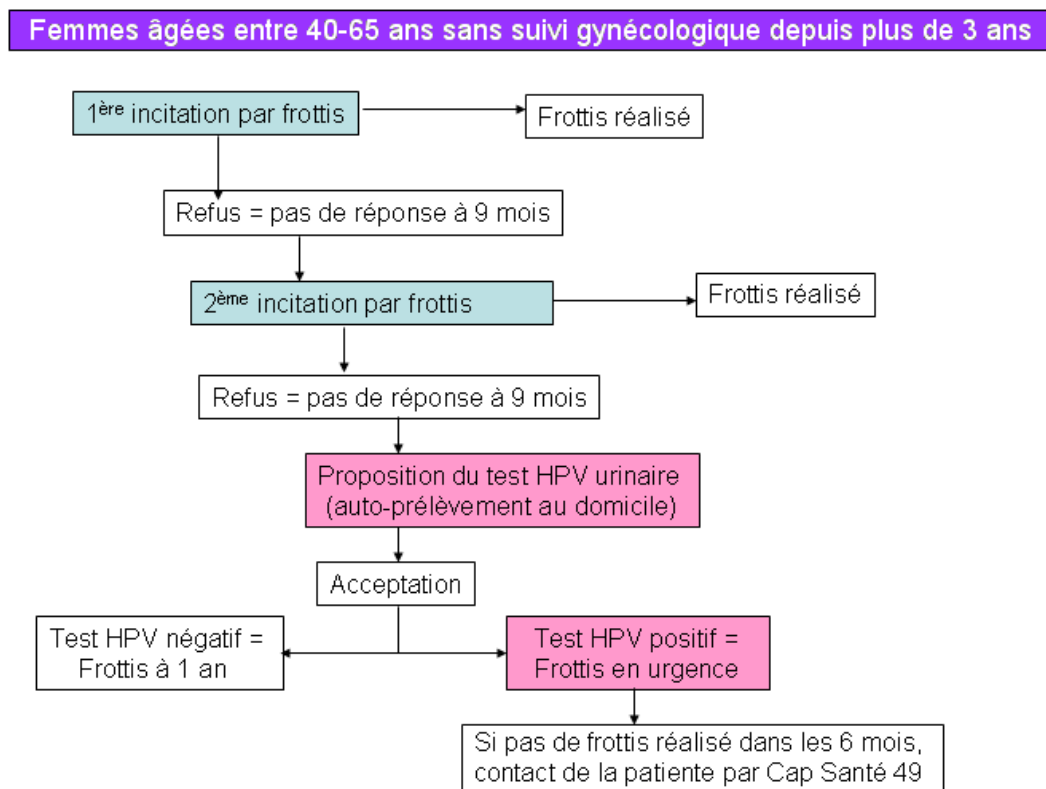


Figure 22 : Récapitulatif du projet

4.4 Méthode de détection des HPV dans les urines

Nous avons utilisé une technique de PCR temps réel (PCR TR) commercialisée par les laboratoires Abbott (Abbott Real Time High Risk HPV).

Cette technique, entièrement automatisée, est adaptée aux grandes séries d'échantillons. Elle utilise la plateforme Abbott m2000 déjà installée au laboratoire et utilisée en routine pour les PCR VHB, VHC, VIH et *Chlamydiae trachomatis*. Cette plateforme comprend le m2000sp qui réalise l'extraction génomique et le m2000rt qui amplifie la cible HPV et détecte le signal.

Cette PCR TR permet la détection des HPV des génotypes 16, 18 et de 12 autres HPV HR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68) avec un gain de temps dans le délai de rendu des résultats puisqu'il faut compter environ 4 heures pour une série de 48 échantillons.

En cas de PCR négative, un compte-rendu était adressé à la patiente, à son médecin traitant ou son gynécologue, ainsi qu'à Cap Santé 49.

En cas de PCR positive, le compte-rendu était envoyé au médecin traitant et/ou gynécologue après transmission des résultats par téléphone. La patiente était ensuite informée du résultat directement par son médecin.

4.4.1 Principe biologique de la technique

Un mélange d'amorces, composé de trois amorces sens et de deux amorces anti-sens ciblant une région L1 conservée du virus est utilisé pour amplifier les cibles de HPV. Le signal pour quatorze génotypes de HPV HR est généré à l'aide de sondes marquées par fluorescence.

La bêta-globine humaine constitue le contrôle interne. Les amplicons sont générés à l'aide d'une paire d'amorces ciblant une séquence de la bêta-globine humaine endogène et sont détectés à l'aide d'une sonde spécifique au contrôle interne. La séquence bêta-globine est détectée comme signal de contrôle interne pour évaluer la richesse des échantillons en cellules, l'extraction des échantillons ainsi que l'efficacité de l'amplification.

Les sondes pour les génotypes de HPV 16, HPV 18, autres HPV HR et pour le contrôle interne sont marquées avec un fluorophore différent permettant à leurs signaux d'être reconnus lors d'une seule réaction.

4.4.2 Traitement des échantillons

Dès leur arrivée au laboratoire, les prélèvements étaient enregistrés dans le logiciel du laboratoire (GLIMS) afin que leur soit attribué un numéro d'échantillon.

Un aliquot de 2 mL était ensuite réalisé à partir du flacon primaire. Cet aliquot étant destiné à une échantillothèque conservée à -20°C.

2,5 mL était transvasés dans un tube contenant un liquide de conservation et provenant d'un kit de recueil de cellules cervicales fourni par Abbott (Abbott Cervi-Collect Specimen Collection Kit). Le tube ainsi que le flacon primaire étaient ensuite placés à 4°C.

Les échantillons ont été passés sur l'automate par séries de 24 ou 48 avec, pour chaque série, un contrôle négatif et un contrôle positif permettant de valider la série.

4.4.3 Extraction

L'extraction génomique est réalisée sur l'automate M2000sp à partir de 400µL d'urines. Cet automate utilise la technologie des micro-billes magnétiques afin de capturer les acides nucléiques. Les particules sont ensuite lavées afin d'éliminer tout composant non lié de l'échantillon, puis les acides nucléiques liés sont élués.

4.4.4 Assemblage de la plaque de réaction (plaque de PCR)

Le *m2000sp* mélange les différents réactifs d'amplification (oligonucléotides, Taq polymérase, réactif d'activation) pour donner le master mix. Le mix d'amplification, ainsi que des fractions aliquotes d'échantillons d'acide nucléique sont alors distribués par l'automate dans les puits d'une plaque de réaction optique à 96 puits. Après avoir été scellée manuellement, la plaque est transférée sur le *m2000rt* qui procède à l'amplification.

4.4.5 Amplification

Au cours de la réaction d'amplification, l'ADN cible est amplifié par l'enzyme AmpliTaq Gold polymérase en présence de dNTPs et de magnésium. L'AmpliTaq Gold polymérase est une enzyme thermophile modifiée au niveau de son site actif par une molécule qui la rend inactive. Lorsque l'enzyme est chauffée avant le début de la PCR, la molécule inhibitrice est séparée de l'enzyme, lui permettant ainsi de redevenir active. De cette façon, l'enzyme n'est active qu'à des températures auxquelles des interactions ADN-ADN spécifiques sont possibles. Ceci permet de réduire considérablement les artéfacts de PCR non spécifiques, tels que les dimères d'amorces.

La Taq polymérase est d'abord activée à 92°C pendant 10 minutes. Pendant chaque cycle de thermocyclage suivant, il y a d'abord une température élevée permet de séparer les brins de l'ADN double brin, suivie d'une température basse où les amorces s'hybrident aux cibles respectives et s'étendent pour créer des produits ADN double brin. L'amplification exponentielle des produits est accomplie grâce au cyclage répété entre températures élevées et basses, entraînant l'amplification au milliardième ou plus des séquences cibles.

Les cibles HPV et contrôle interne sont amplifiées simultanément au cours de la même réaction.

La séquence du virus ciblée se situe dans la région L1 conservée des génomes du HPV. Un mélange d'amorces est conçu pour s'hybrider avec les régions de consensus des génotypes HPV d'environ 150 bases. La séquence cible du contrôle interne est une région de 136 bases dans le gène bêta-globine humaine endogène.

4.4.6 Détection

Pendant les 38 derniers cycles de l'amplification, lors d'une étape de lecture supplémentaire, la température est encore abaissée de manière à permettre la détection par fluorescence des produits amplifiés au cours de l'hybridation des sondes HPV et de contrôle interne avec leurs cibles.

La fluorescence émise par les sondes fluorogéniques utilise le processus de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET : fluorescence resonance energy transfer) entre une molécule électroniquement excitée (Reporter) et une molécule voisine (Quencher). Les sondes HPV et du contrôle interne sont des oligonucléotides ADN simple brin modifiées, une fraction fluorescente (reporter) étant liée de manière covalente à une extrémité de la sonde et une fraction désactivée (quencher) à l'autre extrémité. En l'absence de séquences cibles du HPV ou du contrôle interne, les sondes adoptent une série de conformations au hasard, telles que le quencher se retrouve assez près du fluorophore excité pour pouvoir absorber son énergie avant qu'une émission fluorescente ne soit possible. Lorsqu'une sonde se lie à sa séquence complémentaire dans la cible, le fluorophore et le quencher sont écartés afin de permettre l'émission fluorescente et la détection du signal par le *m2000rt*.

Les sondes pour le HPV 16, le HPV 18, les autres HPV HR et le contrôle interne sont marquées avec un fluorophore différent permettant à leurs signaux reconnaissables d'être détectés et distingués simultanément lors d'une seule réaction. Les signaux du HPV 16, 18, autres HPV HR et du contrôle interne sont détectés dans les canaux VIC (fluorochrome particulier), NED (fluorochrome particulier ABI), FAM (carboxyfluorescéine) et Cy5 (cyanine), respectivement.

4.4.7 Rendu des résultats

Trois signaux HPV correspondant aux HPV 16, 18 et autres HPV HR sont évalués pour chaque échantillon. Chaque signal est déterminé soit comme « détecté » si le nombre de cycle (NC) est inférieur à un cycle seuil déterminé, soit comme « non détecté » si le NC n'est pas généré ou qu'il est supérieur ou égal au cycle seuil de dosage. Tous les signaux détectés (16, 18, autres HPV HR) sont indiqués avec les valeurs de NC respectives.

Les résultats sont uniquement qualitatifs, la charge virale n'est pas mesurée.

4.4.8 Validation de la série

En plus du contrôle interne (béta-globine), un contrôle négatif et un contrôle positif sont nécessaires pour chaque série afin de vérifier le bon déroulement des étapes de préparation des échantillons, d'amplification et de détection. Ces contrôles, fournis par Abbott, doivent être traités avec les échantillons avant l'étape d'amplification de dosage. Le contrôle négatif est formulé avec une séquence de contrôle interne contenant de l'ADN. Le seul signal détecté pour ce contrôle doit être le signal de contrôle interne dans le canal Cy5. Le contrôle positif est formulé avec de l'ADN contenant

des séquences de HPV 16, 18, 58 et de contrôle interne. Les quatre signaux (signal VIC pour HPV 16, NED pour HPV 18, FAM pour HPV 58 et Cy5 pour le contrôle interne) doivent être détectés dans le contrôle positif.

4.5 Questionnaire sur les motifs de refus du FCU

Les femmes invitées à participer à l'étude avaient préalablement reçu deux courriers de Cap Santé les incitant à réaliser un frottis. Un questionnaire leur a donc été adressé afin qu'elles précisent les raisons de leur refus (annexe 2).

Ce questionnaire permettait de préciser : l'âge de la patiente, la connaissance ou non du cancer du col de l'utérus et de son dépistage par le FCU, si un FCU avait déjà été réalisé par la patiente, si oui, quand et par qui, si non, pour quelle(s) raison(s) (choix multiple et possibilité de commentaire libre) et enfin, le(s) motif(s) de refus des deux incitations successives de Cap Santé (choix multiple et possibilité de commentaire libre).

5 Résultats

5.1 Taux de participation

5.1.1 Premier envoi : 55-65 ans

2000 courriers ont été envoyés à 1000 femmes de 55 à 59 ans et 1000 femmes de 60 à 65 ans. Sur ces 2000 courriers, 60 ne sont pas parvenus à leur destinataire (décès, changement d'adresse...).

Sur les 1940 courriers restant, 332 réponses sont parvenues au laboratoire dont 259 avec prélèvement et 73 sans.

Courriers avec prélèvement :

Au total pour le premier envoi, nous avons reçu 259 courriers avec prélèvement d'urine, ce qui représente 13,4% des 1940 courriers de départ.

Parmi ces 259 échantillons, 45 provenaient de femmes hystérectomisées, soit 17,4% des prélèvements reçus. De plus, 8 échantillons étaient accompagnés d'un refus de participer à l'étude. Pour ces 53 prélèvements, la PCR n'a pas été réalisée.

Nous avons donc reçu 205 échantillons de femmes non hystérectomisées et acceptant de participer à l'étude, sur lesquels nous avons réalisé la PCR Abbott Real Time High Risk HPV soit 10,6% des 1940 courriers de départ (Fig.23).

Courriers sans prélèvement :

Nous avons reçu 73 réponses sans prélèvement.

La majorité de ces courriers (58) étaient envoyés par des femmes ayant subi une hystérectomie totale. Deux courriers nous sont parvenus sans questionnaire ou avec un questionnaire non rempli, il nous est donc impossible de connaître la raison pour laquelle ces patientes n'ont pas renvoyé de prélèvement. Enfin, 13 femmes ont renvoyé un courrier sans prélèvement pour un autre motif. Il s'agissait, pour 11 de ces courriers, de femmes qui avaient réalisé un FCU entre temps ou bien qui avaient déjà programmé un rendez-vous gynécologique. Pour les deux courriers restants, l'un correspondait à une patiente décédée et l'autre à un refus (Tableau 2).

55-65 ans		
	nombre	%
Hystérectomies	58	79,5
FCU réalisé entre temps ou en attente de rendez-vous	11	15,1
Questionnaire non renvoyé ou non rempli	2	2,7
Autre	2	2,7
Total	73	100

Tableau 2 : Détail des 73 réponses reçues sans prélèvement (55-65ans)

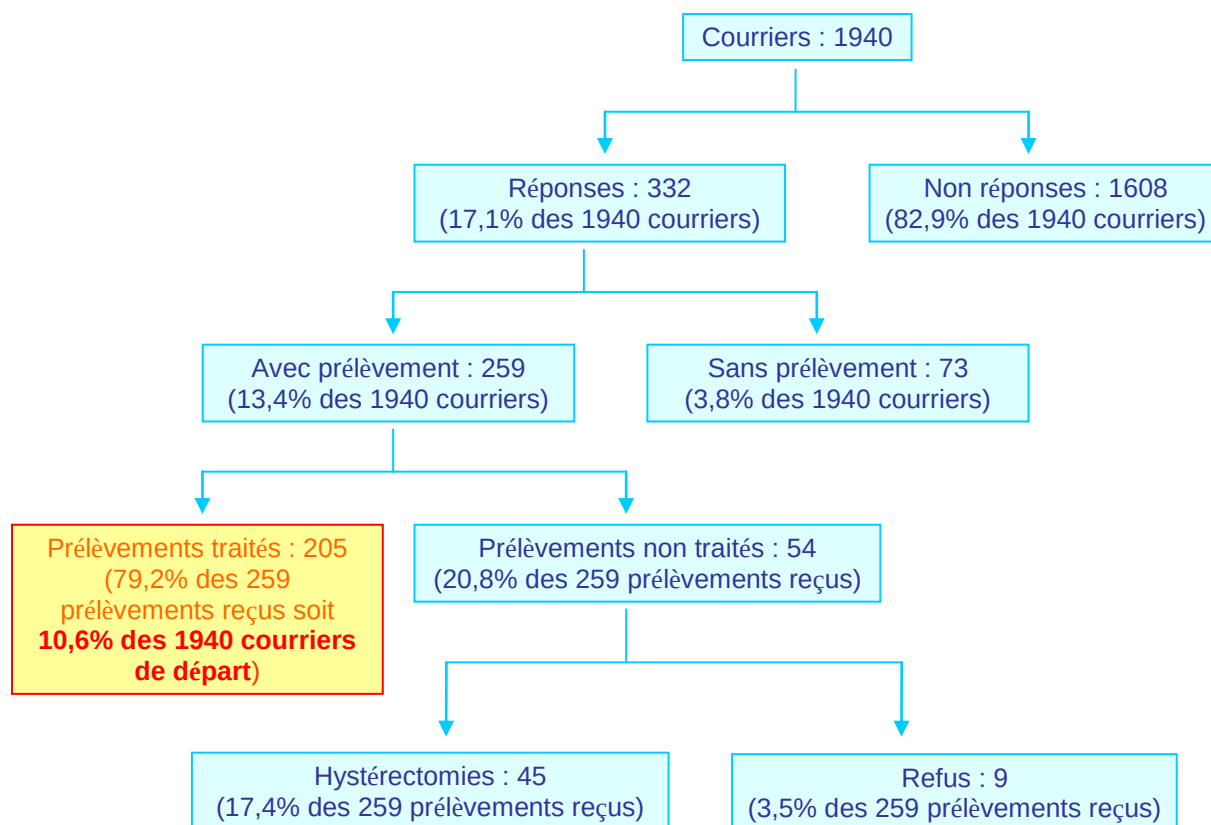


Figure 23 : Détail des réponses reçues sur les 1940 courriers de départ (55-65 ans)

5.1.2 Deuxième envoi : 40-54 ans

3000 courriers ont été envoyés à 1000 femmes de 40 à 44 ans, 1000 femmes de 45 à 49 ans et 1000 femmes de 50 à 54 ans.

Sur ces 3000 courriers, 574 réponses sont parvenues au laboratoire dont 512 avec prélèvement et 62 sans.

Courriers avec prélèvement :

Au total pour le deuxième envoi, nous avons reçu 512 courriers avec prélèvement d'urine, ce qui représente 17,1% des 3000 courriers de départ.

Parmi ces 512 échantillons, 23 provenaient de femmes hystérectomisées, soit 4,5% des prélèvements reçus. De plus, 16 échantillons étaient accompagnés d'un refus de participer à l'étude. Pour ces 39 prélèvements, la PCR n'a pas été réalisée.

Nous avons donc reçu 473 échantillons de femmes non hystérectomisées et acceptant de participer à l'étude, sur lesquels nous avons réalisé la PCR Abbott Real Time High Risk HPV soit 15,8% des 3000 courriers de départ (Fig.24).

Courriers sans prélèvement :

Nous avons reçu 62 réponses sans prélèvement.

25 étaient envoyés par des femmes ayant subi une hystérectomie totale. Six courriers nous sont parvenus sans questionnaire ou avec un questionnaire non rempli, il nous est donc impossible de connaître la raison pour laquelle ces patientes n'ont pas renvoyé de prélèvement. Enfin, 31 femmes ont renvoyé un courrier sans prélèvement pour un autre motif. Il s'agissait, pour 24 de ces courriers, de femmes qui avaient réalisé un FCU entre temps ou bien qui avaient déjà programmé un rendez-vous gynécologique ou encore qui se disaient être suivies régulièrement par leur gynécologue. Parmi les sept autres courriers, deux correspondaient à des patientes décédées, un à un déménagement à l'étranger, une patiente affirmait qu'elle n'avait jamais reçu d'incitation au dépistage jusqu'à ce courrier, deux ont dit que leur médecin traitant ou leur gynécologue ne leur proposait pas de FCU et une patiente a dit qu'elle refusait de participer (Tableau 3).

40-54 ans		
	nombre	%
Hystérectomies	25	40,3
FCU réalisé entre temps ou en attente de rendez-vous	24	38,7
Questionnaire non renvoyé ou non rempli	6	9,7
Autre	7	11,3
Total	62	100

Tableau 3 : Détail des 73 réponses reçues sans prélèvement (40-54 ans)

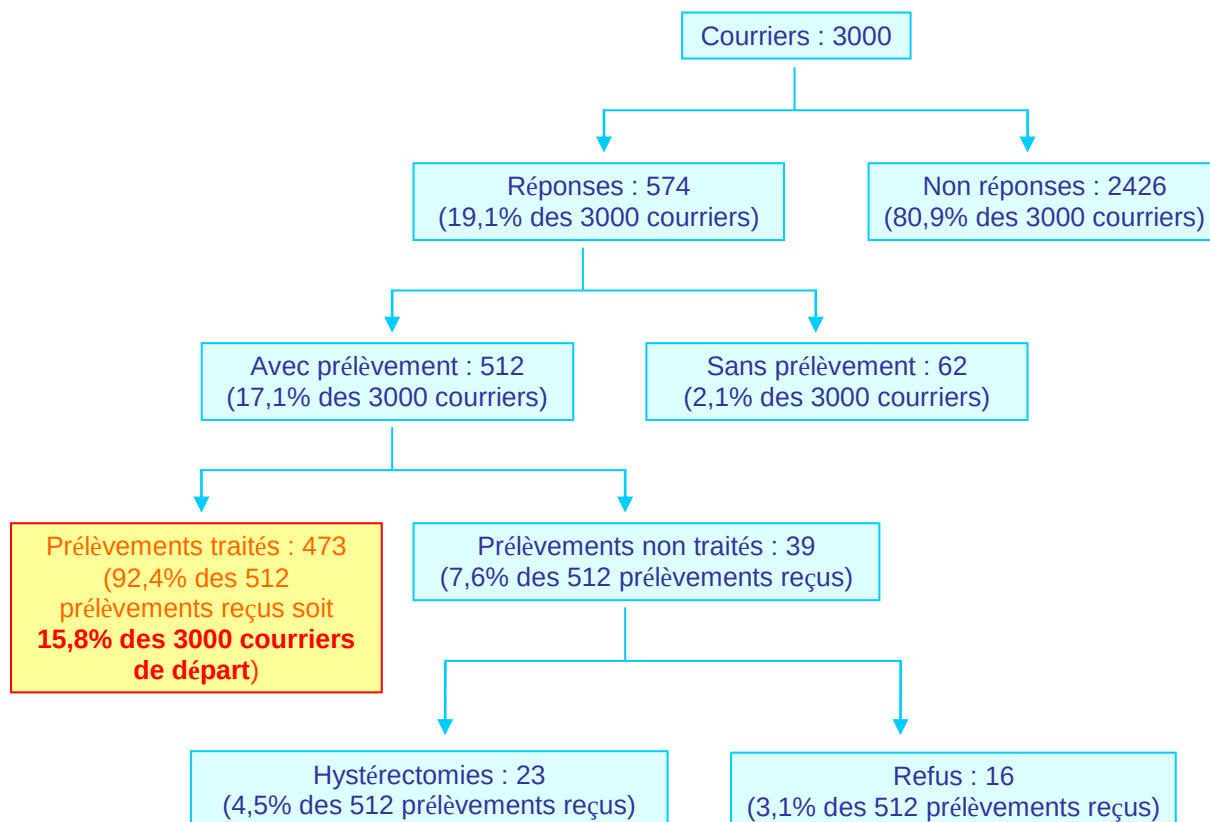


Figure 24 : Détail des réponses reçues sur les 3000 courriers de départ (40-54 ans)

5.1.3 Au total

Sur ces 5000 courriers envoyés, 60 ne sont pas parvenus à leur destinataire (décès ou changement d'adresse).

Sur les 4940 courriers restant, 906 réponses sont parvenues au laboratoire (18,3% des envois) dont : 771 (15,6%) avec prélèvement et 135 (2,7%) sans (Fig.25).

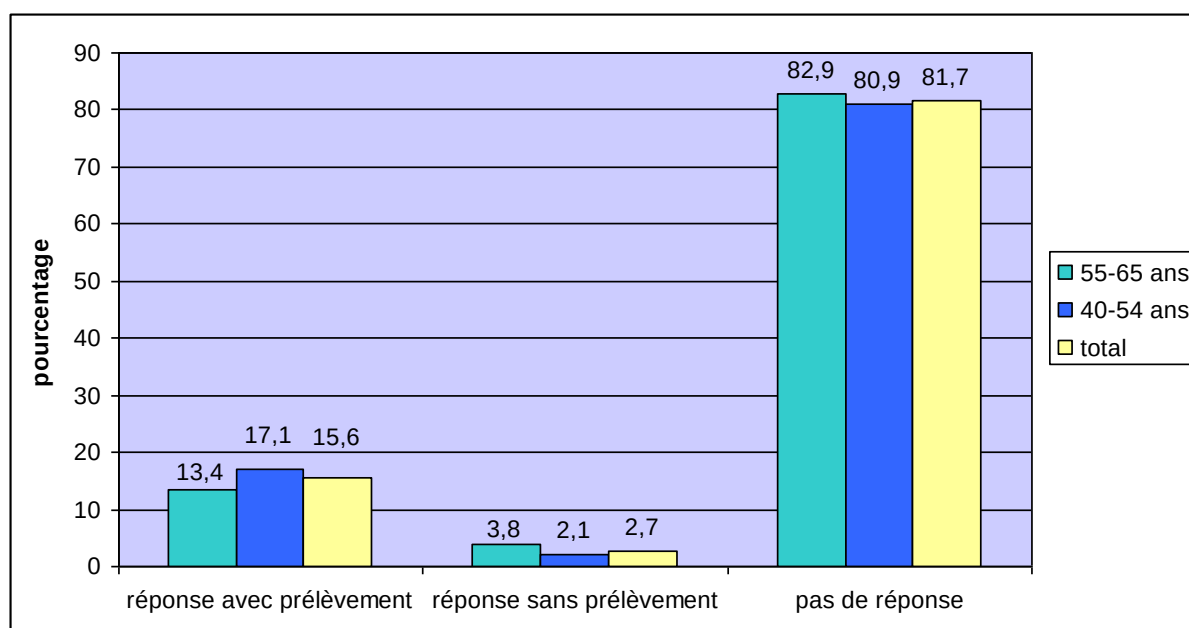


Figure 25 : Taux de réponse avec et sans prélèvement pour les deux tranches d'âge

Courriers avec prélèvement :

Au total pour les deux envois, nous avons reçu 771 courriers avec prélèvement d'urine, ce qui représente 15,6% des 4940 courriers de départ.

Parmi ces 771 échantillons, 68 provenaient de femmes hystérectomisées, soit 8,8% des prélèvements reçus. De plus, 25 échantillons étaient accompagnés d'un refus de participer à l'étude. Pour ces 93 prélèvements, la PCR n'a pas été réalisée.

Nous avons donc reçu 678 échantillons de femmes non hystérectomisées et acceptant de participer à l'étude, sur lesquels nous avons réalisé la PCR Abbott Real Time High Risk HPV, ce qui représente 87,9% des 771 prélèvements reçus et 13,7% des 4940 courriers de départ (Fig.26).

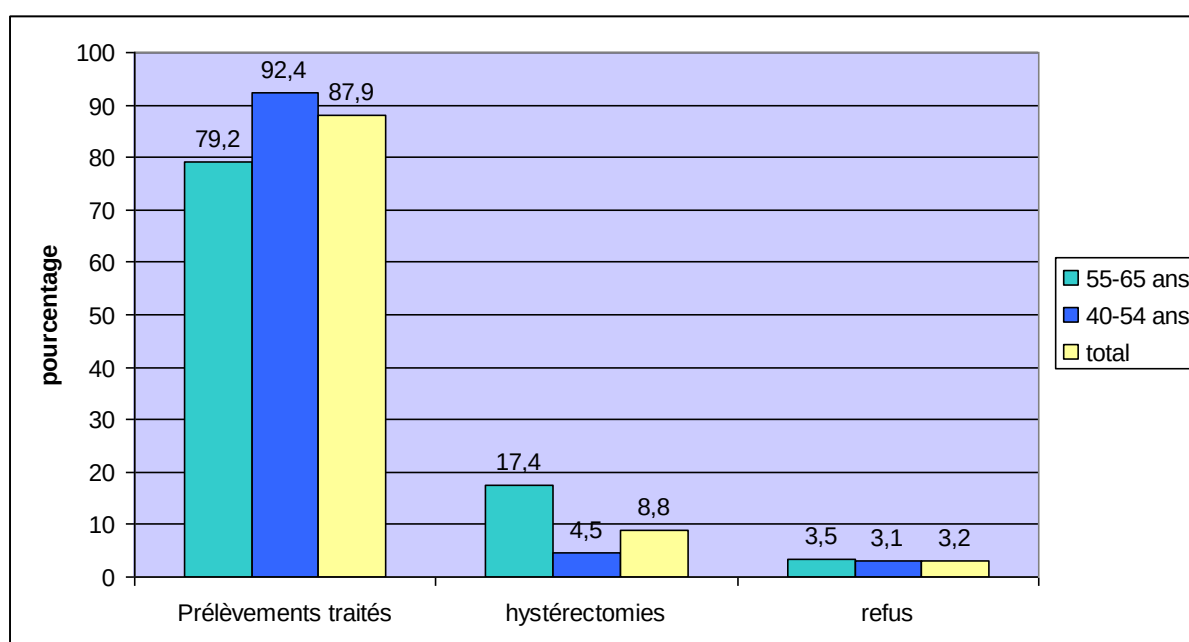


Figure 26 : Détail des prélèvements reçus pour les deux tranches d'âge

Courriers sans prélèvement :

Nous avons reçu 135 réponses sans prélèvement.

83 (61,5%) étaient envoyés par des femmes ayant subi une hystérectomie. 8 (5,9%) courriers nous sont parvenus sans questionnaire ou avec un questionnaire non rempli, il nous est donc impossible de connaître la raison pour laquelle ces patientes n'ont pas renvoyé de prélèvement. Enfin, 44 femmes ont renvoyé un courrier sans prélèvement pour un autre motif. Il s'agissait, pour 35 (25,9%) de ces courriers, de femmes qui avaient réalisé un FCU entre temps ou bien qui avaient déjà programmé un rendez-vous gynécologique (Fig.27).

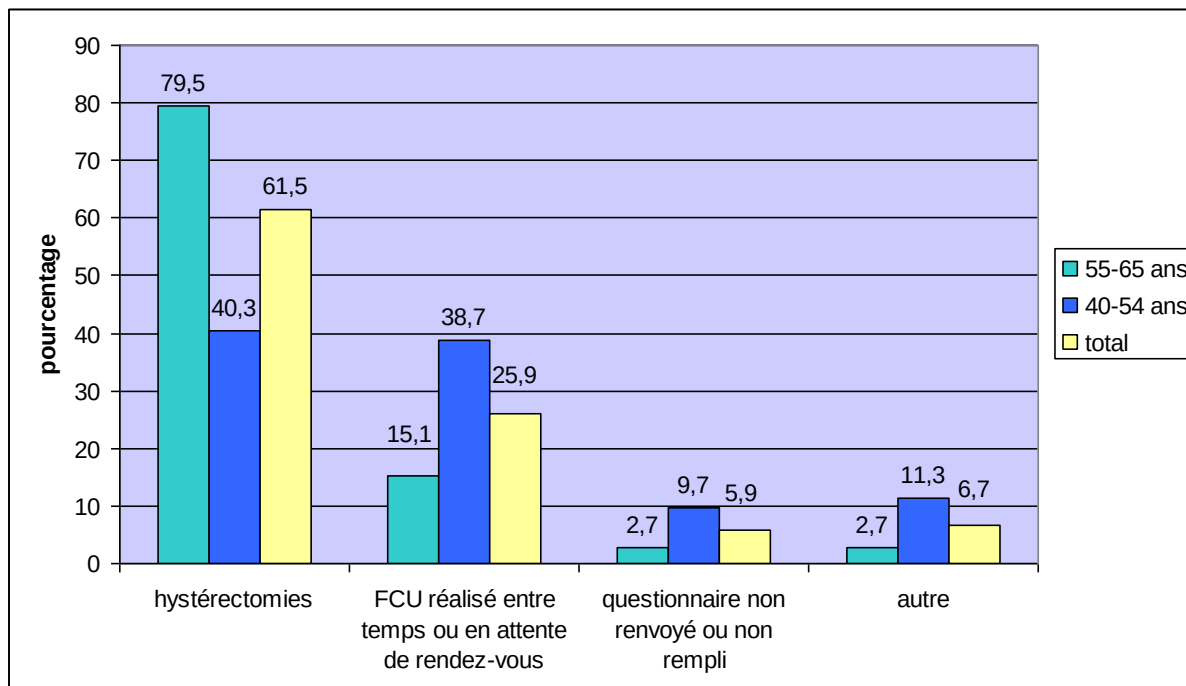


Figure 27 : Détail des réponses reçues sans prélèvement pour les deux tranches d'âge

5.2 HPV : prévalence et génotypage

5.2.1 Prévalence

5.2.1.1 55-65 ans

Sur les 205 PCR réalisées, 200 étaient négatives (97,6%) et 5 étaient positives (2,4%) (Tableau 4).

Parmi les PCR positives, on retrouvait deux HPV 16 et 3 HPV HR autre que 16 ou 18 (other HPV HR).

55-65 ans		
	nombre	%
HPV+	5	2,4
HPV-	200	97,6
Total	205	100

Tableau 4 : Prévalence HPV chez les 55-65 ans

5.2.1.2 40-54 ans

Sur les 473 PCR réalisées, nous avons rencontré des problèmes techniques pour trois des prélèvements pour lesquels nous n'avons pas pu rendre de résultat.

Sur les 470 autres échantillons, 446 PCR étaient négatives (94,9 %) et 24 étaient positives (5,1%) (Tableau 5).

Parmi les PCR positives, on retrouvait un HPV 16, 19 other HPV HR, 1 HPV 18 associé à un other HPV HR et 3 HPV 16 associé un other HPV HR.

40-54 ans		
	nombre	%
HPV+	24	5,1
HPV-	446	94,3
Problème technique	3	0,6
Total	473	100

Tableau 5 : Prévalence HPV chez les 40-54 ans

5.2.1.3 Au total

Sur les 678 PCR réalisées, nous avons rencontré des problèmes techniques pour trois des prélèvements pour lesquels nous n'avons pas pu rendre de résultat. 646 PCR étaient négatives (95,3 %) et 29 étaient positives (4,3%) (Tableau 6).

Pour les 2 envois : 40-65 ans		
	nombre	%
HPV+	29	4,3
HPV-	646	95,3
Problème technique	3	0,4
Total	678	100

Tableau 6 : Prévalence HPV pour les deux tranches d'âge

5.2.2 Problèmes techniques

Pour certains prélèvements, le *m2000rt* n'a pas rendu de résultat lors d'un premier passage.

Pour ces prélèvements, nous traitons l'échantillon une deuxième fois après congélation et décongélation. L'aliquot congelé puis décongelé était ensuite traité de la même manière que les autres échantillons (extraction/amplification à partir de 2,5 mL d'urine dans un milieu de conservation Abbott Cervi-Collect). Si l'automate rendait toujours un résultat ininterprétable après une étape de congélation/décongélation, nous procédions à un troisième passage après dilution.

La congélation et la dilution sont deux procédés ayant pour but de diminuer l'interaction d'un éventuel inhibiteur présent dans le prélèvement.

Nous n'avons pas pu rendre de résultat pour 3 prélèvements pour lesquels l'automate ne détectait aucun signal d'amplification malgré un second passage après congélation/décongélation et un troisième passage après dilution.

5.2.3 Distribution des génotypes d'HPV

Parmi les 29 PCR positives pour les deux tranches d'âge, nous observons la distribution suivante (Fig.28) :

- HPV 16 : 3
- HPV 16 + autre HPV HR : 3
- HPV 18 + autre HPV HR : 1
- Autre HPV HR : 22

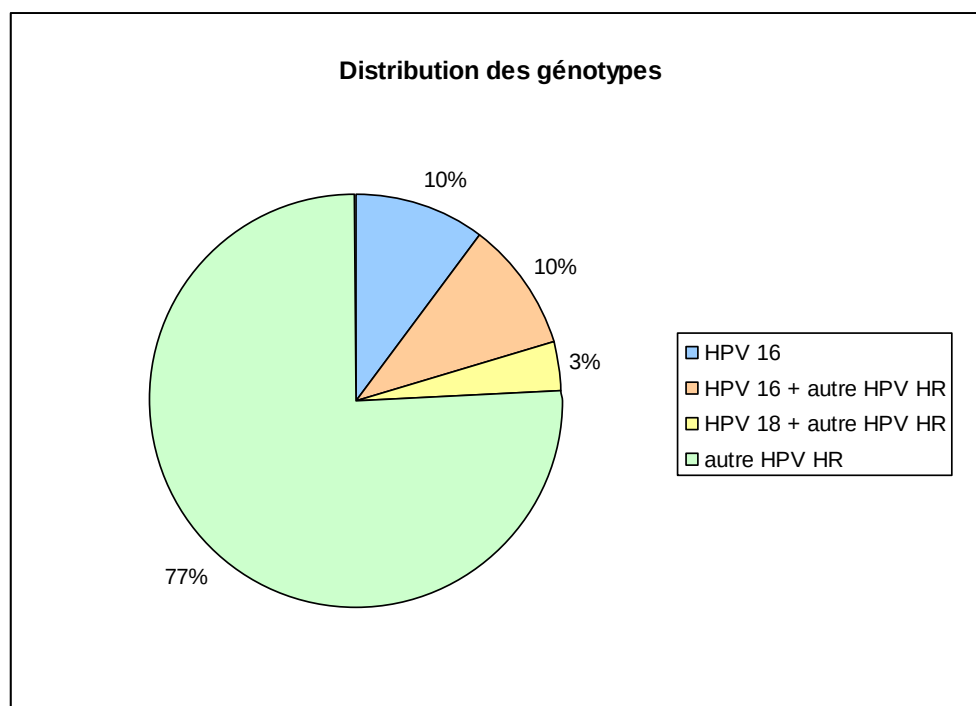


Figure 28 : Distribution des génotypes

5.3 Suivi des femmes HPV+

En cas de PCR positive, la patiente était contactée par son médecin afin de réaliser un FCU dans les plus brefs délais. Le suivi de ces patientes était ensuite assuré par Cap Santé 49 qui devait relancer les patientes en cas de FCU non réalisé malgré un résultat de PCR positif.

A ce jour, nous avons pu suivre 27 des 29 patientes HPV+ en PCR. Les 2 patientes restantes n'ont pas donné suite aux relances de Cap Santé à ce jour (Tableau 7).

	nombre	FCU	Histologie
HPV 16	3	2 normaux 1 HSIL	CIN3 : amputation du col
HPV 16 + autre HPV HR	3	2 normaux 1 en attente	
HPV 18 + autre HPV HR	1	1 FCU normal	
Autre HPV HR	22	12 normaux	
		3 ASC-US	1 CIN1 1 normal 1 en attente
		1 ASC-H	normale
		2 LSIL	1 CIN1 1 en attente
		2 HSIL	1 CIN3 (biopsie et conisation) 1 normal
		1 non réalisé mais colposcopie d'emblée	normale
		1 en attente	

Tableau 7 : Détail du suivi des femmes HPV+ (génotype retrouvé, cytologie, histologie)

Grâce à ce dépistage urinaire, nous avons détecté la présence d'un HPV chez 29 femmes, parmi lesquelles 17 présentaient un frottis normal, 3 présentaient un frottis indéterminé et 6 avaient des lésions histologiques, soit 20,7% des patientes HPV+. Parmi ces 6 patientes, on retrouvait : un frottis ASC-H, 2 frottis LSIL et 3 frottis HSIL. Deux d'entre elles présentaient des lésions de stade CIN3 (Fig.29).

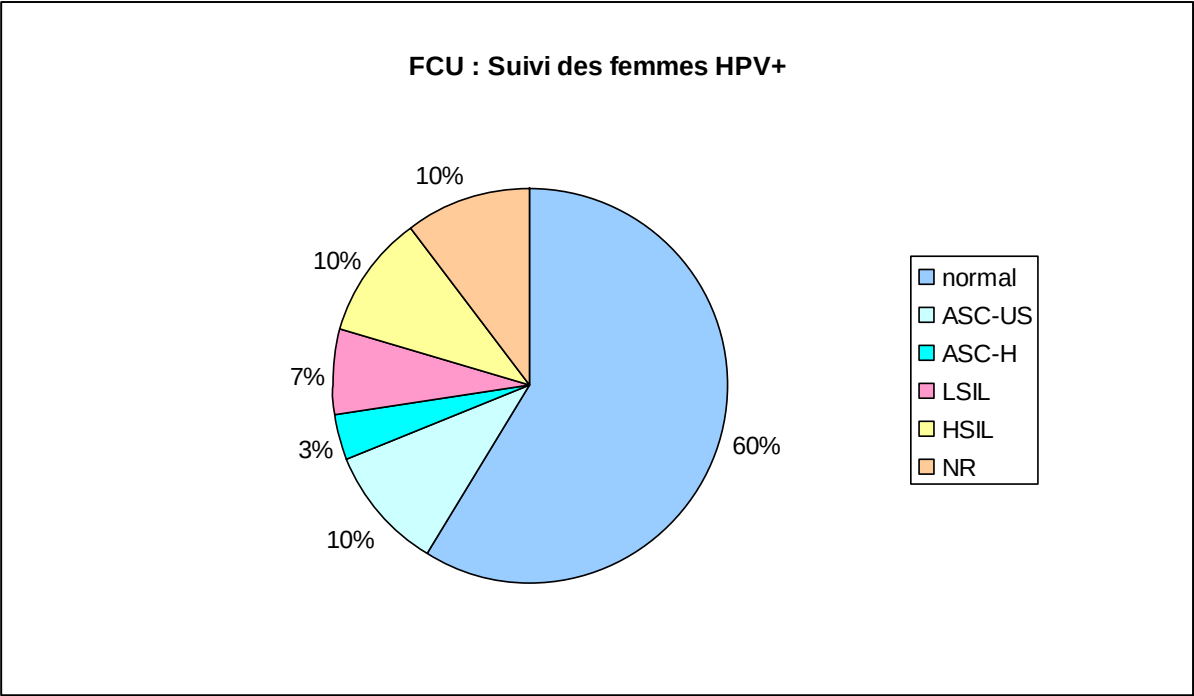


Figure 29 : Suivi des femmes HPV+, résultat des frottis

5.4 Analyse des questionnaires de motifs de refus du FCU chez les femmes ayant renvoyé un prélèvement

Question 1 : Connaissiez-vous le cancer du col de l'utérus ?

A cette question, la majorité des femmes (72,1%) ont répondu oui. Celles-ci avaient déjà entendu parler du cancer du col de l'utérus (Tableau 8)(Fig.30).

	Nombre de réponses	%
Oui	556	72,1
Non	168	21,8
Non renseigné	34	4,4
Pas de questionnaire	13	1,7
Total	771	100,0

Tableau 8 : Réponses à la question « connaissez-vous le cancer du col de l'utérus ? »

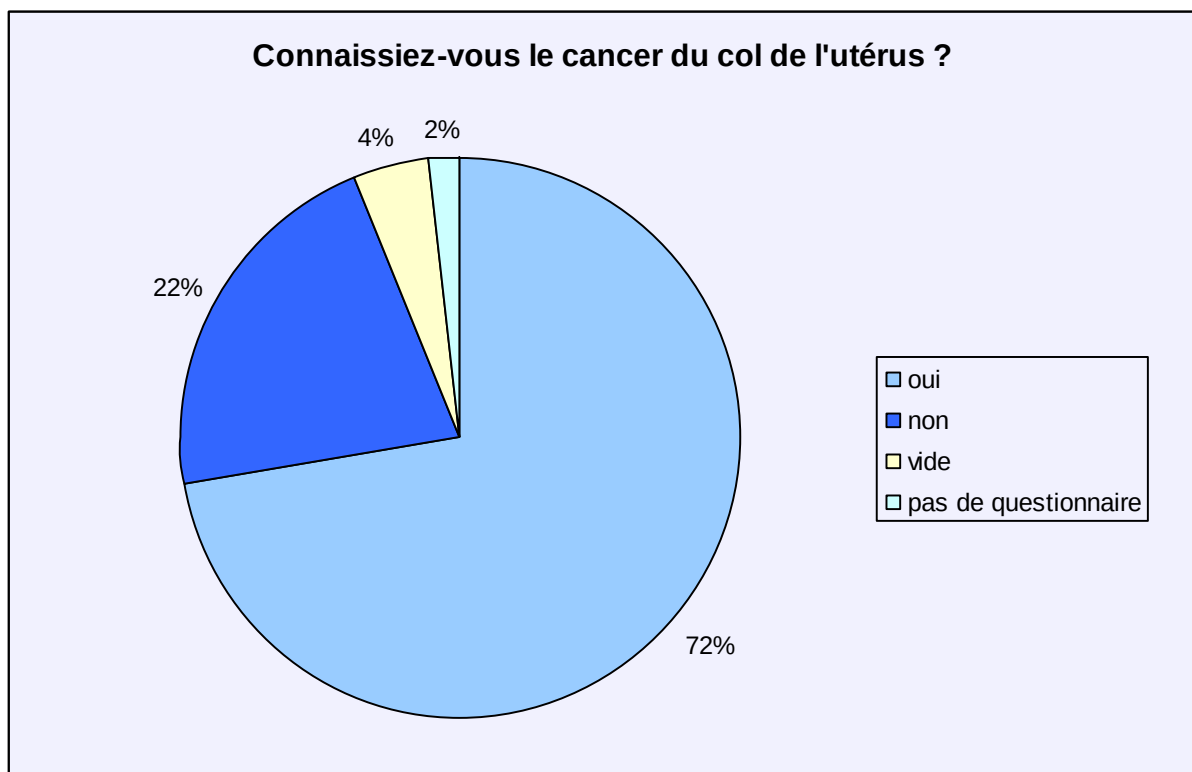


Figure 30 : Réponses à la question « connaissez-vous le cancer du col de l'utérus ? »

Question 2 : Saviez-vous qu'il est recommandé de réaliser un dépistage de ce cancer par un frottis cervico-utérin ?

La grande majorité des patientes (82,1%) savaient qu'il était recommandé de réaliser un dépistage du cancer du col par un frottis cervico-utérin (Tableau 9)(Fig.31).

	Nombre de réponses	%
Oui	633	82,1
Non	92	11,9
Non renseigné	33	4,3
Pas de questionnaire	13	1,7
Total	771	100

Tableau 9 : Réponses à la question « saviez-vous qu'il est recommandé de réaliser un dépistage de ce cancer par un frottis cervico-utérin ? »

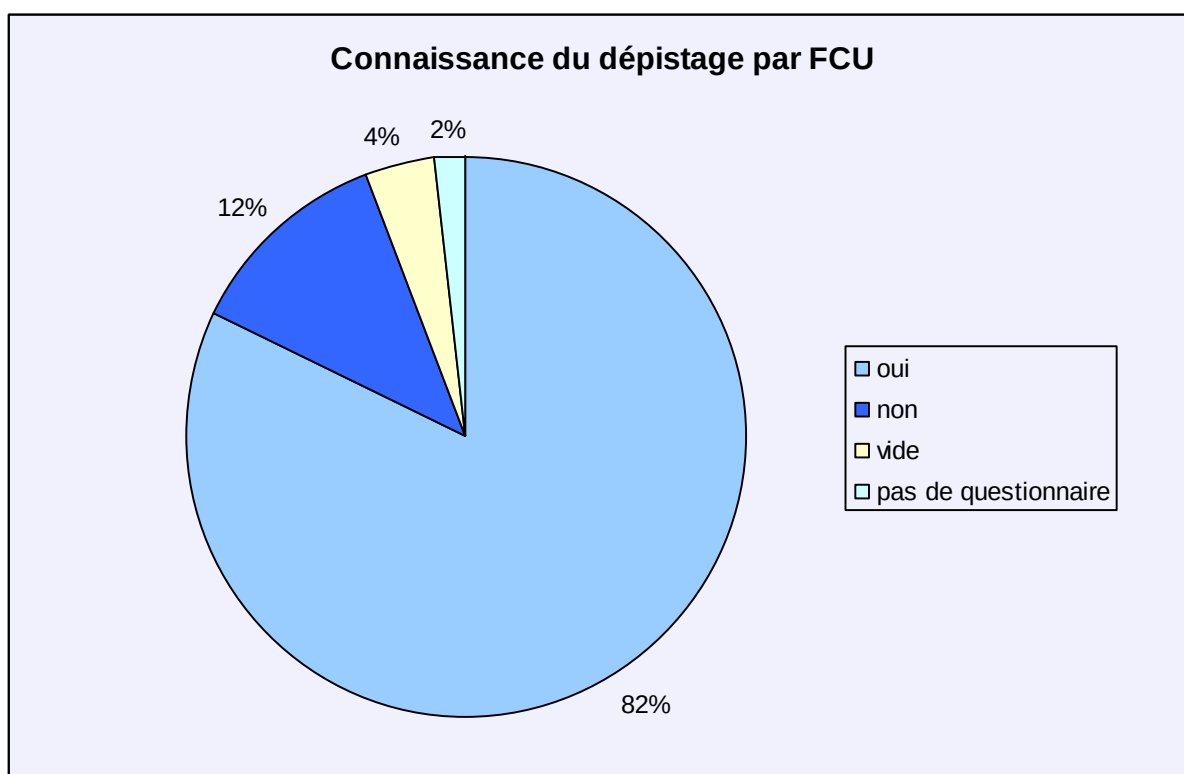


Figure 31 : Réponses à la question « saviez-vous qu'il est recommandé de réaliser un dépistage de ce cancer par un frottis cervico-utérin ? »

Question 3 : Avez-vous déjà fait ce frottis ?

Environ la moitié des femmes (50,8%) avaient déjà eu un FCU (Tableau 10)(Fig.32).

	Nombre de réponses	%
Oui	392	50,8
Non	310	40,2
Non renseigné	55	7,1
Pas de questionnaire	13	1,7
Ne sait pas	1	0,1
Total	771	100,0

Tableau 10 : Réponses à la question « avez-vous déjà fait ce frottis ? »

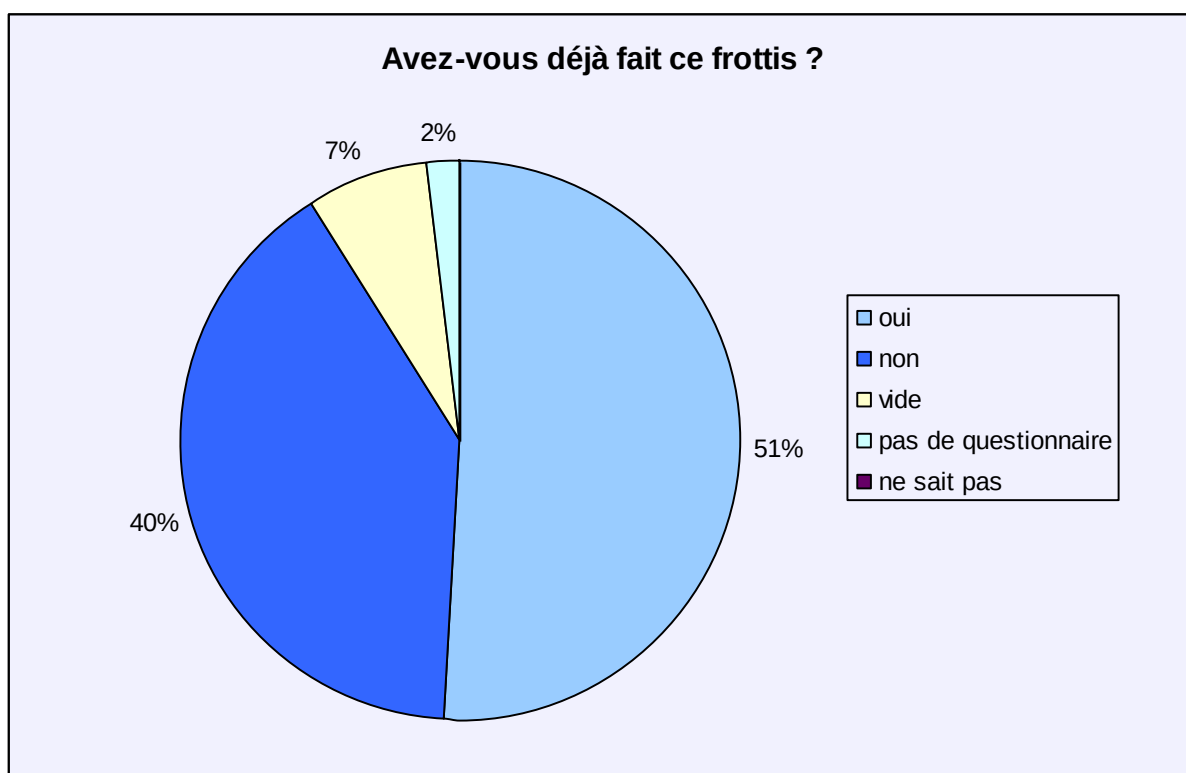


Figure 32 : Réponses à la question « avez-vous déjà fait ce frottis ? »

Question 4 : Si non, pourriez-vous nous indiquer la raison pour laquelle vous n'avez pas eu de frottis à ce jour ?

431 femmes ont répondu à cette question. Plusieurs motifs étaient parfois évoqués (Tableau 11)(Fig.33).

Motif	Nombre de femmes ayant coché cette réponse
Non connu	50
Refus	61
Non proposé	92
Jamais de relations sexuelles	57
Opération de l'utérus	60
Autre	145

Tableau 11 : Motifs de refus du frottis

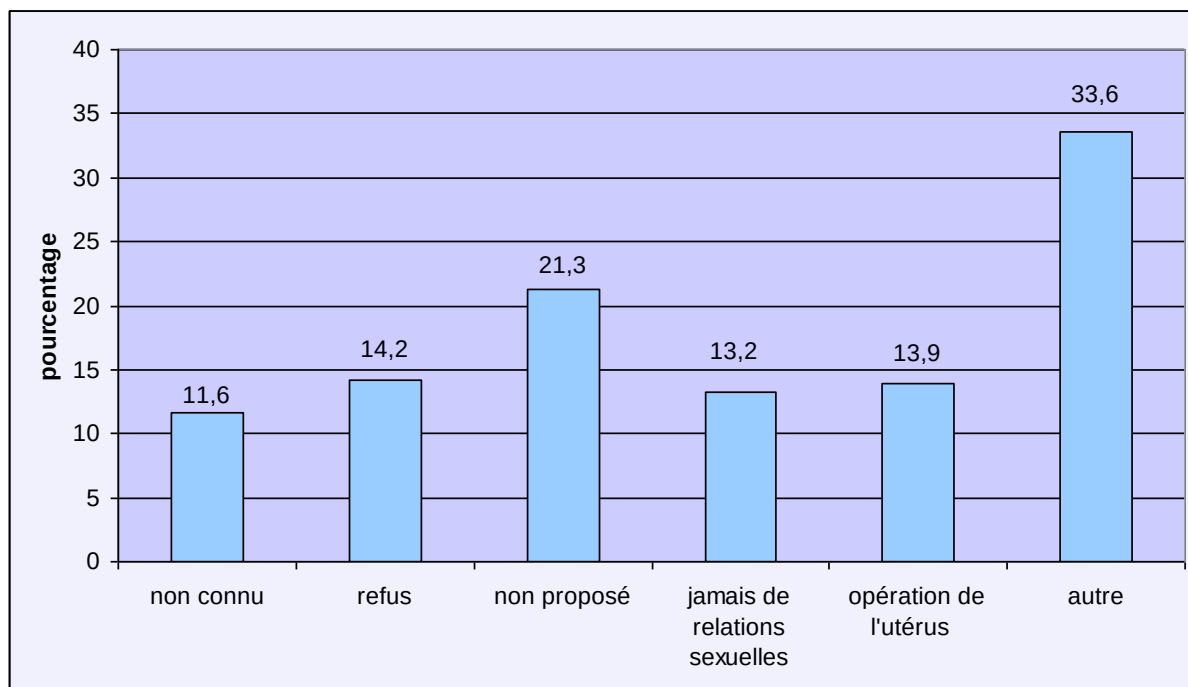


Figure 33 : Motifs de refus du frottis (en % des réponses)

On note que le fait que le médecin ne propose pas la réalisation d'un frottis constitue le principal motif de refus.

Question 5 : Vous avez refusé à deux reprises l'incitation pour réaliser le frottis cervico-utérin, pour quel(s) motif(s) ?

172 patientes n'ont pas répondu à cette question.

599 patientes ont répondu. Plusieurs motifs étaient parfois évoqués (Tableau 12)(Fig.34).

Motif	Nombre de femmes ayant coché cette réponse
Vous n'avez pas le temps de vous rendre chez votre médecin traitant ou votre gynécologue	159
Le délai de rendez-vous chez votre médecin est trop long	36
Vous pensez que le frottis cervico-utérin est un examen douloureux et vous avez peur	90
Vous êtes angoissée à l'idée de recevoir un résultat positif pour le frottis cervico-utérin	102
Vous n'avez jamais eu de rapports sexuels donc vous n'avez aucun risque d'avoir un cancer du col de l'utérus	7
Votre médecin ne vous le propose pas	101
Autre	251

Tableau 12 : Motifs de refus des incitations de Cap Santé à réaliser un FCU

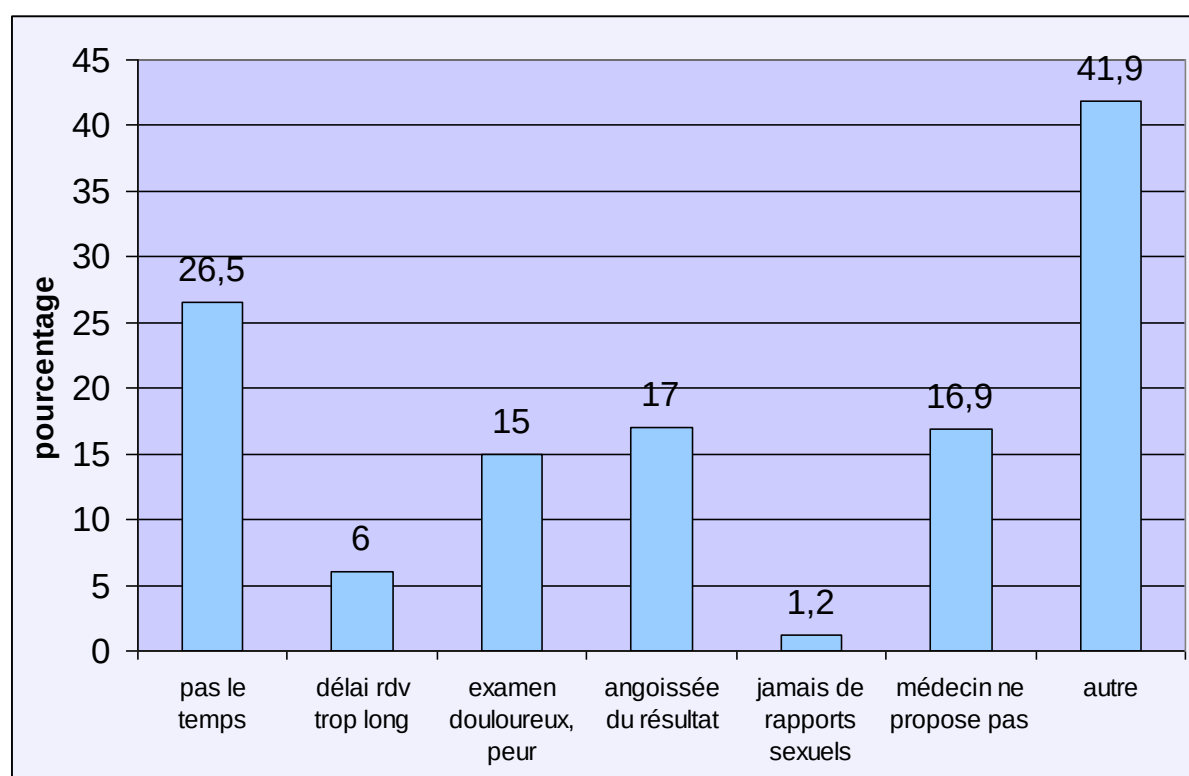


Figure 34 : Motifs de refus des incitations de Cap Santé à réaliser un FCU (en % des réponses)

Le principal motif évoqué par les patientes est le manque de temps. Le fait que le médecin ne propose pas le FCU est encore une fois régulièrement mentionné.

6 Discussion

L'un des objectifs principaux de ce projet était de proposer une alternative au dépistage classique par frottis afin d'augmenter son taux de participation. Le test HPV, actuellement préconisé en cas de cytologie indéterminée (frottis ASC-US), semble être une alternative envisageable car bien que la réalisation du FCU ait diminué sensiblement la prévalence du cancer du col de l'utérus (31), ses performances sont limitées puisque, malgré une spécificité élevée de 96,3% (IC à 95%: 96,1–96,5 %), sa sensibilité est faible. En effet, sa sensibilité à dépister un CIN 2-3 serait de 53% (IC à 95%: 48,6–57,4 %) (18,6 à 76,7% selon les études) (32).

Outre sa sensibilité médiocre, due à son caractère subjectif, cytologiste-dépendant, et à sa faible reproductibilité, le frottis est un examen relativement invasif, inconfortable et chronophage.

Le test HPV dans les prélèvements cervicaux a, en revanche, une meilleure sensibilité mais une spécificité plus faible que le FCU pour le dépistage des CIN 2-3 du col de l'utérus. En effet, le test détecte également des infections transitoires qui ne seront jamais à l'origine de lésions cancéreuses (Tableau 13).

FCU	Test HPV
- Test subjectif, cytologiste dépendant - Faible reproductibilité - Risque de FCU insatisfaisant ou ininterprétable - Moins sensible que le test HPV pour le dépistage des CIN 2-3 - Meilleure spécificité - Les performances seront modifiées par l'impact de la vaccination sur la diminution de la prévalence des lésions précancéreuses et des cancers du col de l'utérus - Réalisation d'un FCU tous les 3 ans après 2 frottis normaux à 1 an d'intervalle - Prélèvement réalisé à l'occasion d'une consultation médicale - Coût assurance maladie (€) = 10,3* - Coût moyen observé en pratique courante (€) = 15,3**	- Test objectif - Excellente reproductibilité - Les tests insatisfaisants ou ininterprétables sont beaucoup plus rares qu'avec le FCU - Plus sensible que le FCU pour le dépistage des CIN 2-3 - Spécificité plus faible - Pas d'impact de la vaccination sur les performances du test HPV - Possibilité d'allonger à 5 ans l'intervalle entre deux tests de dépistage - Possibilité d'un auto-dépistage : Évite le coût d'une consultation médicale - Éventuelle extension de la couverture du dépistage de la population - Coût assurance maladie (€) = 29,2* - Coût moyen observé en pratique courante (€) = 48,6

Tableau 13 : Comparaison des principaux avantages et inconvénients de l'utilisation du test HPV dans le dépistage du cancer du col de l'utérus par rapport au frottis cervicovaginal (32)

* Coûts selon la nomenclature générale des actes professionnels (NGAP) en vigueur depuis mars 2005 et sur la base desquels les patientes sont remboursées.

** (33)

Les résultats de plusieurs méta-analyses récentes illustrent la meilleure sensibilité des tests HPV dans les prélèvements cervicaux par rapport au FCU. Le FCU montrait cependant toujours une meilleure spécificité (32,34,35).

La supériorité du test HPV sur le FCU dans le cadre du dépistage a également été récemment démontrée. Un essai prospectif a été mené en Inde par Sankaranarayanan et al. sur huit ans. Celui-ci incluait 131 746 femmes de 30 à 59 ans et comparait le dépistage par test HPV avec celui par FCU et inspection visuelle du col après application d'acide acétique. Le dépistage par test HPV était le seul à permettre une réduction significative du nombre de cancers du col de stade avancé (stade $\geq$ II) (36).

Le test HC2 est le premier test HPV à avoir été approuvé par la FDA aux USA. Celui-ci a été validé dans de nombreuses études (34,37). La PCR est une technique très sensible puisqu'elle comprend une étape d'amplification de l'ADN extrait contrairement au test HC2, basé sur la technique d'hybridation en phase liquide, qui était à ce jour, la référence. Des études ont été menées dans le but de comparer les techniques de PCR avec la technique HC2 en terme, notamment, de sensibilité à détecter les lésions CIN2+. Il a été démontré à plusieurs reprises, une bonne concordance entre les résultats obtenus avec le test Abbott RealTime High Risk HPV, que nous avons utilisé dans notre étude, et ceux obtenus avec le test HC2. Plusieurs auteurs ont également souligné une excellente sensibilité à détecter les lésions CIN2+ pour le test Abbott.

Huang et al. ont conclu que les performances cliniques pour détecter les lésions de haut grade étaient comparables pour ces deux tests. De plus, ils ont noté que le test Abbott était plus performant pour détecter les HPV à haut risque oncogènes chez les patientes présentant des lésions CIN2+ puisqu'ils ont observé pour cette population un nombre plus important de faux positifs et des faux négatifs pour le test HC2. Les faux positifs étaient généralement dus à une réaction croisée avec les génotypes à bas risque oncogènes (38).

Halfon et al. ont également mené une étude comparative qui a démontré une sensibilité et une VPN $>$ à 90% pour la détection des lésions de haut grade pour les tests Abbott RT HR HPV, HC2 et Linear Array. La concordance entre ces tests était excellente avec notamment une concordance de 93% entre les tests Abbott RT HR HPV et HC2 (39).

Wong et al. ont aussi montré une excellente concordance entre les deux tests avec une sensibilité à détecter les lésions CIN2+ et une VPN de 100% pour les 2 techniques (40).

Le test Abbott RealTime HR HPV a également l'intérêt d'être entièrement automatisé et d'identifier les génotypes 16 et 18 qui sont les deux HPV HR les plus fréquemment rencontrés dans les lésions cancéreuses du col de l'utérus. Ceci permet une meilleure stratification du risque chez les femmes dépistées et par la même, une meilleure prise en charge de ces dernières.

Comme décrit précédemment, le test HPV a des performances au moins égales à celles du frottis ce qui pourrait en faire un outil utilisable en première intention dans le dépistage primaire mais à l'heure actuelle, les tests HPV sont réalisés sur des prélèvements cervicaux nécessitant un prélèvement de

cellules au niveau du col de l'utérus or, le frottis cervico-utérin n'est pas toujours bien accepté par les femmes car c'est un examen relativement invasif et inconfortable. Ce constat est d'autant plus vrai dans les milieux socio-économiques faibles ou bien en zones rurales isolées pour lesquels l'accès aux soins est moins aisé. Parfois, cet examen est mal accepté non pas pour des raisons sociales mais pour des raisons culturelles, notamment de religion.

Afin d'élargir la couverture de dépistage, il serait intéressant de pouvoir proposer la réalisation des tests HPV sur d'autres types de prélèvements, plus faciles à recueillir et/ou mieux acceptés par la population concernée, comme les urines ou l'autoprélèvement vaginal. Des études ont été menées afin de démontrer la meilleure compliance des femmes pour l'autoprélèvement ainsi que la concordance des résultats obtenus entre ce type de prélèvement et les prélèvements cervicaux qui sont, à ce jour, la référence.

Une étude menée chez des femmes à très faibles revenus à Marseille a montré que l'autoprélèvement vaginal était beaucoup mieux accepté que le frottis. Dans cette étude, les femmes ciblées étaient des femmes de 35 à 69 ans qui n'avaient pas répondu à une incitation à faire un frottis. Parmi ces femmes, un groupe recevait une seconde incitation au frottis et l'autre groupe recevait un kit d'autoprélèvement vaginal destiné à la réalisation d'un test HPV. Les taux de participation étaient significativement différents puisqu'ils étaient respectivement de 2,0% et de 18,3% pour la deuxième incitation au frottis et l'autoprélèvement (41).

D'autres études ont montré la meilleure acceptabilité des femmes vis-à-vis de l'autoprélèvement. C'était le cas de l'étude d'Igdbashian et al. qui montrait que 68% des femmes à qui on avait proposé un autoprélèvement vaginal préféraient ce type de prélèvement à un frottis (29).

Dzuba et al. en sont arrivés au même constat dans une étude menée au Mexique. Dans cette étude, un autoprélèvement vaginal était proposé à 1069 femmes de 20 ans et plus qui avaient parallèlement effectué un frottis. Elles étaient ensuite interrogées sur leur ressenti. 68% des femmes qui exprimaient une préférence choisissaient l'autoprélèvement principalement car elles trouvaient celui-ci plus confortable et moins embarrassant (30).

Le fait de proposer un test HPV sur des urines ou sur un autoprélèvement vaginal semble donc mieux accepté. C'est pourquoi ce test pourrait être proposé aux femmes réfractaires au frottis, ce qui constituerait une alternative au FCU dans ces populations qui ne sont pas régulièrement dépistées, sous réserve que les résultats obtenus sur ce type de prélèvements soient fiables. Plusieurs études ont été menées afin de démontrer la concordance entre les résultats obtenus dans les urines et dans les prélèvements cervicaux.

Pour notre étude, le choix s'est porté sur un test urinaire, le laboratoire de virologie du CHU d'Angers ayant déjà réalisé une étude en 2004, l'étude PapU, qui avait pour objectif d'évaluer l'intérêt et la praticabilité d'un dépistage urinaire de l'ADN HPV par rapport au prélèvement vaginal (PV). Les résultats de la comparaison de la détection des HPV sur les couples urines/PV ont montré une très

bonne corrélation entre les deux types de prélèvements avec une concordance à 93%, une sensibilité à 92% et une spécificité à 96% (42).

Daponte a également démontré que la différence de détection dans les urines et dans les prélèvements cervicaux n'était pas significative chez les patientes présentant des lésions de haut grade ou un cancer (43).

Certains auteurs émettent cependant des réserves quant à la fiabilité du test HPV urinaire. Dans une revue de la littérature sur la détection de l'ADN d'HPV dans les urines, Vorsters et al. notent que les résultats ne sont pas toujours concordants selon les auteurs et que les modalités de recueil des échantillons d'urines ainsi que leur conservation et leur préparation ne sont pas toujours clairement mentionnés dans les différentes études, rendant la compilation et l'interprétation des résultats difficiles, ce qui ne permet pas de conclure sur la fiabilité de ce type de prélèvement (44).

De ce fait, afin que le test HPV urinaire se généralise, il faudrait standardiser ces étapes car elles pourraient avoir un impact sur le taux d'ADN viral détecté et donc sur la sensibilité de la méthode.

Dans notre étude, 15,8% des femmes ont renvoyé un prélèvement d'urines, alors qu'elles avaient préalablement refusé le frottis après deux incitations successives.

Dans l'étude de Sancho-Garnier et al., le taux de participation était de 18,3% pour l'autoprélèvement vaginal, chez des femmes ayant refusé une incitation au frottis (41).

Nous observons donc un taux de réponse inférieur mais les femmes incluses dans notre étude avaient refusé deux incitations successives au frottis. De plus, le nombre de prélèvements exploitables aurait probablement été plus important si les 5000 courriers avaient été envoyés uniquement à des femmes non hystérectomisées. En effet, parmi les femmes ayant renvoyé un prélèvement, nous avons dû en exclure 8,8% car elles avaient subi une hystérectomie. Ces femmes n'auraient pas dû figurer dans le fichier de départ constitué par Cap Santé 49. De plus, 3,2% des femmes ayant renvoyé un prélèvement refusaient de participer à l'étude. Cette incohérence (refus de participer malgré l'envoi d'un prélèvement) était probablement due à une incompréhension du consentement à signer. Si l'on prend en considération uniquement les femmes non hystérectomisées ayant renvoyé un échantillon urinaire et acceptant de participer à l'étude, on compte 13,7% de femmes pour lesquelles nous avons pu exploiter un prélèvement. S'agissant de femmes réfractaires au frottis, ce taux reste satisfaisant.

Concernant la prévalence, plusieurs études épidémiologiques ont montré un pic de fréquence du portage de l'HPV autour de 20-25 ans avec une prévalence d'environ 30% puis on observe une diminution progressive de ce taux avec l'âge. Un second pic est constaté autour de 50 ans (45,46). Ce second pic de prévalence pourrait être dû à une ré-infection ou à la réactivation d'une infection latente en période de post-ménopause, période pendant laquelle on observe une baisse des défenses immunitaires.

La détection d'ADN viral pourrait donc présenter une alternative au frottis en dépistage primaire chez les femmes de plus de 30 ans (47) la prévalence des infections à HPV étant trop importante en deçà de cet âge et ces infections étant pour la plupart transitoires.

Une étude chez les femmes de plus de 30 ans a d'ailleurs déjà démontré *"une amélioration du taux de détection des lésions précancéreuses sans surcoût avec un test HPV en dépistage primaire suivi d'une cytologie en test de triage si positivité et d'une colposcopie en cas de cytologie anormale puis avec une surveillance annuelle par un test HPV"* (48).

Ainsi, pour notre étude, nous avons ciblé des femmes âgées de 40 à 65 ans pour lesquelles la prévalence est normalement plus faible que pour les femmes plus jeunes.

Nous avons observé une prévalence de 5,1% pour la tranche d'âge 40-55 ans et de 2,4% pour les femmes de 55 à 65 ans. La prévalence globale pour les femmes de 40 à 65 ans était de 4,3%. Ce taux est supérieur à celui retrouvé par Cox (Amérique du Nord) (49) qui a observé une prévalence de seulement 1,5% pour les femmes au-delà de 35 ans. Il est comparable à celui retrouvé par Meijer (Pays-Bas) qui a noté une prévalence de 4,8% (50). Différents auteurs ont cependant observé une prévalence supérieure. Celle-ci était par exemple de 9,6% pour Sellors (Canada) (51). Pour Giuliano (frontière américano-mexicaine) (52), ce taux était de 5,3% au-delà de 56 ans. Enfin, il était toujours supérieur à 10% jusqu'à 55 ans et de 8% au-delà de 60 ans pour Clavel (France) (53) et Boulanger (France) (54).

Le taux de prévalence que nous avons observé dans notre étude était donc plus faible que celui généralement retrouvé dans la littérature. Il est à noter qu'en plus de varier en fonction de l'âge, la prévalence varie en fonction du niveau socio-économique. Tamalet et al. ont observé une prévalence de 6,6% chez les femmes de 35 à 69 ans issues de deux villes de niveau socio-économique moyen (Vitrolles et Marignane) (55) alors que cette prévalence atteignait 14,1% pour la même catégorie d'âge, dans les quartiers Nord de Marseille où le niveau socio-économique est plus bas et elle atteignait 17,6% chez les femmes bénéficiaires de la CMU-C résidant dans les Bouches du Rhône (56). La prévalence varie aussi en fonction des zones géographiques puisque le comportement sexuel et l'âge du premier rapport diffèrent selon les pays et ces facteurs doivent être pris en compte pour l'interprétation des résultats.

L'utilisation d'un contrôle interne (β -globine) permettant de vérifier la cellularité suffisante du prélèvement ainsi que la réalisation correcte des étapes d'extraction et d'amplification nous permet difficilement de remettre en cause la sensibilité de la technique utilisée dans notre étude.

Il est à noter que la qualité des autoprélèvements réalisés à domicile était bonne puisque nous n'avons pas pu rendre de résultat que pour trois échantillons d'urine. Dans tous les autres échantillons reçus, la cellularité était suffisante et nous n'avons pas été gênés par un éventuel inhibiteur présent dans le prélèvement ce qui nous a permis de rendre un résultat pour 99,6% des prélèvements. Ce résultat est très satisfaisant.

Sur le plan du suivi des femmes HPV+, bien qu'un frottis normal ait été retrouvé pour la majorité des patientes HPV+ (17/29 soit 58%), le suivi a permis de retrouver 3 ASC-US, 1 ASC-H, 2 LSIL dont 1 lésions CIN1 et 3 HSIL dont 2 CIN3.

A ce jour, des lésions de haut grade ont donc été retrouvées chez deux patientes ayant participé à notre dépistage urinaire. Ces patientes ont pu être prises en charge grâce à ce test HPV puisqu'il s'agit de patientes qui ne se faisaient pas régulièrement dépister par FCU et pour lesquelles nous n'aurions donc pas diagnostiqué ces lésions autrement. Il est à noter qu'à ce jour, 2 patientes sur les 29 HPV+ n'ont pas réalisé de suivi suite à ce dépistage urinaire. Le nombre de patientes présentant des lésions de haut grade pourrait donc être sous-estimé.

Dans une étude, l'étude ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics), il a été observé que le risque relatif de développer des lésions CIN2+ chez des patientes présentant un frottis normal était de 16,3 pour les patientes HPV16+, de 8,4 pour les patientes HPV18+ et de 5,5 pour les patientes avec un HPV HR autre (57). Les patientes présentant un frottis normal sont donc à surveiller étroitement puisque la présence d'un HPV HR augmente le risque de développer des lésions cancéreuses. Notre étude a donc également permis de cibler ces femmes à risque.

Nous avons retrouvé des anomalies histologiques pour 4 des 29 patientes HPV+. Parmi ces quatre patientes, l'une présentait des lésions CIN3 et un HPV16. Pour les trois autres, nous avons détecté un HPV HR autre que 16 ou 18. Deux présentaient des lésions de bas grade CIN1 et l'autre des lésions de haut grade CIN3. Cet échantillon est trop petit pour conclure un lien entre le génotype retrouvé et les anomalies histologiques.

Sur les 29 patientes pour lesquelles nous avons détecté un HPV, on retrouve un HPV16 pour 6 d'entre elles (20,7%), un HPV18 pour 1 patiente (3,4%) et un HPV HR autre (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) seul pour 22 patientes (75,9%) et en association avec un HPV16 ou 18 pour 4 patientes (13,8%). Les génotypes HR autres que 16 et 18 étaient donc très majoritairement retrouvés mais les 12 HPV HR autres que 16 ou 18 n'étant pas typés dans notre étude, on ne peut pas établir la part que représente chacun de ces génotypes parmi nos échantillons positifs.

L'HPV16 est malgré tout très représenté puisque nous retrouvons ce génotype chez environ un cinquième de nos patientes HPV+, or ce génotype est le plus fréquemment rencontré à travers le monde.

On retrouve une distribution comparable à la notre dans plusieurs études, avec un HPV16 fréquemment rencontré. Dans une étude ciblant des femmes ne se faisant pas régulièrement dépistées par frottis, Tamalet et al. ont noté qu'un HPV HR autre était plus fréquemment retrouvé que le type 16 (59,6% contre 43,5%) (55) celui-ci étant malgré tout assez largement représenté. Dans une autre étude menée en Italie sur des femmes VIH+ par Tanzi et al., le génotype 16 représentait 22,8% des HPV HR retrouvés dans les prélèvements cervicaux et 21,1% dans les urines (58).

Grâce à notre questionnaire, nous avons pu identifier les motifs de refus du frottis. De plus, celui-ci nous a permis de constater que 72,1% des femmes interrogées avaient déjà entendu parler du cancer du col de l'utérus et 82,1% d'entre elles savaient qu'il était recommandé de réaliser un dépistage par FCU. Ce n'est donc pas l'ignorance de cette pathologie qui constitue le principal frein à son dépistage.

51% des femmes avaient déjà réalisé un frottis au cours de leur vie mais ce frottis n'était pas répété tous les 3 ans comme le préconisent les recommandations.

En ce qui concerne les raisons de la non-réalisation du frottis, aucun motif proposé dans le questionnaire ne se dégage clairement. On note toutefois que le fait que le médecin ne propose pas cet examen constitue la première raison avec 21,3% des femmes ayant coché ce motif. Les autres raisons proposées : refus, opération de l'utérus, jamais de relations sexuelles, méconnaissance de l'examen, arrivent après avec respectivement 14,2%, 13,9%, 13,2% et 11,6%. Les 33,6% restants ont coché la case « autre ».

La raison principale évoquée pour justifier le refus des deux incitations au frottis de Cap Santé était le manque de temps pour 26,5% des femmes. L'angoisse du résultat, le fait que le médecin ne propose pas le frottis et l'appréhension de l'examen viennent ensuite avec respectivement 17%, 16,9% et 15%. Enfin, le délai de rendez-vous trop long ainsi que le fait de n'avoir jamais eu de rapports sexuels sont les deux raisons les moins évoquées (6% et 1,2%). Les 41,9% restants ont coché la case « autre ».

Même si aucun motif ne semble se dégager clairement, le fait que les médecins ne proposent pas régulièrement de frottis est souvent mentionné. Ce point pourrait être amélioré grâce à une meilleure sensibilisation des praticiens aux recommandations actuelles sur le dépistage du cancer du col de l'utérus. Parallèlement, une meilleure explication sur la réalisation de l'examen ainsi que de ses conséquences selon les résultats retrouvés pourrait diminuer le nombre de refus basés sur l'appréhension ou la peur du résultat qui constituent des motifs souvent évoqués également.

7 Conclusion

Cette étude nous a permis de constater que le test urinaire semble mieux accepté que le frottis ce qui pourrait en faire un outil intéressant dans le cadre du dépistage du cancer du col de l'utérus. En effet, un certain nombre de femmes n'ayant pas répondu à deux incitations au FCU ont accepté de réaliser ce test. Ces femmes ont ainsi pu bénéficier d'un dépistage du cancer du col de l'utérus, ce qui n'aurait pas été le cas sans notre sollicitation. A ce jour, nous avons pu suivre 27 femmes parmi 29 HPV+. Ce suivi a permis de détecter des lésions de haut grade CIN3 chez deux patientes qui ont ainsi pu bénéficier d'une prise en charge adaptée.

Ce test urinaire pourrait constituer une alternative notamment dans les populations défavorisées souvent moins sensibles aux problématiques de dépistage et pour lesquelles l'accès aux soins est souvent moins aisé.

Cette option permettrait d'étendre le taux de participation au dépistage en visant un plus grand nombre de femmes.

En France, on dénombre chaque année près de 1000 décès et 3000 nouveaux cas de cancer du col de l'utérus. En proposant un test le moins invasif possible tout en gardant une sensibilité et une spécificité satisfaisantes dans la détection des lésions précancéreuses et cancéreuses, nous tenons entre nos mains une solution qui pourrait faire baisser ces chiffres bien trop élevés.

Annexes

ANNEXE 1: Note d'information



PROJET DE RECHERCHE EPIDEMIOLOGIQUE SUR L'ACCEPTABILITE D'UN TEST HPV URINAIRE CHEZ LES FEMMES NE SOUHAITANT PAS BENEFICIER DU DEPISTAGE CLASSIQUE PAR LE FROTTIS CERVICO-UTERIN : ETUDE AU NIVEAU DEPARTEMENTAL (MAINE-ET-LOIRE)
--

Madame,

Cette lettre a pour objectif de vous délivrer toute l'information nécessaire sur votre rôle, les risques, les contraintes et les bénéfices liés à ce projet car votre participation ne peut se faire sans le recueil de votre consentement.

▪ **Les objectifs de ce projet:**

Dans un précédent courrier, nous vous avons alerté sur l'importance de réaliser le **dépistage du cancer du col de l'utérus** qui peut être guéri si la prise en charge médicale est précoce ; ce dépistage nécessite la réalisation d'un frottis cervico-utérin par votre médecin traitant, votre gynécologue ou sage-femme (recommandations françaises). Cependant, à notre connaissance, vous n'avez pas eu la possibilité de réaliser ce frottis.

Aussi, nous vous proposons de réaliser, **à votre domicile, un autre test simple**, qui consiste à **rechercher dans vos urines la présence des Papillomavirus humains (HPV)**, qui sont responsables des lésions du col de l'utérus. La rencontre avec ce virus est très fréquente, le virus est cependant éliminé de l'organisme dans la grande majorité des cas. Toutefois, ce virus peut persister dans l'organisme pendant de nombreuses années et entraîner le développement d'anomalies cellulaires (lésions au frottis) conduisant progressivement à l'apparition du cancer du col de l'utérus.

Ce test est **GRATUIT et pris en charge par le CHU d'Angers**.

Accompagnant cette lettre, vous trouverez dans l'enveloppe :

- 1 flacon de prélèvement
- 1 mode opératoire
- 1 feuille de consentement
- 1 questionnaire sur les motifs de non-réalisation du frottis
- 1 enveloppe à bulle
- 1 enveloppe T avec l'adresse du laboratoire de virologie du CHU d'Angers

Si vous acceptez de participer à ce projet, vous devez :

- **Bien lire** la lettre d'information
- **Signer la feuille de consentement** (une copie vous sera envoyée avec le résultat du test HPV)
- **Remplir le questionnaire**
- **Procéder à un recueil d'urine** : il est souhaitable de réaliser le recueil de vos urines le matin au lever après un lavage des mains. Vous devez remplir le flacon **à moitié** avec **le premier jet de vos urines** (cf mode opératoire joint). **N'oubliez pas de coller l'étiquette sur le flacon de prélèvement et de compléter la date de prélèvement.**
- Une fois le prélèvement réalisé, vous devez mettre le flacon étiqueté dans l'enveloppe à bulle puis insérer l'enveloppe à bulle dans l'enveloppe T avec la feuille de consentement signée et le questionnaire rempli. La lettre T doit être envoyée par voie postale (la déposer dans toute boîte aux lettres ou bureau de poste).

Si vous le souhaitez, après la réalisation du test HPV urinaire, vos échantillons seront conservés au Centre de Ressources Biologiques du CHU d'Angers pour être utilisés dans des projets scientifiques ultérieurs relatifs au diagnostic des infections HPV.

Vous pouvez cependant, à tout moment arrêter votre participation et demander à ce que les échantillons vous concernant soient détruits.

Aspects réglementaires

▪ Les bénéfices attendus

Sur le plan individuel, ce projet vous permettra de bénéficier d'un dépistage sans avoir à réaliser de frottis. Sur le plan collectif, ce projet permettra de montrer, à plus grande échelle, l'intérêt du test HPV urinaire comme alternative au dépistage classique par frottis. Nous souhaitons également confirmer que les méthodes d'auto-prélèvement améliorent l'acceptabilité des femmes au dépistage et notamment chez celles qui sont en situation précaire et qui n'ont pas accès à des consultations de médecins ou de gynécologues.

Le résultat vous sera envoyé ainsi qu'à votre médecin traitant dans un délai d'1 mois après l'envoi de votre prélèvement. Si ce résultat est positif, vous devez prendre contact avec votre médecin traitant ou votre gynécologue qui vous proposera une prise en charge médicale adaptée.

▪ Protection des personnes participant à ce projet

Ce projet sera mené conformément à « La loi de bioéthique du 6 août 2004. ». Notamment : -L'article 1243-3 du CSP relatif à la déclaration des activités de conservation et préparation d'éléments du corps humain. E projet s'inscrit dans une collection biologique déjà autorisée par le ministère de la Recherche (DC – 2011 – 1467/AC – 2012 – 1507)

Le Comité Protection des Personnes (CPP) pour la recherche Angers Ouest II a émis le 16.10.12 un avis favorable à la mise en œuvre de ce projet.

Une assurance spécifique a été souscrite par le CHU d'Angers, gestionnaire de projet, auprès de la SHAM pour couvrir les risques et dommages pouvant en résulter.

Toutes les informations que vous souhaitez obtenir ultérieurement concernant ce projet, ou votre participation vous seront communiquées dans la mesure du possible par le médecin responsable de la recherche, le Dr Ducancelle Alexandra. (☎02-41-35-54-35). Toute nouvelle information disponible au cours de ce projet et pouvant éventuellement modifier votre décision de participation vous sera rapportée.

Si vous l'acceptez, le Dr Ducancelle Alexandra informera votre médecin traitant le Dr(à compléter) de votre participation à ce projet.

Votre consentement ne dégage ni le gestionnaire, ni les médecins associés à la recherche de leurs responsabilités.

▪ Droit de refuser ou de se retirer de ce projet

Votre participation est totalement volontaire et vous êtes libre de refuser de participer ou d'interrompre votre participation, à tout moment sans avoir à vous justifier.

▪ Confidentialité et CNIL

Les données enregistrées au cours de ce projet feront l'objet d'un traitement informatisé. Votre droit d'accès et de rectification, prévu par la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (Loi 78-17, version consolidée au 7 août 2008), pourra s'exercer dans les conditions prévues par la réglementation à tout moment auprès des responsables du projet. Vous pourrez exercer ce droit directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix. »

La base de données associée à ce projet a fait l'objet d'une déclaration à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (N° autorisation 1410571).

Votre participation à ce projet et les données recueillies vous concernant resteront strictement confidentielles. Votre identité ne sera jamais révélée.

Médecin responsable de la recherche

Nom : DUCANCELLE

Prénom : Alexandra

Date : 25.10.2012

Signature



Ce document vous appartient et vous pouvez le communiquer à votre médecin traitant ou à vos proches pour avis

ANNEXE 2 : Questionnaire



ANNEXE 2 : QUESTIONNAIRE

Madame,

Nous vous avons proposé de participer à une étude permettant d'améliorer le dépistage du cancer du col de l'utérus, en vous incitant à deux reprises à vous rendre chez votre médecin traitant ou votre gynécologue pour lui demander la réalisation d'un frottis cervico- utérin.

Pouvez-vous nous indiquer les motifs de vos refus successifs en répondant au questionnaire ci-dessous ?

- Quel est votre âge?
- Connaissez-vous le cancer du col de l'utérus ? ☐ Oui ☐ Non
- Saviez-vous qu'il est recommandé de réaliser un dépistage de ce cancer par un frottis cervico- utérin?
☐ Oui ☐ Non
- Vous avez déjà fait ce frottis:
☐ Oui Date:..... par le Dr
☐ Non
- Si non, pourriez-vous nous indiquer la raison pour laquelle vous n'avez pas fait de frottis à ce jour?
☐ non connu ; ☐ refus ; ☐ non proposé; ☐ jamais de relations sexuelles
☐ opération de l'utérus : ☐ autre.....
- Vous avez refusé à deux reprises l'invitation pour réaliser le frottis cervico-utérin, pouvez-vous cocher le(s) motif (s) de ce refus ?
☐ Vous n'avez pas le temps de vous rendre chez votre médecin traitant ou votre gynécologue
☐ Le délai de rendez-vous chez votre médecin est trop long
☐ Vous pensez que le frottis cervico-utérin est un examen douloureux et vous avez peur
☐ Vous êtes angoissée à l'idée de recevoir un résultat positif pour le frottis cervico-utérin
☐ Vous n'avez jamais eu de rapports sexuels donc vous n'avez aucun risque d'avoir un cancer du col de l'utérus
autre suggestion :

.....
.....
.....

Merci pour votre participation à cette étude,

Dr A. Ducancelle,

**DOCUMENT A INSERER DANS l'enveloppe LETTRE MAX pour
Envoi au laboratoire de virologie du CHU d'ANGERS**

ANNEXE 3 : Consentement à signer par la patiente

NOM du patient : Prénom :
Date de naissance :/...../..... Adresse :

Je suis libre d'accepter ou de refuser de participer à **l'étude d'acceptabilité d'un test HPV urinaire chez les femmes ne souhaitant pas bénéficier du dépistage classique par le frottis cervico-utérin : étude au niveau départemental (Maine-et-Loire).**

Après avoir pris connaissance de la lettre d'information relative à ce projet, je déclare :

1°/ Avoir été informé(e) conformément à la loi N°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique : de la nature du projet de recherche et de ses buts, du fait que mon prélèvement sera analysé pour permettre un dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus, de la proposition de conserver les échantillons de mon prélèvement au CRB du CHU d'Angers pour une durée illimitée, que les données personnelles, associées à mes prélèvements, seront conservées sous forme codée, que mes échantillons peuvent être cédés à d'autres chercheurs dans le même domaine de recherche tout en garantissant la confidentialité de mes données.

2°/ Avoir reçu toutes les réponses souhaitées à mes questions et avoir noté que ma participation à cette recherche est totalement libre. Si je le désire, je pourrai à tout moment arrêter ma participation et demander la destruction de mes échantillons.

3°/ Avoir noté que les données me concernant resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par des personnes qui collaborent à la recherche, désignées par le Dr..... et éventuellement un représentant des Autorités de Santé. A aucun moment les données personnelles n'apparaîtront en cas de publication des résultats des travaux de recherche.

4°/ Avoir été informé (e) conformément à la loi que certaines données nominatives me concernant feront pour ce projet l'objet d'un traitement informatisé en vertu de la loi "Informatique et Libertés" du 6 janvier 1978 modifiée (notamment par la loi n°2004-801 de août 2004). J'ai été informé(e) de la nature des informations transmises, de la finalité du traitement des données, de mon droit d'accès et de rectification par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix, de mon droit de m'opposer au traitement automatisé des données me concernant.

Compte tenu de toutes les informations reçues, j'accepte librement et volontairement :

- DE PARTICIPER A CE PROJET DE RECHERCHE OUI ☐ NON ☐
- QUE MES ECHANTILLONS SOIENT CONSERVES AU CRB DU CHU D'ANGERS OUI ☐ NON ☐
- QUE MES ECHANTILLONS ET LES DONNES ASSOCIEES PUISSENT ETRE CEDES POUR ETRE UTILISES DANS D'AUTRES PROGRAMMES DE RECHERCHE OUI ☐ NON ☐

Le patient participant au projet

Nom :

Date :

Signature



Le médecin responsable de la recherche

Nom : DUCANCELLE.....

Date : Alexandra.....

Signature

ANNEXE 4 : Mode opératoire pour la réalisation du prélèvement urinaire à domicile

Comment réaliser votre prélèvement d'urine ?

Etape 1 : vérifier le contenu de l'enveloppe

1 Lettre T à renvoyer au CHU
1 enveloppe à bulle

CHU Angers
Laboratoire
de virologie

Enveloppes à bulles

1 flacon de prélèvement

1 formulaire de consentement que **vous devez SIGNER**
 1 questionnaire que **vous devez REMPLIR**
 1 lettre d'information que **vous devez LIRE**
 1 étiquette pré-remplie avec vos nom et prénom

Nom Prénom de la patiente pré-remplis
 Adresse pré-remplie

Etape 2 : faire le prélèvement d'urine selon les recommandations suivantes

1 Laver soigneusement vos mains
Remplir le flacon avec le 1^{er} jet de vos urines du matin. Essuyer soigneusement le flacon et bien visser le bouchon.

2 Coller l'étiquette avec vos nom, prénom et date de naissance sur le flacon propre et sec.
Indiquez la date du prélèvement

Nom
Prénom
DN
Date de prélèvement

3 Mettre le FLACON REMPLI **étiqueté** dans l'enveloppe à bulles. Insérer l'enveloppe à bulles dans l'enveloppe T

→

CHU Angers
Laboratoire
de virologie

4 Avant de fermer l'enveloppe T, ne pas oublier de joindre le consentement signé et le questionnaire rempli

5 Adresser le tout au laboratoire de virologie du CHU d'Angers par voie postale

NB : Evitez les envois le dimanche et jour férié. Au besoin, garder le tube d'urine au réfrigérateur avant l'envoi si celui-ci est reporté au lendemain (Si vous souhaitez obtenir des informations complémentaires concernant ce protocole, vous pouvez contacter le laboratoire de virologie du CHU d'Angers au 02.41.35.54.35).

TEST GRATUIT. SVP, ENVOYEZ VOTRE PRELEVEMENT AVANT LE 20/12/12

Bibliographie

1. Eide ML, Debaque H. Méthodes de détection des HPVs et techniques de génotypage dans le dépistage du cancer du col utérin. *Ann Pathol.* déc 2012;32(6):401-409.
2. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 20 juin 2004;324(1):17-27.
3. Alain S, Hantz S, Denis F. Papillomavirus : les virus et la physiopathologie de l'infection. *MT Pédiatrie.* 2010;13(1).
4. Louie K, Didelot M-N, Damay A, Nagot N, Mayaud P, Segondy M. Papillomavirus humains (HPV) et cancers associés : aspects épidémiologiques. *Rev Francoph Lab.* oct 2008;(405):27-34.
5. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis.* 15 oct 2006;194(8):1044-1057.
6. Aubin F, Prétet J-L, Jacquard A-C, Saunier M, Carcopino X, Jaroud F, et al. Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: a Large French National Study (EDiTH IV). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 sept 2008;47(5):610-615.
7. Riethmuller D, Schaal JP, Mougin C. [Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* févr 2002;30(2):139-146.
8. Mougin C, Nicolier M, Decrion-Barthod A-Z. HPV et cancers : mécanismes de l'oncogenèse. *Rev Francoph Lab.* oct 2008;(405):35-42.
9. Denis F, Hantz S, Alain S. [Clearance, persistence and recurrence of HPV infection]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* avr 2008;36(4):430-440.
10. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 9 juin 2001;357(9271):1831-1836.
11. Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, Strickler HD, Coursaget P, Tan T, et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis.* juin 2009;9(6):347-356.
12. Leroy J. Prise en charge des co-morbidités liées au VIH. Les Papillomavirus oncogènes. Prévention du cancer du col de l'utérus. Lille; 2011.
13. Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology.* 20 févr 2009;384(2):410-414.
14. Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM, Berkhof J, Verheijen RHM. HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* avr 2006;20(2):253-266.
15. Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, Wardle J. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine.* 21 août 2006;24, Supplément 3:S90-S97.
16. Hantz S, Alain S, Denis F. Diagnostic des infections à papillomavirus : état des lieux et perspectives. *MT Pédiatrie.* févr 2010;13(1):20-32.
17. Cattani P, Siddu A, D'Onghia S, Marchetti S, Santangelo R, Vellone VG, et al. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* juill 2009;47(7):2136-2141.

18. Données épidémiologiques sur le cancer du col de l'utérus : état des connaissances. Institut de Veille Sanitaire; 2007.
19. Le cancer du col de l'utérus en France : état des lieux 2010. Boulogne-Billancourt: Institut National du Cancer; 2010 juill.
20. Riethmuller D. Papillomavirus humain, lésions précancéreuses et cancer du col de l'utérus. Référence. (1):3-6.
21. Collège national des gynécologues et obstétriciens français. Infections en gynécologie. Masson ; 2002.
22. Brillac T. Conduite à tenir en cas de frottis anormal. Réalités En Gynécologie-Obstétrique. sept 2012;(164).
23. Etat des lieux et recommandations pour le dépistage du cancer du col de l'utérus. Haute Autorité de Santé; 2010 juill.
24. Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* mai 2005;6(5):271-278.
25. Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen O-E, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer.* 4 déc 2006;95(11):1459-1466.
26. Block SL, Nolan T, Sattler C, Barr E, Giacoletti KED, Marchant CD, et al. Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women. *Pediatrics.* nov 2006;118(5):2135-2145.
27. Hantz S, Alain S, Denis F. [Antipapillomavirus vaccination]. *Gastroentérologie Clin Biol.* mai 2008;32(5 Pt 2):S221-230.
28. Le Calendrier des vaccinations et les recommandations vaccinales 2013 selon l'avis du Haut Conseil de la santé publique. *Bull Epidémiologique Hebd.* 19 avr 2013;(14-15):139.
29. Igidbashian S, Boveri S, Spolti N, Radice D, Sandri MT, Sideri M. Self-collected human papillomavirus testing acceptability: comparison of two self-sampling modalities. *J Womens Heal* 2002. mars 2011;20(3):397-402.
30. Dzuba IG, Díaz EY, Allen B, Leonard YF, Lazcano Ponce EC, Shah KV, et al. The acceptability of self-collected samples for HPV testing vs. the pap test as alternatives in cervical cancer screening. *J Womens Health Gend Based Med.* avr 2002;11(3):265-275.
31. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am.* déc 2007;34(4):739-760.
32. Cuzick J, Clavel C, Petry K-U, Meijer CJLM, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1 sept 2006;119(5):1095-1101.
33. Bergeron C, Breugelmans J-G, Bouée S, Lorans C, Bénard S, Rémy V. [Cervical cancer screening and associated treatment costs in France]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* nov 2006;34(11):1036-1042.
34. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJLM, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine.* 31 août 2006;24 Suppl 3:S3/78-89.

35. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol*. janv 2007;104(1):232-246.
36. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med*. 2 avr 2009;360(14):1385-1394.
37. Mayrand M-H, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*. 18 oct 2007;357(16):1579-1588.
38. Huang S, Erickson B, Tang N, Mak W-B, Salituro J, Robinson J, et al. Clinical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal cytology. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. juill 2009;45 Suppl 1:S19-23.
39. Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiri H, Penaranda G, Martineau A, et al. Evaluation of the clinical performance of the Abbott RealTime High-Risk HPV for carcinogenic HPV detection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. août 2010;48(4):246-250.
40. Wong OG-W, Lo CK, Szeto E, Cheung AN-Y. Efficacy of Abbott RealTime High Risk HPV test in evaluation of atypical squamous cells of undetermined significance from an Asian screening population. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. juin 2011;51(2):136-138.
41. Sancho-Garnier H, Tamalet C, Halfon P, Leandri FX, Retraite LL, Djoufelkit K, et al. HPV self-sampling or the Pap-smear: A randomized study among cervical screening nonattenders from lower socioeconomic groups in France. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 déc 2013;133(11):2681-2687.
42. Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A, et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol*. mars 2007;45(3):897-901.
43. Daponte A, Pournaras S, Mademtzis I, Hadjichristodoulou C, Kostopoulou E, Maniatis AN, et al. Evaluation of high-risk human papillomavirus types PCR detection in paired urine and cervical samples of women with abnormal cytology. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. juill 2006;36(3):189-193.
44. Vorsters A, Micalessi I, Bilcke J, Ieven M, Bogers J, Van Damme P. Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. mai 2012;31(5):627-640.
45. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski JA, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, et al. Prevalence of infection with carcinogenic human papillomavirus among older women. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 15 oct 2002;167(8):871-873.
46. Baay MFD, Smits E, Tjalma WAA, Lardon F, Weyler J, Van Royen P, et al. Can cervical cancer screening be stopped at 50? The prevalence of HPV in elderly women. *Int J Cancer J Int Cancer*. 10 janv 2004;108(2):258-261.
47. Kitchener HC, Almonte M, Wheeler P, Desai M, Gilham C, Bailey A, et al. HPV testing in routine cervical screening: cross sectional data from the ARTISTIC trial. *Br J Cancer*. 3 juill 2006;95(1):56-61.
48. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet*. 6 déc 2003;362(9399):1871-1876.
49. Cox JT. Clinical role of HPV testing. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1 déc 1996;23(4):811-851.

50. Meijer CJ, van den Brule AJ, Snijders PJ, Helmerhorst T, Kenemans P, Walboomers JM. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. *IARC Sci Publ.* 1992;(119):271-281.
51. Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 5 sept 2000;163(5):503-508.
52. Giuliano AR, Papenfuss M, Abrahamsen M, Denman C, de Zapien JG, Henze JL, et al. Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border: implications for cervical cancer prevention and control. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* nov 2001;10(11):1129-1136.
53. Cucherousset J, Bory J, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Intérêt du typage HPV dans le dépistage primaire du cancer du col. Une expérience sur une série de 10 569 femmes. *Gynécologie Prat.* 2003;(153):16-18.
54. Boulanger J-C, Sevestre H, Bauville E, Ghighi C, Harlicot J-P, Gondry J. [Epidemiology of HPV infection]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* mars 2004;32(3):218-223.
55. Tamalet C, Le Retraite L, Leandri F-X, Heid P, Sancho Garnier H, Piana L. Vaginal self-sampling is an adequate means of screening HR-HPV types in women not participating in regular cervical cancer screening. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* janv 2013;19(1):E44-50.
56. Tamalet C, Richet H, Carcopino X, Henry M, Leretraite L, Heid P, et al. Testing for human papillomavirus and measurement of viral load of HPV 16 and 18 in self-collected vaginal swabs of women who do not undergo cervical cytological screening in Southern France. *J Med Virol.* août 2010;82(8):1431-1437.
57. Wright TC Jr, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL, et al. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol.* oct 2011;136(4):578-586.
58. Tanzi E, Bianchi S, Fasolo MM, Frati ER, Mazza F, Martinelli M, et al. High performance of a new PCR-based urine assay for HPV-DNA detection and genotyping. *J Med Virol.* janv 2013;85(1):91-98.

Nom – Prénom : REISER Justine

Titre de la thèse : Le test HPV urinaire proposé comme alternative au frottis cervico-utérin : étude pilote dans le département du Maine et Loire

Résumé de la thèse :

Objectif : Actuellement en France, le dépistage du cancer du col de l'utérus repose sur l'examen cytologique d'un frottis cervico-utérin (FCU) chez les femmes âgées de 25 à 65 ans. Malheureusement, le taux de couverture du frottis est insuffisant. Dans le but d'augmenter la couverture de ce dépistage, nous avons mené une étude pilote dans le département du Maine et Loire dont l'objectif était de mesurer l'adhésion des femmes à un test HPV urinaire par rapport au frottis cervico-utérin.

Méthodes : 5000 courriers proposant de faire un prélèvement urinaire pour évaluer une nouvelle méthode de dépistage du cancer du col ont été envoyés à des femmes de 40 à 65 ans réfractaires au FCU. Le prélèvement était analysé par une technique de PCR en temps réel (PCR TR) commercialisée par les laboratoires Abbott (Abbott Real Time High Risk HPV). Cette technique permet la détection des HPV de génotypes 16, 18 et de 12 autres HPV oncogènes (HPV HR).

Résultats : 678 prélèvements ont été analysés. Parmi eux, 29 étaient positifs pour un HPV HR. Les FCU, réalisés chez toutes les femmes dont le test HPV était positif, ont révélé la présence de 3 HSIL dont deux lésions stade CIN3 confirmées.

Conclusion : Notre étude montre l'adhésion plus facile au test HPV urinaire pour les femmes qui refusaient le FCU. Nous avons pu dépister des lésions cervicales de haut grade chez ces femmes qui n'étaient pas suivies régulièrement. Le test HPV urinaire pourrait être une alternative au dépistage classique par frottis ce qui permettrait d'étendre la couverture du dépistage du cancer du col en France.

MOTS CLÉS : ADN HPV, GENOTYPES HPV, PCR TR, FROTTIS CERVICO-UTERIN, TEST HPV URINAIRE, DEPISTAGE DU CANCER DU COL

JURY

PRÉSIDENT : Mme le Pr Virginie FERRE

ASSEESSEURS : Mme le Dr Alexandra DUCANCELLE

Mme le Pr Françoise LUNEL-FABIANI

Mme le Dr Anne-Sophie LE DUC-BANASZUK

Mr le Dr Nicolas PAILLOCHER

Adresse de l'auteur : 49300 Cholet