

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 15 juin 2015  
Par Mlle COCQUET Marie**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Evaluation des performances des trousse de détection des HPV à haut  
risque Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV et vérification de méthodes dans le  
cadre de l'accréditation**

---

**Membres du jury :**

**Président :** **Monsieur le Professeur L. DUBREUIL**  
Professeur des Universités - Praticien hospitalier

**Assesseurs :** **Madame le Professeur K. FAURE**  
Professeur des Universités - Praticien hospitalier  
**Madame le Docteur M. LAZREK**  
Praticien hospitalier  
**Madame le Docteur A. DEWILDE**  
Maitre de Conférences Universitaires - Praticien hospitalier



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE  
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64



### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :  
Vice- présidents :

Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE  
Professeur Alain DUROCHER  
Professeur Régis BORDET  
Professeur Eric KERCKHOVE  
Professeur Eric BOULANGER  
Professeur Frédéric LOBEZ  
Professeur Damien CUNY  
Professeur Benoit DEPREZ  
Professeur Murielle GARCIN  
Monsieur Pierre RAVAUX  
Monsieur Larbi AIT-HENNANI  
Monsieur Antoine HENRY

Directeur Général des Services :

Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :  
Vice-Doyen, 1<sup>er</sup> assesseur :  
Assesseur en charge de la pédagogie  
Assesseur en charge de la recherche  
Assesseur délégué à la scolarité  
Assesseur délégué en charge des  
relations internationales  
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante

Professeur Damien CUNY  
Professeur Bertrand DECAUDIN  
Dr. Annie Standaert  
Pr. Patricia Melnyk  
Dr. Christophe Bochu  
  
Pr. Philippe Chavatte  
M. Thomas Morgenroth

Chef des services administratifs :

Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

| Civ. | NOM          | Prénom    | Laboratoire         |
|------|--------------|-----------|---------------------|
| Mme  | ALLORGE      | Delphine  | Toxicologie         |
| M.   | BROUSSEAU    | Thierry   | Biochimie           |
| Mme  | CAPRON       | Monique   | Immunologie         |
| M.   | DECAUDIN     | Bertrand  | Pharmacie Galénique |
| M.   | DINE         | Thierry   | Pharmacie clinique  |
| M.   | DUBREUIL     | Luc       | Bactériologie       |
| Mme  | DUPONT-PRADO | Annabelle | Hématologie         |
| M.   | DUTHILLEUL   | Patrick   | Hématologie         |
| M.   | GRESSIER     | Bernard   | Pharmacologie       |
| M.   | LUYCKX       | Michel    | Pharmacie clinique  |

|    |         |         |                          |
|----|---------|---------|--------------------------|
| M. | ODOU    | Pascal  | Pharmacie Galénique      |
| M. | DEPREUX | Patrick | Chimie Organique (ICPAL) |

### Liste des Professeurs des Universités

| Civ. | NOM                | Prénom          | Laboratoire                         |
|------|--------------------|-----------------|-------------------------------------|
| M.   | ALIOUAT            | El Moukhtar     | Parasitologie                       |
| Mme  | AZAROUAL           | Nathalie        | Physique                            |
| M.   | BERTHELOT          | Pascal          | Chimie Thérapeutique 1              |
| M.   | CAZIN              | Jean-Louis      | Pharmacologie – Pharmacie clinique  |
| M.   | CHAVATTE           | Philippe        | Chimie Thérapeutique 2              |
| M.   | COURTECUISSÉ       | Régis           | Sciences végétales et fongiques     |
| M.   | CUNY               | Damien          | Sciences végétales et fongiques     |
| Mme  | DELBAERE           | Stéphanie       | Physique                            |
| M.   | DEPREZ             | Benoît          | Chimie Générale                     |
| Mme  | DEPREZ             | Rebecca         | Chimie Générale                     |
| M.   | DUPONT             | Frédéric        | Sciences végétales et fongiques     |
| M.   | DURIEZ             | Patrick         | Physiologie                         |
| M.   | GARÇON             | Guillaume       | Toxicologie                         |
| Mme  | GAYOT              | Anne            | Pharmacotechnie Industrielle        |
| M.   | GESQUIERE          | Jean-Claude     | Chimie Organique                    |
| M.   | GOOSSENS           | Jean François   | Chimie Analytique                   |
| Mme  | GRAS               | Hélène          | Chimie Thérapeutique 3              |
| M.   | HENNEBELLE         | Thierry         | Pharmacognosie                      |
| M.   | LEMDANI            | Mohamed         | Biomathématiques                    |
| Mme  | LESTAVEL           | Sophie          | Biologie Cellulaire                 |
| M.   | LUC                | Gerald          | Physiologie                         |
| Mme  | MELNYK             | Patricia        | Chimie thérapeutique 2              |
| Mme  | MUHR – TAILLEUX    | Anne            | Biochimie                           |
| Mme  | PAUMELLE-LESTRELIN | Réjane          | Biologie Cellulaire                 |
| Mme  | PERROY – MAILLOLS  | Anne Catherine  | Droit et déontologie pharmaceutique |
| Mme  | ROMOND             | Marie Bénédicte | Bactériologie                       |
| Mme  | SAHPAZ             | Sevser          | Pharmacognosie                      |
| M.   | SERGHÉRAERT        | Eric            | Droit et déontologie pharmaceutique |
| M.   | SIEPMANN           | Juergen         | Pharmacotechnie Industrielle        |
| M.   | STAELS             | Bart            | Biologie Cellulaire                 |
| M    | TARTAR             | André           | Chimie Organique                    |
| M.   | VACCHER            | Claude          | Chimie Analytique                   |
| M.   | WILLAND            | Nicolas         | Chimie organique                    |
| M.   | MILLET             | Régis           | Chimie Thérapeutique (ICPAL)        |

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

| Civ. | NOM      | Prénom          | Laboratoire         |
|------|----------|-----------------|---------------------|
| Mme  | BALDUYCK | Malika          | Biochimie           |
| Mme  | GARAT    | Anne            | Toxicologie         |
| Mme  | GOFFARD  | Anne            | Bactériologie       |
| M.   | LANNOY   | Damien          | Pharmacie Galénique |
| Mme  | ODOU     | Marie Françoise | Bactériologie       |
| M.   | SIMON    | Nicolas         | Pharmacie Galénique |

## Liste des Maitres de Conférences

| Civ. | NOM               | Prénom           | Laboratoire                     |
|------|-------------------|------------------|---------------------------------|
| Mme  | AGOURIDAS         | Laurence         | Chimie thérapeutique 2          |
| Mme  | ALIOUAT           | Cécile Marie     | Parasitologie (90%)             |
| M.   | ANTHERIEU         | Sébastien        | Toxicologie                     |
| Mme  | AUMERCIER         | Pierrette        | Biochimie                       |
| Mme  | BANTUBUNGI        | Kadiombo         | Biologie cellulaire             |
| Mme  | BARTHELEMY        | Christine        | Pharmacie Galénique             |
| Mme  | BEHRA             | Josette          | Bactériologie                   |
| M    | BELARBI           | Karim            | Pharmacologie                   |
| M.   | BERTHET           | Jérôme           | Physique                        |
| M.   | BERTIN            | Benjamin         | Immunologie                     |
| M.   | BLANCHEMAIN       | Nicolas          | Pharmacotechnie industrielle    |
| M.   | BOCHU             | Christophe       | Physique                        |
| M.   | BRIAND            | Olivier          | Biochimie                       |
| Mme  | CACHERA           | Claude           | Biochimie                       |
| M.   | CARNOY            | Christophe       | Immunologie                     |
| Mme  | CARON             | Sandrine         | Biologie cellulaire (80%)       |
| Mme  | CHABÉ             | Magali           | Parasitologie (80%)             |
| Mme  | CHARTON           | Julie            | Chimie Organique (80%)          |
| M    | CHEVALIER         | Dany             | Toxicologie                     |
| M.   | COCHELARD         | Dominique        | Biomathématiques                |
| Mme  | DANEL             | Cécile           | Chimie Analytique               |
| Mme  | DEMANCHE          | Christine        | Parasitologie (80%)             |
| Mme  | DEMARQUILLY       | Catherine        | Biomathématiques                |
| Mme  | DUMONT            | Julie            | Biologie cellulaire             |
| M.   | FARCE             | Amaury           | Chimie Thérapeutique 2          |
| Mme  | FLIPO             | Marion           | Chimie Organique                |
| Mme  | FOULON            | Catherine        | Chimie Analytique               |
| M.   | GELEZ             | Philippe         | Biomathématiques                |
| M.   | GERVOIS           | Philippe         | Biochimie                       |
| Mme  | GRAVE             | Béatrice         | Toxicologie                     |
| Mme  | GROSS             | Barbara          | Biochimie                       |
| Mme  | HAMOUDI           | Chérifa Mounira  | Pharmacotechnie industrielle    |
| Mme  | HANNOTHIAUX       | Marie-Hélène     | Toxicologie                     |
| Mme  | HELLEBOID         | Audrey           | Physiologie                     |
| M.   | HERMANN           | Emmanuel         | Immunologie                     |
| Mme  | HOUSSIN-THUILLIER | Pascale          | Hématologie                     |
| M.   | KAMBIA            | Kpakpaga Nicolas | Pharmacologie                   |
| M.   | KARROUT           | Youness          | Pharmacotechnie Industrielle    |
| Mme  | LALLOYER          | Fanny            | Biochimie                       |
| M.   | LEBEGUE           | Nicolas          | Chimie thérapeutique 1          |
| Mme  | LECOEUR           | Marie            | Chimie Analytique               |
| Mme  | LIPKA             | Emmanuelle       | Chimie Analytique               |
| Mme  | MARTIN            | Françoise        | Physiologie                     |
| M.   | MOREAU            | Pierre Arthur    | Sciences végétales et fongiques |
| Mme  | MUSCHERT          | Susanne          | Pharmacotechnie industrielle    |
| Mme  | NEUT              | Christel         | Bactériologie                   |
| Mme  | NIKASINOVIC       | Lydia            | Toxicologie                     |
| Mme  | PINÇON            | Claire           | Biomathématiques                |
| M.   | PIVA              | Frank            | Biochimie                       |
| Mme  | PLATEL            | Anne             | Toxicologie                     |
| M.   | RAVAUX            | Pierre           | Biomathématiques                |
| Mme  | RIVIERE           | Céline           | Pharmacognosie                  |
| Mme  | ROGER             | Nadine           | Immunologie                     |

|     |           |            |                                 |
|-----|-----------|------------|---------------------------------|
| M.  | ROUMY     | Vincent    | Pharmacognosie                  |
| Mme | SEBTI     | Yasmine    | Biochimie                       |
| Mme | SIEPMANN  | Florence   | Pharmacotechnie Industrielle    |
| Mme | SINGER    | Elisabeth  | Bactériologie                   |
| Mme | STANDAERT | Annie      | Parasitologie                   |
| M.  | TAGZIRT   | Madjid     | Hématologie                     |
| M.  | WELTI     | Stéphane   | Sciences végétales et fongiques |
| M.  | YOUS      | Saïd       | Chimie Thérapeutique 1          |
| M.  | ZITOUNI   | Djamel     | Biomathématiques                |
| M.  | FURMAN    | Christophe | Pharmacobiochimie (ICPAL)       |
| Mme | GOOSSENS  | Laurence   | Chimie Organique (ICPAL)        |

### Professeurs Agrégés

| Civ. | NOM        | Prénom  | Laboratoire                         |
|------|------------|---------|-------------------------------------|
| Mme  | MAYES      | Martine | Anglais                             |
| M.   | MORGENROTH | Thomas  | Droit et déontologie pharmaceutique |

### Professeurs Certifiés

| Civ. | NOM      | Prénom    | Laboratoire |
|------|----------|-----------|-------------|
| M.   | HUGES    | Dominique | Anglais     |
| Mlle | FAUQUANT | Soline    | Anglais     |
| M.   | OSTYN    | Gaël      | Anglais     |

### Professeur Associé - mi-temps

| Civ. | NOM     | Prénom | Laboratoire                         |
|------|---------|--------|-------------------------------------|
| M.   | DHANANI | Alban  | Droit et déontologie pharmaceutique |

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

| Civ. | NOM       | Prénom    | Laboratoire                              |
|------|-----------|-----------|------------------------------------------|
| Mme  | BERTOUX   | Elisabeth | Pharmacie Clinique -<br>Biomathématiques |
| M.   | BRICOTEAU | Didier    | Biomathématiques                         |
| M.   | FIEVET    | Pierre    | Information Médicale                     |
| M.   | FRIMAT    | Bruno     | Pharmacie Clinique                       |
| M.   | MASCAUT   | Daniel    | Pharmacie Clinique                       |
| M.   | WATRELOS  | Michel    | Droit et déontologie pharmaceutique      |
| M.   | ZANETTI   | Sébastien | Biomathématiques                         |

### AHU

| Civ. | NOM    | Prénom    | Laboratoire         |
|------|--------|-----------|---------------------|
| Mme  | DROUET | Maryline  | Pharmacie Galénique |
| Mme  | GENAY  | Stéphanie | Pharmacie Galénique |

## ***Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

# **Remerciements**

**Au Président du jury :**

**Monsieur le Professeur Luc DUBREUIL**

Professeur de Microbiologie à l'Université de Lille 2

Praticien Hospitalier, Service des Maladies Infectieuses, CH de Tourcoing

Doyen honoraire de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

Officier des Palmes Académiques

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury.  
Soyez assuré de ma plus haute considération et de tous mes remerciements.

**A mes assesseurs :**

**Madame le Professeur Karine FAURE**

Professeur des Universités en Maladies Infectieuses et Tropicales, Faculté de Médecine Henri

Warembourg, Université de Lille 2

Praticien Hospitalier, Service de gestion du Risque Infectieux et des Vigilances,

Unité de Maladies Infectieuses, Hôpital Claude Huriez, CHRU de Lille

Je suis particulièrement honorée de votre présence dans ce jury de thèse, merci pour l'intérêt  
que vous avez pu porter à ce travail.

Merci pour le regard clinique que vous avez apporté à cette thèse.

Soyez assurée de mes sincères remerciements et de mon profond respect.



**A mes assesseurs :**

**Madame le Docteur Mouna LAZREK**

Praticien Hospitalier, Laboratoire de Virologie, CHRU de Lille

Un grand merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour l'aide que vous m'avez apportée dans ce travail.

Merci pour les connaissances que vous m'avez transmises pendant ce semestre au laboratoire, j'ai pris un réel plaisir à travailler avec vous.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

**A ma Directrice de thèse :**

**Madame le Docteur Anny DEWILDE**

Maître de Conférences Universitaires en Virologie, Faculté de Médecine Henri Warembourg,

Université de Lille 2

Praticien Hospitalier, Laboratoire de Virologie, CHRU de Lille

Vous m'avez fait l'immense honneur de me confier et d'encadrer ce travail, merci pour la confiance que vous m'avez accordée.

Merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos corrections et vos conseils qui ont contribué à l'amélioration de ce manuscrit. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Merci pour la formation que j'ai pu recevoir tout au long de ce semestre.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de toute mon estime.

**A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse :**

Merci à toute l'équipe de techniciens de Virologie pour votre aide et pour la bonne ambiance dans laquelle j'ai pu effectuer mes manipulations.

Merci à Kazali, « expert HPV », avec qui j'ai eu la chance de partager le bureau pendant 6 mois. Merci de m'avoir fait part de tes connaissances, merci pour tes conseils, ta joie de vivre, tes chemises colorées et ta sympathie.

Merci à toutes les équipes des laboratoires où j'ai été formée : CH de Rouen, CH de Lille, CH d'Arras, Hôpital Saint-Philibert et CH de Valenciennes.

Je remercie également le Professeur Gérard Forzy pour l'analyse statistique de ces résultats

**Je dédie cette thèse :**

A toute ma famille, merci pour votre soutien tout au long de ces années. Un merci tout particulier à mes parents et à mes sœurs, vous avez toujours cru en moi et vous m'avez donné les moyens d'arriver jusqu'ici, je ne vous remercierai jamais assez.

A mes co-internes, Anaïs, Haciba, Caroline, Marie, Sandra, Fanny, Mathilde, Camille, Audrey, Damien et tous les autres, avec qui j'ai passé de bons moments aussi bien en stage qu'autour d'un petit Tariquet.

A mes deux belles rencontres rouennaises Céline et Dany que je n'oublie pas.

A mes amies de fac, Lisette, Juju, Pau, Mathilde, Morgane et mon binôme de choc Stéphanie, qui avait déjà prédit mon avenir dans les laboratoires. Merci à toutes pour ces bons souvenirs.

A mes amies de longue date : Elise, ma BanAna, Julie & Julie et à mes 4 coloc' successives : Inès, Juju, Macc et Adé. Merci pour ces bons moments passés à vos côtés, je suis heureuse de voir que ces amitiés perdurent.

Un merci tout particulier à mon acolyte, Adé, tu m'as toujours soutenue et encouragée. Tu as aussi réussi à me supporter cette année, je t'en félicite.

# SOMMAIRE

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| SOMMAIRE .....                                               | 11 |
| TABLE DES FIGURES.....                                       | 14 |
| TABLE DES TABLEAUX.....                                      | 15 |
| INTRODUCTION.....                                            | 16 |
| I. Généralités.....                                          | 17 |
| A) Classification des HPV.....                               | 17 |
| B) Structure et réplication .....                            | 19 |
| C) Epidémiologie .....                                       | 21 |
| II. Physiopathologie.....                                    | 23 |
| A) Contamination .....                                       | 23 |
| B) Mécanisme d'apparition du cancer.....                     | 24 |
| C) Facteurs de risque.....                                   | 26 |
| 1) Les facteurs exogènes.....                                | 27 |
| 2) Les cofacteurs viraux.....                                | 27 |
| 3) Les cofacteurs liés à l'hôte .....                        | 27 |
| D) HPV et VIH.....                                           | 27 |
| III. Manifestations cliniques.....                           | 29 |
| A) Lésions cutanées.....                                     | 29 |
| 1) Lésions cutanées bénignes.....                            | 29 |
| 2) Lésions cutanées malignes .....                           | 30 |
| B) Epidermodysplasie verruciforme.....                       | 30 |
| C) Lésions cutanéomuqueuses orales.....                      | 30 |
| D) Lésions cutanéomuqueuses de la sphère ano-génitale.....   | 31 |
| 1) Lésions bénignes .....                                    | 31 |
| 2) Lésions malignes .....                                    | 32 |
| IV. Méthodes diagnostiques .....                             | 33 |
| A) Indications .....                                         | 33 |
| B) Prélèvement .....                                         | 33 |
| C) Le diagnostic anatomopathologique.....                    | 34 |
| D) Le diagnostic virologique.....                            | 35 |
| 1) Méthodes de détection de l'ADN des HPV.....               | 36 |
| 2) Détection des ARNm E6 et E7.....                          | 39 |
| 3) Génotypage des HPV .....                                  | 40 |
| 4) Techniques de détection quantitative de l'ADN d'HPV ..... | 43 |
| E) Cytologie ou test HPV ?.....                              | 43 |
| V. Prévention et prise en charge.....                        | 44 |

|                            |                                                                                                               |    |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A)                         | Prévention primaire : la vaccination.....                                                                     | 44 |
| B)                         | Prévention secondaire : le dépistage.....                                                                     | 46 |
| C)                         | Prévention tertiaire : le traitement .....                                                                    | 46 |
| D)                         | Surveillance post thérapeutique.....                                                                          | 47 |
| OBJECTIFS DU TRAVAIL ..... |                                                                                                               | 48 |
| MATERIEL & METHODES .....  |                                                                                                               | 49 |
| I.                         | Milieus de prélèvement.....                                                                                   | 49 |
| II.                        | Echantillons biologiques et contrôles de qualité .....                                                        | 50 |
| A)                         | Echantillons biologiques .....                                                                                | 50 |
| B)                         | Contrôles de qualité.....                                                                                     | 50 |
| 1)                         | Les contrôles AcroMetrix®.....                                                                                | 51 |
| 2)                         | Les QCMD : Quality Control for Molecular Diagnostics .....                                                    | 51 |
| III.                       | Techniques Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV.....                                                                 | 52 |
| A)                         | Préanalytique .....                                                                                           | 52 |
| 1)                         | Technique Cobas® 4800 HPV .....                                                                               | 52 |
| 2)                         | Technique Xpert® HPV .....                                                                                    | 52 |
| B)                         | Extraction et Amplification .....                                                                             | 53 |
| 1)                         | Technique Cobas® 4800 HPV .....                                                                               | 53 |
| 2)                         | Technique Xpert® HPV .....                                                                                    | 54 |
| C)                         | Temps de réalisation des analyses .....                                                                       | 55 |
| 1)                         | Technique Cobas® 4800 HPV .....                                                                               | 55 |
| 2)                         | Technique Xpert® HPV .....                                                                                    | 56 |
| D)                         | Traçabilité.....                                                                                              | 57 |
| E)                         | Interprétation des courbes de fluorescence.....                                                               | 57 |
| 1)                         | Technique Cobas® 4800 HPV .....                                                                               | 57 |
| 2)                         | Technique Xpert® HPV .....                                                                                    | 59 |
| IV.                        | Evaluation des performances analytiques des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV pour différents milieux ..... | 60 |
| A)                         | Détermination de la limite de détection.....                                                                  | 60 |
| B)                         | Répétabilité.....                                                                                             | 61 |
| C)                         | Fidélité intermédiaire .....                                                                                  | 62 |
| D)                         | Stabilité.....                                                                                                | 62 |
| V.                         | Comparaison des tests Cobas® 4800 HPV (Roche) et Xpert® HPV (Cepheid) .....                                   | 64 |
| A)                         | Choix des échantillons.....                                                                                   | 64 |
| B)                         | Comparaison des résultats .....                                                                               | 64 |
| C)                         | Corrélation entre les Ct des deux techniques pour HPV 16 .....                                                | 65 |
| D)                         | Analyse des discordances .....                                                                                | 65 |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESULTATS .....                                                                                                  | 66 |
| I. Evaluation des performances analytiques des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV pour différents milieux ..... | 66 |
| A) Détermination de la limite de détection.....                                                                  | 66 |
| B) Répétabilité.....                                                                                             | 69 |
| C) Fidélité intermédiaire .....                                                                                  | 70 |
| D) Stabilité.....                                                                                                | 71 |
| E) Résultats des QCMD.....                                                                                       | 72 |
| II. Comparaison des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV .....                                                    | 73 |
| A) Comparaison des résultats .....                                                                               | 73 |
| 1) Résultat global.....                                                                                          | 75 |
| 2) Concordance sur l' HPV 16.....                                                                                | 76 |
| 3) Concordance sur les géotypes d'HPV à HR autres que HPV 16.....                                                | 76 |
| B) Corrélation entre les Ct des deux techniques pour HPV 16 .....                                                | 77 |
| C) Analyse des discordances .....                                                                                | 77 |
| 1) Discordances sur l'HPV 16 .....                                                                               | 78 |
| 2) Discordances sur les géotypes d'HPV HR autres que HPV 16.....                                                 | 79 |
| DISCUSSION .....                                                                                                 | 81 |
| I. Evaluation des performances analytiques des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV pour différents milieux ..... | 82 |
| A) Détermination de la limite de détection.....                                                                  | 82 |
| 1) Test Cobas® 4800 HPV .....                                                                                    | 82 |
| 2) Test Xpert® HPV .....                                                                                         | 83 |
| B) Répétabilité.....                                                                                             | 83 |
| C) Fidélité intermédiaire .....                                                                                  | 84 |
| D) Stabilité.....                                                                                                | 84 |
| E) Résultats des QCMD.....                                                                                       | 84 |
| II. Comparaison des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV .....                                                    | 85 |
| 1) Meilleure sensibilité du test Cobas® ?.....                                                                   | 85 |
| 2) Faux positifs avec le test Cobas® ?.....                                                                      | 86 |
| 3) Pertinence clinique .....                                                                                     | 87 |
| III. Praticabilité des tests .....                                                                               | 90 |
| A) Temps de réalisation.....                                                                                     | 90 |
| B) Traçabilité.....                                                                                              | 90 |
| C) Validation des résultats .....                                                                                | 90 |
| D) Coût.....                                                                                                     | 91 |
| CONCLUSION .....                                                                                                 | 92 |
| ANNEXES .....                                                                                                    | 93 |
| BIBLIOGRAPHIE .....                                                                                              | 99 |

# TABLE DES FIGURES

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Représentation schématique du génome des HPV (7) .....                                                                      | 19 |
| Figure 2 : Cycle de multiplication des papillomavirus (9) .....                                                                        | 20 |
| Figure 3 : Incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde en 2012 (14) .....                                                     | 21 |
| Figure 4 : Histoire naturelle de l'infection HPV et du cancer du col de l'utérus (5).....                                              | 24 |
| Figure 5 : Coopération des protéines E6, E7 et E5 des HPV muqueux génitaux dans la persistance virale et l'oncogenèse virale (3) ..... | 26 |
| Figure 6 : a) Verrue commune b) Verrue plane d'un genou c) Verrue filiforme chez un transplanté ...                                    | 29 |
| Figure 7 : Verrue génitale chez une petite fille (2).....                                                                              | 31 |
| Figure 8 : Condylome acuminé d'un pénis (2).....                                                                                       | 31 |
| Figure 9 : Verrues anales chez un adulte (2) .....                                                                                     | 31 |
| Figure 10 : Caractéristiques des kits de détection de l'ADN d'HPV commercialisés en France (56) ...                                    | 36 |
| Figure 11 : Principales étapes de la technique Hybrid Capture 2 (51) .....                                                             | 37 |
| Figure 12 : Principe de la PCR en temps réel (52) .....                                                                                | 39 |
| Figure 13 : Principe de la technique INNO-Lipa .....                                                                                   | 42 |
| Figure 14 : Schéma français de la vaccination HPV 2014 (67).....                                                                       | 44 |
| Figure 15 : Caractéristiques des 3 vaccins HPV : Cervarix, Gardasil et Gardasil 9 (75).....                                            | 46 |
| Figure 16 : Structure du Cidofovir (78).....                                                                                           | 47 |
| Figure 17 : Milieux de transport et de conservation Preservcyt®, Easyfix®, Novaprep® et Cobas®                                         | 49 |
| Figure 18 : Cartouche GenXpert® HPV .....                                                                                              | 52 |
| Figure 19 : Automate Cobas® 4800 de Roche (de gauche à droite : modules x 480 et z 480).....                                           | 53 |
| Figure 20 : Automate GenXpert® de Cepheid.....                                                                                         | 55 |
| Figure 21 : Représentation schématique du temps d'analyse du test Cobas® 4800 HPV .....                                                | 56 |
| Figure 22 : Courbe de fluorescence de la détection des HPV à HR des témoins positif et négatif par la technique Roche .....            | 57 |
| Figure 23 : Résultats de la PCR Cobas® 4800 HPV.....                                                                                   | 58 |
| Figure 24 : Résultats de la PCR Xpert® HPV de Cepheid .....                                                                            | 59 |
| Figure 25 : Corrélation entre les Ct obtenus par les tests Roche et Cepheid pour la détection d'HPV                                    | 16 |
| .....                                                                                                                                  | 77 |

# TABLE DES TABLEAUX

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Classification des différents géotypes d'HPV en fonction de la localisation de leurs lésions (4).....                            | 18 |
| Tableau 2 : Répartition des HPV à tropisme muqueux selon leur pouvoir oncogène (5).....                                                      | 18 |
| Tableau 3 : Concentrations utilisées pour les bas et hauts niveaux.....                                                                      | 61 |
| Tableau 4 : Détermination des limites de détection de la technique Roche pour HPV 16.....                                                    | 66 |
| Tableau 5 : Détermination des limites de détection de la technique Roche pour HPV 18.....                                                    | 67 |
| Tableau 6 : Détermination des limites de détection de la technique Roche pour HPV 68.....                                                    | 67 |
| Tableau 7 : Détermination des limites de détection de la technique Cepheid pour HPV 68.....                                                  | 68 |
| Tableau 8 : Récapitulatif des valeurs des LOD des techniques Roche et Cepheid pour différents milieux.....                                   | 68 |
| Tableau 9 : Détermination de la répétabilité des techniques Roche et Cepheid pour HPV 68 dans les différents milieux.....                    | 69 |
| Tableau 10: Détermination de la fidélité intermédiaire des techniques Roche et Cepheid pour HPV 68 dans les différents milieux.....          | 70 |
| Tableau 11 : Etude de la stabilité des milieux par la comparaison des Ct.....                                                                | 71 |
| Tableau 12 : Résultats des QCMD.....                                                                                                         | 72 |
| Tableau 13 : Comparaison des résultats des tests Cobas® 4800 HPV Roche et Xpert® HPV Cepheid pour les échantillons Preservcyt® positifs..... | 74 |
| Tableau 14 : Comparaison des résultats des tests Cobas® 4800 HPV Roche et Xpert® HPV Cepheid pour les échantillons Novaprep positifs.....    | 75 |
| Tableau 15 : Comparaison des techniques Roche et Cepheid - présence ou non d'HPV HR.....                                                     | 75 |
| Tableau 16: Concordance des résultats de la détection d'HPV 16.....                                                                          | 76 |
| Tableau 17: Concordance des résultats de la détection d'HPV HR autres que HPV 16.....                                                        | 76 |
| Tableau 18 : Comparaison des techniques Roche et Cepheid – Analyse des DISCORDANCES.....                                                     | 78 |



# INTRODUCTION

Le virus du papillome humain (HPV) est un virus ubiquitaire à l'origine d'infections de la peau et des muqueuses. Certains génotypes d'HPV sont à l'origine des cancers du col de l'utérus et de ses lésions précurseurs : ce sont les HPV dits « à haut risque », ils sont retrouvés dans la quasi-totalité des cancers du col utérin.

En France, le dépistage de ce cancer par la réalisation de frottis cervico-utérins réguliers est recommandé pour les femmes de 25 à 65 ans. Ces prélèvements sont envoyés pour analyse cytologique au laboratoire d'anatomopathologie, les frottis présentant des cellules atypiques (de type ASC-US) doivent faire l'objet d'une recherche d'HPV à haut risque. La détection de ces HPV est également préconisée dans les suivis de patientes traitées. Le prélèvement de cellules au niveau du col de l'utérus peut se faire dans différents milieux de transport et de conservation. Le milieu de référence est le Preservcyt®. Le virus HPV ne poussant pas en culture conventionnelle, et la sérologie étant incertaine, la recherche d'HPV à haut risque est réalisée par biologie moléculaire. Plusieurs techniques de PCR en temps réel existent.

Dans le contexte actuel d'accréditation, les techniques automatisées sont très prisées car elles permettent de faciliter les vérifications de méthode et assurent une excellente traçabilité, élément indispensable pour satisfaire les exigences qualité. Au laboratoire de virologie du CHRU de Lille, le système Cobas® 4800 de Roche, déjà utilisé pour la détection du génome de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Chlamydia trachomatis*, est utilisé en routine pour la détection des HPV à haut risque. Une nouvelle trousse l'Xpert® HPV de Cepheid vient de paraître sur le marché. Ce sont toutes deux des PCR multiplex qualitatives en temps réel et automatisées ; elles permettent de détecter la présence de 14 génotypes d'HPV à haut risque. Ce sont ces deux méthodes que nous avons testées dans cette étude.

# I. Généralités

## A) Classification des HPV

Les papillomavirus appartiennent à la famille des Papillomaviridae. Ils peuvent infecter diverses espèces d'oiseaux et de mammifères dont les chats, les chiens, le bétail, les lapins, etc., mais aussi l'Homme, on les désigne alors par le sigle HPV (*Human PapillomaVirus*).

La classification des HPV est basée sur les similarités des séquences nucléotidiques de leur génome (notamment de la séquence du gène L1 qui code pour la protéine majeure de la capsid virale) (1). On connaît actuellement plus de 200 génotypes dont 120 ont été séquencés (2). Ils se répartissent dans 5 genres : les HPV  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  et  $\nu$ . Au sein des genres (définis par un degré d'homologie inférieur à 60% de la séquence L1), on distingue des espèces (60 à 70% d'homologie) et des types (71 à 89% d'homologie, soit au moins 10 % de divergence). Au sein des types existent des variants qui ne peuvent différer des autres virus du même type que par une ou quelques paires de bases (moins de 2% de divergences) (3). Le taux de mutations des papillomavirus est faible par rapport aux virus à ARN. En effet, les ADN polymérase ont la capacité de relire la séquence et de corriger les erreurs (activité exonucléasique) (1).

Les HPV ont un tropisme pour les épithéliums malpighiens comme ceux qui constituent la peau et les muqueuses. Ces virus sont à l'origine aussi bien d'infections cutanéomuqueuses bénignes que de pathologies malignes, comme le cancer du col de l'utérus. Chaque génotype d' HPV aura tendance à infecter un ou plusieurs sites anatomiques en particulier, même si un HPV qui se loge fréquemment au niveau génital pourra être retrouvé au niveau de la peau et vice versa. La localisation des différents génotypes est résumée dans le tableau 1 (4).

**TABLE 1: Classification of HPV types into cutaneous, mucosal (genital), cutaneous and / or mucosal and cutaneous associated with epidermodysplasia verruciformis according to the location of the lesion that it most often causes**

| Location                                                  | HPV types                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cutaneous                                                 | 1, 4, 41, 48, 60, 63, 65, 76, 77, 88, 95                                                                                                                      |
| Mucosal                                                   | 6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 89 |
| Cutaneous and/or mucosal                                  | 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62, 78, 91, 94, 101, 103                                                                                             |
| Cutaneous associated with Epidermodysplasia Verruciformis | 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20/46*, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 50, 80, 75, 92, 93, 96, 107                                                      |

\* HPV 46 is a subtype of HPV 20  
DE VILLIERS modified TABLE, 2004

**Tableau 1 : Classification des différents génotypes d’HPV en fonction de la localisation de leurs lésions (4)**

Une quarantaine de génotypes ont un tropisme ano-génital, ils sont classés suivant leur pouvoir oncogène (Tableau 2) (5).

| Classification       | Types                                                  |
|----------------------|--------------------------------------------------------|
| Haut risque          | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59         |
| Haut risque probable | 26, 53, 66, 68, 73, 82                                 |
| Bas risque           | 6, 11, 13, 40, 42, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89          |
| Risque indéterminé*  | 30, 32, 34, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90 |

\*Peuvent être considérés comme à bas risque, mais données insuffisantes.

**Tableau 2 : Répartition des HPV à tropisme muqueux selon leur pouvoir oncogène (5)**

Les HPV à haut risque oncogène (HPV HR) sont associés au développement de lésions de haut grade (H-SIL) et au cancer du col de l’utérus. Les HPV à bas risque (HPV BR) sont responsables de condylomes et de lésions de bas grade (L-SIL) qui, dans la plupart des cas, régressent spontanément. HPV 16 possède un pouvoir oncogène majeur, il est retrouvé dans plus de la moitié des cancers utérins, vient ensuite HPV 18. A eux deux ils sont à l’origine de 70% des cancers du col de l’utérus (6).

## B) Structure et réplication

Les HPV sont de petits virus nus (50 à 55 nm), à capsidie icosaédrique constituée de 72 capsomères. Ce sont des virus très résistants dans le milieu extérieur, à la dessiccation et à la congélation, ce qui facilite leur transmission. Leur génome est composé d'un ADN circulaire bicaténaire de 8000 pdb, dont un seul brin est codant. La structure du génome est identique pour tous les papillomavirus et est composée d'une région précoce E (Early), d'une région tardive L (Late) et d'une région de régulation appelée LCR (Locus Control Region) (Figure1) (7).

- La région précoce E, comprend 6 à 7 gènes nommés E1 à E8 codant des protéines de régulation précoces. Les protéines E1 (hélicase) et E2 sont responsables de la réplication du virus, E2 de la transcription, E4 permet la maturation et la libération des particules virales. Les protéines E5, E6 et E7 sont impliquées dans la prolifération et la transformation cellulaire. Une protéine E8 est codée par certains HPV génitaux (3).

- La région L quant à elle code pour les protéines de capsidie : L1 protéine majeure et L2 protéine mineure. La protéine L1 est la plus abondante (80% des protéines de capsidie) et est très immunogène. Ensemble elles permettent l'incorporation de l'ADN du virus dans le virion (4).

- La région LCR (Long Control Region), encore appelée URR (Upstream Regulatory Region) relie L1 et E6 et joue un rôle dans l'expression des gènes et dans la réplication virale. Elle n'est en général pas bien conservée (4).

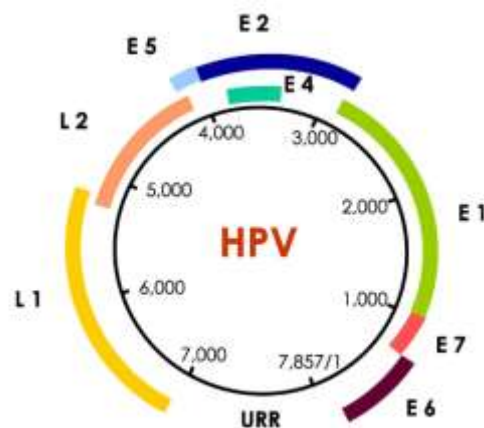


Fig. 1. Schematic presentation of the HPV genome showing the arrangement of the early E or nonstructural genes, the capsid genes (L1 and L2) and the upstream regulatory region (URR).

**Figure 1 : Représentation schématique du génome des HPV (7)**

Comme tous les virus, les HPV sont obligatoirement intracellulaires, ils doivent libérer leur génome et leurs protéines accessoires dans la cellule hôte. Ils pourront ensuite se répliquer en utilisant la machinerie enzymatique de celle-ci (8).

Les HPV pénètrent l'épithélium malpighien au niveau de la jonction endocol/exocol à la faveur d'une microlésion. Ils vont ainsi infecter les cellules de la couche basale, siège du renouvellement de l'épithélium. Le cycle de multiplication des HPV dépend de l'état de différenciation des cellules. Le virus est internalisé via des récepteurs cellulaires. Cette entrée est complexe et plusieurs récepteurs ont été décrits (8). La particule virale est ensuite désassemblée afin de permettre l'entrée du génome dans le noyau cellulaire par endocytose.

Le virus se réplique indépendamment du génome de la cellule sous forme d'épisome, alors que dans les premières phases d'évolution vers le cancer, on observe l'intégration du génome d'HPV dans le génome cellulaire. Dans les cellules basales et suprabasales le taux d'HPV est maintenu à un taux de 50 à 100 de copies. Les protéines de la capsid ne sont synthétisées que dans les couches plus différenciées, à savoir les couches supérieures des kératinocytes où les régions tardives L1 et L2 s'expriment. Les particules virales vont s'assembler dans les couches superficielles de l'épithélium et le virus va profiter de l'apoptose naturelle de la cellule pour les libérer (3) (Figure 2 (9)). Cette libération se fait dans la lumière et dans le mucus du col de l'utérus, les virus pourront alors réinfecter l'individu ou d'autres personnes par contact direct (7)(10).

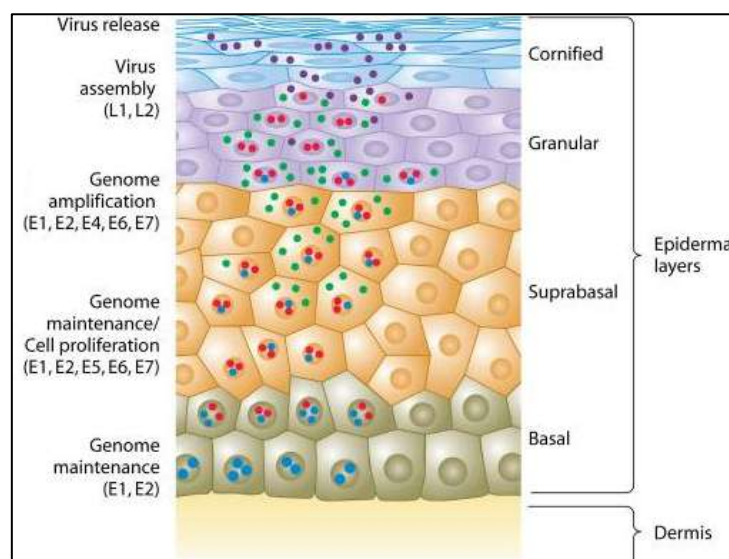


Figure 2 : Cycle de multiplication des papillomavirus (9)

L'effet cytopathogène de cette infection productive par HPV est l'apparition de koïlocytes pathognomoniques : ce sont des cellules à cytoplasme clair, ayant un noyau irrégulier ou binucléé (11).

### C) Epidémiologie

HPV est responsable de 5% des cancers humains (12). Ce virus est considéré comme la première cause du cancer du col de l'utérus. Au niveau mondial c'est le 2<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent chez la femme, 530 000 nouveaux cas se déclarent chaque année, dont plus de la moitié décèdent. Il existe une forte disparité entre les pays développés et ceux à faible niveau socioéconomique, comme le montre la figure 3. Plus de 85% des décès ont lieu dans les pays à bas et moyen revenus (13)(14).

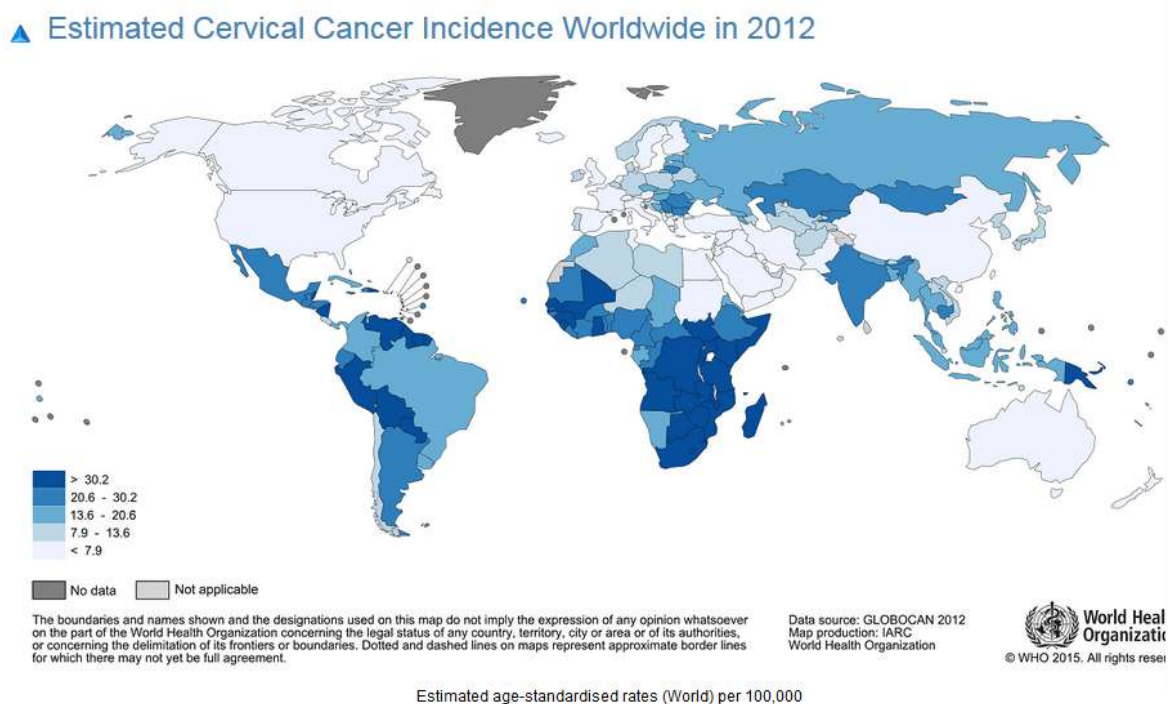


Figure 3 : Incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde en 2012 (14)

En France on estime à 1100 le nombre de décès par an dus au cancer du col de l'utérus. C'est le 11<sup>ème</sup> cancer en termes de fréquence et le 10<sup>ème</sup> en termes de mortalité (15).

Les papillomavirus humains sont des virus ubiquitaires, l'infection par HPV est l'IST la plus fréquente. Elle survient juste après le début de la vie sexuelle : à l'adolescence ou vers vingt ans (16)(17). La prévalence du virus HPV est de 75% chez les femmes entre 18 et 25 ans, sa

présence est un marqueur d'activité sexuelle (18). La prévalence décroît ensuite avec l'âge, on observe néanmoins un second pic moins important vers 50 ans (10).

HPV 16 et 18 représentent à eux deux 70% des cancers du col de l'utérus (55% pour HPV 16 et 16% pour HPV 18) (5). Vingt pourcents supplémentaires sont dus à 6 génotypes : HPV 31, 33, 35, 45, 52, 58 (6). Une étude américaine chez les femmes de 31 à 65 ans a démontré que les multi-infections à HPV augmentent le risque d'avoir des anomalies cytologiques (19).

## II. Physiopathologie

### A) Contamination

L'infection par HPV est l'IST la plus fréquente. La contamination se fait par contact direct ou indirect avec les zones infectées, lorsque la barrière épithéliale est rompue (microlésions de la muqueuse). La transmission se fait classiquement lors des rapports sexuels, lors de la pénétration le plus souvent, mais un simple contact entre muqueuses ou entre peau et muqueuses suffit (20)(21)(22). La transmission sexuelle des HPV est favorisée par la forte charge virale présente au niveau des voies génitales à la phase productive de l'infection par les HPV muqueux génitaux. Les hommes sont également infectés au niveau pénien ou anal et sont donc des vecteurs majeurs des papillomavirus génitaux (3). On retrouve le virus dans des zones non couvertes par un préservatif notamment au niveau des poils de la sphère anogénitale, il ne protège donc que partiellement de l'infection par HPV (23). La présence d'HPV chez des jeunes femmes vierges (moins de 2%) et chez de jeunes enfants fait suspecter d'autres voies de transmission que celle liée aux relations sexuelles (18).

Le changement de nos pratiques sexuelles, plus particulièrement le sexe oral, serait en partie à l'origine de l'augmentation des cancers des voies aérodigestives (24)(25).

Lorsqu'une femme enceinte est porteuse du virus HPV, même asymptomatique, il est prouvé que le risque de transmission verticale existe. Elle se fait généralement lors de l'accouchement pendant le passage du bébé dans la filière génitale. L'HPV peut aussi être transmis par ascendance lors d'une rupture prématurée des membranes. On sait que le risque de transmission est plus élevé si la femme accouche par voie basse que par césarienne (26).

Le risque pour le nouveau-né est estimé à 1 pour 400 de contracter une papillomatose laryngée juvénile lorsque la maman présente des verrues anogénitales lors de l'accouchement (27). Le pronostic vital peut être mis en jeu par obstruction respiratoire (5).

La transmission par les mains, le linge ou les surfaces contaminées est également possible. Des études ont démontré la présence des HPV génitaux sur des surfaces non épithéliales comme les sondes d'échographie endovaginales. Peu d'arguments existent quant à une éventuelle contamination des patientes lors des échographies (28).



## B) Mécanisme d'apparition du cancer

L'infection par HPV est nécessaire à l'apparition du cancer du col utérin, le virus HPV est retrouvé dans 99,7% des cas (29), mais encore faut-il que cette infection soit persistante.

L'histoire naturelle de l'infection par HPV jusqu'à l'évolution en cancer du col de l'utérus est représentée dans la figure 4. Aucun modèle expérimental n'existe puisque le virus ne se cultive pas. Les connaissances actuelles sur les HPV sont basées essentiellement sur l'épidémiologie. La plupart des infections à HPV disparaissent spontanément, un délai de 1 à 2 ans est nécessaire pour éliminer le virus (phénomène appelé clairance) (30)(31). Si l'infection persiste elle peut amener à des lésions de différents grades : les lésions de bas grade vont dans la plupart des cas régresser, par élimination du virus. Les lésions de haut grade peuvent régresser, mais sont le plus souvent persistantes et sont susceptibles d'évoluer vers un cancer invasif. Le délai moyen entre l'infection et la survenue du cancer utérin est de 20 à 30 ans (5).

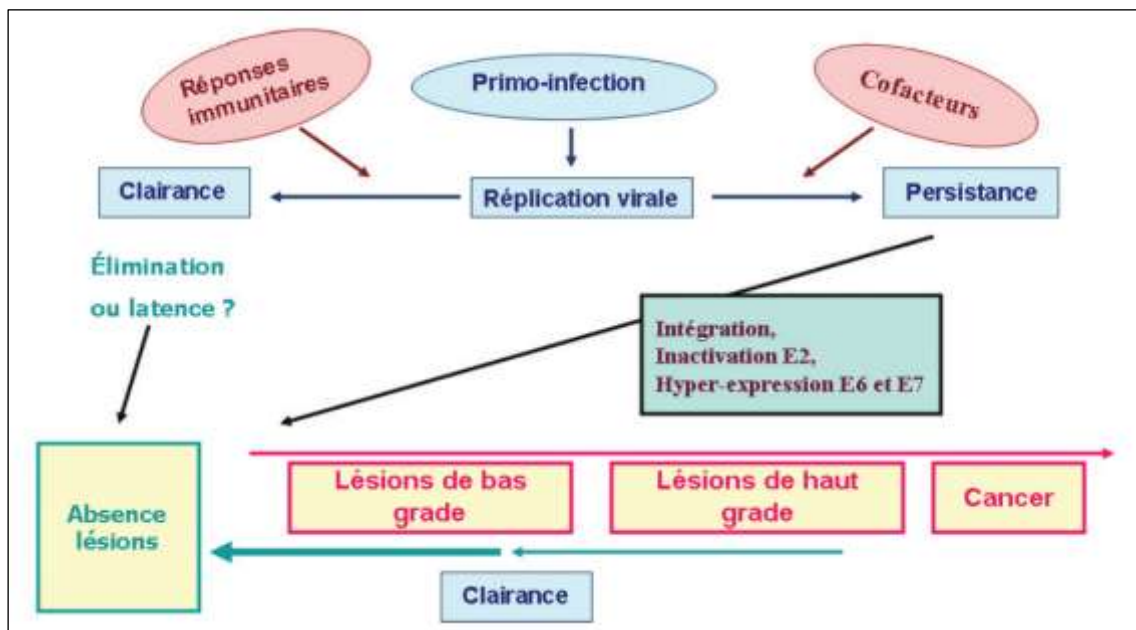


Figure 4 : Histoire naturelle de l'infection HPV et du cancer du col de l'utérus (5)

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la transformation des lésions de bas grade en lésions de haut grade. On remarque ainsi que les cellules prolifèrent et produisent de façon persistante

des oncoprotéines E6 et E7. De plus, l'expression des autres protéines virales et la réplication du virus se voient diminuées.

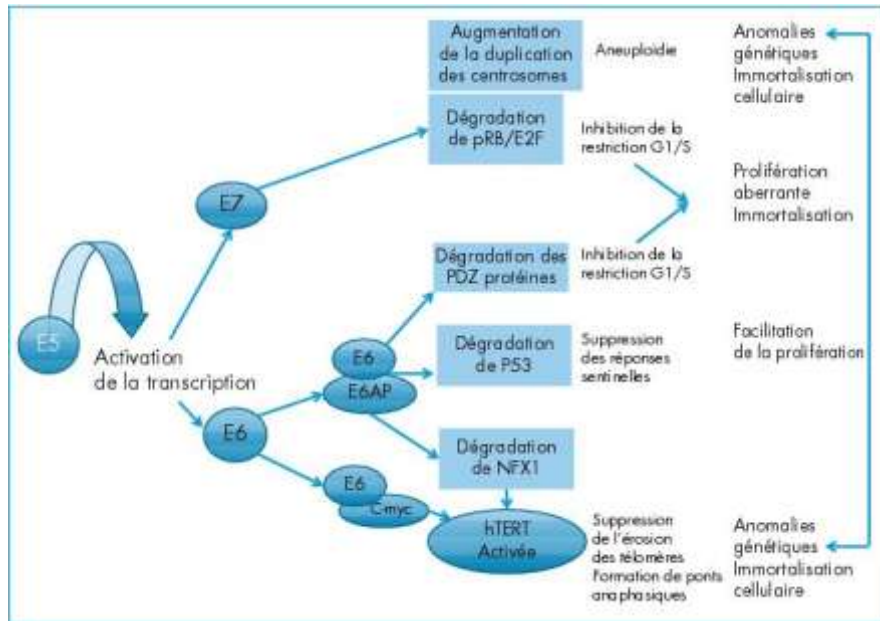
Les gènes E6 et E7 du virus HPV sont des oncogènes, ils jouent un rôle important dans l'apparition du cancer cervical. Les protéines codées par ces deux gènes interagissent avec les protéines des gènes p53 et pRb, deux gènes suppresseurs de tumeurs qui vont induire la prolifération, l'immortalisation, et la transformation maligne des cellules (32).

E6 se lie à p53, favorise son ubiquitination et sa destruction. P53 ne peut donc plus jouer son rôle d'induction de l'apoptose par blocage du cycle cellulaire en phase G1. Un second mécanisme permet l'inhibition de la sénescence cellulaire par érosion des chromosomes (activation de la télomérase). En outre, les protéines E6 à HR ont la capacité de se lier à de nombreuses protéines régulatrices du cycle cellulaire par liaison à leur domaine PDZ (3).

E7 favorise la liaison de la protéine pRb à la calpaïne, pRb est alors partiellement dégradée puis complètement par le protéasome. L'activité du facteur de transcription E2F est normalement régulée négativement par pRb. Le relargage de E2F favorise la transcription de gènes codant pour des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire vers la phase S (3)(7)(33).

E7 favorise les anomalies cellulaires et notamment l'aneuploïdie par dérégulation du contrôle des centrosomes, indispensable lors de la mitose pour permettre la séparation des chromosomes (3).

E5 intervient aussi dans le processus de transformation. Elle joue un rôle dans la prolifération et la persistance virale. Elle intervient précocement dans l'évolution des lésions et se trouve fréquemment délétée en cas d'intégration. Elle augmente les récepteurs EGF à la surface de la cellule, facilite le trafic des vésicules intracellulaires, stimule plusieurs facteurs de transcription et augmente la synthèse de E6 et E7 (Figure 5) (3).



**Figure 5 : Coopération des protéines E6, E7 et E5 des HPV muqueux génitaux dans la persistance virale et l'oncogenèse virale (3)**

L'infection persistante par HPV peut conduire à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, elle est observée dans les premières phases d'évolution vers le cancer et interrompt la réplication du virus. Cette intégration joue un rôle majeur dans la transformation cellulaire, elle est retrouvée dans la majorité des cancers utérins. Pour s'intégrer, le génome d'HPV va devoir se linéariser, et durant cette étape, l'ADN a de grandes chances de se rompre au niveau du gène E2, ce qui l'inactive (5). Cette intégration est observée de façon constante dans les cancers liés à HPV 18 mais n'est pas systématique pour HPV 16 (3).

On peut se demander pourquoi les HPV à BR, qui possèdent également les gènes E6 et E7, ne mènent pas vers la cancérisation. Ceci est expliqué par le fait que les protéines E6 des HPV à BR ne se lient pas à p53 et ne possèdent pas de motif de liaison à PDZ. Les protéines E7 de ces HPV possèdent une substitution d'un acide aminé dans le site de liaison à pRb, et n'entraînent pas de surduplication des centrosomes (3).

### **C) Facteurs de risque**

L'infection par HPV est nécessaire à la survenue du cancer cervical mais ne serait pas suffisante. Plusieurs cofacteurs sont connus à ce jour (7).

### **1) Les facteurs exogènes**

Le risque de développer un cancer du col de l'utérus augmenterait avec le nombre de partenaires sexuels. L'âge précoce du premier rapport jouerait également un rôle. Cependant, il est probable qu'il y ait un lien entre l'âge précoce et le nombre élevé de partenaires.

Autres facteurs exogènes : les contraceptifs oraux ou thérapies substitutives hormonales, le tabac par son action cocarcinogène et son effet immunosuppresseur. La multiparité expose une zone de l'exocol qui facilite l'infection par HPV, les modifications hormonales de la grossesse entrent aussi en jeu. Un lien a été démontré entre la survenue du cancer du col utérin et les coinfections par une autre IST, en particulier HSV-2, *Chlamydia trachomatis* et le VIH. Une alimentation riche en fruits et légumes aurait au contraire un effet protecteur contre le cancer du col de l'utérus (7)(34).

### **2) Les cofacteurs viraux**

L'infection par un HPV à HR est indispensable, mais il faut savoir que le potentiel oncogène diffère selon les génotypes : les HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 et 58 sont les plus souvent retrouvés dans les cas de cancer cervical ou ses précurseurs. Le génotype HPV 16 est un facteur majeur d'évolution vers la cancérisation. Les variants sont également des cofacteurs : certains d'entre eux présentent des mutations qui leur permettent d'échapper aux défenses immunitaires (3).

La coinfection avec un autre génotype de HPV, la charge virale et l'intégration virale participent également à l'évolution maligne de l'infection (3)(7).

### **3) Les cofacteurs liés à l'hôte**

Les hormones endogènes (nombre de grossesses, statut ménopausique), les facteurs génétiques et les capacités de réponse immunitaire propres à l'individu (déficits immunitaires constitutionnels) jouent un rôle dans la carcinogénèse (7)(35)(34).

## **D) HPV et VIH**

Les patients porteurs du VIH sont plus à risque de développer un cancer du col de l'utérus. En effet, ils ont un plus grand risque d'infection persistante à HPV (36), par

conséquent la prévalence des lésions intraépithéliales est plus élevée. Ceci s'explique par la clairance du virus qui se voit diminuée du fait du déficit de l'immunité à médiation cellulaire. Il en est de même chez les transplantés (37). Une étude prospective française a montré que l'incidence du cancer du col de l'utérus était dix fois plus élevée chez les femmes VIH+. Ce chiffre varie selon les études : 4 fois aux USA, 8 fois en Suisse, et 22 fois plus élevée en Italie (38). Le cancer du col utérin se développe plus rapidement chez les patientes VIH+ (5 à 10 ans vs 15 à 20 ans chez les femmes VIH-). Il est à noter que les coinfections par plusieurs génotypes d'HPV sont plus fréquentes chez les femmes séropositives pour le VIH (39)(40).

Le pouvoir oncogène des HPV est favorisé par l'immunodépression : chez les patients VIH+, comme chez les transplantés, on note une prévalence moins élevée du génotype HPV 16 au profit d'autres génotypes (3). En effet, les génotypes HPV 18, 45 et 68 ont une prévalence plus élevée chez les femmes séropositives pour le VIH. Ces femmes ont aussi une plus forte proportion d'anomalies glandulaires au frottis cervical. Si ce lien de causalité est confirmé, ce type de lésions étant sous-évalué en cytologie, le suivi des patientes VIH+ par génotypage pourrait s'avérer plus utile que le frottis (41).

Le cancer du col de l'utérus est un des cancers classant Sida (les autres étant le sarcome de Kaposi et les lymphomes malins non hodgkiniens) (42).

### III. Manifestations cliniques

Les HPV ont un tropisme pour les épithéliums malpighiens et comme nous l'avons vu dans le tableau 1, les différents génotypes d'HPV ont des préférences de localisation. On peut ainsi les classer en HPV cutanés, HPV cutanéomuqueux et HPV associés à l'épidermodysplasie verruciforme.

L'infection par les HPV peut être productive, subclinique ou latente. Elle est productive lorsque les lésions sont cliniquement visibles (exemple : les verrues), subclinique lorsque d'autres outils sont nécessaires afin de détecter leur présence (ex : application d'acide acétique à la colposcopie). Enfin, l'infection est latente lorsque seule la détection de l'ADN d'HPV permet d'affirmer leur présence (absence de signes cliniques et histologiques) (2).

#### A) Lésions cutanées

##### 1) Lésions cutanées bénignes

Les lésions cutanées bénignes dues au virus HPV sont appelées verrues. Les verrues sont des hypertrophies des couches supérieures du derme. Elles disparaissent généralement spontanément, mais peuvent parfois être résistantes au traitement. Elles sont palmaires (verrues communes), plantaires, planes, filiformes ou pigmentées (Figure 6) (4). Elles peuvent survenir à tout âge, mais l'incidence augmente à l'âge scolaire, avec un pic chez l'adolescent et le jeune adulte (43).



Figure 6 : a) Verrue commune b) Verrue plane d'un genou c) Verrue filiforme chez un transplanté (4)

## 2) *Lésions cutanées malignes*

HPV serait également à l'origine d'atteintes malignes de la peau comme la maladie de Bowen (carcinome *in situ* des cellules squameuses) et le cancer de la peau non mélanome (carcinome des cellules basales ou des cellules squameuses) (4).

### **B) Epidermodysplasie verruciforme**

L'épidermodysplasie verruciforme constitue la forme disséminée de l'infection par HPV. C'est une maladie autosomale récessive due à une mutation d'un des deux gènes (EVER1 et EVER2) du bras long du chromosome 17. Ce gène EVER code pour une protéine transmembranaire ayant un rôle dans l'homéostasie du Zinc, la perte de celui-ci conduit à l'expression des gènes E6 et E7. On retrouve également dans cette pathologie une diminution d'un clone de lymphocytes T (2).

Sur le plan clinique, on retrouve deux types de lésions dans lesquelles la charge virale d'HPV est très élevée (2):

- Des verrues planes disséminées, principalement au niveau du tronc, du cou et des extrémités. Ces papules sont hypo ou hyperpigmentées et peuvent se rejoindre et ressembler à des lésions écailleuses ressemblant au *Pityriasis versicolor*. Ces lésions apparaissent dans l'enfance et persistent tout au long de la vie.
- Des lésions verruqueuses qui apparaissent au niveau des zones exposées à la lumière. Ces lésions sont associées aux HPV 5 et 8, souvent plus d'un génotype est détecté. Elles évoluent fréquemment en carcinome épidermoïde cutané.

### **C) Lésions cutané-muqueuses orales**

Les HPV peuvent donner des papillomes oraux laryngés, tumeurs bénignes de la cavité buccale, mais également des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS). HPV est

incriminé dans 25% de ces cancers, les autres causes étant principalement le tabac et l'alcool. Parmi les cancers des VADS, ce sont ceux de l'amygdale qui sont le plus souvent associés au virus HPV (prévalence de l'ordre de 50%). Les cancers des VADS HPV+ sont retrouvés chez les sujets jeunes et sont associés à l'activité sexuelle, notamment les pratiques orogénitales. Ils sont de meilleur pronostic que les cancers HPV négatifs (5).

## **D) Lésions cutanéomuqueuses de la sphère ano-génitale**

### ***1) Lésions bénignes***

Les verrues génitales, encore appelées condylomes, sont la manifestation la plus courante de l'infection par HPV au niveau de la sphère anogénitale. Elles sont hautement infectieuses et récidivent fréquemment (Figures 7 à 9). Ce sont des papules, nodules ou des excroissances rosâtres, filiformes et molles, pédiculées ou non. Les condylomes sont acuminés (appelés crêtes de coq) ou plans (visibles après applications d'acide acétique). Les génotypes HPV 6 et 11 sont les plus fréquemment retrouvés dans les condylomes acuminés (2)(44).



**Figure 7 : Verrue génitale chez une petite fille (2)**



**Figure 8 : Condylome acuminé d'un pénis (2)**



**Figure 9 : Verrues anales chez un adulte (2)**



## 2) *Lésions malignes*

Les papillomavirus humains sont très fréquemment incriminés dans les cancers du col de l'utérus et ses précurseurs : HPV est retrouvé dans 90 à 100% des cancers du col de l'utérus (45). HPV 16 et 18 sont à l'origine de 70% des cancers cervicaux (46). Les cancers du col de l'utérus sont dans la grande majorité des cas (90%) des carcinomes épidermoïdes et plus rarement (10%) des adénocarcinomes (5).

La muqueuse du col de l'utérus constitue le 1<sup>er</sup> site d'infection par les HPV. Ceci s'explique par le remaniement constant des cellules les plus profondes et la fragilité de la zone de jonction entre épithélium malpighien (exocol) et glandulaire (endocol) qui est constituée d'une seule couche de cellules basales.

Les signes cliniques du cancer du col de l'utérus n'apparaissent qu'à partir d'un stade avancé et sont aspécifiques : métrorragies spontanées ou provoquées lors des rapports sexuels, dyspareunies, leucorrhées, douleurs dorsales ou pelviennes (47).

Les HPV peuvent également être à l'origine de la Maladie de Bowen de la sphère génitale (dysplasie vulvaire), des cancers de la vulve, du vagin, du pénis ou encore du cancer anal (44).

## IV. Méthodes diagnostiques

### A) Indications

Pour le dépistage du cancer du col de l'utérus, la Haute Autorité de Santé recommande la réalisation d'un frottis cervico-utérin (FCU) tous les trois ans entre 25 et 65 ans après deux FCU normaux réalisés à un an d'intervalle chez les femmes asymptomatiques ayant ou ayant eu une activité sexuelle. Il est indispensable de répéter les FCU, puisque la sensibilité d'un seul frottis n'est que de 63% et l'évolution de la maladie est lente et fluctuante (48).

### B) Prélèvement

Le prélèvement est actuellement le frottis cervico-utérin. Il est réalisé par un personnel formé (médecin, sage-femme, biologiste). Le col doit être rendu visible à l'aide d'un spéculum, si besoin recourir à un traitement par œstrogènes chez la femme ménopausée.

Le FCU est préférablement effectué à distance des rapports sexuels (>48h), en dehors des règles et de toute infection ou traitement local. Il ne faut pas pratiquer de toucher vaginal avant d'effectuer le frottis, ni utiliser de lubrifiant. La totalité de l'orifice cervical externe ainsi que l'endocol sont prélevés à l'aide d'un dispositif adapté : plusieurs types de brosses existent, choisir la plus adaptée à la taille, à la forme du col et à la situation clinique.

Il existe deux types de frottis :

- **le frottis conventionnel (selon Papanicolaou)**

Le matériel est étalé de façon uniforme sur une lame et fixé immédiatement.

- **le frottis en milieu liquide**

Il est placé dans un milieu de transport approprié (recommandé par le laboratoire effectuant l'analyse). La durée et la température de conservation doivent être conformes aux recommandations du fabricant.

Le frottis, accompagné d'une feuille de renseignements (identité, date du prélèvement, date des dernières règles, motif de l'examen, antécédents gynécologiques et thérapeutiques,

contraception), est envoyé au laboratoire d'anatomopathologie qui fera un compte rendu cytologique du frottis.

Le diagnostic virologique, lui, ne peut se faire que sur frottis en milieu liquide. Ce milieu de conservation, adapté à la cytologie, doit être validé par le laboratoire de virologie pour la recherche de papillomavirus par PCR. Si un frottis conventionnel a été effectué, un second prélèvement est nécessaire. Il doit être déchargé dans un milieu de transport approprié.

Plusieurs techniques d'auto-prélèvement sont en cours d'évaluation et de standardisation : prélèvement des urines, en particulier la première miction qui contient des cellules vaginales, cervicales et utérines (49) et le prélèvement vaginal sur écouvillon sec (50). Ces prélèvements ne sont pas invasifs, sont simples de réalisation et plus facilement acceptés par les femmes (50)(51). Ils pourraient constituer une alternative au frottis dans le cas des sous-groupes difficiles à suivre (49)(50)(52).

### **C) Le diagnostic anatomopathologique**

Le laboratoire d'anatomopathologie va effectuer une analyse cytologique des frottis cervico utérins selon le système Bethesda 2001 (Annexe 1) (53) :

Les anomalies des cellules malpighiennes sont recherchées et sont notées :

- ASC-H : lésion malpighienne intraépithéliale de haut grade
- ASC-US : atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée

Les lésions précancéreuses sont classées par analyse cytologique du frottis en lésions de bas grade : L-SIL (low-grade squamous intraepithelial lesions) et lésions de haut grade : H-SIL (high-grade squamous intraepithelial lesions)

Après analyse histologique des biopsies, on classe ces lésions (Classification OMS) en fonction de la profondeur des atteintes :

- CIN 1 : Dysplasie légère ne dépassant pas le 1/3 inférieur de l'épithélium
- CIN 2 : Dysplasie modérée ne dépassant pas le 1/3 moyen de l'épithélium
- CIN 3 : Dysplasie sévère atteignant toute la hauteur de l'épithélium

(CIN : Cervical intraepithelial neoplasia,)

CIN 1 correspond au stade L-SIL, CIN 2 et CIN 3 correspondent au stade H-SIL.

Un autre type d'anomalies correspond à l'atteinte des cellules glandulaires, pouvant conduire au carcinome *in situ*.

Dans le cas d'un frottis ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) c'est-à-dire présentant une atypie des cellules malpighiennes de signification indéterminée, trois options sont possibles :

- la colposcopie
- la réalisation d'un frottis de contrôle 6 mois plus tard
- le diagnostic virologique : la recherche des HPV oncogènes (test de **dépistage**)

#### **D) Le diagnostic virologique**

L'analyse cytologique du frottis reste la technique de référence en première intention, remboursée par la sécurité sociale, mais elle manque de sensibilité et il existe une variabilité significative inter-laboratoire (54). Le diagnostic virologique est recommandé et pris en charge par l'Assurance Maladie uniquement en cas de frottis ASC-US (B140 soit 37,80 euros). Ce sont principalement ces frottis que nous recevons au laboratoire de virologie pour la recherche des HPV oncogènes par PCR. Les autres sont les frottis de suivi de patientes traitées.

Les techniques virologiques sont limitées : les HPV se cultivent difficilement et la sérologie n'est pas très informative. C'est pourquoi l'identification des HPV fait appel à des techniques moléculaires, qui sont plus sensibles que la cytologie (55). De nombreux tests sont commercialisés en France (Figure 10) (56).

| Nom du kit, fabricant               | Technologie                                                                                                                      | Contrôle interne                                         | HPV recherchés                                                                                                                                       |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HC2 (Hybrid Capture 2), Qiagen      | Hybridation ADN/ARN capturés en microplaque avec amplification du signal par chimiluminescence                                   | Non<br>Témoin positif (HPV 16)<br>Témoin négatif (HPV 6) | 13 HPV HR* :<br>16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,<br>51, 52, 56, 58, 59, 68                                                                                |
| Amplicor, Roche                     | PCR avec amorces PGMY09/PGMY11<br>Hybridation sur microplaque et révélation colorimétrique                                       | Bêta globine                                             | 13 HPV HR :<br>16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,<br>51, 52, 56, 58, 59, 68                                                                                 |
| Cobas 4 800 HPV test, Roche         | PCR temps réel                                                                                                                   | Bêta globine                                             | 14 HPV HR :<br>16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,<br>51, 52, 56, 58, 59, 66, 68<br>+ Génotypage 16-18                                                       |
| Abbott Real Time, Abbott            | PCR temps réel                                                                                                                   | Bêta globine                                             | 14 HPV HR :<br>16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,<br>51, 52, 56, 58, 59, 66, 68<br>+ Génotypage 16-18                                                       |
| Seeplex HPV4 ACE Screening, Seegene | Amplification par PCR classique et détection par électrophorèse sur gel d'agarose ou électrophorèse capillaire automatisée (DPO) | Plasmide coamplifié avec la cible                        | 18 types d'HPV HR : 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82<br>2 HPV BR <sup>§</sup> : 6, 11<br>+ Génotypage 16 et 18 |
| Cervista HPV HR, Hologic            | Hybridation                                                                                                                      | Histone                                                  | 14 HPV HR :<br>16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,<br>51, 52, 56, 58, 59, 66, 68                                                                             |

\* HR : haut risque. § BR : bas risque.

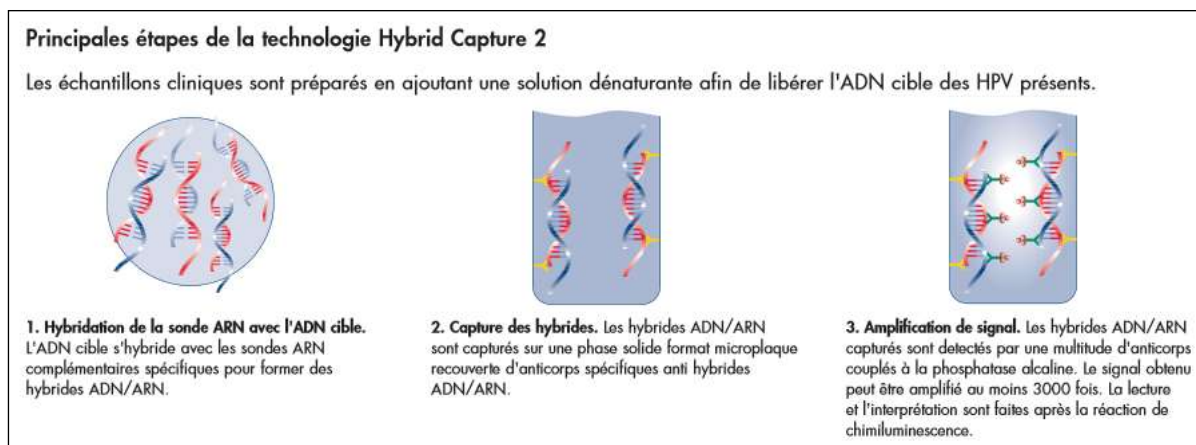
**Figure 10 : Caractéristiques des kits de détection de l'ADN d'HPV commercialisés en France (56)**

### 1) Méthodes de détection de l'ADN des HPV

#### a) L'amplification du signal

- Hybridation en phase liquide : (HC2 : Hybrid Capture 2 Qiagen®)

Cette technique est la plus ancienne approuvée par la FDA. Les cellules contenues dans l'échantillon sont lysées et l'ADN d'HPV double brin est dénaturé, puis mis en contact en phase liquide avec un cocktail de sondes ARN complémentaires de 13 génotypes d'HPV à HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Des hybrides ADN/ARN se forment, ils sont capturés sur une phase solide grâce à des anticorps polyclonaux anti-duplex ADN/ARN fixés sur la paroi de la microplaque. Après cette étape de capture, des anticorps anti duplex ADN/ARN couplé à une phosphatase alcaline (PAL) vont se lier à la partie libre des hybrides. La révélation se fait par chimiluminescence : en présence d'un substrat, la PAL déclenche une émission de lumière qui est détectée à l'aide d'un spectrophotomètre (55)(57)(58)(59) (Figure 11(51)).



**Figure 11 : Principales étapes de la technique Hybrid Capture 2 (51)**

Cette technique possède une sensibilité plus faible que la PCR (5000 copies/mL vs 300 copies/mL). Elle est rapide, reproductible, applicable pour des séries importantes et présente une très bonne significativité clinique (53). Ses inconvénients sont l'absence de contrôle interne, le résultat rendu est qualitatif (présence ou absence de virus HPV à HR), il ne permet pas de distinguer le génotype en question, ni de mettre en évidence les infections multiples. L'hybridation moléculaire ne permet pas non plus de détermination de la charge virale (58).

- Amplification par PCR couplée à une détection immunoenzymatique (PCR AmpliCor® Roche Diagnostics)

Cette technique est une PCR classique qui comporte des étapes de lyse, d'extraction de l'ADN, et d'amplification et de révélation de l'ADN amplifié. Les amorces sont biotinyllées, c'est-à-dire couplées à la biotine, et encadrent un fragment de la région L1 du virus HPV. L'étape d'amplification terminée, les amplicons sont dénaturés, puis hybridés dans un puits avec un cocktail de sondes complémentaires de 13 génotypes d'HPV à HR. L'addition d'un conjugué streptavidine-peroxydase, puis d'un substrat spécifique (TMB) permet le développement d'une coloration qui est mesurée au spectrophotomètre. Un témoin cellulaire ou contrôle interne (béta-globine) permet de valider à la fois la qualité du prélèvement mais aussi la PCR et la révélation (58)(59).

De la même manière que l'hybridation moléculaire, on obtient un résultat qualitatif (Présence ou Absence d'HPV à HR). Ce test ne met pas non plus en évidence les infections multiples. Sa sensibilité analytique est de 480 copies/mL (53).

## **b) L'amplification d'ADN**

### **- La Real-Time PCR (PCR en temps réel)**

La PCR en temps réel est basée sur le même principe que la PCR classique mais la détection est automatisée et se fait en temps réel : la fluorescence émise permet de quantifier la cible présente. Chaque sonde oligonucléotidique est marquée d'un fluorophore ou émetteur (appelé reporter) et par un suppresseur (appelé quencher). Le suppresseur a pour rôle de neutraliser l'émission fluorescente lorsqu'il se trouve proche de l'émetteur, c'est-à-dire lorsque la sonde est intacte.

Les sondes étant complémentaires de l'amplicon, elles vont se fixer à celui-ci au fur et à mesure de l'avancement de l'amplification. L'ADN polymérase a non seulement une activité d'élongation, mais aussi une activité nucléasique en 5' 3' qui clive les sondes.

L'émetteur et le suppresseur vont ainsi être séparés, le suppresseur ne pourra plus neutraliser la fluorescence de l'émetteur. Le fluorophore pourra donc émettre une fluorescence d'une longueur d'onde caractéristique lorsqu'il est excité par un spectre de lumière approprié (Figure 12 ) (52).

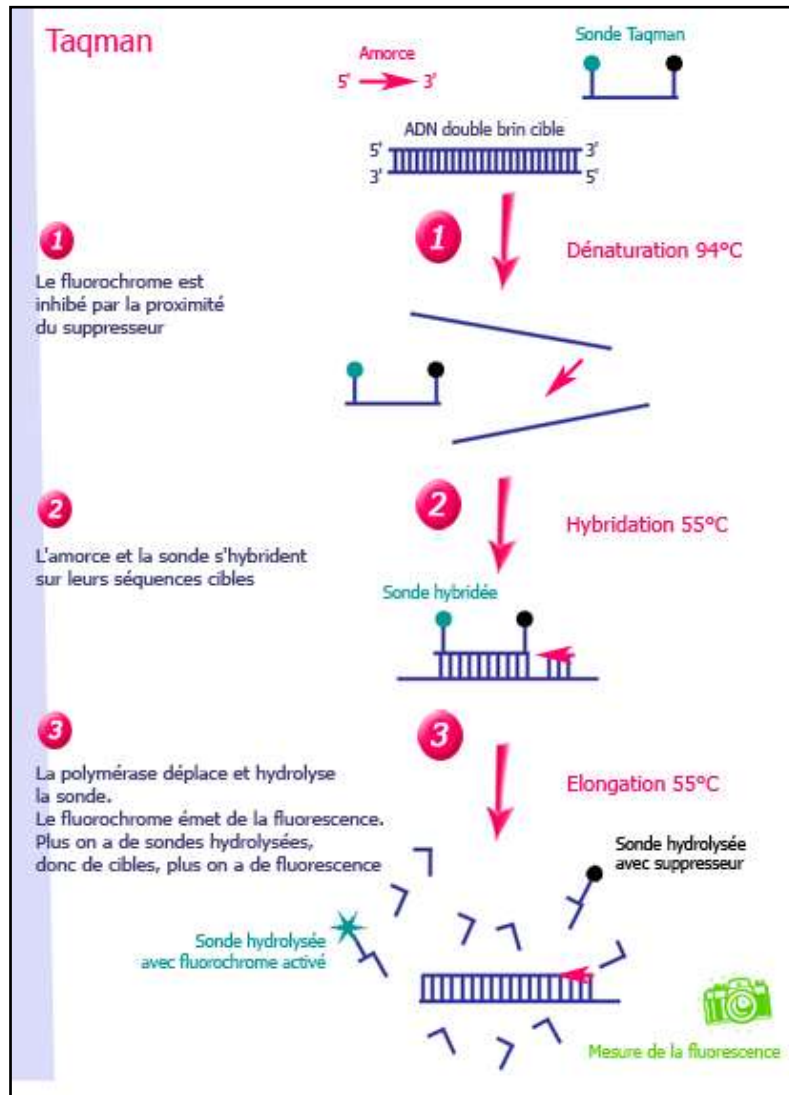


Figure 12 : Principe de la PCR en temps réel (52)

Deux techniques de PCR en temps réel sont commercialisées en France : le test Abbott Real Time High Risk HPV® (Abbott) et le test Cobas® 4800 HPV Test (Roche). Les 2 tests permettent de détecter 12 HPV HR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) et séparément les HPV 16 et 18, grâce à l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques des types 16 et 18 ou spécifiques du panel des 12 HPV HR. Les 3 sondes étant marquées par un fluorophore différent. Un contrôle interne utilisant le gène de la  $\beta$ -globine est également présent dans chaque réaction.

## 2) Détection des ARNm E6 et E7

Il existe également des techniques de détection des HPV basées sur la détection de leur ARN, plus particulièrement les ARNm E6/E7. Il est aujourd'hui prouvé que les protéines



oncogéniques E6 et E7 sont à l'origine de la transformation maligne des lésions dues à HPV. La détection des ARN messagers E6/E7 est le reflet d'une activité transcriptionnelle des HPV à Haut Risque, elle pourrait donc constituer un marqueur intéressant pour identifier les femmes à risque d'évolution vers une lésion précancéreuse, voire un cancer du col de l'utérus (58).

Le test NucliSENS EasyQ HPV® commercialisé par Biomérieux permet de détecter séparément les ARNm des oncoprotéines E6 et E7 des 5 principaux génotypes d'HPV HR (HPV 16, 18, 31, 33 et 45). Il utilise la technologie NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Assay) qui repose sur un processus d'amplification des ARN à température constante avec 3 enzymes : une transcriptase inverse, une ARN polymérase et une Rnase. Après amplification, la détection des ARNm est réalisée en temps réel. Un contrôle interne ciblant l'ARN humain ubiquitaire U1A permet de contrôler la qualité d'extraction et de conservation des ARN (53)(58)(59).

Le test Aptima® HPV Assay (GenProbe/Hologic) permet la détection globale de 14 types d'ARNm des protéines E6 et E7. Il utilise la technologie TMA (Transcription Mediated Amplification) dont le principe repose sur une amplification isotherme mais avec deux enzymes : une transcriptase inverse et l'ARN polymérase T7 (53).

### **3) *Génotypage des HPV***

Le génotypage est l'identification du ou des génotype(s) d'HPV présent(s) dans un échantillon. Il présente plusieurs intérêts (59) :

- distinguer les infections par un seul type d'HPV des multi-infections par HPV
- intérêt épidémiologique, déterminer la prévalence de chaque génotype
- évaluer le risque de progression vers des lésions de haut grade (génotypes 16 et 18 principalement)
- savoir, en cas de persistance d'une infection, si elle est due au même génotype ou si c'est une succession d'infections à différents génotypes.

Les techniques de génotypage pur n'ont pas été cliniquement validées pour le triage des frottis ASC-US. Actuellement, aucune recommandation n'exclut le génotypage comme technique de

dépistage. Une étude récente montre qu'environ 10% des ASC-US sont actuellement triés par génotypage (60).

- Les puces à ADN (PapilloCheck®, Clart® HPV2)

La technique de puce à ADN est une technique de biologie moléculaire récente qui a le grand avantage d'être rapide. Des sondes spécifiques des génotypes d'HPV à HR sont disposées sur une lame sous forme de spots distincts. Une PCR est réalisée avec des amorces marquées par un fluorochrome ou par la biotine et, après dénaturation, le produit de cette PCR est hybridé sur les puces. Après lavage, un scanner va lire la lame et conclura sur le(s) génotype(s) présent(s). Cette technique est simple, rapide et permet de détecter les infections multiples (58). Le test Papillocheck® (Greiner Bio-One) permet la détection de 24 génotypes d'HPV dont 18 HR ou potentiellement HR et 6 BR. Le test Clart HPV 2® (Genomica) détecte 35 génotypes dont 20 HR ou potentiellement HR et 15 BR. La sensibilité de ces tests est plus élevée que celle des PCR en temps réel.

- Génotypage sur bandelettes (INNO-LiPA HPV GENOTYPING Extra®, Linear Array HPV Genotyping Test®)

Cette technologie utilise le principe de l'hybridation inverse avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques des différents génotypes d'HPV fixées sur des bandelettes. Une PCR est réalisée avec des amorces biotinylées, les produits de cette PCR sont déposés sur une bandelette et sont alors hybridés. Les hybrides amplicon-oligonucléotides sont révélés par colorimétrie après ajout d'un conjugué streptavidine-phosphatase alcaline ou streptavidine-peroxydase et de son substrat (respectivement BCIP/NBT et TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il se forme un précipité coloré au niveau des lignes réactionnelles (en violet pour la technique INNO-Lipa ou en bleu pour la technique Linear-Array), permettant une interprétation visuelle des résultats (Figure 13).

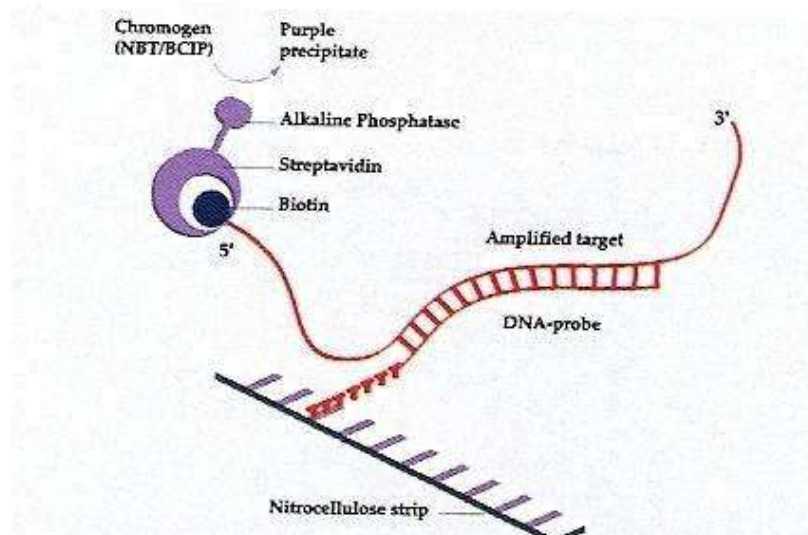


Figure 13 : Principe de la technique INNO-Lipa

La bandelette est à comparer à une bandelette témoin sur laquelle on retrouve le profil de tous les génotypes d'HPV. On identifie de cette manière les génotypes présents dans l'échantillon. Le test INNO-Lipa HPV Genotyping Extra® (Innogenetics) permet la détection de 28 types d'HPV dont 18 HPV HR, BR et 3 non classés, tandis que Linear Array HPV Genotyping Test® (Roche) identifie 37 HPV dont 13 types HR et 24 types BR.

- Technologie Luminex (HPV Genotyping LQ® Qiagen)

Le principe est basé sur une PCR avec amorces marquées par un fluorophore, suivie d'une hybridation des amplicons dénaturés sur des billes de polystyrène couplées à des sondes oligonucléotidiques marquées par des fluorophores différents des amorces et spécifiques des génotypes d'HPV recherchés. L'analyse se fait par cytométrie en flux à deux lasers : un pour la détection de l'amplicon et un autre pour la détection du génotype.

- Le séquençage

Le principe du séquençage consiste à déterminer la séquence de l'ADN cible amplifié pour ainsi la comparer aux séquences génomiques d'une banque de données. La région L1 est la plus fréquemment utilisée. Bien que considérée comme méthode de référence, elle présente l'inconvénient de ne pas détecter les infections multiples, son utilisation en routine reste fastidieuse. Son avantage principal est de détecter les variants intratypiques (61).

#### **4) Techniques de détection quantitative de l'ADN d'HPV**

Différentes techniques de PCR en temps réel ont été mises au point afin de permettre la quantification du génome d'HPV. L'interprétation de la charge virale est délicate dans la pratique clinique car le seuil est difficile à déterminer (quantité de cellules variable, proportion de cellules infectées, présence d'infections multiples, intégration de l'ADN) (61). La pratique actuelle de quantification de l'ADN est réservée au domaine de la recherche.

#### **E) Cytologie ou test HPV ?**

La cytologie a permis une réduction massive de l'incidence du cancer du col de l'utérus ces dernières années, mais elle a atteint ses limites. Le frottis manque de sensibilité et sa reproductibilité est mauvaise (analyse cytologiste-dépendant). De plus, il ne possède pas de contrôle de qualité (CQ), ce qui pose un problème en termes de qualité de rendu du résultat. Son manque de sensibilité conduit à répéter les FCU, ce qui ne rend plus le frottis coût-efficace. Il en serait de même lors de la mise en place de CQ (62).

Le test HPV possède une excellente valeur prédictive négative (VPN), c'est pourquoi il est utilisé dans le triage des frottis douteux (ASC-US). Cependant, il manque de spécificité (un test HPV positif ne signifie pas présence de lésions) (62).

Dans le cadre du dépistage primaire, un schéma intéressant est proposé par plusieurs auteurs : effectuer le test HPV seul en première intention, et, en deuxième intention, le triage des femmes HPV+ par la cytologie. De cette manière, on profite de la grande sensibilité du test HPV et de la plus grande spécificité de l'analyse cytologique. Ainsi, on détecte plus précocement les femmes susceptibles de développer des lésions cancéreuses et on pourrait allonger l'intervalle de temps entre deux dépistages (62) (63).

La généralisation de la vaccination des jeunes filles va, dans quelques années, modifier la prévalence des lésions de haut grade et du cancer du col de l'utérus. Le FCU deviendra inadapté pour le dépistage primaire, puisque sa valeur prédictive positive est directement liée à la prévalence des anomalies du col. Dans ce contexte le test HPV deviendrait l'outil idéal pour le dépistage primaire (62) (63) (64).

## V. Prévention et prise en charge

### A) Prévention primaire : la vaccination

Deux vaccins prévenant l'apparition des cancers cervicaux et anogénitaux sont actuellement commercialisés en France : Cervarix® vaccin bivalent commercialisé par le laboratoire GlaxoSmithKline et Gardasil® vaccin quadrivalent commercialisé par Merck (Figure 15). Ils protègent tous les deux contre les génotypes HPV 16 et 18, responsables de 70% des cancers du col de l'utérus. Gardasil® protège en plus contre les génotypes HPV 6 et 11, responsables de verrues génitales : approximativement 90% des condylomes acuminés génitaux seraient dus aux génotypes HPV 6 ou 11 (65)(66).

Ces deux vaccins sont composés de protéines de capsid L1 des différents génotypes d'HPV cités précédemment, synthétisées par génie génétique puis hautement purifiées. Le gène L1 est introduit dans des levures (cas du Gardasil®), ou des cellules d'insectes (Cervarix®), permettant ainsi la synthèse de l'antigène viral L1 recombinant. Cette protéine de capsid possède la capacité de s'autoassembler en pseudoparticules virales ou VLPs (virus-like particles). Ces particules ressemblent aux virions et vont induire la production de hauts titres d'anticorps neutralisants contre les différents épitopes de la protéine L1. Elles ne possèdent pas de génome, elles ne sont donc pas infectieuses. Ces anticorps circulants vont par transsudation au niveau de l'épithélium, capter les HPV avant qu'ils ne puissent infecter les cellules. Des campagnes de vaccination des jeunes filles sont en cours dans de nombreux pays.

Le schéma vaccinal français pour l'année 2014 est détaillé en figure 14:

| <b>Schéma vaccinal</b>               |                                                          |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| • Vaccin quadrivalent <sup>®</sup> : |                                                          |
| Entre 11 et 13 ans révolus :         | deux doses espacées de 6 mois.                           |
| Entre 14 et 19 ans révolus :         | trois doses administrées selon un schéma 0, 2 et 6 mois. |
| • Vaccin bivalent <sup>®</sup> :     |                                                          |
| Entre 11 et 14 ans révolus :         | deux doses espacées de 6 mois.                           |
| Entre 15 et 19 ans révolus :         | trois doses administrées selon un schéma 0, 1 et 6 mois. |

Figure 14 : Schéma français de la vaccination HPV 2014 (67)

Une étude française de 2012 prédit une diminution de 83% de la survenue des cancers du col de l'utérus 50 ans après la première vaccination (68). Ce taux pourrait être augmenté si les hommes participaient à la vaccination. C'est le cas de plusieurs pays: USA, Canada, Australie, Autriche (seul pays en Europe) (69) où la vaccination des hommes par le vaccin quadrivalent est recommandée.

Il existerait une protection croisée avec HPV 31 : les géotypes HPV 16 et HPV 31 sont phylogénétiquement proches et présentent quelques épitopes communs (3). Un article parle même de protection croisée avec les HPV 31, 33 et 45 pour le vaccin bivalent, plus forte que pour le vaccin quadrivalent (70).

Ces deux vaccins ont prouvé leur innocuité, leur efficacité et leur bonne tolérance (71). La vaccination ne se substitue pas aux frottis de dépistage à partir de 25 ans. Ce qui n'est pas encore bien compris puisqu'une étude en Australie montre que le taux de dépistage chez les jeunes femmes vaccinées est plus bas que chez les non vaccinées (18). Ceci montre bien que des efforts sont à faire en termes d'information auprès des patientes.

Plusieurs « case report » ont suggéré un lien entre le vaccin Gardasil® et l'apparition de sclérose en plaques et d'autres pathologies démyélinisantes. Plusieurs études montrent qu'il n'existerait pas de lien véritable entre le vaccin et la maladie (73)(74).

Un vaccin 9-valent va bientôt paraître sur le marché : Gardasil 9 du laboratoire Merck (Figure 15). Il est également constitué de VLP, et protège contre les HPV 6, 11, 16, 18 (4 valences du Gardasil) ainsi que les HPV 31, 33, 45, 52 et 58. Ces 5 géotypes sont à l'origine de 10 à 15% des cancers du col de l'utérus, ce nouveau vaccin permet donc d'assurer une protection contre au moins 80% des cancers utérins (75).

TABLE 1. Characteristics of the three human papillomavirus (HPV) vaccines licensed for use in the United States

| Characteristic  | Bivalent (2vHPV)*                                                                         | Quadrivalent (4vHPV)†                                          | 9-valent (9vHPV)‡                                              |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Brand name      | Cervarix                                                                                  | Gardasil                                                       | Gardasil 9                                                     |
| VLPs            | 16, 18                                                                                    | 6, 11, 16, 18                                                  | 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58                              |
| Manufacturer    | GlaxoSmithKline                                                                           | Merck and Co., Inc.                                            | Merck and Co., Inc.                                            |
| Manufacturing   | <i>Trichoplusia ni</i> insect cell line infected with L1 encoding recombinant baculovirus | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Baker's yeast), expressing L1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Baker's yeast), expressing L1 |
| Adjuvant        | 500 µg aluminum hydroxide, 50 µg 3-O-desacyl-4' monophosphoryl lipid A                    | 225 µg amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate             | 500 µg amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate             |
| Volume per dose | 0.5 ml                                                                                    | 0.5 ml                                                         | 0.5 ml                                                         |
| Administration  | Intramuscular                                                                             | Intramuscular                                                  | Intramuscular                                                  |

Abbreviation: L1 = the HPV major capsid protein; VLPs = virus-like particles.

\* Only licensed for use in females in the United States. Package insert available at <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM186981.pdf>.

† Package insert available at <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM111263.pdf>.

‡ Package insert available at <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM426457.pdf>.

Figure 15 : Caractéristiques des 3 vaccins HPV : Cervarix, Gardasil et Gardasil 9 (75)

## B) Prévention secondaire : le dépistage

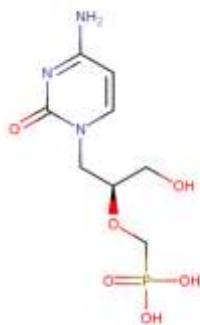
La prévention secondaire passe par le dépistage des lésions du col de l'utérus, au moyen du FCU (cf. Méthodes diagnostiques).

## C) Prévention tertiaire : le traitement

Le traitement du cancer du col de l'utérus repose sur trois types de méthodes utilisées seules ou en association : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Le choix et l'ordre des traitements dépendent notamment de l'étendue du cancer au moment du diagnostic (Annexe 4).

Il n'existe pas de traitement antiviral spécifique contre les HPV. Néanmoins, des chercheurs s'intéressent actuellement à l'utilisation du Cidofovir (Figure 16) dans le traitement des lésions dues à HPV. Le Cidofovir, analogue de la cytidine, habituellement utilisé pour le traitement des rétinites à CMV des patients HIV positifs pour lequel la molécule a reçu l'AMM, est actif sur d'autres virus : autres *herpesviridae*, adénovirus mais aussi HPV. Il a été démontré qu'il réduisait l'expression de E6 et E7 et les propriétés métastatiques des tumeurs HPV+ (76). Partant de ce principe, des chercheurs français ont émis l'hypothèse que le cidofovir pourrait potentiellement accroître la réponse du cancer aux traitements endommageant l'ADN (radiothérapie et chimiothérapie). Une étude clinique a démontré en phase I que le Cidofovir sensibiliserait à la chimiothérapie et la radiothérapie sans augmenter

les effets secondaires toxiques. La combinaison Cidofovir + radiochimiothérapie montre une régression de la tumeur chez tous les patients, et une rémission complète chez 80% de ces patients (77).



**Figure 16 : Structure du Cidofovir (78)**

Une autre molécule, l'Imiquimod, est utilisée dans le traitement des verrues génitales externes ou périanales sous forme de crème. Elle possède des propriétés antivirales et antitumorales. Son action repose sur l'activation combinée de l'immunité naturelle locale, par la mise en jeu d'interféron alpha ( $IFN\alpha$ ) et de l'immunité acquise, par stimulation d'une réponse cellulaire de type T (79). L'inconvénient de cette molécule est qu'elle provoque une inflammation sévère au niveau de la zone traitée (80).

## **D) Surveillance post thérapeutique**

La surveillance post-thérapeutique repose sur l'examen clinique et les FCU réguliers. Aucun examen d'imagerie n'est systématique. Le schéma de surveillance est adapté en fonction des cas cliniques. En 2007 le CNGOF (collège national des gynécologues et obstétriciens de France) a recommandé le test HPV en suivi post opératoire (après traitement des lésions CIN2/3) (81). Toutefois, cette indication n'a pas été retenue par la HAS et le test n'est donc pas remboursé par la Sécurité Sociale dans ce contexte.



# OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le travail présenté ci-après a été réalisé au Laboratoire de Virologie du CHRU de Lille entre juin et octobre 2014, dans le cadre de l'accréditation.

Le but de notre étude a été, dans un premier temps, de vérifier sur site les performances des tests Cobas® 4800 HPV (Roche) et Xpert® HPV (Cepheid) sur le milieu Preservcyt®, et celles du test Cobas® 4800 HPV (Roche) sur le milieu Cobas® PCR Cell Collection Media. La deuxième partie de ce travail a porté sur l'évaluation des performances de ces troussees sur les milieux autres, à savoir sur les milieux Novaprep® et Easyfix®.

Enfin, nous avons souhaité comparer ces deux troussees à partir de patientes connues au CHRU de Lille.

# MATERIEL & METHODES

## I. Milieux de prélèvement

Les techniques Cobas® 4800 HPV de Roche et Xpert® HPV de Cepheid sont toutes deux validées sur le milieu de prélèvement Preservcyt® utilisé par le laboratoire d'anatomopathologie du CHRU de Lille. Les paramètres de performances de ce milieu sont indiqués dans les notices fournisseur. Ce milieu Preservcyt® constitue donc notre référence. Les prélèvements provenant de services extérieurs au CHU nous parviennent aussi sur deux autres milieux le Novaprep® et l'Easyfix®. Nous avons vérifié sur site les performances des trousse Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV sur ces trois milieux ainsi que les performances de la trousse Cobas® sur le milieu fournisseur : milieu Cobas® PCR Cell Collection Media (que nous appellerons par la suite milieu Cobas®).

Les quatre milieux cités précédemment (Figure 17) sont des milieux de transport et de conservation des échantillons gynécologiques. Les milieux Preservcyt®, Novaprep® et Easyfix® permettent la réalisation d'un frottis pour une analyse en anatomopathologie, mais également une analyse en biologie moléculaire pour la recherche des papillomavirus oncogènes. Le milieu Cobas® permet uniquement la recherche des HPV en biologie moléculaire. Le milieu Preservcyt®, encore appelé Thinprep®, est une solution tamponnée à base de méthanol, tout comme le milieu Cobas®. Le Novaprep® est, quant à lui, à base d'éthanol, et l'Easyfix® est composé d'un mélange de différents alcools et d'eau.



Figure 17 : Milieux de transport et de conservation Preservcyt®, Easyfix®, Novaprep® et Cobas®

## **II. Echantillons biologiques et contrôles de qualité**

### **A) Echantillons biologiques**

Les échantillons biologiques utilisés dans cette étude sont des frottis cervico-utérins (FCU) reçus au laboratoire pour la recherche par PCR des HPV oncogènes. Les échantillons provenant des services du CHRU de Lille sont principalement adressés par les consultations de gynécologie et les consultations prénatales. Les prélèvements extérieurs proviennent en grande partie des Hôpitaux de St Vincent, de Valenciennes et de St Quentin. Les milieux les plus couramment reçus au laboratoire sont les milieux Preservcvt® et Novaprep®. Ces échantillons sont analysés en routine au laboratoire par le test Cobas® 4800 HPV, puis conservés à température ambiante.

La collection des échantillons pour cette étude s'est effectuée de juin à octobre 2014. Les échantillons ont été sélectionnés d'une part en fonction de la date de prélèvement. En effet, le prélèvement doit être technique dans les trois mois pour les milieux Preservcvt® et Novaprep® et dans les deux mois pour Easyfix® (cf. délais de conservation indiqués par les fabricants). D'autre part, nous avons judicieusement choisi des échantillons trouvés positifs en routine par le test Cobas® suivant le ou les génotype(s) détecté(s), afin d'obtenir une diversité de souches à haut risque. Le dernier critère de choix a été le volume d'échantillon : seuls ont été sélectionnés les échantillons en quantité suffisante pour pouvoir effectuer la technique Cepheid, c'est-à-dire dont le volume restant après passage sur le Cobas était d'au moins 1 mL. Le génotype HPV 18 étant plus rare, nous n'avons pu inclure dans cette étude que très peu d'échantillons positifs en HPV 18. De plus, lors de la période de recueil des échantillons, nous n'avons pas reçu de prélèvements dans le milieu Easyfix®.

Trente-cinq échantillons positifs et vingt échantillons négatifs avec le test Roche ont été évalués par la technique Cepheid afin de comparer les deux méthodes.

### **B) Contrôles de qualité**

Deux types de contrôles ont été utilisés : les contrôles AcroMetrix® et les QCMD.

### **1) Les contrôles AcroMetrix®**

Trois contrôles sont utilisés au laboratoire : AcroMetrix® HPV 16, AcroMetrix® HPV 18 et AcroMetrix® HPV 68. Ce sont des lignées cellulaires infectées par un génotype d'HPV, mises en suspension dans le milieu de conservation Preservcyt®. L'ADN d'HPV est intégré au génome cellulaire, de façon à mimer les échantillons de patientes. Ces contrôles sont calibrés à : 50 000 cellules/mL, 100 000 cellules/mL et 250 000 cellules/mL, pour AcroMetrix® HPV 16 (cellules SiHa), HPV 68 (cellules ME-180) et HPV 18 (cellules RWPE-1) respectivement.

Au laboratoire, un mélange de ces trois témoins est effectué selon des dilutions préétablies. Ce mélange est utilisé comme témoin positif maison pour la technique Roche, en plus des témoins positif et négatif fournis dans le kit. Il permet la validation de la série et informe d'une éventuelle dérive de la méthode grâce au suivi des Ct sur le logiciel Unity Real Time®.

Dans cette étude nous avons utilisé des dilutions de ces trois contrôles afin de déterminer les performances des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV. Une solution mère à 10 000 cellules/mL a été créée afin de préparer les solutions de travail.

### **2) Les QCMD : Quality Control for Molecular Diagnostics**

Les QCMD sont des contrôles qualité externes auxquels est abonné le laboratoire. Ce sont soit des cellules en suspension infectées par divers génotypes d'HPV à différentes concentrations, soit des cellules non infectées. Le milieu de suspension est le Preservcyt®. Trois QCMD ont été testés par les deux techniques, les résultats ont été comparés à ceux obtenus par les différents laboratoires participants.

### III. Techniques Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV

La société Cepheid nous a fourni gracieusement les tests Xpert® HPV. Les tests Cobas® nécessaires à la validation de méthode nous ont également été offerts par la société Roche.

#### A) Préanalytique

Les échantillons sont soit transmis par les laboratoires d'anatomopathologie en cas de frottis ASC-US, soit directement par le service prescripteur dans le cadre des suivis de lésions cervicales après traitement.

Les prélèvements gynécologiques de couleur marron foncé (prélèvements hématiques) sont refusés et font l'objet d'une non-conformité (présence possible d'inhibiteurs de la PCR, comme l'hémoglobine, qui conduisent à des résultats faussement négatifs).

Les techniques Roche et Cepheid nécessitent chacune un volume minimal d'échantillon de 1 mL. En routine, le laboratoire n'effectuant qu'un seul test, les prélèvements dont la quantité est inférieure à 1mL sont refusés.

#### 1) Technique Cobas® 4800 HPV

Les prélèvements sont étiquetés d'un code barre puis vortexés. La brosette est ensuite enlevée à l'aide d'une pince stérile. Les échantillons en milieu Preservcyt® et Cobas® ayant un volume compris entre 1 et 3 mL sont transvasés dans un tube secondaire. Les milieux Novaprep® et Easyfix® sont dans tous les cas transvasés puisqu'il n'existe pas de portoir approprié à ces flacons sur l'automate Roche. Les échantillons sont ensuite disposés sur les portoirs adéquats.

#### 2) Technique Xpert® HPV

La technique Xpert® HPV se déroule à l'intérieur d'une cartouche fournie dans le kit (Figure 18) qui doit être dans un premier temps identifiée par le technicien. Après avoir vortexé le prélèvement, un volume d' 1 mL est déversé dans celle-ci à l'aide de la pipette fournie. Il faut ensuite scanner le code barre de la cartouche, puis celui du prélèvement et insérer la cartouche dans l'automate.



Figure 18 : Cartouche GenXpert® HPV

## B) Extraction et Amplification

Les deux méthodes à comparer, le Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV, sont des **PCR multiplex qualitatives en temps réel**.

### 1) *Technique Cobas® 4800 HPV*

La technique Cobas® 4800 HPV permet la détection des génotypes HPV 16, 18 et autres HPV à haut risque (à savoir 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68), ainsi que celle d'un contrôle cellulaire : la bêta-globine.

Le principe du test Cobas® 4800 HPV repose sur deux étapes successives :

La première concerne la **préparation des échantillons** qui est automatisée sur le Cobas® x 480 (Figure 19). Cette première étape permet l'extraction de l'ADN d' HPV et de l'ADN cellulaire.



**Figure 19 : Automate Cobas® 4800 de Roche (de gauche à droite : modules x 480 et z 480)**

Les prélèvements sont digérés en conditions dénaturantes à des températures élevées, puis mis en contact avec un réactif chaotropique qui permet de lyser les cellules. L'ADN d'HPV et l'ADN cellulaire ainsi libérés sont attirés vers des particules de verre magnétiques. Une étape de lavage permet ensuite de purifier l'ADN. Pour finir, l'élution permet de récupérer les acides nucléiques. La durée de préparation de l'échantillon par l'automate est de 1h30.

Après chargement des échantillons, des consommables et des réactifs (étape nécessitant une vingtaine de minutes), le run est lancé.

Le Cobas® x 480 se charge de déposer dans la plaque à micropuits les extraits d'ADN, les ions métalliques divalents et le Master Mix contenant notamment l'ADN polymérase, les amorces spécifiques, les sondes oligonucléotidiques, des dNTP, l'AmpErase et les dUTP. L'ADN d'HPV et l'ADN cellulaire sont alors prêts à être amplifiés et détectés.

La deuxième étape correspond à **l'amplification et à la détection** de ces ADN. Elle se fait sur le Cobas® z 480 (Figure 19) en 2 heures. En pratique, il suffit de transférer la plaque à micropuits du Cobas® x 480 vers le Cobas® z 480.

Le test Cobas® 4800 utilise des amorces qui définissent une séquence d'environ 200 nucléotides dans la région L1 et permettent l'amplification de l'ADN de 14 types d'HPV à haut risque. Une paire supplémentaire d'amorces cible le gène  $\beta$ -globine humain (amplicon de 330 pb) afin de contrôler la qualité du prélèvement. La détection de l'ADN se fait en temps réel à l'aide de sondes spécifiques des types 16, 18 ou d'un panel de 12 HPV HR marquées par 3 fluorophores différents. Un 4<sup>ème</sup> fluorophore marque la sonde spécifique de la  $\beta$ -globine. De cette manière, on peut mesurer indépendamment les différents amplicons puisqu'ils émettent à une longueur d'onde différente.

L'amplification est sélective grâce à une AmpErase et à des dUTP contenus dans le MasterMix. La désoxyuridine triphosphate n'existe pas dans l'ADN naturel, elle remplace la thymidine du brin d'ADN HPV ou de  $\beta$ -globine. Seuls les amplicons contiennent de l'uridine triphosphate. L'enzyme AmpErase va cliver l'ADN à l'endroit où se situe l'uridine, lors de la première étape de thermocyclage. De cette façon, tout amplicon contaminant provenant d'une manipulation antérieure sera clivé donc non amplifiable. Il ne reste alors que l'ADN à amplifier. L'AmpErase étant inactive à des températures supérieures à 55°C, l'amplicon cible ne sera donc pas clivé par la suite.

## **2) Technique Xpert® HPV**

Le test Xpert® HPV permet sur l'automate GenXpert® de Cepheid (Figure 20) de détecter la région E6/E7 du génome d'ADN viral des mêmes 14 HPV à haut risque. Les canaux de détection diffèrent de la technique Roche : il existe un canal permettant la détection de l' HPV 16, un autre la détection du couple HPV 18/45, et trois autres pour détecter les

autres HPV à haut risque (OHR : Other high risk) à savoir 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68.



**Figure 20 : Automate GenXpert® de Cepheid**

L'automate nécessite une cartouche à usage unique qui comprend les réactifs de PCR, reçoit l'échantillon et constitue également le lieu du déroulement de la PCR.

La première étape est la lyse des cellules par ultrasons, ce qui permet la libération des acides nucléiques à la fois du virus HPV et des cellules humaines. Ensuite l'ADN est purifié sur une colonne de filtration, puis élué. L'ADN est alors prêt à être amplifié sur le même principe de PCR et détecté en temps réel. Un contrôle cellulaire, appelé ici contrôle d'adéquation de l'échantillon (CAE), permet de détecter la présence d'un gène humain à copie unique et vérifie que l'échantillon contient le nombre de cellules suffisant pour permettre de déterminer la présence ou non d'HPV. Il constitue l'équivalent de la  $\beta$ -globine chez Roche. Le contrôle de vérification de sonde (CVS) permet de vérifier la réhydratation des réactifs, le remplissage de la cartouche, l'intégrité de la sonde et la stabilité du colorant.

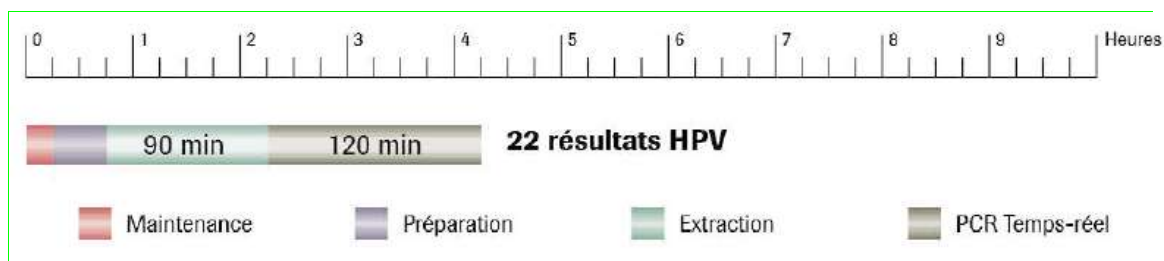
## **C) Temps de réalisation des analyses**

### ***1) Technique Cobas® 4800 HPV***

Une maintenance quotidienne est effectuée avant d'utiliser le Cobas® 4800, cette opération dure 6 minutes environ et consiste à décontaminer l'appareil et vider les poubelles.



Le test Cobas® 4800 HPV nécessite environ 30 minutes de préparation par un technicien : cette préparation consiste à déboucher puis positionner les échantillons sur les portoirs et charger les réactifs et consommables. Ensuite le run est lancé. L'extraction de l'ADN (module x) ainsi que l'amplification et la détection en temps réel (module z) sont automatisées, ces deux étapes durent respectivement 90 minutes et 2 heures. Le technicien n'intervient qu'à la fin de l'extraction pour charger la plaque de micropuits dans le module z. Cette intervention ne nécessite qu'une seule minute. L'enchaînement et la durée des étapes du test Cobas® 4800 HPV sont schématisés dans la figure 21.



**Figure 21 : Représentation schématique du temps d'analyse du test Cobas® 4800 HPV**

A la fin de l'analyse, le technicien décharge les échantillons, les réactifs et les consommables, et valide puis transfère les résultats dans le système informatique du laboratoire (SIL). Cette étape nécessite 4 minutes. Une série d'échantillons (21 échantillons + 1 CQI) est donc analysée par le Cobas® en 4 heures environ, le temps d'intervention du technicien est de 40 minutes.

## 2) *Technique Xpert® HPV*

Le test Xpert® HPV est un test unitaire, 1 minute est nécessaire à la préparation de la cartouche et au lancement du test. L'analyse dure moins d'une heure. Plusieurs cartouches peuvent être lancées les unes à la suite des autres. Le temps de manipulation par les techniciens est très limité (moins de 2 minutes) et comprend :

- Le déchargement du prélèvement dans la cartouche
- Scan du code barre de la cartouche et du prélèvement
- L'insertion de la cartouche dans l'automate
- Le déchargement de la cartouche une fois le test terminé
- La récupération du résultat dans le logiciel Xpert® et la transcription dans le SIL.

## D) Traçabilité

Dans les deux tests étudiés, lors du pré-analytique, le technicien identifie le prélèvement à l'aide d'un numéro de dossier, étape indispensable et critique. Ensuite, un lecteur code barre permet de scanner cette même étiquette. Les deux techniques communiquent avec le SIL, ce qui limite les erreurs d'identité.

Sur chacun de ces automates, le technicien va également scanner le code barre des lots de réactifs et consommables, ce qui permet une bonne traçabilité.

## E) Interprétation des courbes de fluorescence

### 1) Technique Cobas® 4800 HPV

Les courbes de fluorescence de la technique Roche sont représentées sur la figure 22.

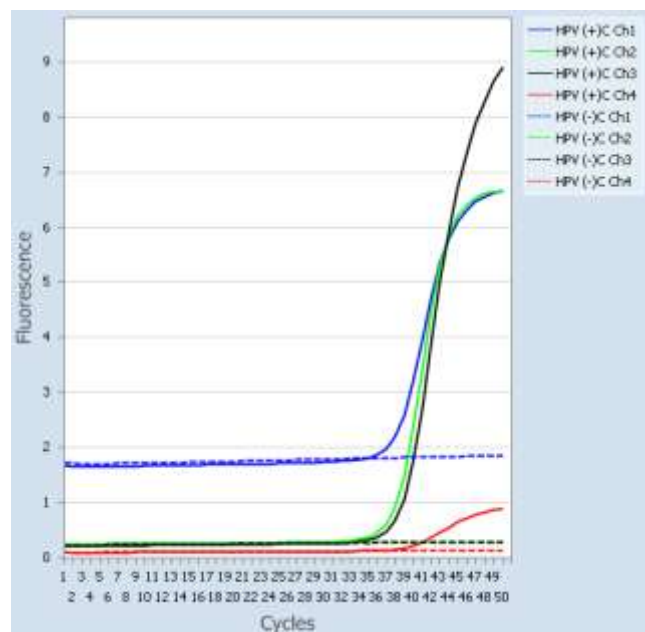


Figure 22 : Courbe de fluorescence de la détection des HPV à HR des témoins positif et négatif par la technique Roche

Dans la technique Roche, quatre canaux de détection existent, à savoir Ch1, Ch2, Ch3 et Ch4. Ils permettent respectivement de détecter HPV OHR, HPV 16, HPV 18 et la  $\beta$ -globine. Un témoin HPV positif et un témoin négatif sont présents dans le kit Cobas® 4800 HPV et permettent de valider la PCR :

- Le **témoin positif (HPV (+)C)** comprend des cellules infectées par HPV 16, HPV 18 et un autre génotype d'HPV HR : HPV 39. Les courbes de fluorescence de ce témoin sont représentées par un trait plein. Les Ct correspondants sont d'autant plus petits que la quantité d'ADN est grande (détection plus précoce).
- Le **témoin négatif (HPV (-)C)** ne contient pas de cellules et pas d'ADN d' HPV. Aucun canal ne doit détecter de fluorescence. Les courbes sont représentées par un trait discontinu, aucune ne doit décrocher. Le seuil de positivité de chaque canal se situe au-dessus des courbes plates du témoin négatif du canal correspondant. En dessous de ce seuil, la fluorescence est non spécifique.

Les courbes patients ne sont pas accessibles sur l'automate. Les résultats sont affichés sous forme d'un tableau (Figure 23).

|                 |                  |            |            |                      |                   |          |     |
|-----------------|------------------|------------|------------|----------------------|-------------------|----------|-----|
| 2H17011001602RS | valid            | Valid      | Valid      | 09-Oct-2014 11:29:07 | not available     | Microbia | A01 |
| 0NCT011121608GF | valid            | Valid      | Valid      | 09-Oct-2014 11:29:07 | not available     | Microbia | B01 |
| 44100313802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | C01 |
| 44100319802     | POS Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | D01 |
| 44100373802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | E01 |
| 44100374802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | F01 |
| 44100378802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | G01 |
| 44100383802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | H01 |
| 44100385802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | A02 |
| 44100391802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | B02 |
| 44100395802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | C02 |
| 44100396802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | D02 |
| 44100398802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | E02 |
| 44100399802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | F02 |
| 44100401802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | G02 |
| 44100402802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | H02 |
| 44100408802     | POS Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | A03 |
| 44100409802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | B03 |
| 44100408802     | POS Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | C03 |
| 44100409802     | NEG Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | D03 |
| 44100411802     | POS Other HR HPV | POS HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | E03 |
| 44100310802     | POS Other HR HPV | NEG HPV 16 | NEG HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | F03 |
| 208301          | POS Other HR HPV | POS HPV 16 | POS HPV 18 | 09-Oct-2014 11:29:07 | HPV high Risk ... | Microbia | G03 |

Figure 23 : Résultats de la PCR Cobas® 4800 HPV

## 2) Technique Xpert® HPV

En ce qui concerne la technique Cepheid, le test étant unitaire, les courbes de fluorescence (Figure 24) sont visualisées pour chaque test.

Une courbe correspond au contrôle cellulaire CAE (encore appelé SAC pour Specimen Adequacy Control) qui doit donner un résultat positif, sinon l'analyse est invalide (l'ADN cellulaire n'est pas détectable ce qui signifie que le prélèvement ne contient pas assez de cellules pour permettre la recherche des papillomavirus).

Les génotypes d'HPV HR vont être détectés par 5 sondes de fluorescence différente. On observe donc cinq courbes : une première courbe pour HPV 16, une deuxième pour HPV 18/45 et trois correspondent aux 11 autres HPV à haut risque puisque 3 canaux de couleur sont dédiés à ceux-ci, à savoir : Canal P3 : HPV 31, 33, 35, 52, 58 / Canal P4 : HPV 51 et 59 / Canal P5 : HPV 39, 56, 66, 68.

Les Ct sont visibles dans le tableau situé au-dessus du graphique, ainsi que le résultat POSITIF ou NEGATIF. Le contrôle de vérification de sonde (CVS) permet de s'assurer que la sonde est bien active (noté REUSSITE), sinon (ECHEC) l'analyse est invalide.

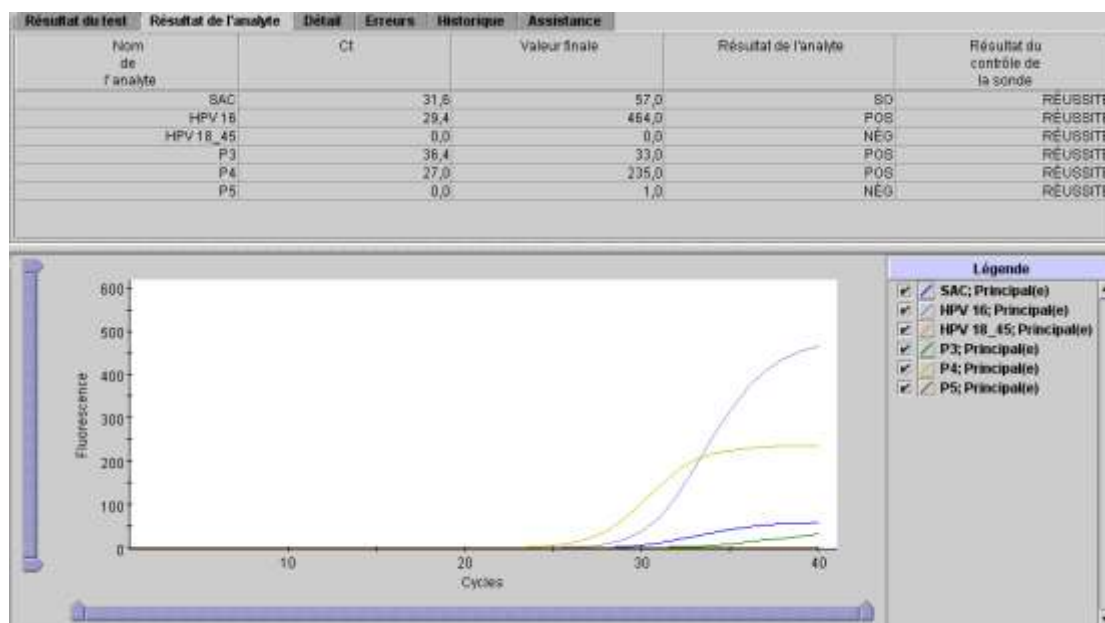


Figure 24 : Résultats de la PCR Xpert® HPV de Cepheid

## **IV. Evaluation des performances analytiques des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV pour différents milieux**

Une étude récente menée par *H.Khiri & al.* (82) a évalué les performances du test Cobas® 4800 HPV et la stabilité des principaux milieux de conservation et/ou de transport de cellules du col de l'utérus utilisés en France. Nous nous sommes inspirés de cet article afin de mener à bien notre étude.

### **A) Détermination de la limite de détection**

La limite de détection (LOD) est définie comme le plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est encore appelée sensibilité analytique. Pour les méthodes qualitatives, la limite de détection correspond au seuil de positivité (83).

Pour la technique Cobas® 4800 HPV, la limite de détection a été évaluée à partir de témoins AcroMatrix® HPV 16, HPV 18 et HPV 68 de concentrations respectives 50 000 cellules/mL, 250 000 cellules/mL et 100 000 cellules/mL. En ce qui concerne la technique Xpert® HPV, seule la LOD pour HPV 68 a été déterminée dans un souci d'économie de kits.

Pour cela, des dilutions successives de chaque témoin ont été effectuées, dans les différents milieux étudiés : Novaprep®, Easyfix®, ainsi que dans le milieu de référence le Preservcyt®. La technique Roche a été testée sur un milieu supplémentaire : le milieu Cobas® PCR Cell Collection Media (milieu validé par le fabricant).

Les dilutions ont été testées en triplicate, la dilution la plus élevée pour laquelle le résultat de chaque triplicate est positif constitue la limite de détection.

Les valeurs des LOD de l'article d'*H.Khiri & al.* nous ont aidé à avoir une idée approximative des premières dilutions à tester. En fonction du résultat obtenu nous avons effectué d'autres dilutions afin d'affiner le résultat de la LOD.

Exemple de l'HPV 16 en milieu Preservcyt®: La LOD annoncée par l'article est de 105 cellules/mL. Nous avons donc testé les concentrations suivantes : 100 cellules/mL ainsi que 500 cellules/mL et 50 cellules/mL afin de l'encadrer. Comme la technique détecte trois

fois le prélèvement à 100 cellules/mL et pas celui à 50 cellules/mL, nous avons testé une valeur intermédiaire à 80 cellules/mL pour affiner le résultat.

Nous avons fait de même, en nous basant sur les données fabricant pour les tests sur Cepheid. N'ayant aucune donnée pour le milieu Cobas®, nous avons effectué les mêmes dilutions que pour le Preservcyt®.

Nous avons évalué les performances des deux techniques en comparant les résultats de LOD aux données de la notice fournisseur puis aux résultats de l'article d'*H.Khiri & al.* Les LOD ont été déterminées par le fournisseur Roche, d'une part à l'aide de plasmides de HPV 31, HPV 16 et HPV 18 et d'autre part à l'aide de lignées cellulaires positives au HPV : SiHa pour HPV 16 et Hela pour HPV 18. Nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus par Roche sur les lignées cellulaires et non sur les plasmides, puisque notre modèle expérimental est également fait à partir de lignées cellulaires.

Nous avons évalué aussi l'influence des milieux sur la sensibilité du test en comparant nos valeurs pour les milieux Novaprep®, Easyfix® et +/- Cobas®, au milieu de référence le Preservcyt®, comme cela a été fait dans l'article.

## B) Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument / réactif) pour le paramètre concerné (83).

Pour chacun des trois milieux Preservcyt®, Novaprep® et Easyfix®, des dilutions du contrôle AcroMetrix® HPV 68 ont été réalisées afin d'obtenir des concentrations approximativement égales à 3 fois la LOD (un bas niveau) et 10 fois la LOD (un haut niveau) (Tableau 3).

| Concentration en cellules/mL | Roche  | Cepheid |      |
|------------------------------|--------|---------|------|
| Preservcyt®                  | 3 LOD  | 390     | 2400 |
|                              | 10 LOD | 1300    | 8000 |
| Novaprep® & Easyfix®         | 3 LOD  | 360     | 2400 |
|                              | 10 LOD | 1200    | 8000 |

Tableau 3 : Concentrations utilisées pour les bas et hauts niveaux

Ces bas et hauts niveaux sont testés cinq fois sur chacune des deux techniques. Ils sont lancés par le même opérateur, dans le même run pour la technique Roche, et dans le même module, au même moment pour le test Cepheid.

Nous avons jugé des performances des deux techniques en appréciant les coefficients de variation obtenus dans cette étude de répétabilité et en les comparant aux données fournisseurs.

### **C) Fidélité intermédiaire**

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages,... (83).

Les mêmes bas et haut niveaux que pour la répétabilité ont été testés cinq fois. Ces cinq tests ont été lancés à des jours différents donc dans un run différent pour le Cobas®, et dans un module différent pour Xpert® à des jours différents, l'opérateur ne changeant pas.

De la même manière nous avons jugé des performances des deux techniques en appréciant les coefficients de variation obtenus dans cette étude de fidélité intermédiaire et en les comparant aux données fournisseurs.

### **D) Stabilité**

La stabilité représente la durée maximale de conservation de l'échantillon dans le milieu utilisé, à partir de la date du prélèvement et à une température donnée. Les prélèvements étant stockés à température ambiante au laboratoire, elle sera évaluée uniquement à cette température.

Dans les notices fournisseurs, la stabilité à température ambiante des prélèvements gynécologiques est garantie durant 6 mois en milieu Preservcvt®, 90 jours en milieu Novaprep® et 60 jours en milieu Easyfix®. Elle a été évaluée comme dans l'article *d'H.Khiri & al.* : à J0, J30, J60 et J90 en milieux Preservcvt® et Novaprep® et à J0, J30, J60 en milieu Easyfix®.

Cette étude de stabilité a été réalisée à l'aide du contrôle AcroMetrix® HPV 68 : puisque la nature du génotype des HPV n'a pas d'incidence significative sur la stabilité de l'échantillon (82).

Les cellules du témoin AcroMetrix® HPV 68 sont en suspension dans le milieu Preservcyt®. Elles vont devoir être lavées afin de s'affranchir de toute interférence due à ce milieu.

Voici le mode opératoire de préparation des échantillons :

- A partir du témoin AcroMetrix® HPV 68, 3 aliquots de 500 µL (contenant approximativement 50 000 cellules) sont préparés, puis centrifugés à 1500 tours/min pendant 10 minutes.
- Les 3 culots cellulaires sont récupérés et lavés avec chacun des milieux.
- Après une deuxième centrifugation (1500 tours/min, 10 minutes), les culots de cellules sont récupérés et repris dans un volume de milieu égal au volume initialement prélevé en témoin, soit 500 µL.

Ces trois tubes contiennent chacun 50 000 cellules soit une concentration de 100 000 cellules/mL. Des dilutions avec le milieu approprié ont été effectuées afin d'obtenir une concentration en cellules environ égale à 5 fois la LOD (soit 600 cellules/mL pour Roche et 4000 cellules/mL pour Cepheid).

Ces trois échantillons sont passés une seule fois sur Cobas® et Xpert®. Nous évaluerons si les milieux sont stables en se basant sur le résultat qualitatif (présence ou absence d'HPV à HR) et nous apprécierons la variation des Ct obtenus au moyen du coefficient de variation.



## **V. Comparaison des tests Cobas® 4800 HPV (Roche) et Xpert® HPV (Cepheid)**

### **A) Choix des échantillons**

Dans cette étude, la méthode Xpert® HPV (Cepheid) est comparée à la méthode Cobas® 4800 HPV (Roche). Pour se faire, de juin à octobre 2014, parmi les échantillons patients retrouvés négatifs en routine par la technique Roche, nous avons sélectionné 10 prélèvements sur milieu Preservcyt® et 10 sur milieu Novaprep®. Ensuite, nous avons sélectionné 35 prélèvements parmi ceux retrouvés positifs en HPV HR, en fonction de leur génotype afin d'obtenir un maximum de diversité. Vingt échantillons sur milieu Preservcyt® et 15 sur milieu Novaprep®, positifs à un seul ou plusieurs HPV HR en technique Roche ont ainsi été choisis. Les 55 échantillons (20 négatifs et 35 positifs) ont été testés par la trousse Xpert® HPV afin de comparer les deux méthodes.

Deux prélèvements jugés peu hématiques ont été testés par la technique Roche et ont montré la présence d'HPV 16. Ils ont tous deux été testés par la technique Cepheid 2 semaines après pour l'un et 5 semaines après pour l'autre, mais sont sortis invalides. Nous avons donc décidé de les exclure de la comparaison de méthodes. La présence de sang dans le prélèvement même en faible quantité a probablement altéré la stabilité des cellules.

### **B) Comparaison des résultats**

Les deux techniques détectent les mêmes 14 génotypes d'HPV HR et possèdent un canal commun pour la détection de l'HPV 16. Les autres canaux de détection sont différents : Roche détecte l'HPV 18 seul alors que Cepheid détecte le couple HPV 18/45. Nous avons donc comparé les résultats de plusieurs manières :

- Le résultat global : c'est-à-dire « Présence / Absence d'HPV HR »
- Détection d'HPV 16
- Détection d'HPV HR autres que HPV 16

Nous avons calculé pour ces 3 groupes le Coefficient Kappa de Cohen afin de mesurer le degré d'accord entre les deux techniques, indépendamment du milieu, puisque le but ici est de comparer les méthodes et non les milieux. Des valeurs comprises entre 0,81 et 1,00 démontrent un accord excellent.

Pour affiner nos résultats nous avons également calculé le Chi<sup>2</sup> de McNemar qui évalue l'équilibre des résultats discordants (c'est-à-dire Roche+/Cepheid- et Roche-/Cepheid+), ainsi que la proportion d'agrément positif évaluant le pourcentage de résultats positifs à la fois sur Roche et Cepheid, parmi tous les résultats qui sont au moins positifs pour un test ; et la proportion d'agrément négatif (pourcentage de résultats négatifs à la fois sur Roche et Cepheid, parmi tous les résultats qui sont au moins négatifs pour un test).

### **C) Corrélation entre les Ct des deux techniques pour HPV 16**

Les tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV sont deux tests qualitatifs, les Ct sont néanmoins comparés pour déceler d'éventuelles discordances. Le canal HPV 16 étant le seul commun entre les deux tests, il est impossible de comparer les Ct des autres génotypes.

Nous avons établi la droite de corrélation entre les Ct (HPV 16) Roche / Cepheid. Aucune des deux méthodes ne constituant de référence et les méthodes n'étant pas indépendantes, nous avons déterminé le Coefficient de Corrélation Intraclasse (CCI) pour évaluer la corrélation entre ces deux tests.

### **D) Analyse des discordances**

Les prélèvements montrant une discordance entre les deux techniques ont été réévalués par la technique Roche. L'analyse par le test Xpert® étant effectuée quelques jours à 2 mois après la technique Roche, il fallait vérifier que le résultat obtenu lors du premier test Roche était identique à celui du deuxième essai, pour écarter l'hypothèse d'une dégradation du prélèvement.

De plus, dans quelques cas, un génotypage par le test LINEAR ARRAY HPV® a été réalisé, afin d'avoir un élément supplémentaire pour conclure sur les discordances.

Aucun des échantillons n'a posé problème en termes de volume de prélèvement, le volume était dans tous les cas bien supérieur à 1 mL, ce qui nous a permis d'effectuer les analyses complémentaires.

# RESULTATS

## I. Evaluation des performances analytiques des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV pour différents milieux

### A) Détermination de la limite de détection

Pour la technique Roche, les limites de détection (LOD) ont été déterminées pour les différents milieux et pour chaque génotype. Elles ont été évaluées :

- Pour HPV 16, à **100** cellules/mL dans les milieux Preservcyt®, Novaprep® et Cobas®, et à **50** cellules/mL dans le milieu Easyfix® (Tableau 4)
- Pour HPV 18, à **1500** cellules/mL dans les quatre types de milieux testés : Preservcyt®, Novaprep®, Easyfix® et Cobas® (Tableau 5)
- Pour HPV 68, à **130** cellules/mL dans le milieu Preservcyt®, **120** cellules/mL pour Novaprep® et Easyfix®, et à **80** cellules/mL dans le milieu Cobas® (Tableau 6)

| Milieux     | Concentration HPV 16 (cellules/mL) | Valeurs des Ct obtenus sur Roche |              |              |
|-------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|
|             |                                    | 1er passage                      | 2ème passage | 3ème passage |
| Preservcyt® | 500                                | 36,9                             | 36,5         | 35,9         |
|             | <b>100</b>                         | 38,9                             | 38,1         | 38,7         |
|             | 80                                 | -                                | -            | -            |
|             | 50                                 | -                                | -            | -            |
| Novaprep®   | 500                                | 37,1                             | 36,1         | 37           |
|             | <b>100</b>                         | 40,1                             | 40           | 38,2         |
|             | 80                                 | 38,4                             | -            | 39,2         |
|             | 50                                 | -                                | 39           | 39,4         |
| Easyfix®    | 500                                | 36,2                             | 35,6         | 36,2         |
|             | 100                                | 40,4                             | 38,2         | 39,5         |
|             | <b>50</b>                          | 40,2                             | 39,9         | 40,2         |
| Cobas®      | 500                                | 36,7                             | 36,7         | 36,4         |
|             | <b>100</b>                         | 38,5                             | 40,2         | 38,6         |
|             | 80                                 | -                                | -            | -            |
|             | 50                                 | -                                | -            | -            |

Tableau 4 : Détermination des limites de détection de la technique Roche pour HPV 16

| Milieux     | Concentration HPV 18 (cellules/mL) | Valeurs des Ct obtenus sur Roche |              |              |
|-------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|
|             |                                    | 1er passage                      | 2ème passage | 3ème passage |
| Preservcyt® | 5000                               | 37,6                             | 37,7         | 39,2         |
|             | 1500                               | 38,3                             | 38,2         | 38,6         |
|             | 1000                               | -                                | -            | -            |
| Novaprep®   | 5000                               | 37,3                             | 37,9         | 37,8         |
|             | 2000                               | 38,6                             | 38,6         | 38,2         |
|             | 1750                               | 38,3                             | 38,2         | 39,7         |
|             | 1500                               | 39,6                             | 38,7         | 39,8         |
|             | 1000                               | -                                | -            | -            |
| Easyfix®    | 5000                               | 39,3                             | 38,3         | 38,5         |
|             | 1500                               | 39,2                             | 39,9         | 39,5         |
|             | 1000                               | -                                | -            | 39,8         |
| Cobas®      | 5000                               | 37,9                             | 38,7         | 38,4         |
|             | 1500                               | 38,1                             | 37,9         | 37,8         |
|             | 1000                               | -                                | -            | -            |

Tableau 5 : Détermination des limites de détection de la technique Roche pour HPV 18

| Milieux     | Concentration HPV 68 (cellules/mL) | Valeurs des Ct obtenus sur Roche |              |              |
|-------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|
|             |                                    | 1er passage                      | 2ème passage | 3ème passage |
| Preservcyt® | 500                                | 36,4                             | 35,7         | 36,3         |
|             | 130                                | 40                               | 38,2         | 37,5         |
|             | 120                                | 38,9                             | -            | 38,8         |
|             | 100                                | 38,5                             | -            | 37,5         |
| Novaprep®   | 500                                | 36,2                             | 36,2         | 36,5         |
|             | 120                                | 39,3                             | 38,6         | 38,6         |
|             | 100                                | -                                | 39,3         | 38,8         |
| Easyfix®    | 500                                | 35,9                             | 36           | 35,7         |
|             | 120                                | 38,7                             | 38,1         | 39,6         |
|             | 100                                | 38,1                             | -            | 38,6         |
| Cobas®      | 500                                | 35,6                             | 35,6         | 36,1         |
|             | 100                                | 39,4                             | 39,3         | 39,1         |
|             | 80                                 | 39,2                             | 39,9         | 39,8         |
|             | 50                                 | 38,1                             | -            | 39,9         |

Tableau 6 : Détermination des limites de détection de la technique Roche pour HPV 68

Pour la Technique Cepheid, seules les LOD de l'HPV 68 ont été déterminées. Elles s'élèvent à 800 cellules/mL dans les trois milieux testés : Preservcyt®, Novaprep® et Easyfix® (Tableau 7).

| Milieux     | Concentration HPV 68 (cellules/mL) | Valeurs des Ct obtenus sur Cepheid |              |              |
|-------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|
|             |                                    | 1er passage                        | 2ème passage | 3ème passage |
| Preservcyt® | 800                                | 39,1                               | 37,2         | 36,9         |
|             | 400                                | -                                  | -            | 37,7         |
| Novaprep®   | 800                                | 36,4                               | 39           | 36,8         |
|             | 400                                | -                                  | 38           | -            |
| Easyfix®    | 800                                | 37,7                               | 37           | 37,1         |
|             | 400                                | -                                  | -            | 37,5         |

Tableau 7 : Détermination des limites de détection de la technique Cepheid pour HPV 68

Nous n'avons pas pu affiner ce résultat du fait d'un nombre de cassettes insuffisant.

L'ensemble des valeurs des LOD obtenues est regroupé dans le tableau 8.

| Résultats des LOD  |              |         |       |              |         |            |              |         |       |                |       |
|--------------------|--------------|---------|-------|--------------|---------|------------|--------------|---------|-------|----------------|-------|
| Unité              | copies/mL    |         |       |              |         |            |              |         |       | cellules/mL    |       |
| Génotype Technique | HPV 16 Roche |         |       | HPV 18 Roche |         |            | HPV 68 Roche |         |       | HPV 68 Cepheid |       |
| Données            | Exp          | Article | Fourn | Exp          | Article | Fourn      | Exp          | Article | Fourn | Exp            | Fourn |
| Preservcyt®        | 200          | 105     | 200   | 1500         | 1219    | 400 à 2000 | 130          | 113     | NE    | 800            | 267   |
| Novaprep®          | 200          | 110     |       | 1500         | 1759    |            | 120          | 104     |       | 800            |       |
| Easyfix®           | 100          | <100    |       | 1500         | 1211    |            | 120          | 110     |       | 800            |       |
| Cobas®             | 200          |         |       | 1500         |         |            | 80           |         |       |                |       |

Tableau 8 : Récapitulatif des valeurs des LOD des techniques Roche et Cepheid pour différents milieux

Exp : valeurs expérimentales / Article : valeurs données dans l'article de *H.Khiri & al* / Fourn : données fournisseur / NE : Non effectué

Les LOD de l'article de *H.Khiri & al* sont exprimées en copies/mL, nous avons converti dans cette même unité nos résultats obtenus sur Roche (exprimés en cellules/mL dans les tableaux 4 à 6) :

- Le témoin AcroMetrix® HPV 16 est constitué de cellules SiHa, chacune d'entre elles comporte environ 2 copies d'ADN d'HPV. Les LOD obtenues ont été multipliées par 2 pour les convertir en copies/mL.
- Le témoin AcroMetrix® HPV 18 est constitué de cellules RWPE-1, le témoin HPV 68 contient lui des cellules ME180, chacune de ces deux lignées présente une seule copie d'ADN d'HPV par cellule. La conversion ne change pas les valeurs.

Nous avons converti également en copies/mL les données fournisseur Roche :

- Pour HPV 16, la lignée SiHa est également utilisée, la LOD égale à 100 cellules/mL équivaut donc à 200 copies/mL.
- Pour HPV 18, Roche utilise une lignée différente de la notre : la lignée HeLa, elle contient 10 à 50 copies d'ADN d'HPV par cellule. Le résultat Roche de 40 cellules/mL équivaut donc à une concentration de 400 à 2000 copies/mL.

Pour les autres HPV HR, Roche a évalué la LOD sur HPV 31, alors que nous avons utilisé un témoin AcroMetrix® HPV 68 (seul disponible dans le commerce). La comparaison n'est donc pas possible.

La lignée cellulaire utilisée par Cepheid est la même que celle testée dans notre étude (ME180), les résultats obtenus sont donc directement comparables avec les données fournisseurs (en cellules/mL).

## B) Répétabilité

Les résultats de l'étude de répétabilité sont regroupés dans le tableau 9 ci-dessous, le détail des Ct obtenus se trouve en annexe 1.

| Etude de répétabilité |           |                                    |                |                   |        |
|-----------------------|-----------|------------------------------------|----------------|-------------------|--------|
| Milieux               | Technique | Equivalent Concentration en HPV 68 | Moyenne des Ct | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Preservcyt®           | Roche     | 3 LOD                              | 36,44          | 0,55              | 1,52   |
|                       |           | 10 LOD                             | 34,64          | 0,14              | 0,39   |
|                       | Cepheid   | 3 LOD                              | 35,88          | 0,38              | 1,05   |
|                       |           | 10 LOD                             | 34,00          | 0,76              | 2,22   |
| Novaprep®             | Roche     | 3 LOD                              | 36,34          | 0,40              | 1,10   |
|                       |           | 10 LOD                             | 34,68          | 0,15              | 0,42   |
|                       | Cepheid   | 3 LOD                              | 35,24          | 0,60              | 1,69   |
|                       |           | 10 LOD                             | 33,66          | 0,77              | 2,28   |
| Easyfix®              | Roche     | 3 LOD                              | 36,22          | 0,36              | 0,99   |
|                       |           | 10 LOD                             | 34,58          | 0,19              | 0,56   |
|                       | Cepheid   | 3 LOD                              | 34,28          | 0,46              | 1,34   |
|                       |           | 10 LOD                             | 33,06          | 0,51              | 1,55   |

Tableau 9 : Détermination de la répétabilité des techniques Roche et Cepheid pour HPV 68 dans les différents milieux

Les coefficients de variation des Ct sont respectivement pour les techniques Roche et Cepheid :

En milieu Preservcyt®: de 1,52 % et 1,05 % à une concentration de 3 fois la LOD et de 0,39 % et 2,22 % à une concentration de 10 fois la LOD.

En milieu Novaprep® : de 1,10 % et 1,69 % à une concentration de 3 fois la LOD et de 0,42 % et 2,28 % à une concentration de 10 fois la LOD.

En milieu Easyfix®: de 0,99 % et 1,34 % à une concentration de 3 fois la LOD et de 0,56 % et 1,55 % à une concentration de 10 fois la LOD.

Dans la notice Roche, l'étude de précision sur le milieu Preservcyt® fournit pour la répétabilité des CV de Ct situés entre 0,7 et 1,90 %. Pour Cepheid, ils sont compris entre 1,9 et 7,2 %.

### C) Fidélité intermédiaire

Les résultats concernant la fidélité intermédiaire sont regroupés dans le tableau 10, le détail des Ct obtenus se trouve en annexe 2.

| Etude de fidélité intermédiaire |           |                                    |                |                   |        |
|---------------------------------|-----------|------------------------------------|----------------|-------------------|--------|
| Milieux                         | Technique | Equivalent Concentration en HPV 68 | Moyenne des Ct | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Preservcyt®                     | Roche     | 3 LOD                              | 36,26          | 0,30              | 0,83   |
|                                 |           | 10 LOD                             | 34,54          | 0,21              | 0,60   |
|                                 | Cepheid   | 3 LOD                              | 35,64          | 0,70              | 1,96   |
|                                 |           | 10 LOD                             | 34,00          | 0,30              | 0,87   |
| Novaprep®                       | Roche     | 3 LOD                              | 36,14          | 0,33              | 0,90   |
|                                 |           | 10 LOD                             | 34,58          | 0,26              | 0,74   |
|                                 | Cepheid   | 3 LOD                              | 35,08          | 0,25              | 0,71   |
|                                 |           | 10 LOD                             | 33,12          | 0,31              | 0,94   |
| Easyfix®                        | Roche     | 3 LOD                              | 35,88          | 0,52              | 1,44   |
|                                 |           | 10 LOD                             | 34,24          | 0,27              | 0,80   |
|                                 | Cepheid   | 3 LOD                              | 34,44          | 0,34              | 0,98   |
|                                 |           | 10 LOD                             | 32,56          | 0,29              | 0,88   |

**Tableau 10 : Détermination de la fidélité intermédiaire des techniques Roche et Cepheid pour HPV 68 dans les différents milieux**

Les coefficients de variation des Ct sont respectivement pour les techniques Roche et Cepheid :

En milieu Preservcyt® : de 0,83 % et 1,96 % à une concentration de 3 fois la LOD et de 0,60 % et 0,87 % à une concentration de 10 fois la LOD.

En milieu Novaprep® : de 0,90 % et 0,71 % à une concentration de 3 fois la LOD et de 0,74 % et 0,94 % à une concentration de 10 fois la LOD.

En milieu Easyfix®: de 1,44 % et 0,98 % à une concentration de 3 fois la LOD et de 0,80 % et 0,88 % à une concentration de 10 fois la LOD.

Dans les notices fournisseurs, les CV des Ct obtenus en milieu Preservcyt® pour la reproductibilité sont compris entre 1,3 et 2,2 % pour Roche et entre 2,3 et 7,2 % pour Cepheid.

## D) Stabilité

Les résultats concernant la stabilité des milieux sont rassemblés dans le tableau 11.

| Technique | Milieux     | Valeur des Ct obtenus pour HPV 68 (5LOD) |      |      |      | Moyenne des Ct | Ecart-type des Ct | CV (%) |
|-----------|-------------|------------------------------------------|------|------|------|----------------|-------------------|--------|
|           |             | J 0                                      | J 30 | J 60 | J 90 |                |                   |        |
| Roche     | Preservcyt® | 37,2                                     | 35,9 | 35,4 | 35,6 | 36,0           | 0,7               | 1,95   |
|           | Novaprep®   | 35,6                                     | 36,3 | 35,7 | 35,6 | 35,8           | 0,3               | 0,81   |
|           | Easyfix®    | 35,2                                     | 37,8 | 34,7 |      | 35,9           | 1,4               | 3,79   |
| Cepheid   | Preservcyt® | 36,9                                     | 35   | 36,5 | 36,4 | 36,2           | 0,7               | 1,98   |
|           | Novaprep®   | 35                                       | 34,9 | 35,4 | 35   | 35,1           | 0,2               | 0,55   |
|           | Easyfix®    | 34,2                                     | 33,7 | 34,8 |      | 34,2           | 0,4               | 1,31   |

Tableau 11 : Etude de la stabilité des milieux par la comparaison des Ct

L'étude de stabilité montre que la détection est positive pour chaque technique, pour tous les milieux et à tous les temps testés. Les coefficients de variation des Ct obtenus pour l'évaluation de la stabilité sont respectivement pour Roche et Cepheid :

En milieu Preservcyt®: de 1,95 % et 1,98 %

En milieu Novaprep® : de 0,81 % et 0,55 %

En milieu Easyfix® : de 3,79 % et 1,31 %



## E) Résultats des QCMD

Les résultats obtenus pour la détection des 3 QCMD par les deux techniques Roche et Cepheid sont rassemblés dans le tableau 12.

| Résultats des Ct Milieu Preservcyt® |           | QCMD 2         | QCMD 6         | QCMD 9                       |
|-------------------------------------|-----------|----------------|----------------|------------------------------|
| ROCHE                               | HPV 16    | 29,6           | -              | 30,9                         |
|                                     | HPV 18    | -              | 28,2           | 29,4                         |
|                                     | HPV OHR   | -              | -              | -                            |
| CEPHEID                             | HPV 16    | 27,3           | -              | 29,8                         |
|                                     | HPV 18_45 | -              | 29,8           | 32,3                         |
|                                     | HPV OHR   | -              | -              | -                            |
| Résultat organisme QCMD (Ct)        |           | HPV 16+ (30,9) | HPV 18+ (28,9) | HPV 16+(32)<br>HPV 18+(30,2) |

Tableau 12 : Résultats des QCMD

Pour les 3 QCMD testés, les tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV donnent des résultats identiques aux résultats rendus par l'organisme de contrôles qualité.

## **II. Comparaison des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV**

### **A) Comparaison des résultats**

#### Echantillons négatifs sur le Cobas® 4800 HPV (Roche)

Les 20 échantillons trouvés négatifs par la technique Roche (10 échantillons en milieu Preservcyt® et 10 échantillons en milieu Novaprep®) conduisent également à un résultat négatif avec le test Xpert® HPV (Cepheid).

#### Echantillons positifs sur le Cobas® 4800 HPV (Roche)

Les résultats des 35 échantillons trouvés initialement positifs par la technique Roche (20 en milieu Preservcyt® et 15 en milieu Novaprep®) sont rassemblées dans les tableaux 13 et 14.

Sept discordances ont été répertoriées sur les 55 échantillons (prélèvements n° 17, 18, 19, 20, 33, 34, 35), soit un taux de discordances estimé à 12,7 %.

|                                              |           | 1     | 2     | 3                    | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12                             | 13    | 14                   | 15                   | 16    | 17          | 18          | 19                 | 20          |
|----------------------------------------------|-----------|-------|-------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|-------|----------------------|----------------------|-------|-------------|-------------|--------------------|-------------|
| <b>PRESERVICYT</b>                           |           | Lec,c | Hoo,o | Fet,n                | Pei,p | Pou,m | Alg,s | Gou,v | Ner,m | Mai,e | Mez,n | Maj,s | Hof,a                          | Sin,s | Lho,k                | Wat,k                | Cai,t | Lor,s       | Jul,s       | Dub,d              | Har,c       |
| <b>R<br/>O<br/>C<br/>H<br/>E</b>             | HPV 16    | -     | -     | -                    | -     | -     | 24    | 36,7  | -     | -     | 30    | -     | -                              | -     | -                    | 26,5                 | 24,5  | <b>35,9</b> | -           | 29,7               | <b>40,4</b> |
|                                              | HPV 18    | -     | -     | -                    | -     | -     | -     | -     | 30,3  | 27    | -     | 35,9  | -                              | -     | -                    | -                    | 27,2  | -           | -           | <b>37,5</b>        | -           |
|                                              | HPV OHR   | 19,7  | 27,4  | 26,7                 | 29,2  | 34,1  | -     | -     | 34,7  | 25,8  | -     | 33,8  | 29,8                           | 28,5  | 22,7                 | 24,7                 | 34,4  | -           | <b>39,1</b> | 26,1               | 38,6        |
| <b>C<br/>E<br/>P<br/>H<br/>E<br/>I<br/>D</b> | HPV 16    | -     | -     | -                    | -     | -     | 24,7  | 34,6  | -     | -     | 30,1  | -     | -                              | -     | -                    | 28,7                 | 29,8  | -           | -           | 29,4               | -           |
|                                              | HPV 18_45 | -     | -     | -                    | -     | -     | -     | -     | 31,9  | 32,3  | -     | 32,7  | 16,9                           | -     | -                    | -                    | 28,3  | -           | -           | -                  | -           |
|                                              | HPV OHR   | 28,4  | 30,7  | 29,1(P3)<br>34,5(P4) | 31,2  | 27,9  | -     | -     | 33,3  | 33,2  | -     | 32    | 34,2(P3)<br>16(P4)<br>18,9(P5) | 29,5  | 22,9(p3)<br>36,8(p5) | 24,7(p3)<br>29,3(p4) | -     | -           | -           | 36,4(p3)<br>27(p4) | 36,2        |

**Tableau 13 : Comparaison des résultats des tests Cobas® 4800 HPV Roche et Xpert® HPV Cepheid pour les échantillons Preservcyt® positifs**

 Discordances

|                                              |           | 21    | 22    | 23    | 24    | 25    | 26    | 27    | 28    | 29    | 30    | 31    | 32    | 33          | 34        | 35          |
|----------------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-----------|-------------|
| <b>NOVAPREP</b>                              |           | Coc,c | Gad,e | Ble,e | Rog,s | Dal,p | Tra,s | Arb,i | Lau,a | Thi,p | Boi,d | Sui,l | Gue,s | Dro,o       | Gob,j     | Blo,y       |
| <b>R<br/>O<br/>C<br/>H<br/>E</b>             | HPV 16    | -     | -     | -     | -     | 33,2  | 40    | 29,2  | 27,2  | 21,1  | -     | 33,4  | -     | 35,1        | <b>40</b> | -           |
|                                              | HPV 18    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 36,9  | -     | 32,2  | -           | 38,7      | -           |
|                                              | HPV OHR   | 20,3  | 27    | 33,4  | 32,8  | -     | -     | -     | -     | 24,7  | -     | 27,6  | 34,6  | <b>28,8</b> | -         | <b>39,1</b> |
| <b>C<br/>E<br/>P<br/>H<br/>E<br/>I<br/>D</b> | HPV 16    | -     | -     | -     | -     | 30,3  | 36,7  | 26,8  | 25,1  | 19,2  | -     | 33,2  | -     | 34          | -         | -           |
|                                              | HPV 18_45 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 39,5  | 27,9  | 35,7  | -           | 39,5      | -           |
|                                              | HPV OHR   | 20,3  | 34,9  | 30,2  | 35,6  | -     | -     | -     | -     | 27,3  | -     | 38,3  | -     | -           | -         | -           |

**Tableau 14 : Comparaison des résultats des tests Cobas® 4800 HPV Roche et Xpert® HPV Cepheid pour les échantillons Novaprep positifs**

 Discordances

### 1) *Résultat global*

En prenant en compte uniquement le résultat global c'est-à-dire PRESENCE D'HPV HR ou ABSENCE D'HPV HR, 32 échantillons sur 35 conduisent à des résultats concordants. Les résultats discordants concernent les prélèvements n° 17, 18 et 35 (Tableau 15).

| <b>Tous génotypes d'HPV confondus</b> |       | <b>Roche</b> |           |           |
|---------------------------------------|-------|--------------|-----------|-----------|
|                                       |       | HR +         | HR -      | Total     |
| <b>Cepheid</b>                        | HR+   | 32           | 0         | <b>32</b> |
|                                       | HR -  | 3            | 20        | <b>23</b> |
|                                       | Total | <b>35</b>    | <b>20</b> | <b>55</b> |

**Tableau 15 : Comparaison des techniques Roche et Cepheid - présence ou non d'HPV HR**

Le coefficient Kappa de Cohen est égal à 0,89 IC (0,76 - 1).

Chi<sup>2</sup> McNemar = 1,33 , p = 0,24

Proportion d'accord positif = 0,91 IC (0,84 - 0,99)

Proportion d'accord négatif = 0,87 IC (0,78 - 0,96)

## 2) Concordance sur l' HPV 16

Concernant la détection d'HPV 16, 52 prélèvements sur 55 conduisent à des résultats concordants. Les discordances concernent les prélèvements n°17, 20, 34, positifs avec la technique Roche et négatifs avec la Technique Cepheid (Tableau 16).

| HPV 16  |          | Roche     |           |           |
|---------|----------|-----------|-----------|-----------|
|         |          | HPV 16 +  | HPV 16 -  | Total     |
| Cepheid | HPV 16 + | 13        | 0         | <b>13</b> |
|         | HPV 16 - | 3         | 39        | <b>42</b> |
|         | Total    | <b>16</b> | <b>39</b> | <b>55</b> |

Tableau 16 : Concordance des résultats de la détection d'HPV 16

Le coefficient Kappa de Cohen est de 0,86 IC (0,71 - 1).

Chi<sup>2</sup> McNemar = 1,33 , p = 0,24

Proportion d'agrément positif = 0,81 IC (0,71 - 0,92)

Proportion d'agrément négatif = 0,93 IC (0,86 - 1,1)

## 3) Concordance sur les génotypes d'HPV à HR autres que HPV 16

Concernant la détection d'HPV HR autres que HPV 16, 51 prélèvements sur 55 conduisent à des résultats concordants. Les discordances concernent les prélèvements n°18, 19, 33, 35 (Tableau 17).

| HPV HR autres que HPV 16 |       | Roche     |           |           |
|--------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|
|                          |       | +         | -         | Total     |
| Cepheid                  | +     | 22        | 0         | <b>22</b> |
|                          | -     | 4         | 29        | <b>33</b> |
|                          | Total | <b>26</b> | <b>29</b> | <b>55</b> |

Tableau 17 : Concordance des résultats de la détection d'HPV HR autres que HPV 16

Le coefficient Kappa de Cohen est de 0,85 IC (0,78 - 1).

Chi<sup>2</sup> McNemar = 2,25 , p = 0,13

Proportion d'agrément positif = 0,85 IC (0,75 - 0,94)

Proportion d'agrément négatif = 0,88 IC (0,79 - 0,97)

## B) Corrélation entre les Ct des deux techniques pour HPV 16

La droite de corrélation entre les Ct des deux techniques pour la détection d'HPV 16 a été établie (Figure 25).

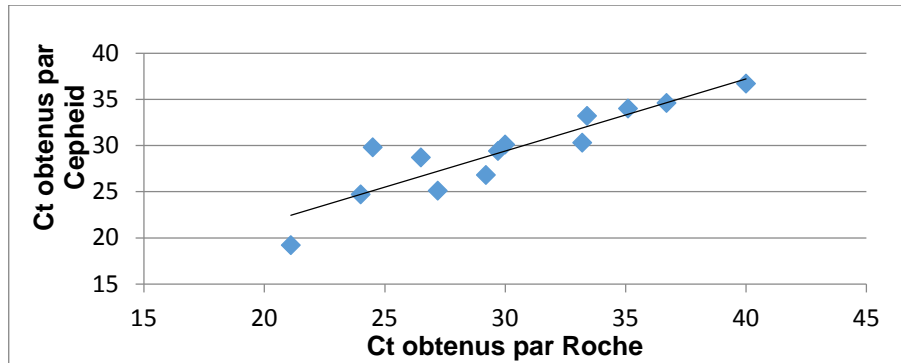


Figure 25 : Corrélation entre les Ct obtenus par les tests Roche et Cepheid pour la détection d'HPV 16

Le Coefficient de Corrélation Intraclasse (CCI) est égal à 0,884 IC (0,66 - 0,96) ,  $p = 0,0001$ .

## C) Analyse des discordances

Les résultats obtenus pour ces 7 patients discordants, après repassage et génotypage, ont été rassemblés dans le tableau 18.

| Milieu de prélèvement   |                 | Preservcyt® |                 |          |        | Novaprep® |         |         |
|-------------------------|-----------------|-------------|-----------------|----------|--------|-----------|---------|---------|
| Patient                 |                 | Jul,s       | Dub,d           | Har,c    | Lor,s* | Blo,y     | Dro,o   | Gob,j   |
| N° du prélèvement       |                 | 18          | 19              | 20       | 17     | 35        | 33      | 34      |
| Date de prélèvement     |                 | 18 août     | 21-juil         | 03-sept  | 28-oct | 06-juin   | 20-juin | 02-juin |
| ROCHE 1<br>(Ct)         | HPV 16          | -           | 29,7            | 40,4     | 35,9   | -         | 35,1    | 40      |
|                         | HPV 18          | -           | 37,5            | -        | -      | -         | -       | 38,7    |
|                         | HPV OHR         | 39,1        | 26,1            | 38,6     | -      | 39,1      | 28,8    | -       |
|                         | Date de passage | 20-août     | 30-juil         | 17-sept  | 1-déc  | 16-juil   | 6-août  | 16-juil |
| ROCHE 2<br>(Ct)         | HPV 16          | -           | 28,2            | 40,4     |        | -         | 33,6    | -       |
|                         | HPV 18          | -           | -               | -        |        | -         | -       | 38,8    |
|                         | HPV OHR         | 39,5        | 25,9            | 38,6     |        | 38,1      | 27,7    | 39,2    |
|                         | Date de passage | 01-oct      | 01-oct          | 01-oct   | /      | 01-oct    | 01-oct  | 01-oct  |
| ROCHE 3<br>(Ct)         | HPV 16          | -           | 28              | -        |        | -         | 35      | -       |
|                         | HPV 18          | -           | 33,8            | -        |        | -         | -       | 39,4    |
|                         | HPV OHR         | 38,3        | 25              | 36,7     |        | 39        | 28,8    | 39,9    |
|                         | Date de passage | 15-oct      | 15-oct          | 15-oct   | /      | 15-oct    | 15-oct  | 15-oct  |
| CEPHEID<br>(Ct)         | HPV 16          | -           | 29,4            | -        | -      | -         | 34      | -       |
|                         | HPV 18_45       | -           | -               | -        | -      | -         | -       | 39,5    |
|                         | HPV OHR         | -           | 36,4(p3) 27(p4) | 36,2(p4) | -      | -         | -       | -       |
|                         | Date de passage | 21-août     | 21-août         | 19-sept  | 8-déc  | 28-août   | 19-août | 20-août |
| Génotypage<br>le 20-oct | Haut risque     | -           | HPV16,18,51     | HPV51    |        |           |         |         |
|                         | Bas risque      | HPV67       | HPV54,61        | -        |        |           |         |         |

Tableau 18 : Comparaison des techniques Roche et Cepheid – Analyse des DISCORDANCES

 Résultats hors délai de validité des milieux  Non réalisé  Discordances

HPV OHR : Other high risk (autres HPV à haut risque)

\*Lor,s : L'analyse par la technique Cepheid a été réalisée seulement une semaine après la réalisation de la technique Roche. Il n'y a donc pas eu de contrôle des résultats de la technique Roche. Le génotypage n'a pas pu être réalisé.

(Roche 1 : résultats obtenus lors de la 1<sup>ère</sup> évaluation avec la technique Roche, Roche 2 : résultats de la 2<sup>ème</sup> évaluation, Roche 3 : résultats de la 3<sup>ème</sup> évaluation)

### 1) *Discordances sur l'HPV 16*

Les prélèvements 17, 20 et 34 donnent un résultat positif en HPV 16 avec la technique Roche et sont négatifs pour ce même génotype avec le test Cepheid.

Le prélèvement 17 n'a pas donné lieu à une vérification par la technique Roche car le test Cepheid a été effectué une semaine seulement après la technique Roche. Le génotypage n'a pas pu être réalisé car le délai de validité du milieu était dépassé.

Des contrôles par la technique Roche ont été effectués sur le prélèvement 20 trouvé initialement positif en HPV 16 et HPV HR. Le premier contrôle Roche (Roche 2) a conduit à des résultats similaires mais le second réalisé 15 jours plus tard, n'a donné de résultat positif que pour les HPV HR, l'HPV 16 était indétectable. Le génotypage réalisé un mois plus tard n'a permis la détection que de l'HPV HR 51. En Cepheid, ce prélèvement n'est trouvé positif qu'en HPV HR avec une réponse au niveau du canal 4 qui détecte les HPV 51 et 59. Ce résultat est cohérent avec le test de génotypage.

Le prélèvement 34 est trouvé positif en HPV 18 par les 2 techniques. De l'HPV 16 a été initialement détecté par le test Roche (à des taux faibles comme en témoigne le Ct élevé) mais pas par la technique Cepheid. Un contrôle des résultats par la technique Roche a été mis en œuvre, mais au-delà du délai de validité des milieux. En effet, nous nous sommes rendus compte *a posteriori* que les prélèvements avaient été reçus au laboratoire bien après la date de prélèvement, c'est pourquoi les tests de contrôle par Roche ont été effectués par erreur. Ces contrôles n'ont pas permis de retrouver l'HPV 16 mais par contre ont conduit à une réaction (faiblement) positive pour les autres HPV HR. Le génotypage n'a pas été effectué.

## ***2) Discordances sur les géotypes d'HPV HR autres que HPV 16***

Les discordances sur les géotypes d'HPV HR autres que HPV 16 concernent les prélèvements n°18, 19, 33 et 35.

Le prélèvement 18 trouvé initialement positif en HPV 18 par la technique Roche a fait l'objet de 2 contrôles par cette même technique qui ont conduit à un résultat similaire. Le test Xpert est lui retrouvé négatif en HPV 18. Le génotypage n'a mis en évidence qu'un HPV 67 classé dans les HPV BR.

Le prélèvement 19 s'est révélé initialement positif en HPV 16, HPV 18 et HPV HR par la technique Roche alors qu'en Cepheid, il n'était positif qu'en HPV 16 et HPV HR. Le génotypage a permis de détecter des HPV HR 16, 18 et 51 et des HPV BR 54 et 61. Ainsi, le génotypage permet bien d'identifier de l'HPV 18 non détecté par le test Cepheid. De l'HPV 51 est aussi identifié par génotypage ce qui concorde avec le résultat positif pour le



canal 4 du test Cepheid. Par contre, le test Cepheid est également positif au niveau du canal 3 qui détecte des HPV 31, 33, 35, 52, 58 : aucun de ces HPV n'a été retrouvé par génotypage.

Pour les prélèvements 33 et 35, les contrôles par la technique Roche (réalisés malencontreusement après le délai acceptable) ont détecté d'autres HPV HR comme la première recherche. Le génotypage n'a pas été réalisé.

# DISCUSSION

Dans le contexte actuel d'accréditation, les laboratoires doivent satisfaire à des exigences de qualité de plus en plus grandes. L'automatisation des techniques de PCR permet de faciliter la démarche d'accréditation.

Pour la détection des génotypes d'HPV à haut risque, notre laboratoire utilise le test Cobas® 4800 HPV de Roche, choisi pour sa praticabilité et ses bonnes performances. Comparé au test Hybrid Capture 2 (HC2), considéré comme la référence en raison des nombreuses études cliniques dont il a bénéficié, ce test présente une bonne concordance et des performances analytiques comparables (84)(85)(86). Il se révèle plus spécifique que le test HC2 qui présente l'inconvénient de donner de nombreuses réactions croisées avec les HPV à bas risque (87)(88). De plus, par rapport au test HC2, il a l'avantage de comporter un contrôle de cellularité qui permet de vérifier la qualité du prélèvement.

Par ailleurs, un nouveau test de détection des HPV à haut risque vient de paraître sur le marché : le test Xpert® HPV de Cepheid. Nous avons eu l'opportunité de le tester.

Le but de ce travail était, dans un premier temps, de vérifier si les performances des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV annoncées par les fournisseurs dans le milieu de référence Preservcyt® sont retrouvées sur site. Notre laboratoire reçoit également d'autres milieux de transport et de conservation, notamment le Novaprep® et l'Easyfix®, il semblait donc indispensable, pour répondre aux besoins des services, de valider les trousse sur ces milieux.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les résultats des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV de Cepheid sur 55 frottis de patientes.

Enfin, nous avons comparé la praticabilité de ces deux tests en nous focalisant sur le temps consacré à la manipulation et la traçabilité. Une évaluation du coût a également été réalisée.

# **I. Evaluation des performances analytiques des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV pour différents milieux**

## **A) Détermination de la limite de détection**

### **1) Test Cobas® 4800 HPV**

La comparaison de nos résultats aux données du fabricant montrent qu'ils sont conformes à ceux attendus, tant pour l'HPV 16 que pour l'HPV 18 (Tableau 8 page 68). Les limites de détection que nous avons déterminées pour les génotypes HPV 16, 18 et 68 pour la technique Roche dans les milieux Preservcyt®, Novaprep® et Easyfix®, sont également très proches de celles indiquées dans l'article de *H.Khiri & al.* (82) (Tableau 8 page 68).

Les LOD obtenues pour HPV 16 (100 à 200 copies/mL), et HPV 68 (80 à 130 copies/mL) dans les 4 milieux testés sont faibles ce qui signifie que le test Cobas® possède une bonne sensibilité pour la détection des génotypes HPV 16 et 68 dans les différents milieux testés.

En ce qui concerne HPV 18, les LOD trouvées sont plus élevées (1500 copies/mL), mais similaires à celles indiquées dans l'article de *H. Khiri & al.* (1211 à 1759 copies/mL). Le témoin AcroMetrix HPV 18 est connu pour avoir plus de difficultés à être détecté. Deux hypothèses sont avancées :

- Le contrôle est mal calibré et la quantité réelle de cellules est inférieure à celle annoncée.
- Le contrôle se dégrade et le nombre de cellules diminue dans le temps.

Pour vérifier ces hypothèses, nous avons donc fait une numération en cellule de Malassez du nombre de cellules contenues dans le témoin AcroMetrix® HPV 18. Ce nombre s'est effectivement avéré 2 à 3 fois plus faible que celui annoncé (il faut signaler néanmoins la présence de quelques amas cellulaires qui sous-estiment le résultat). Ainsi, les hypothèses avancées sont possibles, sans que nous puissions trancher en faveur de l'une ou l'autre. Pour cela, il aurait fallu déterminer la concentration cellulaire dès la réception du contrôle au laboratoire, puis suivre l'évolution de cette concentration au cours du temps.

Il est à souligner que les valeurs de LOD obtenues pour les trois milieux Novaprep®, Easyfix® et Cobas® sont sensiblement égales aux LOD obtenues en milieu Preservcyt®, et ceci pour les trois génotypes testés. Nous pouvons donc conclure que la sensibilité du test Cobas® pour la détection des HPV 16, 18 et 68, ne diffère pas selon le milieu utilisé.

Notre étude comporte des limites : pour estimer la limite de détection dans les règles de l'art, il aurait fallu tester davantage de répliquats afin de déterminer la valeur seuil pour laquelle la technique rend un résultat positif pour 95% des répliquats. Dans l'article d'*H. Khiri & al.*(82), 10 répliquats ont été réalisés pour chaque concentration, nous n'en avons testé que 3 dans notre étude. De plus, pour affiner la LOD, il aurait également été souhaitable de tester davantage de concentrations. Notre but n'était toutefois pas de déterminer précisément les LOD, mais de vérifier que, dans nos conditions de réalisation, les résultats que nous obtenions étaient similaires à ceux du fabricant. Ceci a bien été vérifié pour les HPV 16 et 18. Par ailleurs, les LOD déterminées dans notre laboratoire pour les 3 types d'HPV sont proches de celles rapportées dans la littérature. Nous pouvons conclure à notre échelle, que les conditions de réalisations sont suffisantes pour l'estimation de la limite de détection.

## **2) Test Xpert® HPV**

En ce qui concerne la technique Cepheid, la LOD trouvée pour HPV 68 (800 cellules/mL) est supérieure à celle annoncée par le fournisseur (267 cellules/mL). Dans ce cas encore, l'hypothèse d'une mauvaise calibration ou d'une dégradation des cellules dans le temps du contrôle AcroMetrix® HPV 68 peut être envisagée. Elle semble néanmoins peu probable dans la mesure où les essais avec le test Cobas® 4800 HPV ont été réalisés avec le même lot de contrôles, au même moment, et sont conformes aux attentes.

Nos résultats montrent que la sensibilité du test Xpert® HPV pour HPV 68 est inférieure à celle du test Cobas® 4800 HPV pour la détection d'HPV 68 et que les LOD sont identiques quel que soit le milieu utilisé (Preservcyt®, Novaprep® et Easyfix®). La nature du milieu n'influe donc pas sur la sensibilité du test Xpert® HPV.

## **B) Répétabilité**

Les valeurs de CV de répétabilité obtenus dans cette étude (situées entre 0,39 et 1,52% pour Roche et entre 1,05 et 2,28% pour Cepheid) sont faibles et proches des données des fabricants (Roche : 0,7 à 1,90% ; Cepheid : 1,9 à 7,2%).

Ainsi, les tests Cobas® et Xpert®, réalisés au sein de notre laboratoire, présentent une bonne répétabilité, conforme à celle attendue.

### **C) Fidélité intermédiaire**

Les valeurs de CV de fidélité intermédiaire obtenus dans cette étude (de 0,60 à 1,44% pour Roche et entre 0,71 et 1,96% pour Cepheid) sont faibles et proches des données fabricants (Roche : 1,3 à 2,2% ; Cepheid : 2,3 à 7,2%). Les performances des techniques Roche et Cepheid en termes de fidélité intermédiaire sont donc vérifiées au sein de notre laboratoire.

### **D) Stabilité**

Les techniques Roche et Cepheid détectent bien la présence d'HPV dans les différents milieux de transport jusqu'à J60 pour Easyfix® et J90 pour Preservcyt® et Novaprep®. De plus, les coefficients de variation des Ct obtenus dans les différents milieux sont faibles (de 0,55 à 3,79 %). Nous avons donc vérifié que, pour une concentration d'environ 5 fois la LOD, les milieux Preservcyt® et Novaprep® sont stables 3 mois, et le milieu Easyfix® stable 2 mois, conformément aux indications des notices fournisseurs.

### **E) Résultats des QCMD**

Les tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV donnent des résultats identiques aux résultats rendus par l'organisme de contrôle qualité pour les 3 QCMD testés. Ainsi, nous établissons l'exactitude des résultats de notre laboratoire avec ces deux techniques.

## II. Comparaison des tests Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV

Que ce soit au niveau du résultat global (présence ou absence d'HPV), de la détection d'HPV 16 ou de la détection des génotypes d'HPV HR autres que l'HPV 16, il existe une **bonne concordance entre les 2 tests**, comme en témoignent les coefficients Kappa de Cohen qui varient de 0,85 à 0,89. Les résultats du Chi<sup>2</sup> de McNemar et les résultats d'agréments positifs et négatifs confirment cette bonne concordance (absence de déséquilibre entre les résultats discordants). De plus, la comparaison des Ct obtenus pour l'HPV 16 montre qu'il existe une très bonne corrélation entre les deux techniques pour la détection de ce génotype (Coefficient de corrélation intraclassé égal à 0,884).

Sept discordances de résultats ont néanmoins été répertoriées : 4 en milieu Preservcyt® et 3 en milieu Novaprep® (Tableau 18 page 78). Il s'agit dans tous les cas résultats positifs par la technique Roche et négatifs par le test Cepheid. Deux hypothèses peuvent être envisagées :

- **une meilleure sensibilité de la technique Roche**
- **l'existence de faux résultats positifs avec la technique Roche** en raison de réactions croisées avec les HPV à bas risque comme cela a été montré pour la technique HC2.

### 1) *Meilleure sensibilité du test Cobas® ?*

En fonction des résultats que nous avons obtenus, la **première hypothèse** semble la plus vraisemblable. En effet, nous avons montré que pour l'HPV 68, dans des conditions réactionnelles similaires, la LOD était plus élevée avec la technique Cepheid qu'avec le test Roche (800 cellules/mL vs 130). Par ailleurs, pour le prélèvement 19, l'HPV 18 détecté par la technique Roche avec un Ct élevé à 37,5 (donc en faible quantité), a bien été identifié par génotypage alors que le test Cepheid a conduit à un résultat négatif.

Dans 2 autres cas (prélèvements 18 et 20), le génotypage n'a pas permis d'identifier le génotype détecté lors du dépistage par la technique Roche, mais les Ct sont élevés (Prélèvement 18 : Ct HPV OHR = 39,1 ; 39,5 et 38,3 / Prélèvement 20 : Ct HPV 16 = 40,4), ce qui signifie que la quantité d'ADN présente dans le prélèvement était faible. Une faible quantité d'ADN peut ne pas être détectée à chaque test (lois statistiques et répartition au hasard dans le milieu). De ce fait, il n'est pas équitable de comparer les 3 tests Roche à un

seul test Cepheid. Le contrôle des résultats du test Cepheid n'a pas été possible car le nombre de cartouches dont nous disposions était limité.

Il est également envisageable que cette faible quantité d'ADN se soit dégradée au cours du temps et soit devenue indétectable, mais dans les deux cas, le contrôle par la technique Roche réalisé 2 à 6 semaines après le test Cepheid, a confirmé les résultats du premier passage sur le Cobas®.

## 2) *Faux positifs avec le test Cobas® ?*

Quant à l'hypothèse de faux résultats positifs avec le test Cobas® 4800 HPV en raison de réactions croisées avec des HPV à bas risque, elle ne peut être totalement exclue. Il est surprenant de constater en effet que pour le prélèvement 33, le test conduit à un résultat bien positif pour les HPV OHR (Ct à 28,8), alors que le test Xpert® est négatif pour ces mêmes HPV. Il ne semble pas s'agir d'un problème ponctuel avec le test Xpert®, puisque l'HPV 16 détecté par le test Cobas® est également mis en évidence avec le test Xpert® et à un Ct comparable (35,1 vs 34).

Dans la littérature, plusieurs articles décrivent pour la méthode HC2, l'existence de réactions croisées avec les HPV BR, notamment HPV 53 et HPV 42, ce qui a pour conséquence d'augmenter le nombre de faux positifs (86)(89). Lindeman & al. (86) comparent les techniques HC2 et Cobas® sur 1360 prélèvements cervicaux, la vérification des discordances se faisant par génotypage Linear Array (LA). La concordance entre les 2 tests est bonne (86,57 %) avec un coefficient kappa de Cohen de 0,7625. Le test LA détecte des HPV BR dans 58% des échantillons positifs en HC2 et négatifs en Cobas® (52/90), et dans 14 % des échantillons négatifs en HC2 et positifs en Cobas® (7/50). Avec une approche similaire, Cui & al. (83) sur un total de 180 échantillons, retrouvent une bonne concordance entre les 2 tests (88,33%) avec un coefficient kappa de Cohen de 0,767. Dans les échantillons discordants, le test LA détecte des HPV BR dans la moitié des échantillons positifs en HC2 et négatifs en Cobas® (2/4) et dans 13,33% des échantillons positifs en Cobas® et négatifs en HC2 (2/15). Ainsi, **des cas de faux positifs par réactions croisées avec les HPV BR sont également décrits pour la technique Cobas®, mais à un taux bien inférieur à celui de HC2.**

Dans leur étude, Cui & al. (83) observent que les 2 échantillons HC2 négatif et Cobas® positif contiennent plusieurs génotypes d'HPV et suggèrent que **les infections multiples par HPV conduiraient à des faux positifs par le test Cobas®.** A notre connaissance, aucun autre article dans la littérature n'évoque cette possibilité. Dans notre étude, le génotypage

n'ayant pas pu être réalisé pour le prélèvement 33, nous ne pouvons confirmer cette hypothèse.

### 3) *Pertinence clinique*

La pertinence clinique du test HPV est un critère important à prendre en compte pour le choix du test. Ce point a été souligné par la HAS dans son rapport d'évaluation sur les conditions pré-analytiques de réalisation de la recherche du génome (ADN) des Papillomavirus humains oncogènes à partir de frottis cervico-utérins (90). Les experts ont rappelé que « les tests HPV historiques pour lesquels la performance clinique a été évaluée et sur lesquels reposent les recommandations actuelles, ont des seuils compris entre 500 et 5000 copies/mL et sont des tests qualitatifs (présence ou absence d'HPV oncogènes). Il existe des tests de génotypage plus récents, précisant le type d'HPV et pouvant détecter jusqu'à 20-30 copies/mL d'HPV. La pertinence clinique d'un si faible seuil n'a cependant pas été démontrée, leur utilisation pour le triage des ASC-US n'a pas été validée ».

L'utilité clinique d'un test HPV est d'autant plus grande (bonnes sensibilité et spécificité) que le test identifie les femmes HPV+ ayant le plus grand risque d'avoir ou de développer une lésion de haut grade (91)(92).

Selon les **recommandations** du *Guidelines for human papillomavirus DNA test* de Meijer & al. (93), les tests HPV permettant le dépistage primaire des cancers du col de l'utérus doivent remplir certains critères dont :

- **Une sensibilité clinique pour les CIN2+ au moins égale à 90% de celle d'HC2 chez les femmes de 30 ans et plus.** Une forte sensibilité clinique se traduit par une Valeur Prédictive Négative (VPN) élevée. Cette forte sensibilité clinique permet d'espacer l'intervalle entre deux dépistages pour les frottis HPV négatifs.
- **Une spécificité clinique pour les CIN2+ au moins égale à 98% de celle obtenue pour HC2 chez les femmes de 30 ans et plus.** Une spécificité clinique élevée permet de limiter le nombre de tests positifs qui classeraient inutilement des femmes en HPV + et les surveilleraient inutilement.
- **Une reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoire au minimum de 87%.**



La plupart des tests HPV diffèrent sur la spécificité clinique, ceci est dû en grande majorité à la détection ou non des faibles taux d'HPV retrouvés dans les infections transitoires. Ces infections transitoires ne provoquent pas de tumeurs malignes, dépistées HPV positifs elles déclenchent un suivi inutile. Cette surveillance engendre de l'anxiété chez les patientes et un coût non négligeable (93).

Le test Cobas® 4800 HPV a été validé cliniquement par plusieurs études, et comparé au test HC2 : toutes les études montrent des valeurs de sensibilité et de spécificité similaires pour les deux tests, mais variables en fonction des populations étudiées (patientes présentant un frottis ASC-US, devant bénéficier d'une colposcopie, ayant un CIN2...) (Annexe 5).

Une étude multicentrique américaine (7 centres) a évalué le test Xpert® HPV en comparaison à l'HC2 et au Cobas® 4800 HPV (94) : la **sensibilité clinique du test Xpert® HPV** pour la détection des CIN2 ou grades plus sévères (CIN2+) (n=141) **est égale à celle du Cobas®** (90,8% vs 90,8%,  $P=1$ ) et meilleure que celle d'HC2 (90,8% vs 81,6%,  $P= 0004$ ) ; **le test Xpert® est plus spécifique que Cobas®** (42,6% vs 39,6%,  $P= 0,02$ ) mais moins spécifique que HC2 (42,6% vs 47,7%,  $P< 0,001$ ). Des résultats similaires sont obtenus pour la détection des CIN3 ou plus. (Annexe 6)

La détection de HPV 16 par le test Xpert® identifie 41,8% des échantillons CIN2+ avec une VPP de 54,6%. Par comparaison, la détection de l'HPV 16 par le test Cobas® identifie 42,6% des échantillons CIN2+ avec une VPP de 55,0%. Les performances de ces 2 tests sont donc tout à fait comparables (94).

Les HPV 16 et 18 étant les plus susceptibles de donner des lésions de haut grade par rapport aux autres HPV HR (à eux deux ils représentent 70% des cas de cancer du col utérin (95)), un test capable de différencier spécifiquement ces deux génotypes constitue une valeur ajoutée. C'est le cas du test Cobas®. Le test Cepheid permet également de détecter le génotype HPV 16 seul, le génotype HPV 18 est lui couplé à HPV 45. La raison pour laquelle la société Cepheid a décidé d'attribuer le même canal de détection pour HPV 18 et HPV 45 est basée sur deux études qui montrent que HPV 16, 18 et 45 sont responsables de 80% des cancers du col de l'utérus (91)(96,97).

Ces deux tests sont basés sur une **détection qualitative** du génome d'HPV, de ce fait elles ne permettent pas de différencier les prélèvements fortement positifs des faiblement positifs. De nombreux articles ont démontré l'**augmentation significative de la charge virale moyenne avec la sévérité des lésions cervicales** (63). Cependant, elle est très **variable pour des lésions de même grade**, c'est pourquoi son utilisation en vue d'une application clinique

semble limitée. La charge virale **dépend également du type d'HPV** (plus forte pour HPV 16) **et du statut vis-à-vis du VIH** (plus forte chez les VIH+) (63). Plutôt que l'observation ponctuelle d'une charge virale élevée, l'évolution et la cinétique de la charge virale seraient plus prédictives de la persistance et de l'évolution de l'infection ou au contraire de sa clairance. Par exemple, dans le suivi post thérapeutique des CIN 2 et 3, il est prouvé que la persistance de l'infection à HPV est le meilleur facteur prédictif d'une lésion résiduelle ou d'une récurrence. Elle est d'autant plus significative si le génotype persistant est le même que celui détecté avant traitement (63).

### **III. Praticabilité des tests**

#### **A) Temps de réalisation**

Bien que le test Cobas® 4800 HPV soit beaucoup plus long que le test Cepheid (4 heures vs 1 heure), le temps d'intervention global du technicien est d'environ 40 minutes pour tester 21 échantillons et un contrôle positif, ce qui revient à environ 2 minutes par échantillon. Ce qui équivaut au temps d'intervention technicien pour le test Cepheid.

Les 2 tests évalués dans ce travail sont faciles à mettre en œuvre. Le test Cobas® 4800 HPV est plus adapté aux séries, le test Xpert® HPV est plus pratique et rapide lorsque peu d'échantillons sont à analyser. Le choix de l'une ou l'autre technique est à faire en fonction de l'organisation du laboratoire et du nombre d'échantillons. Dans notre laboratoire, nous recevons généralement les prélèvements de manière groupée, le test Cobas® 4800 HPV est plus adapté dans ce cas de figure. Une matinée tous les 10 à 15 jours est réservée à l'analyse d'une série d'HPV sur le Cobas® (planning ajustable en fonction de l'arrivage). Lorsqu'un échantillon est à recontrôler, il faut attendre qu'une série soit complète avant de relancer l'analyse, ce qui peut être parfois long. Le délai de rendu du résultat est donc moins rapide avec le test Cobas® mais acceptable devant le caractère non urgent de l'analyse. L'utilisation du test Xpert® HPV permettrait un rendu plus rapide des résultats notamment en cas de contrôle.

#### **B) Traçabilité**

La traçabilité est bonne pour ces deux techniques : la bonne identité du prélèvement est assurée grâce au lecteur code barre et à la transmission des résultats vers le SIL. De plus, la traçabilité des réactifs et consommables est également informatisée.

#### **C) Validation des résultats**

Le Cobas® ne permet pas l'accès aux courbes de fluorescence des prélèvements des patients, ce qui est pourtant intéressant dans certains cas pour juger de la spécificité du signal. Avec la technique Cepheid, on peut visualiser l'ensemble des résultats, les valeurs de Ct et les courbes sur le logiciel GenXpert®.

## **D) Coût**

D'après des données qui nous ont été fournies par la société Cepheid, qui a estimé le coût de revient d'un test pour une activité annuelle d'environ 6000 échantillons, le Cost Per Reproducible Results (CPRR, coût du test incluant le réactif et le temps technicien) d'un test Cobas® 4800 HPV s'élève à 35,93 euros si la série est complète (22 échantillons). Les réactifs n'étant pas récupérables, une série incomplète augmente le coût unitaire. Le CPRR d'un test Xpert HPV est évalué à 32,86 euros. Les différences de coût sont liées au temps technicien, le coût réactif étant le même pour les 2 tests (30 €). Dans notre laboratoire, le coût réactif d'un test Cobas® 4800 est d'environ 25 €, soit inférieur à celui considéré dans l'estimation de Cepheid et au final, le CPRR d'un test Cobas® HPV dans notre laboratoire est inférieur à celui du test Xpert® HPV.

# CONCLUSION

Cette étude effectuée au CHRU de Lille de juin à octobre 2014, a permis de vérifier sur site les bonnes performances des trousse Cobas® 4800 HPV de Roche et Xpert® HPV de Cepheid sur les milieux Preservcyt®, Novaprep® et Easyfix®. Les limites de détection de la trousse Cobas® sur le milieu fabricant, Cobas® PCR Cell Collection Media ont également été testées et sont satisfaisantes. L'étude de la stabilité des milieux permet de confirmer les données fabricants : les milieux Preservcyt® et Novaprep® sont stables 90 jours après le prélèvement, le milieu Easyfix® 60 jours.

Dans une deuxième partie, nous avons comparé ces deux trousse en confrontant les résultats obtenus pour 55 frottis de patientes. L'analyse statistique de ces résultats nous montre une excellente concordance entre les deux techniques quant à la détection des HPV à haut risque. Sur 55 échantillons, 7 présentaient une discordance, le test Cobas® ayant plutôt tendance à rendre davantage de résultats positifs que le test Xpert®. Notre étude a montré qu'un certain nombre de ces discordances pouvaient s'expliquer par une meilleure sensibilité du test Cobas. Mais l'hypothèse de faux résultats positifs ne peut être écartée et nécessite des investigations cliniques sur un grand nombre d'échantillons.

L'étude de la praticabilité de ces deux tests, nous indique un CPRR (Cost Per Reproducible Results, coût du test incluant le réactif et le temps technicien) équivalent et une bonne traçabilité. Le temps de manipulation est plus important pour la technique Cobas®, mais elle permet d'effectuer les tests par série, alors que le test Xpert® est rapide et avantageux lorsque peu de prélèvements sont à analyser. Sur ce dernier critère, le test Cobas® 4800 HPV semble mieux adapté à l'organisation du laboratoire, c'est pour cette raison qu'il sera retenu pour la détection des HPV à haut risque en routine.

Dans le cadre du dépistage primaire, le manque de sensibilité de l'analyse cytologique laisse présager un avenir certain pour les techniques de dépistage moléculaire. Les tests HPV présentent une sensibilité et une valeur prédictive négative supérieures à celles de la cytologie. Utilisés en dépistage primaire, ils permettraient de dépister davantage de femmes susceptibles de développer un cancer du col, ainsi que d'espacer l'intervalle de temps entre les dépistages.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Système BETHESDA 2001 (53)

### Encadré 1. SYSTÈME DE BETHESDA 2001 (résumé)

#### QUALITÉ DU PRÉLÈVEMENT

Satisfaisant pour évaluation

Non satisfaisant pour évaluation (préciser la raison)

#### INTERPRÉTATION/RÉSULTAT

Absence de lésion malpighienne intra-épithéliale ou de signe de malignité (NIL/M).

S'il y a lieu, préciser :

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

Anomalies des cellules malpighiennes :

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

Anomalies des cellules glandulaires :

- atypies des cellules glandulaires (AGC) : endocervicales, endométriales ou sans autre précision (NOS) ;
- atypies des cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie : endocervicales ou sans autre précision (NOS) ;
- adénocarcinome endocervical in situ (AIS) ;
- adénocarcinome.

Autres (liste non limitative) :

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

## Encadré 2. SYSTÈME DE BETHESDA 2001 (abréviations)

|                   |                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AGC</b>        | <b>atypie des cellules glandulaires (<i>Atypical Glandular Cells</i>) ;</b>                                                                                                         |
| <b>ASC</b>        | <b>atypie des cellules malpighiennes (<i>Atypical Squamous Cells</i>) ;</b>                                                                                                         |
| <b>ASC-US</b>     | <b>atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée (<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>) ;</b>                                             |
| <b>ASC-H</b>      | <b>atypie des cellules malpighiennes ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (<i>Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL</i>) ;</b> |
| <b>CIN 1</b>      | <b>néoplasie* intra-épithéliale cervicale de grade 1 (<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>) ;</b>                                                                              |
| <b>CIN 2 ou 3</b> | <b>néoplasie* intra-épithéliale cervicale de grade 2 ou 3 (<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>) ;</b>                                                                         |
| <b>CIS</b>        | <b>carcinome <i>in Situ</i> ;</b>                                                                                                                                                   |
| <b>HSIL</b>       | <b>lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (<i>High Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>) ;</b>                                                                    |
| <b>LSIL</b>       | <b>lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade (<i>Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>) ;</b>                                                                      |
| <b>NIL/M</b>      | <b>absence de lésion intra-épithéliale ou de malignité (<i>Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy</i>) ;</b>                                                             |
| <b>NOS</b>        | <b>sans autre précision (<i>Not Otherwise Specified</i>).</b>                                                                                                                       |

\* « Néoplasie » désigne ici, au strict sens étymologique du terme, toute formation d'un nouveau tissu, bénin ou malin.

## Annexe 2 : Résultats de l'étude de répétabilité

| PRESERVCYT® |               | Valeur des Ct obtenus pour HPV 68 |              |              |              |              | Analyse statistique |                   |        |
|-------------|---------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|-------------------|--------|
| Test        | Concentration | 1er passage                       | 2ème passage | 3ème passage | 4ème passage | 5ème passage | Moyenne des Ct      | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Roche       | 3 LOD         | 37,5                              | 36,2         | 36,4         | 36,2         | 35,9         | 36,4                | 0,6               | 1,52   |
|             | 10 LOD        | 34,6                              | 34,5         | 34,9         | 34,6         | 34,6         | 34,6                | 0,1               | 0,39   |
| Cepheid     | 3 LOD         | 36                                | 36,3         | 35,2         | 36,1         | 35,8         | 35,9                | 0,4               | 1,05   |
|             | 10 LOD        | 33,3                              | 33,8         | 34,1         | 33,4         | 35,4         | 34,0                | 0,8               | 2,22   |

| NOVAPREP® |               | Valeur des Ct obtenus pour HPV 68 |              |              |              |              | Analyse statistique |                   |        |
|-----------|---------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|-------------------|--------|
| Test      | Concentration | 1er passage                       | 2ème passage | 3ème passage | 4ème passage | 5ème passage | Moyenne des Ct      | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Roche     | 3 LOD         | 36,4                              | 36           | 36,9         | 35,8         | 36,6         | 36,3                | 0,4               | 1,10   |
|           | 10 LOD        | 34,8                              | 34,6         | 34,6         | 34,9         | 34,5         | 34,7                | 0,1               | 0,42   |
| Cepheid   | 3 LOD         | 35,5                              | 35,1         | 34,2         | 36           | 35,4         | 35,2                | 0,6               | 1,69   |
|           | 10 LOD        | 33,7                              | 33,4         | 33,2         | 32,9         | 35,1         | 33,7                | 0,8               | 2,28   |

| EASYFIX® |               | Valeur des Ct obtenus pour HPV 68 |              |              |              |              | Analyse statistique |                   |        |
|----------|---------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|-------------------|--------|
| Test     | Concentration | 1er passage                       | 2ème passage | 3ème passage | 4ème passage | 5ème passage | Moyenne des Ct      | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Roche    | 3 LOD         | 36,2                              | 35,8         | 36,4         | 35,9         | 36,8         | 36,2                | 0,4               | 0,99   |
|          | 10 LOD        | 34,4                              | 34,4         | 34,9         | 34,7         | 34,5         | 34,6                | 0,2               | 0,56   |
| Cepheid  | 3 LOD         | 33,9                              | 35           | 34,5         | 33,7         | 34,3         | 34,3                | 0,5               | 1,34   |
|          | 10 LOD        | 33,1                              | 32,6         | 32,4         | 33,4         | 33,8         | 33,1                | 0,5               | 1,55   |



### Annexe 3 : Résultats de l'étude de fidélité intermédiaire

| PRESERVCYT® |               | Valeur des Ct obtenus pour HPV 68 |              |              |              |              | Analyse statistique |                   |        |
|-------------|---------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|-------------------|--------|
| Test        | Concentration | 1er passage                       | 2ème passage | 3ème passage | 4ème passage | 5ème passage | Moyenne des Ct      | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Roche       | 3 LOD         | 36,3                              | 36,1         | 36,7         | 36,4         | 35,8         | 36,3                | 0,3               | 0,83   |
|             | 10 LOD        | 34,9                              | 34,3         | 34,6         | 34,5         | 34,4         | 34,5                | 0,2               | 0,60   |
| Cepheid     | 3 LOD         | 35,1                              | 35           | 36,8         | 35,2         | 36,1         | 35,6                | 0,7               | 1,96   |
|             | 10 LOD        | 33,7                              | 34,5         | 33,7         | 34           | 34,1         | 34,0                | 0,3               | 0,87   |

| NOVAPREP® |               | Valeur des Ct obtenus pour HPV 68 |              |              |              |              | Analyse statistique |                   |        |
|-----------|---------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|-------------------|--------|
| Test      | Concentration | 1er passage                       | 2ème passage | 3ème passage | 4ème passage | 5ème passage | Moyenne des Ct      | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Roche     | 3 LOD         | 36,5                              | 36,4         | 36,3         | 35,8         | 35,7         | 36,1                | 0,3               | 0,90   |
|           | 10 LOD        | 34,6                              | 35           | 34,2         | 34,5         | 34,6         | 34,6                | 0,3               | 0,74   |
| Cepheid   | 3 LOD         | 35,3                              | 35,1         | 35,2         | 35,2         | 34,6         | 35,1                | 0,2               | 0,71   |
|           | 10 LOD        | 32,8                              | 32,9         | 33,1         | 33,7         | 33,1         | 33,1                | 0,3               | 0,94   |

| EASYFIX® |               | Valeur des Ct obtenus pour HPV 68 |              |              |              |              | Analyse statistique |                   |        |
|----------|---------------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|-------------------|--------|
| Test     | Concentration | 1er passage                       | 2ème passage | 3ème passage | 4ème passage | 5ème passage | Moyenne des Ct      | Ecart-type des Ct | CV (%) |
| Roche    | 3 LOD         | 36,6                              | 36,2         | 36           | 35,4         | 35,2         | 35,9                | 0,5               | 1,44   |
|          | 10 LOD        | 34,4                              | 34,3         | 34,6         | 33,8         | 34,1         | 34,2                | 0,3               | 0,80   |
| Cepheid  | 3 LOD         | 33,9                              | 34,6         | 34,7         | 34,8         | 34,2         | 34,4                | 0,3               | 0,98   |
|          | 10 LOD        | 32,3                              | 33,1         | 32,4         | 32,6         | 32,4         | 32,6                | 0,3               | 0,88   |

## Annexe 4 : Traitements du cancer du col de l'utérus (98)

### Le cancer du col de l'utérus : les traitements possibles en fonction de l'étendue du cancer

| ÉTENDUE DE LA MALADIE Au MOMENT DU DIAGNOSTIC                                                                                                               | POSSIBILITÉS DE TRAITEMENT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| La tumeur est limitée au col de l'utérus et de petite taille (invisible à l'œil nu, observable uniquement au microscope)                                    | Après examen du fragment de col retiré par conisation ayant permis de porter le diagnostic, deux options sont possibles : <ul style="list-style-type: none"> <li>■ une <b>surveillance simple</b> si les marges du fragment retiré sont saines, autrement dit si la totalité de la tumeur a été enlevée lors de la conisation, et si la patiente souhaite conserver son utérus ;</li> <li>■ une <b>chirurgie</b>, dans le cas contraire. Elle consiste à retirer l'utérus (hystérectomie) et, parfois, les paramètres et les ganglions lymphatiques du pelvis. Une chirurgie dite conservatrice peut être proposée, dans certains cas, pour préserver l'utérus et permettre une grossesse ultérieure. Le chirurgien ne retire alors que le col de l'utérus (trachélectomie), ainsi que les ganglions lymphatiques pelviens. Si les ganglions pelviens sont envahis par des cellules cancéreuses, une radiochimiothérapie concomitante est réalisée en complément.</li> </ul> |
| La tumeur est limitée au col de l'utérus et directement visible à l'œil nu lors de l'examen gynécologique, mais de taille inférieure à 4 centimètres.       | Les trois options sont la chirurgie, la radiochirurgie et la radiothérapie. <ul style="list-style-type: none"> <li>■ La <b>chirurgie</b> consiste le plus souvent à retirer l'utérus, le tiers supérieur du vagin et les paramètres (colpo-hystérectomie élargie) ainsi que les ovaires et les ganglions lymphatiques pelviens. Parfois, en fonction des caractéristiques de la tumeur, une chirurgie conservatrice peut être proposée.</li> <li>■ La <b>radiochirurgie</b> repose sur une curiethérapie suivie d'une colpo-hystérectomie élargie.</li> <li>■ Une <b>radiothérapie</b> qui associe une radiothérapie externe et une curiethérapie peut être proposée en cas de contre-indication à la chirurgie. Suite à une chirurgie ou une radiochirurgie, si les ganglions pelviens ou les marges de la pièce opératoire contiennent des cellules cancéreuses, une radiochimiothérapie concomitante est réalisée en complément.</li> </ul>                               |
| La tumeur est limitée au col de l'utérus et de taille supérieure à 4 centimètres ou elle s'est propagée au-delà du col (vagin, paramètres, vessie, rectum). | Le traitement de référence est la <b>radiochimiothérapie concomitante</b> . Elle associe une radiothérapie externe, une chimiothérapie et une curiethérapie. Avant ce traitement, une recherche est effectuée pour déterminer si les ganglions, en particulier ceux de la région lombo-aortique, sont envahis par des cellules cancéreuses. L'objectif est de déterminer précisément la région à irradier (pelvis seul ou pelvis et région lombo-aortique). Cette étude des ganglions se fait à partir des examens d'imagerie et/ou à partir d'une chirurgie qui consiste à retirer les ganglions pelviens et/ou lombo-aortiques (lymphadénectomie pelvienne et/ou lombo-aortique).<br><br>Si un traitement par radiochimiothérapie n'est pas réalisable, une radiothérapie seule peut être proposée.<br><br>Parfois, une chirurgie de l'utérus (voire plus étendue) peut être réalisée en complément de la radiochimiothérapie concomitante.                                |
| Le cancer a envahi des organes éloignés, sous la forme d'une ou plusieurs métastases.                                                                       | Le traitement repose sur une <b>chimiothérapie et/ou une radiothérapie</b> (le plus souvent externe).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

## Annexe 5 : Sensibilité et spécificité cliniques des tests Cobas® 4800 HPV et HC2 dans la littérature

| ARTICLES       | Patientes<br>(nombre, âge, type)                                                                                                       | Sensibilité (%)*            |                               | Spécificité (%)*              |                               |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                |                                                                                                                                        | Cobas                       | HC2                           | Cobas                         | HC2                           |
| Heideman (99)  | pour la sensibilité: 60,<br>âge médian 35 ans,<br>CIN2+ confirmé;<br><br>pour la spécificité:<br>800, âge médian 45<br>ans, sans CIN2+ | 90                          | 91,7                          | 94,6                          | 94,4                          |
| Lapierre (100) | 396, âge ≥ 24 ans,<br>ASC-US                                                                                                           | 89,7<br>87 chez ≥<br>30 ans | 93,1<br>91,3 chez ≥<br>30 ans | 66,7<br>74,1 chez ≥<br>30 ans | 72,2<br>75,2 chez ≥<br>30 ans |
| White (101)    | 558, âge médian 32<br>ans, colposcopie                                                                                                 | 90                          | 90,5                          | 55,5                          | 50,2                          |
| Chen (102)     | 670                                                                                                                                    | 91,07                       | 93,75                         | 70,97                         | 71,33                         |
| Stoler (84)    | 1578, âge ≥ 21 ans,<br>ASC-US                                                                                                          | 90                          | 87,2                          | 70,5                          | 71,1                          |
| Szarewski (92) | 1099, âge médian 29<br>ans, colposcopie                                                                                                | 95,2                        | 96,3                          | 24                            | 19,5                          |

\* pour la détection des CIN2+

CIN2+ : Lésions de stade CIN2 et lésions plus sévères.

## Annexe 6 : Sensibilité et spécificité cliniques du test Xpert® HPV; comparaison au test Cobas® 4800 HPV et à l'HC2 (94)

| Einstein<br>(94) | Sensibilité (%) |      |       | Spécificité (%) |      |       |
|------------------|-----------------|------|-------|-----------------|------|-------|
|                  | Cobas           | HC2  | Xpert | Cobas           | HC2  | Xpert |
| CIN2+            | 90,8            | 81,6 | 90,8  | 39,6            | 47,7 | 42,6  |
| CIN3+            | 92,3            | 80,2 | 92,3  | 37,2            | 45   | 40    |

# BIBLIOGRAPHIE

1. Bernard H-U. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. août 2013;18:357-61.
2. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*. oct 2013;445(1-2):21-34.
3. Alain S, Hantz S, Denis F. Papillomavirus : les virus et la physiopathologie de l'infection. 2010. 5-19.
4. Leto M das GP, Santos Júnior GFD, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*. avr 2011;86(2):306-17.
5. Segondy M. Papillomavirus et cancer. *Rev Francoph Lab*. 2013;2013(456):57-66.
6. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. août 2006;24:S26-34.
7. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. août 2006;24:S1-10.
8. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J [Internet]*. 2010 [cité 15 oct 2014];7(11). Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1743-422X-7-11.pdf>
9. Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. juin 2009;73(2):348-70.
10. Denis F, Hanz S, Alain S. Clairance, persistance et récurrence de l'infection à Papillomavirus. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. avr 2008;36(4):430-40.
11. Mouglin C, Dalstein V, Pretet J. L'infection génitale à papillomavirus humains : histoire naturelle, épidémiologie et rôle dans la carcinogénèse du col utérin. *Réalités en Gynécologie-Obstétrique*. janv 2006;
12. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*. nov 2012;30:F12-23.
13. OMS | Papillomavirus humain (PVH) et cancer du col de l'utérus [Internet]. [cité 27 avr 2015]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/fr/>
14. Cervical Cancer Estimated Incidence Worldwide in 2012 [Internet]. [cité 27 avr 2015]. Disponible sur: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

15. INCa. Les cancers en France - Edition 2014. 2015.
16. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 5 mai 1997;102(5A):3-8.
17. 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):1831-6.
18. Gavillon N, Vervaeet H, Derniaux E, Terrosi P, Graesslin O, Quereux C. Papillomavirus humain (HPV) : comment ai-je attrapé ça ? *Gynécologie Obstétrique Fertil* 38. 2010;199-204.
19. Dickson EL, Vogel RI, Geller MA, Downs LS. Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31–65. *Gynecol Oncol.* juin 2014;133(3):405-8.
20. Moscicki A-B, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* août 2006;24:S42-51.
21. Winer RL, Lee S-K, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 1 févr 2003;157(3):218-26.
22. Lam JUH, Rebolj M, Dugue P-A, Bonde J, von Euler-Chelpin M, Lynge E. Condom use in prevention of Human Papillomavirus infections and cervical neoplasia: systematic review of longitudinal studies. *J Med Screen.* 1 mars 2014;21(1):38-50.
23. Poljak M, Kocjan BJ, Potočnik M, Seme K. Anogenital Hairs Are an Important Reservoir of Alpha-Papillomaviruses in Patients with Genital Warts. *J Infect Dis.* mai 2009;199(9):1270-4.
24. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):781-9.
25. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16-Positive and Human Papillomavirus Type 16-Negative Head and Neck Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 19 mars 2008;100(6):407-20.
26. Medeiros LR, Ethur AB de M, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saúde Pública.* 2005;21(4):1006-15.
27. Lacey CJN, Woodhall SC, Wikstrom A, Ross J. 2012 European guideline for the management of anogenital warts: Management of anogenital warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* mars 2013;27(3):e263-70.
28. Heard I, Favre M. Contamination des sondes d'échographie endovaginale par les papillomavirus humains. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod [Internet].* juin 2014 [cité 7 janv 2015]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com>

29. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* sept 1999;189(1):12-9.
30. Couto E, Sæterdal I, Juvet LK, Klemp M. HPV catch-up vaccination of young women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2014;14:867.
31. Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wiggert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(12):862-74.
32. Boulet GA, Horvath CA, Berghmans S, Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(4):810-7.
33. Saha A, Kaul R, Murakami M, Robertson ES. Tumor viruses and cancer biology: Modulating signaling pathways for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther.* 15 nov 2010;10(10):961-78.
34. Tjalma WAA, Van Waes TR, Van den Eeden LEM, Bogers JJPM. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* août 2005;19(4):469-83.
35. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J.* 2011;8(6):1-8.
36. Sun X-W, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright Jr TC. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med.* 1997;337(19):1343-9.
37. Segondy M. Papillomavirus et immunodépression. *Med Ther Pédiatrie.* 2010;13(1):70-9.
38. Dal Maso L, Franceschi S, Polesel J, Braga C, Piselli P, Crocetti E, et al. Risk of cancer in persons with AIDS in Italy, 1985–1998. *Br J Cancer.* 7 juill 2003;89(1):94-100.
39. Clifford GM, Gonçalves MAG, Franceschi S, HPV and HIV Study Group. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS Lond Engl.* 28 nov 2006;20(18):2337-44.
40. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst.* 3 févr 1999;91(3):226-36.
41. Gonfrier G, Delotte J, Chevallier A, Giordanengo V. Répartition des génotypes de papillomavirus humain dans les frottis ASC-US de patientes infectées ou non par le VIH-1. Résultats préliminaires d'une enquête rétrospective locale. *Gynécologie Obstétrique Fertil [Internet].* 2014 [cité 1 déc 2014]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297958914002720>
42. From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA.* 10 févr 1993;269(6):729-30.

43. Kilkenny M, Marks R. The descriptive epidemiology of warts in the community. *Australas J Dermatol.* mai 1996;37(2):80-6.
44. Ljubojevic S, Skerlev M. HPV-associated diseases. *Clin Dermatol.* mars 2014;32(2):227-34.
45. Heideman DAM, Waterboer T, Pawlita M, Delis-van Diemen P, Nindl I, Leijte JA, et al. Human papillomavirus-16 is the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 oct 2007;25(29):4550-6.
46. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* mai 2002;2(5):342-50.
47. HAS. Dépistage et prévention du cancer du col de l'utérus. Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé (EPS). 2013.
48. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol.* 1 avr 1995;141(7):680-9.
49. Pathak N, Dodds J, Zamora J, Khan K. Accuracy of urinary human papillomavirus testing for presence of cervical HPV: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 16 sept 2014;349(sep16 12):g5264-g5264.
50. Haguenoer K, Giraudeau B, Gaudy-Graffin C, de Pinieux I, Dubois F, Trignol-Viguiier N, et al. Accuracy of dry vaginal self-sampling for detecting high-risk human papillomavirus infection in cervical cancer screening: A cross-sectional study. *Gynecol Oncol.* août 2014;134(2):302-8.
51. Sellors JW, Lorincz AT, Mahony JB, Mielzynska I, Lytwyn A, Roth P, et al. Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 5 sept 2000;163(5):513-8.
52. Arbyn M, Verdoodt F, Snijders PJ, Verhoef VM, Suonio E, Dillner L, et al. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014;15(2):172-83.
53. ANAES. Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal - Recommandations pour la pratique clinique. 2002.
54. Weyn C, Garbar C, Noël J-C, Weynand B, Verhest A, d' Olne D, et al. Inter-laboratory variability in the presence of human papillomavirus in normal and abnormal cervical cytology samples. *Cancer Epidemiol.* août 2013;37(4):457-61.
55. Clavel C. Tests diagnostiques HPV : réalisation et interprétation. *SPECTRA Biol* N°171. mars 2009;
56. HAS, Service d'évaluation des actes professionnels. Conditions de réalisation de la détection des HPV - Note de cadrage. 2012.

57. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol J.* 2012;9:262.
58. Ollier L, Giordanengo V. Méthodes de détection et d'identification des HPV. *Rev Francoph Lab.* oct 2008;2008(405):51-5.
59. 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):401-9.
60. Heard I, Arowas L, Cochand-Priollet B, Bellocq J-P. Enquête sur la pratique des tests HPV en France. *Feuillets de Biologie N°323.* mars 2015;
61. Hantz S, Alain S, Denis F. Diagnostic des infections à papillomavirus: état des lieux et perspectives. *Médecine ThérapeutiquePédiatrie.* 2010;13(1):20-32.
62. Clavel C, Dalstein V, Birembaut P. Stratégies de dépistage des lésions précancéreuses du col de l'utérus: cytologie ou test HPV? *Rev Francoph Lab.* 2008;2008(405):57-65.
63. Carcopino X, Henry M, Olive D, Boubli L, Tamalet C. Détection et quantification des infections génitales à papillomavirus humains □: conséquences virologiques, épidémiologiques et cliniques. *Médecine Mal Infect.* févr 2011;41(2):68-79.
64. Riethmuller D, Ramanah R, Pretet J-L, Mougin C. Intégration du test HPV dans le dépistage primaire □? *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* févr 2008;37(1):S139-51.
65. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 8 sept 2007;370(9590):890-907.
66. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer J Int Cancer.* 20 août 2004;111(2):278-85.
67. Calendrier\_vaccinal\_ministere\_sante\_2014.pdf [Internet]. [cité 14 févr 2015]. Disponible sur: [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Calendrier\\_vaccinal\\_ministere\\_sante\\_2014.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Calendrier_vaccinal_ministere_sante_2014.pdf)
68. Ribassin-Majed L, Hill C, Lounes R. Efficacy of vaccination against HPV infection to prevent cervical cancer in France. *Public Health [Internet].* déc 2014 [cité 14 janv 2015]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0033350614002947>
69. Crosignani P, De Stefani A, Fara GM, Isidori AM, Lenzi A, Liverani CA, et al. Towards the eradication of HPV infection through universal specific vaccination. *BMC Public Health.* 2013;13(1):642.
70. Malagón T, Drolet M, Boily M-C, Franco EL, Jit M, Brisson J, et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* oct 2012;12(10):781-9.
71. Lu B, Kumar A, Castellsagué X, Giuliano AR. Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011;11:13.



72. Budd AC, Brotherton JML, Gertig DM, Chau T, Drennan KT, Saville M. Cervical screening rates for women vaccinated against human papillomavirus. *Med J Aust.* 1 sept 2014;201(5):279-82.
73. Scheller NM, Svanström H, Pasternak B, Arnheim-Dahlström L, Sundström K, Fink K, et al. Quadrivalent HPV Vaccination and Risk of Multiple Sclerosis and Other Demyelinating Diseases of the Central Nervous System. *JAMA.* 6 janv 2015;313(1):54.
74. Tanday S. HPV vaccination not linked to multiple sclerosis. *Lancet Oncol.* févr 2015;16(2):e57.
75. Petrosky E, Bocchini JA, Hariri S, Chesson H, Curtis CR, Saraiya M, et al. Use of 9-Valent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine: Updated HPV Vaccination Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 27 mars 2015;64(11):300-4.
76. Amine A, Rivera S, Opolon P, Dekkal M, Biard DSF, Bouamar H, et al. Novel anti-metastatic action of cidofovir mediated by inhibition of E6/E7, CXCR4 and Rho/ROCK signaling in HPV tumor cells. *PLoS One.* 2009;4(3):e5018.
77. Researchers pioneer new approach to treating HPV-related cervical cancer [Internet]. [cité 23 févr 2015]. Disponible sur: <http://www.ecco-org.eu/Global/News/ENA-2014-PR/2014/11/Researchers-pioneer-new-approach-to-treating-HPV-related-cervical-cancer>
78. DrugBank: Cidofovir (DB00369) [Internet]. [cité 26 avr 2015]. Disponible sur: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00369>
79. Hober D, Ajram L, Chehadeh W, Lazrek M, Goffard A, Dewilde A, et al. [Mechanisms of imiquimod indirect antiviral activity]. *Annales de biologie clinique* [Internet]. 2004 [cité 23 févr 2015]. p. 155-63. Disponible sur: <http://europepmc.org/abstract/med/15771973>
80. Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, Lacey CJ, et al. Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine.* nov 2012;30:F71-82.
81. CNGOF. RECOMMANDATIONS POUR LA PRATIQUE - RPC PRÉVENTION DU CANCER DU COL DE L'UTÉRUS [Internet]. 2007 [cité 14 mai 2015]. Disponible sur: <http://www.cngof.asso.fr>
82. Khiri H, Camus C, Portugal M, Pénaranda G, Boyer S, Halfon P. [Cytological and virological medium performance and stability assessment using the Cobas 4800 HPV test (Roche Diagnostics) used in France]. *Ann Biol Clin (Paris).* avr 2014;72(2):213-23.
83. SH-GTA-04 [Internet]. [cité 28 avr 2015]. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
84. Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL, et al. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol.* mars 2011;135(3):468-75.
85. Wong AA, Fuller J, Pabbaraju K, Wong S, Zahariadis G. Comparison of the Hybrid Capture 2 and cobas 4800 Tests for Detection of High-Risk Human Papillomavirus in Specimens Collected in PreservCyt Medium. *J Clin Microbiol.* 1 janv 2012;50(1):25-9.

86. Mateos Lindemann ML, Rodriguez Dominguez MJ, Chacón de Antonio J, Sandri MT, Tricca A, Sideri M, et al. Analytical Comparison of the cobas HPV Test with Hybrid Capture 2 for the Detection of High-Risk HPV Genotypes. *J Mol Diagn.* janv 2012;14(1):65-70.
87. Castle PE, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Wacholder S, Schiffman M. Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2. *J Clin Microbiol.* août 2008;46(8):2595-604.
88. Poljak M, Kocjan BJ, Kovanda A, Lunar MM, Lepej SZ, Planinic A, et al. Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2 low-risk probe cocktail. *J Clin Microbiol.* août 2009;47(8):2611-5.
89. Cui M, Chan N, Liu M, Thai K, Malaczynska J, Singh I, et al. Clinical Performance of Roche Cobas 4800 HPV Test. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2014;52(6):2210-1.
90. HAS. Conditions pré-analytiques de réalisation de la recherche du génome (ADN) des Papillomavirus humains (HPV) oncogènes à partir de frottis cervico-utérins. 2013.
91. Rao A, Sandri MT, Sideri M, Young S, Sharma A, Behrens C. Comparison of hybrid capture 2 High-Risk HPV results in the low positive range with cobas® HPV Test results from the ATHENA study. *J Clin Virol.* sept 2013;58(1):161-7.
92. Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparison of Seven Tests for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears: the Predictors 2 Study. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2012;50(6):1867-73.
93. Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1 févr 2009;124(3):516-20.
94. Einstein MH, Smith KM, Davis TE, Schmeler KM, Ferris DG, Savage AH, et al. Clinical Evaluation of the Cartridge-Based GeneXpert Human Papillomavirus Assay in Women Referred for Colposcopy. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2014;52(6):2089-95.
95. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
96. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* nov 2010;11(11):1048-56.
97. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer J Int Cancer.* 15 févr 2011;128(4):927-35.
98. Le cancer du col de l'utérus : les traitements possibles en fonction de l'étendue du cancer [Internet]. [cité 26 avr 2015]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/cancer-du-col-de-luterus/lesions-precancereuses/traitements-des-lesions-precancereuses>

99. Heideman D a. M, Hesselink AT, Berkhof J, van Kemenade F, Melchers WJG, Daalmeijer NF, et al. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J Clin Microbiol.* nov 2011;49(11):3983-5.
100. Lapierre SG, Sauthier P, Mayrand M-H, Dufresne S, Petignat P, Provencher D, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance with cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 tests for detection of high-grade lesions of the uterine cervix. *J Clin Microbiol.* avr 2012;50(4):1240-4.
101. White C, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, Kerr P, Sharp L, et al. Evaluation of the Clinical Performance of the cobas 4800 HPV Test in Patients Referred for Colposcopy. *J Clin Microbiol.* 1 oct 2013;51(10):3415-7.
102. Chen W, Yu L, Wang H, Fu C, Chen F, Cao Y, et al. [Evaluation of cobas 4800 high-risk HPV test as a tool in cervical cancer screening and cytology triage]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* juill 2012;34(7):543-8.

Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2014/2015

**Nom : COCQUET**  
**Prénom : Marie**

**Titre du mémoire / thèse :**  
**Evaluation des performances des trousse de détection des HPV à haut risque Cobas® 4800 HPV et Xpert® HPV et vérification de méthodes dans le cadre de l'accréditation**

**Mots-clés :**  
**HPV , papillomavirus, Cobas® 4800 HPV, Xpert® HPV, validation de milieux de conservation, accréditation**

---

**Résumé :**

Le but de cette étude réalisée au laboratoire de Virologie du CHRU de Lille était, dans un premier temps, de vérifier sur site les performances de deux PCR multiplex qualitatives en temps réel : le Cobas® 4800 HPV de Roche utilisé en routine au laboratoire et l'Xpert® HPV de Cepheid. Ces tests ont été effectués sur différents milieux et à partir de témoins AcroMetrix® HPV. Dans un deuxième temps, nous avons comparé ces deux techniques en confrontant les résultats obtenus pour 55 frottis cervico-utérins reçus au laboratoire.

Cette étude a permis de valider les bonnes performances de ces deux méthodes sur les milieux Preservcyt®, Novaprep® et Easyfix®, ainsi que celles du Cobas® sur le milieu Cobas® PCR Cell Collection Media. Par ailleurs, la stabilité des milieux de transport et de conservation a été vérifiée. Nous avons également mis en évidence la bonne concordance des deux méthodes pour la détection des HPV à haut risque. Sur 55 échantillons, 7 présentaient une discordance, le test Cobas® conduisant à davantage de résultats positifs que le test Xpert®. Ces discordances sont au moins pour une part liées à une meilleure sensibilité du test Cobas®.

Devant les performances comparables des deux trousse, nous avons comparé leur praticabilité : elles présentent un coût équivalent et permettent une excellente traçabilité, élément indispensable dans le contexte actuel d'accréditation. La trousse Cobas®, qui permet d'analyser les frottis par série est plus adaptée à l'organisation du laboratoire.

---

**Membres du jury :**

**Président :** **Monsieur le Professeur L. DUBREUIL**  
Professeur des Universités - Praticien hospitalier

**Asseseurs :** **Madame le Professeur K. FAURE**  
Professeur des Universités - Praticien hospitalier  
**Madame le Docteur M. LAZREK**  
Praticien hospitalier  
**Madame le Docteur A. DEWILDE**  
Maitre de Conférences universitaires - Praticien hospitalier