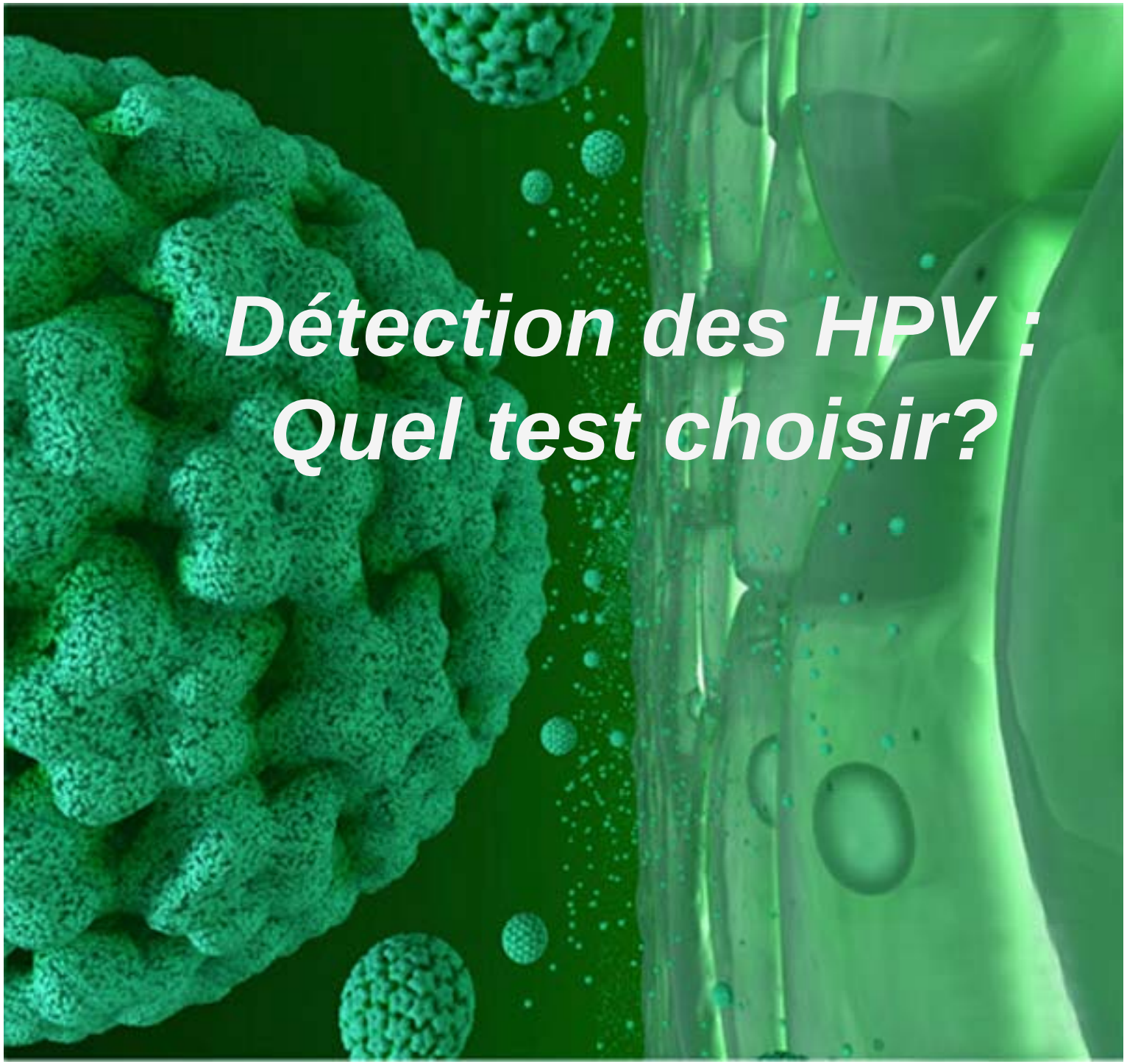


Détection des HPV : Quel test choisir?

Pr Ch PASQUIER
Laboratoire de Virologie
CHU de Toulouse

41ème CNBH
Toulouse
26.09.2012

Au programme

A quoi sert un test HPV ?

Quels sont les tests disponibles ?

Critères de choix d’un test ?

Au programme

A quoi sert un test HPV ?

Quels sont les tests disponibles ?

Critères de choix d’un test ?

Papillomavirus humains *(HPV)* Classification

Famille : *Papillomaviridae*

Genres: *(Alpha à Omega) Papillomavirus*

Espèces : *Human papillomavirus* -X

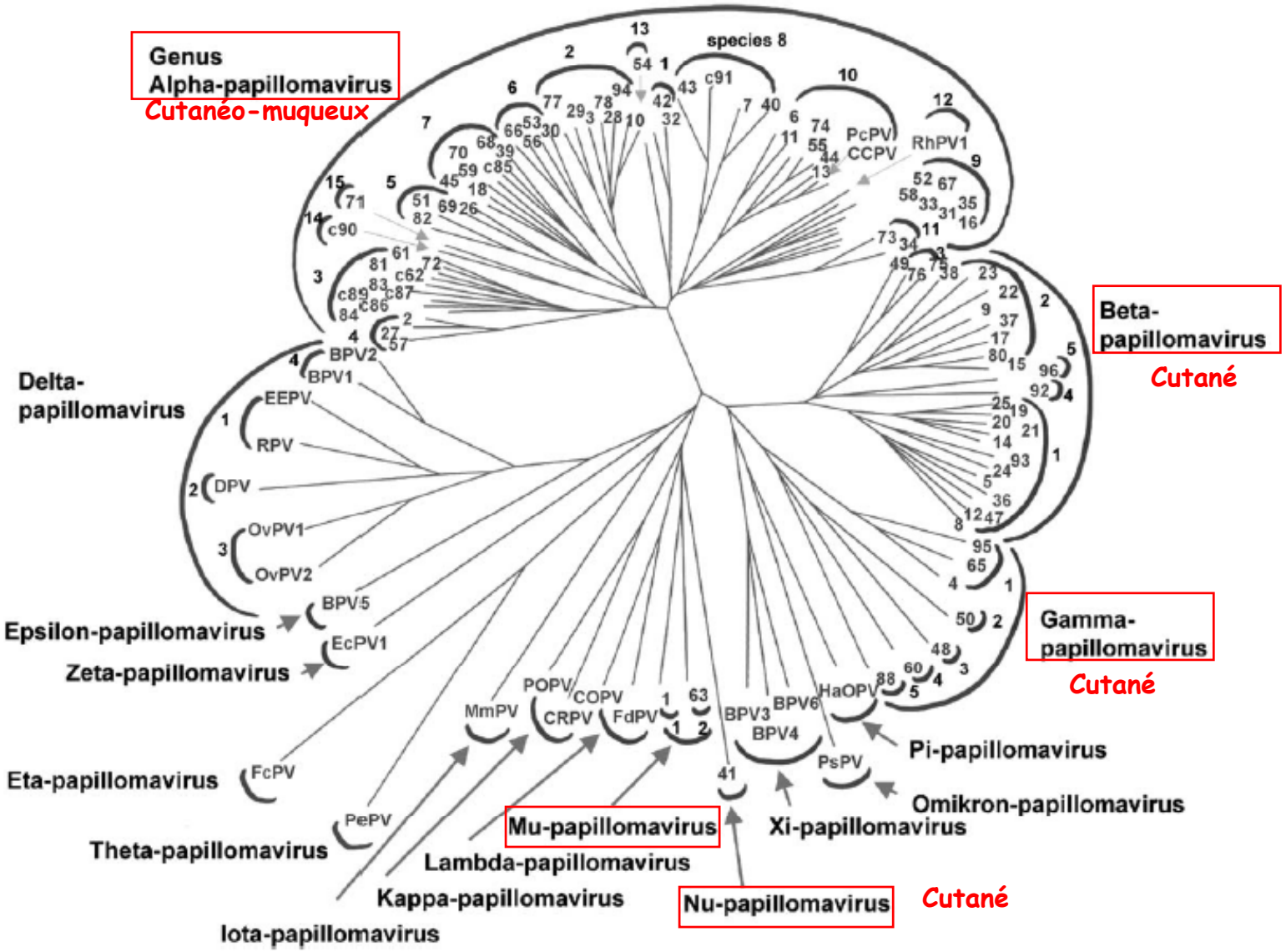
Types : > 200 types

Sous-types

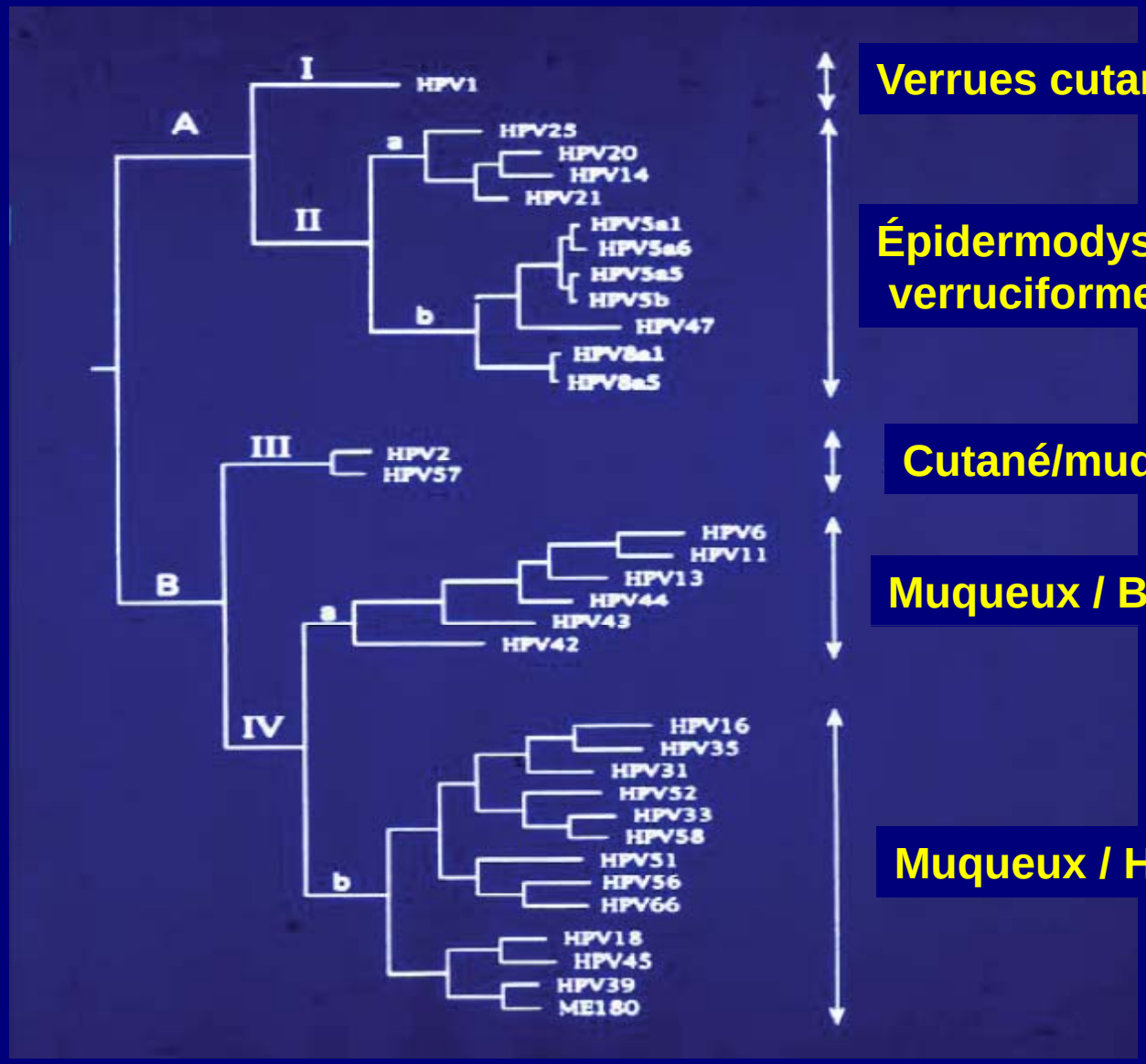
Variants

De multiples types d'HPV

E.-M. de Villiers et al. / Virology 324 (2004) 17–27



Distribution des HPV (E6)



Verrues cutanées

Épidermodysplasie verruciforme

Cutané/muqueux

Muqueux / BR

Muqueux / HR

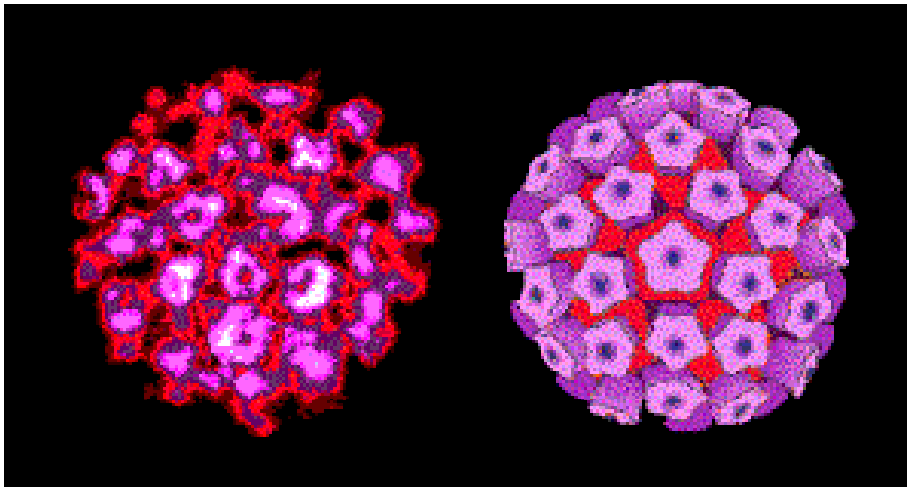
Van Ranst J Gen Virol 1992, 73:2653

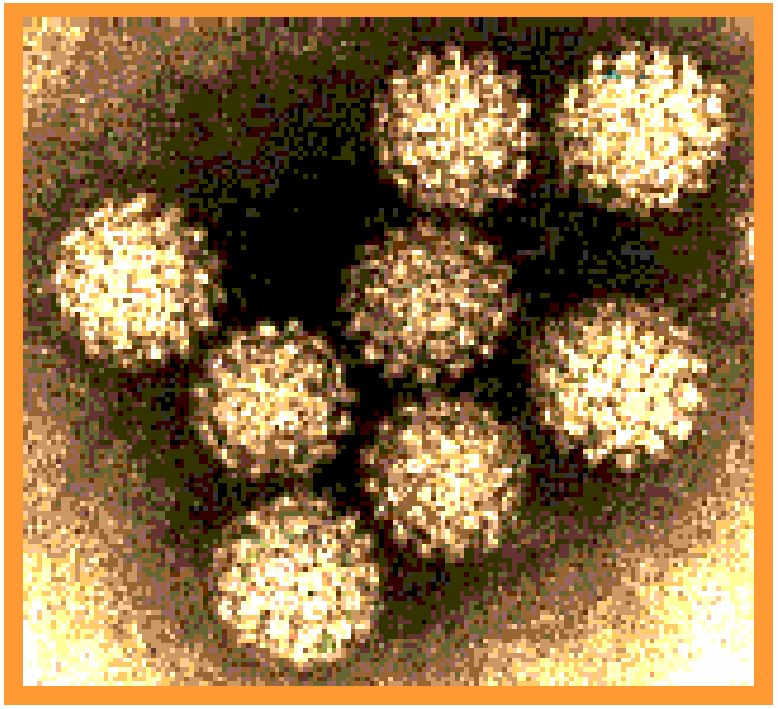
Structure des HPV

Petit virus nu (55 nm),

Capside icosédrique

Virus ubiquiste (commensal)

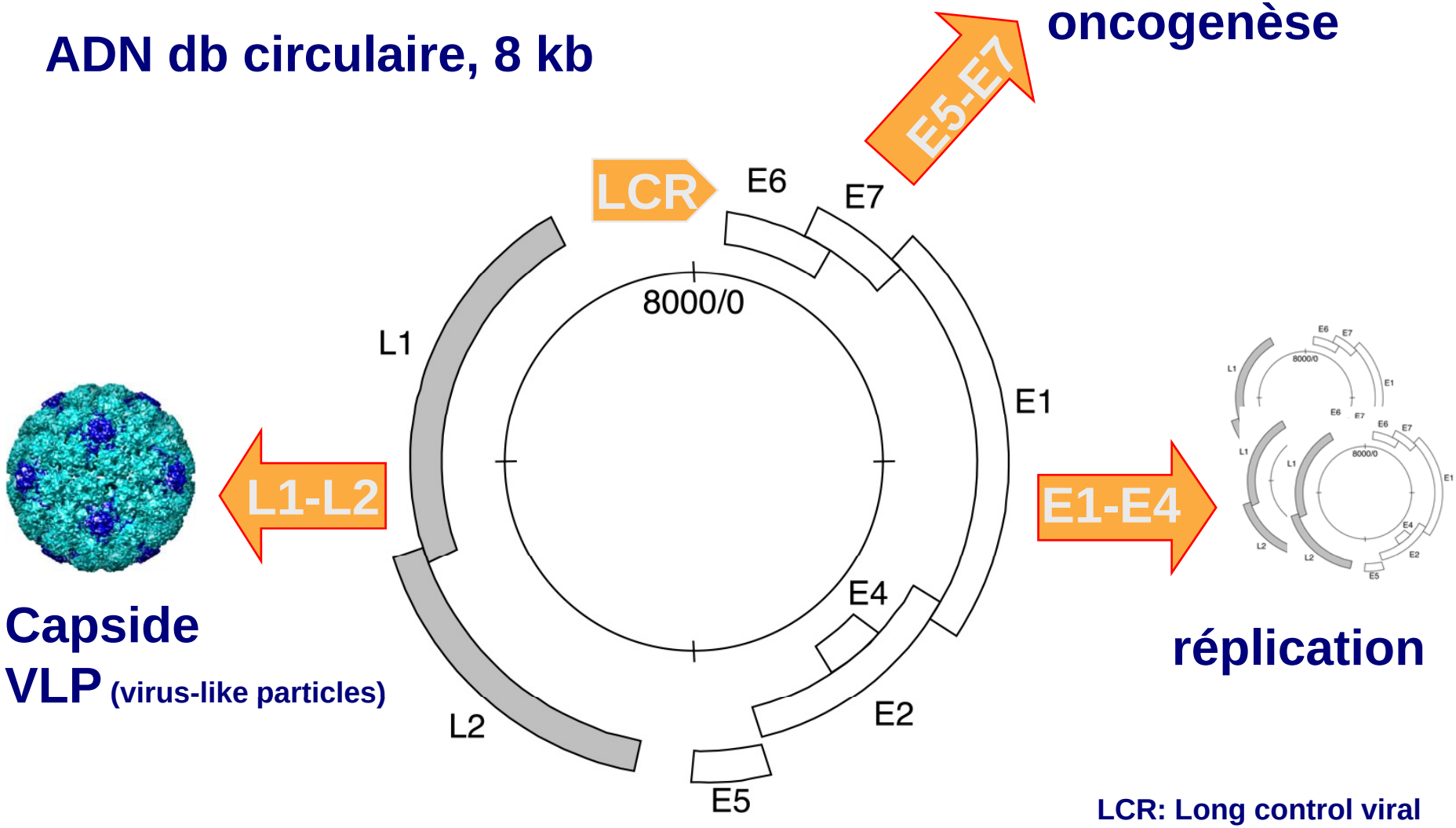




Génomes des *HPV*

ADN db circulaire, 8 kb

oncogenèse



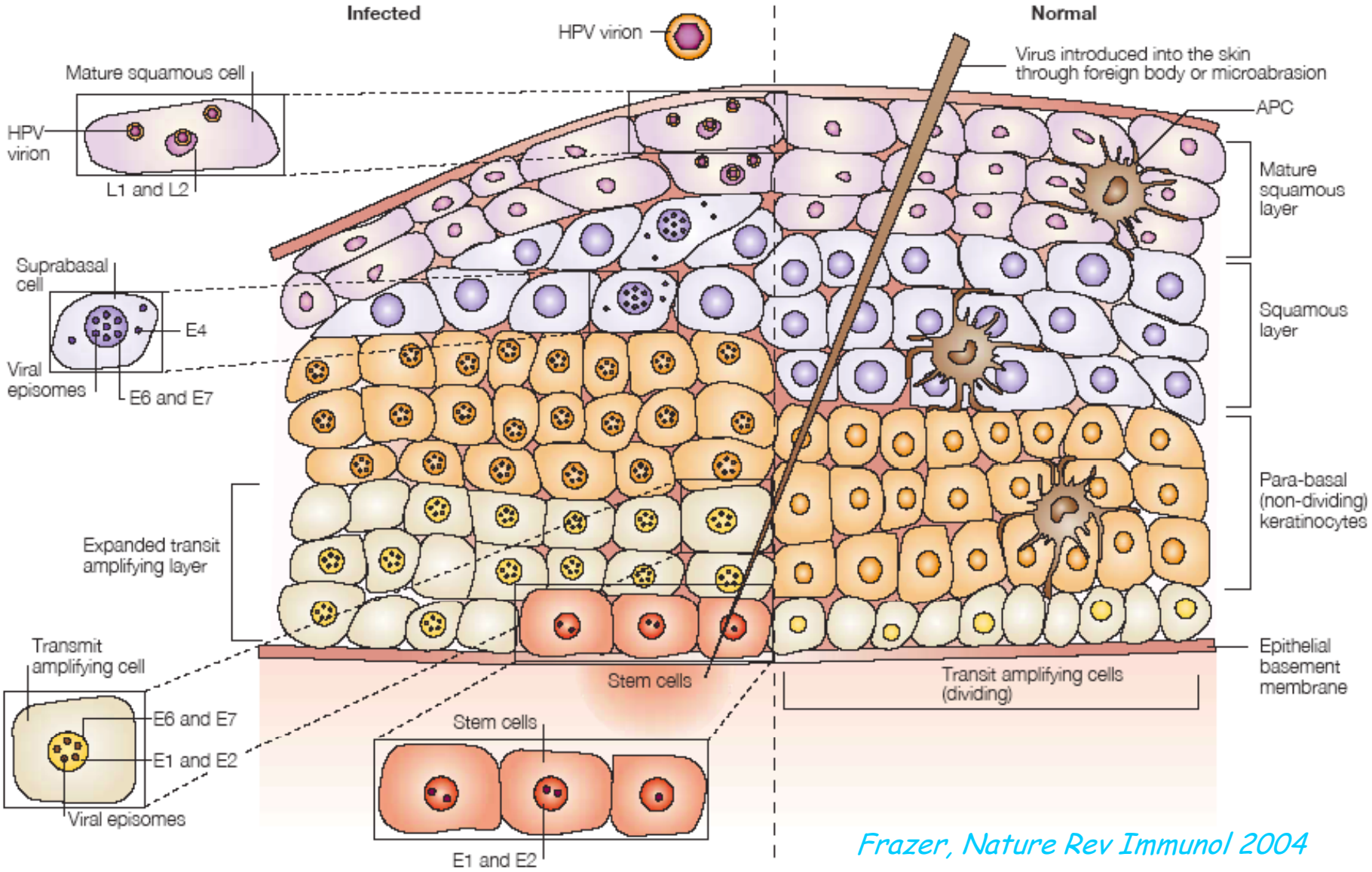
Capside

VLP **(virus-like particles)**

réplication

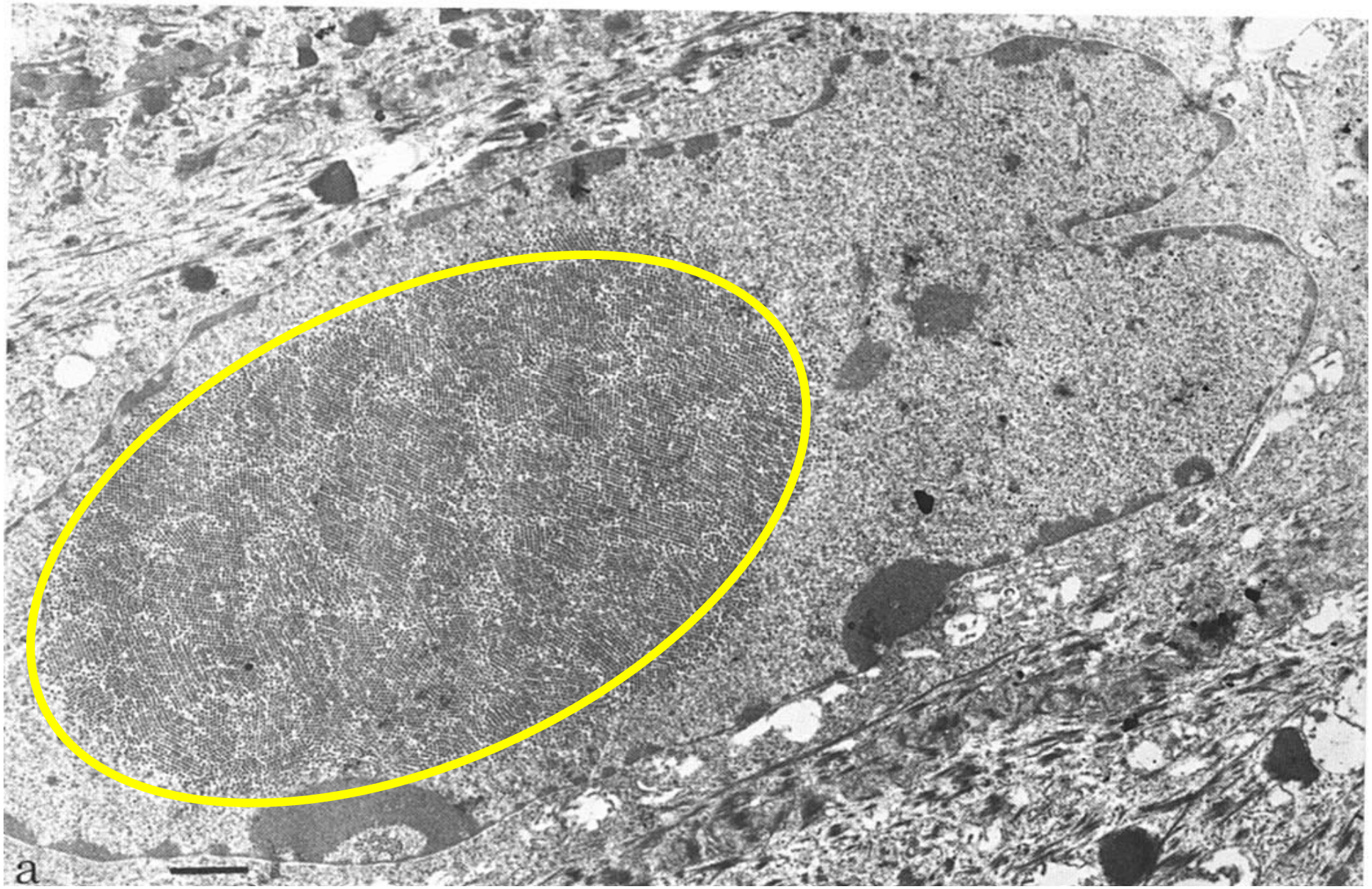
LCR: Long control viral

Réplication des HPV



Frazer, Nature Rev Immunol 2004

HPV dans un noyau cellulaire



HPV - Épidémiologie

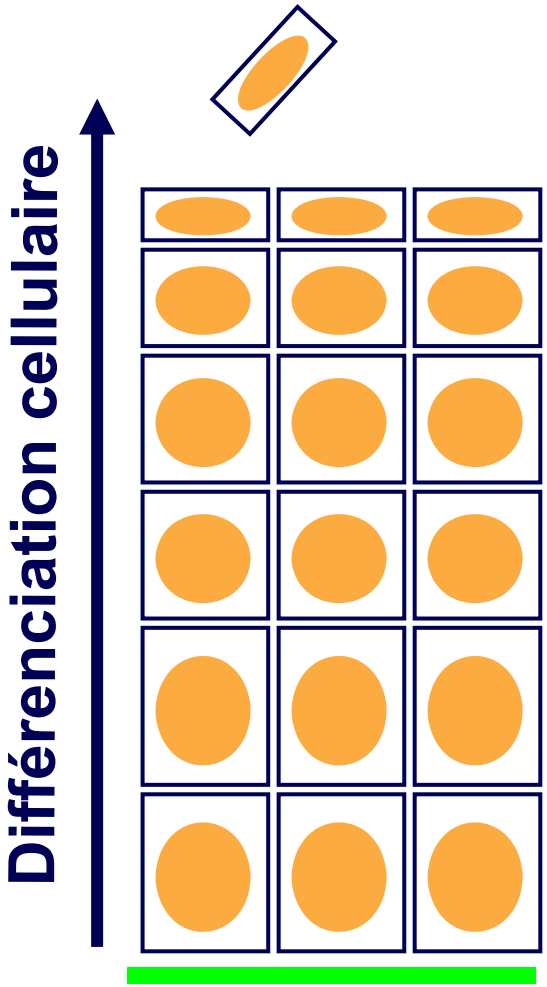
- Tropisme : peau et muqueuses
- Transmission directe par contact ou indirecte
- Prévalence élevée au niveau génital chez la femme jeune (>30%) puis décroissante
- Impliqué dans le cancer du col utérin (100% cancer HPV positif) et divers cancers ano-génitaux et cutanés

= virus oncogènes

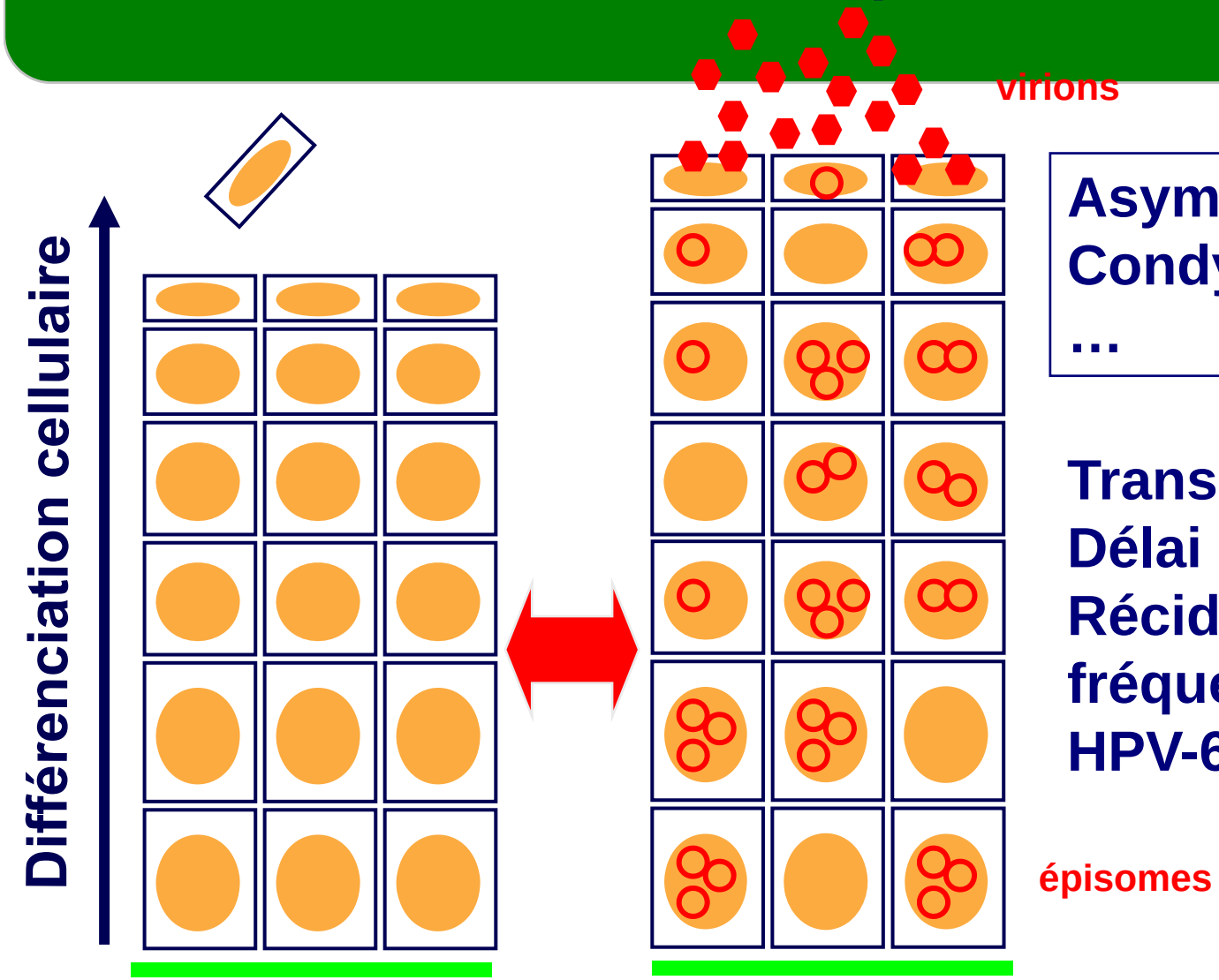
HPV - types et lésions

- Lésions cutanées
  - Verrues plantaires, vulgaires ou planes : HPV-1, 2, 4, ...
  - Épidermodysplasie verruciforme : HPV-5, 8, 9, 12, …
- Lésions muqueuses
  - Cancer du col, du vagin de l'anus, condylomes, maladie de Bowen, … : HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, …
  - Mélanome malin : HPV-38
  - Papillomatose laryngée de l 'enfant : HPV-6 et 11
  - Condylomes acuminés vénériens : HPV-6 et 11

Infection par HPV



Infection par HPV



Asymptomatique ++
Condylomes acuminés
…

Transmission ++IST
Délai court
Récidives fréquentes
HPV-6, 11 (BR>>HR)

Infection productive

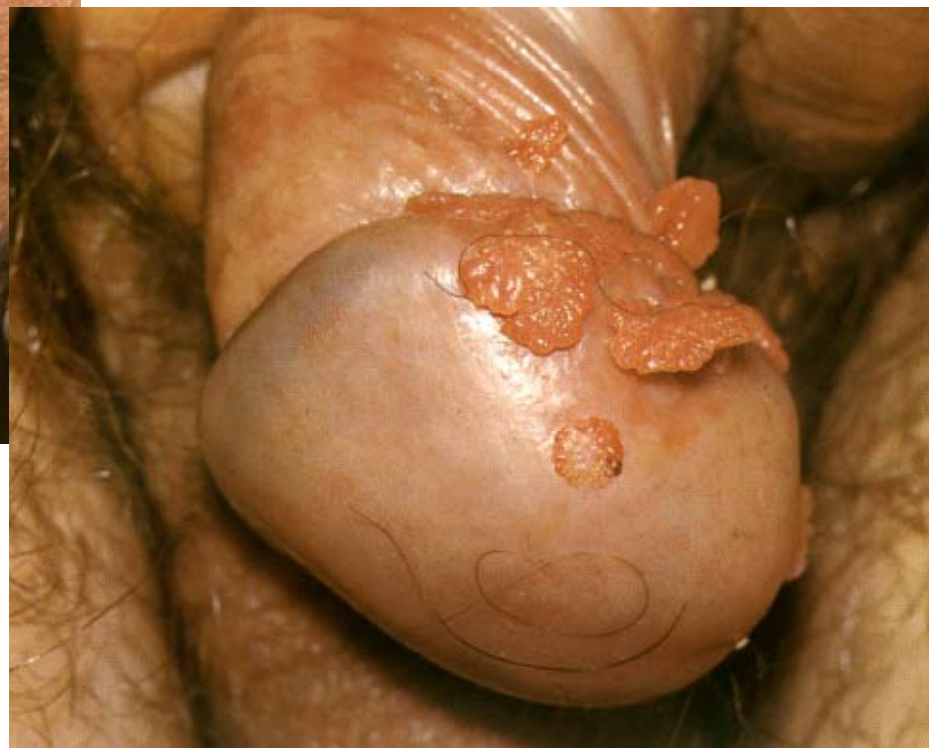
Les condylomes acuminés

- IST (partenaires HPV+ 50%)
- Lésions cliniques et diagnostic clinique +++
- Délai d'apparition des lésions courts (2 à 8 mois)
- HPV-BR > HR
- Réplication virale +++ (contagiosité)
- Récidives fréquentes après traitement
- Génomes HPV épisomiques

- Pas d'intérêt du test HPV en pratique (sauf si détection HPV-BR, éventuelle confirmation diagnostic clinique)

Condylomes acuminés

Condylomes acuminés

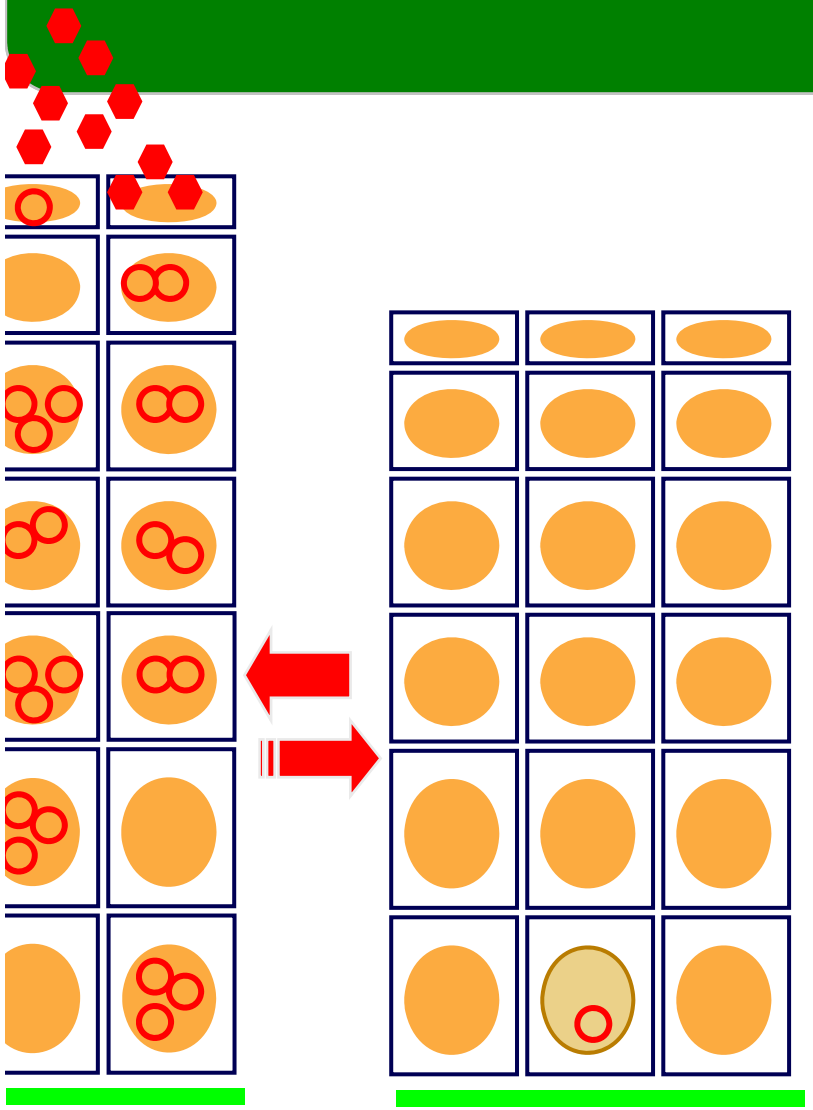


Lésions du col

cancer

condylome

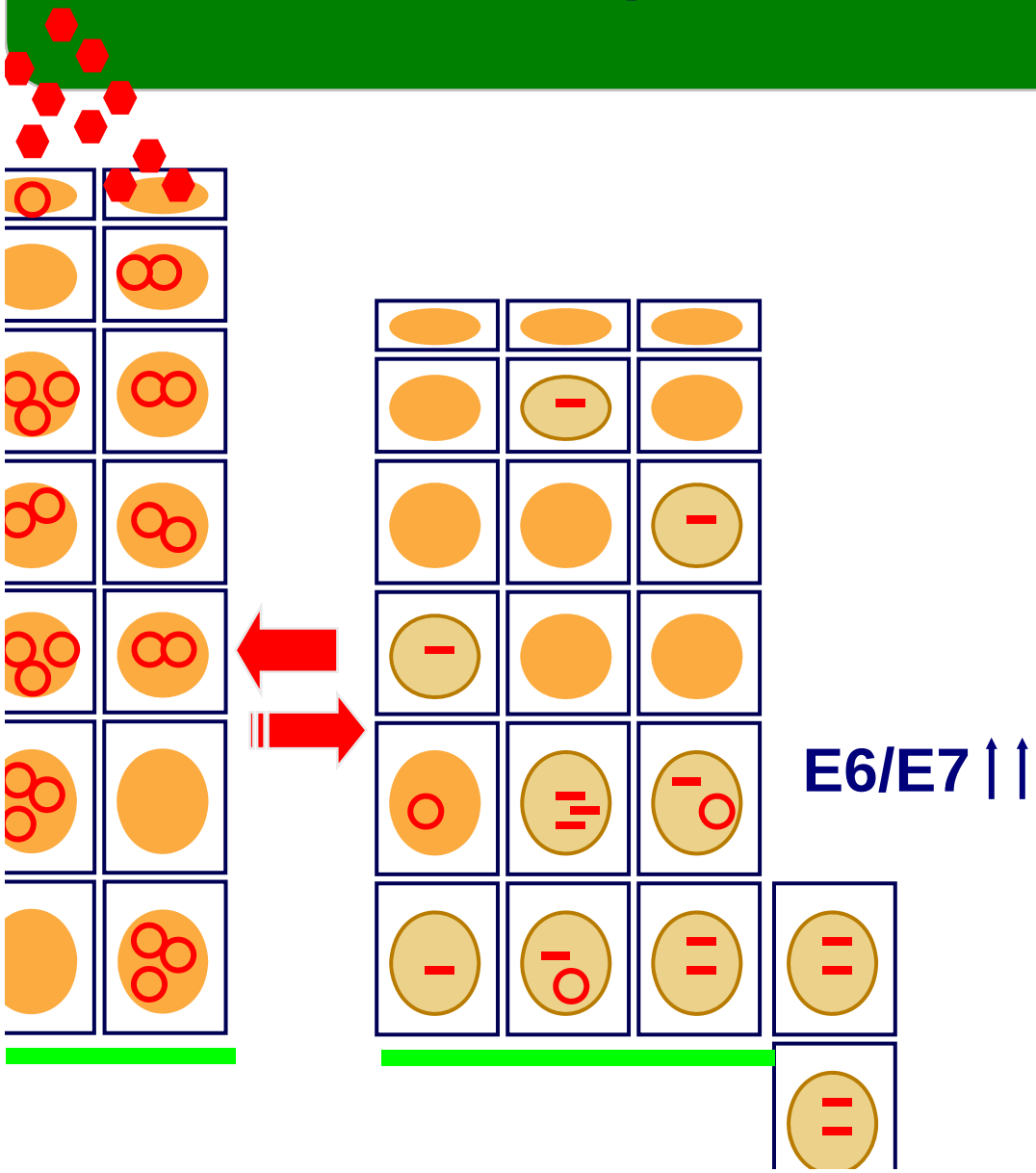
Infection contrôlée (1)



Latence
Risque de réactivation

Test HPV négatif

Infection persistante à HPV (2)



Asymptomatique ++
Dysplasies, cancers
…

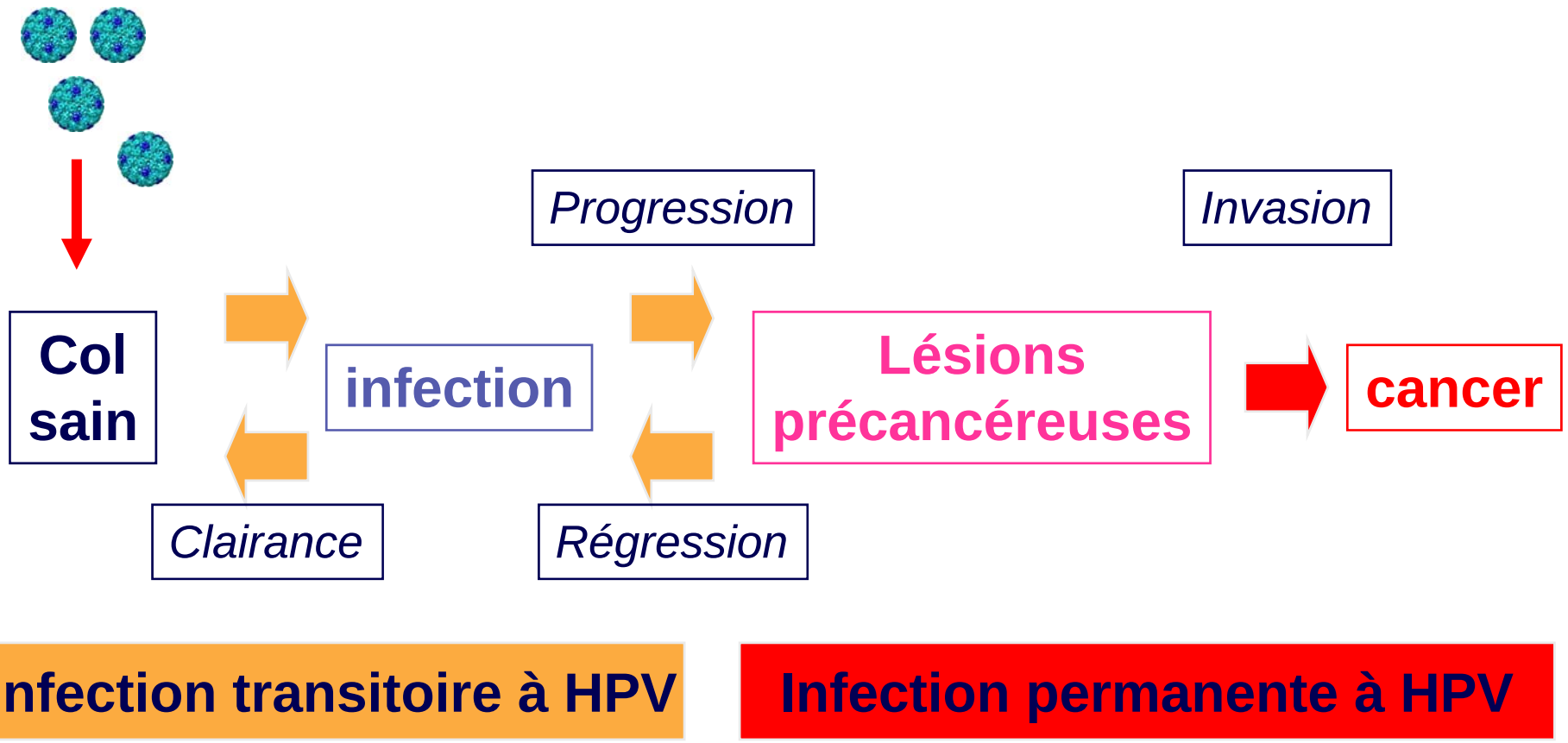
Transmission faible
Délai long
Récidives rares
HPV-16, 18 (HR)

Les cancers HPV induits (col)

- IST (partenaires HPV+ < 5%)
- Délai d'apparition des lésions très long (des années)
- HPV-HR > BR
- Réplication virale faible dans la dysplasie et le cancer
- Récidives rares après traitement (< 10%)
- Génomes HPV intégrés

- Intérêt du test HPV car seule les lésions HPV + peuvent donner un cancer et la persistance d'un HPV-HR est un facteur de risque majeur du cancer du col

Carcinogénèse du col utérin



HPV et oncogénèse

- Facteurs viraux transformants
  - . Intégration du génome viral (inactivation E2)
  - . Expression transitoire de E5
  - . Surexpression de E6 et E7 +++
    - transformation et immortalisation
    - Cellules dysplasiques
    - Accumulation d'anomalies génétiques
- Cellule cancéreuse HPV + (type HeLa)

Prévention du cancer du col

- Facteurs de risques
  . Virologiques : détection HPV, vaccins HPV
  Autres : tabac, …

- Dépistage des lésions
  . Cytologie sur frottis cervico-utérin (FCU)
  . Colposcopie et anatomopathologie sur biopsie

Optimisation de l'utilisation des différents moyens

Utilisations possibles du test HPV

- Diagnostic d'une infection active à HPV +++

- Triage des ASC-US (NABM)

- Dépistage du cancer du col
- Pronostic post-conisation

Au programme

A quoi sert un test HPV ?

Quels sont les tests disponibles ?

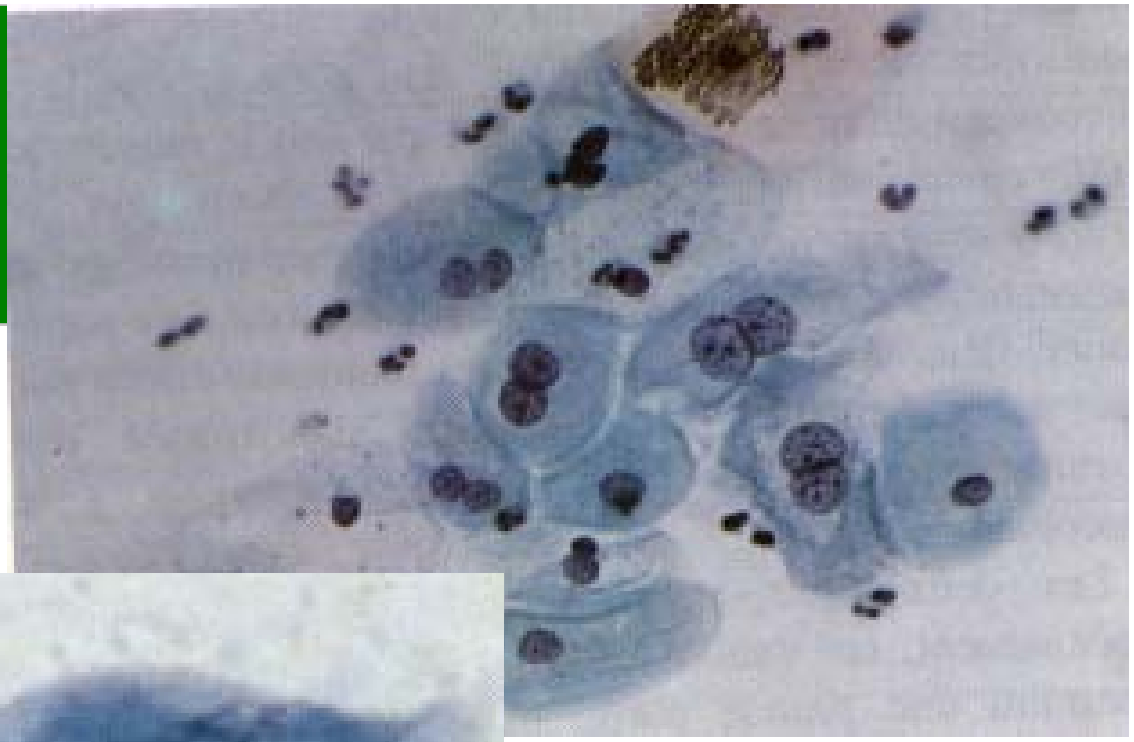
Critères de choix d’un test ?

Mise en évidence indirecte

- Cytologie : (FCU – koïlocytes)
  . Cytologie classique ou monocouche
  . Coloration de Papanicolaou
  . Système Bethesda 2001 (ASC < LSIL < HSIL)
  . Sensibilité 70%, spécificité > 90%

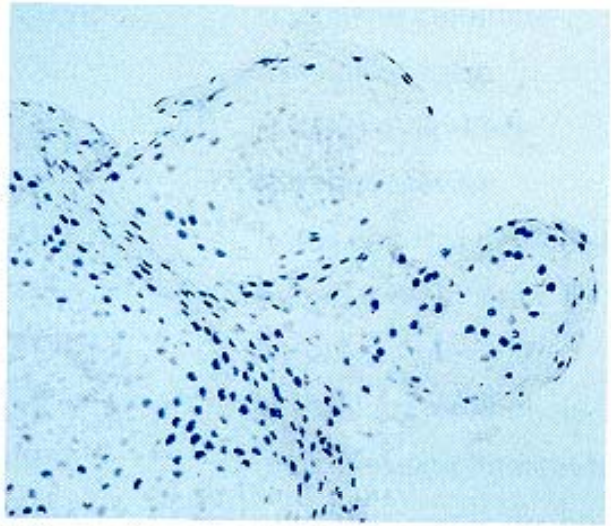
- Histopathologie (référence)
  . Colposcopie + biopsies ± hybridation *in situ*
  . Système CIN (CIN1< 2 < 3 < carcinome)
  . Spécificité 100%

Koïlocytes



Hybridation *in situ*

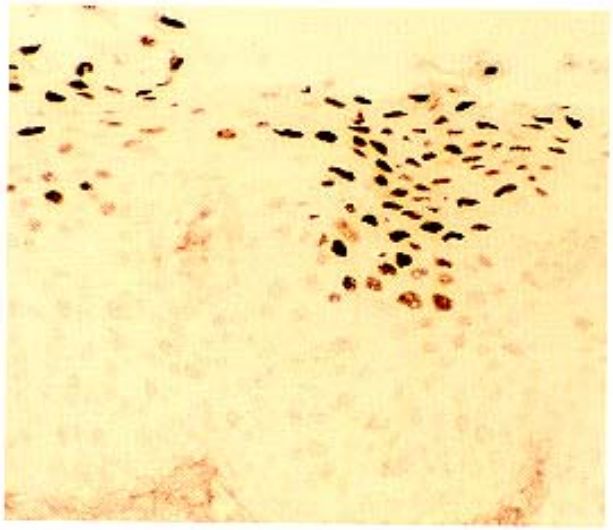
- Sur frottis cellulaire ou coupe histologique
- Sondes ADN spécifiques marquées :
  - HR : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66
  - BR : 6, 11
- Avantage :
  - visualisation des cellules infectées
- Inconvénient :
  - peu sensible (notamment couche basale)



Condylome exophytique :
marquage par la sonde 6/11

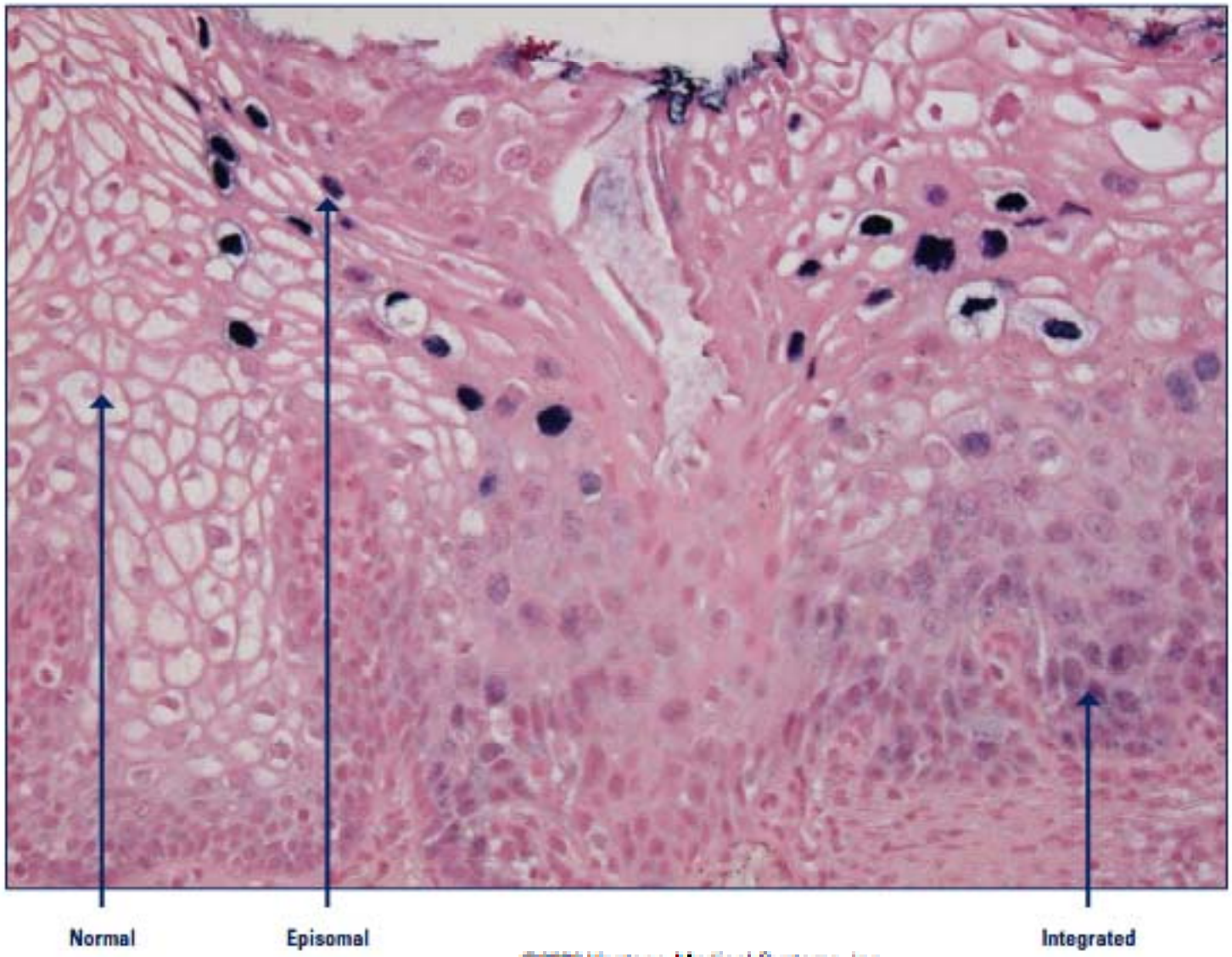
Hybridation in situ

D ’après G Daste et al.



Dysplasie modérée :
marquage par la sonde 16/18

Hybridation *in situ*



©2006 Ventana Medical Systems, Inc.

Marqueurs virologiques

- Détection ADN ou ARN

- Typage (HR/BR, précis)

- Quantification : PCR (technique ANRS type 16 et 18)
- Intégration (Alu-PCR, E2)

- Recherche d'anticorps
- Culture *in vitro (levures, culture de peau)*

Prélèvement

- FCU, frottis anaux
- Biopsies, écouvillonnages, urines, ….

- Non standardisé en quantité de cellule, sensibilité variable !
- Contrôle interne pour la présence d'un gène de ménage
- Non standardisé en composition : Surepath®, Easyfix®, …

Evolutions techniques

Matrice
ADN ou ARN

Hybridation

Amplification

Consensus

Hybridation inverse
Hybridation sur puce
RFLP
Séquençage

Spécifique
(multiplex)

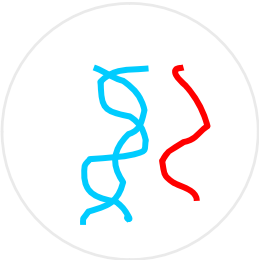
Hybridation Temps réel
Détection sur gel

AD
N
Hyb

Hybrid capture II HPV - DNA
(Digène, Qiagen)

- Milieu de prélèvement spécifique (Digène, Cytyc)
- Prélèvements endo/exocol et biopsies uniquement
- Sensibilité 100 000 copies /mL
- Hybridation avec 2 cocktails de sondes ARN
  - HR: **16**, **18**, **31**, **33**, 35, 39, **45**, 51, 52, 56, 58, 59, et 68
  - BR: 6, 11, 42, 43, 44
- Semi-quantitatif (DO)

Hybrid capture II HPV DNA
Digène corporation

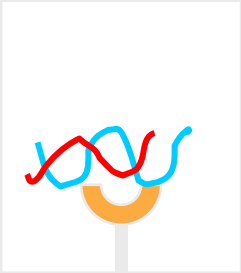


ADN
échantillon

Sonde HPV

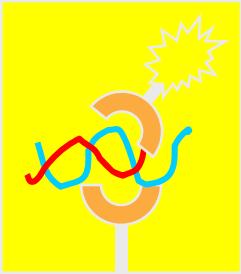
Hybridation ADN/ARN

Fixation



Ac anti-hybride ARN/ADN

Révélation



Ac anti-hybride ARN/ADN
Phosphatase alcaline

Substrat

AD
N
Hyb

Cervista® HPV HR (Hologic) ± Cervista® HPV 16/18 (Hologic)

- Milieu de prélèvement spécifique (ThinPrep®)
- Prélèvements endo/exocol et biopsies uniquement
- Sensibilité 1000-5000 copies /réaction
- Hybridation avec cocktail de sondes ARN
  - 14 HR: **16**, **18**, **31**, **33**, 35, 39, **45**, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68
  - HR: 16/18
- Semi-quantitatif (DO)

AR
N
Hyb

HPV OncoTect™ E6/E7 mRNA

(IncellDx)

- Détection ARNm E6/E7 en **cytométrie de flux** (ThinPrep® et Surepath®)
- Résultats en 3h, de 24 à 96 échantillons
- 500 ul, lavages, marquage par hybridation *in situ*, lavages
- Détection 95% ≥ CIN2

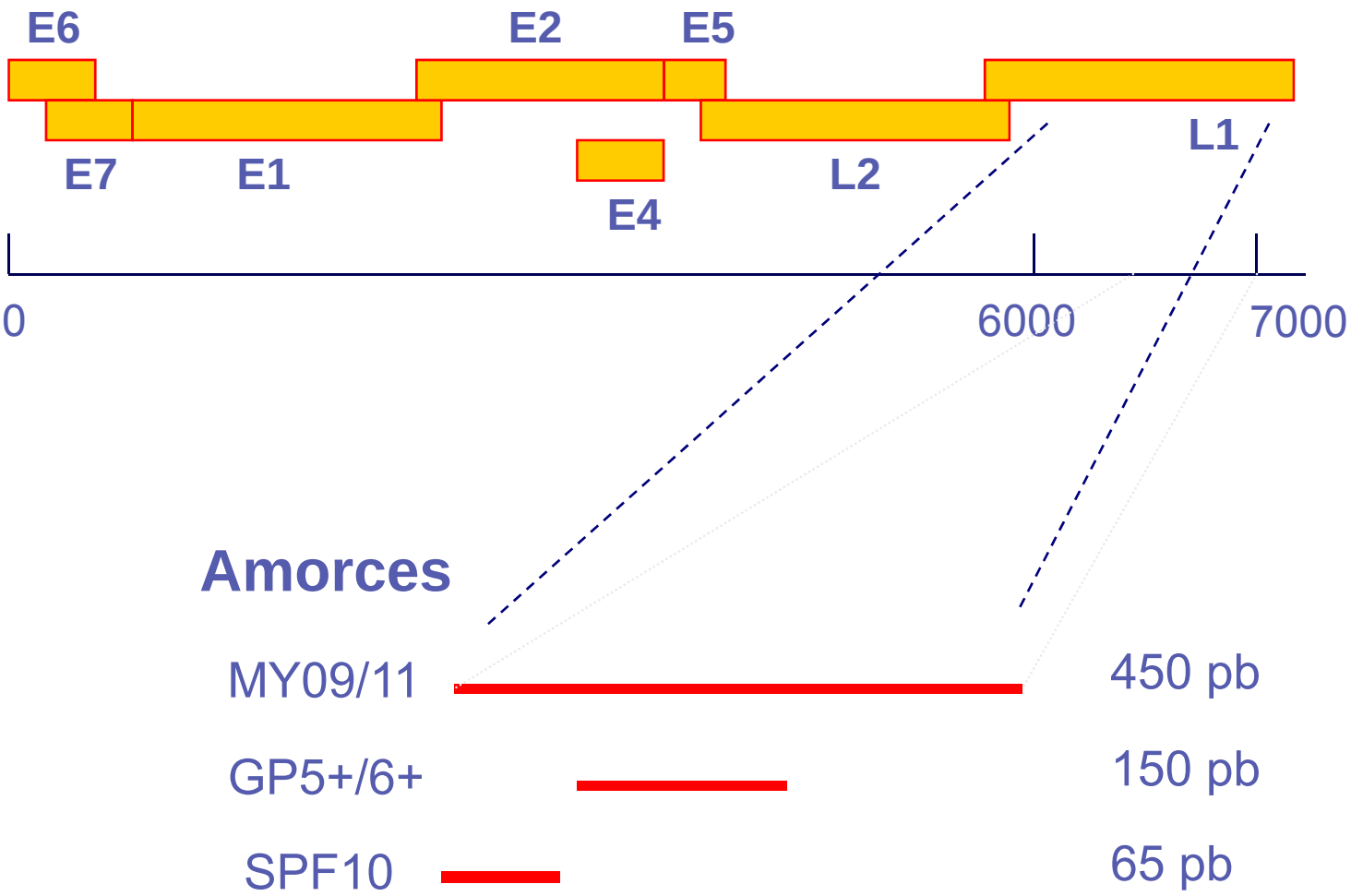
ADN
Amp

Amplification par PCR

- Très bonne sensibilité : 10 à 100 copies
  - amorces universelles (L1)
    - MY09/MY11 : référence
    - PGMY09/PGMY11/HMB01 : détection plus large
    - GP5+/6+ : meilleure détection de HPV 35 (risque intermédiaire)
    - SPF10 : plus sensible, amplification après fixation
  - Amorces spécifiques (multiplex)

ADN
Amp

Détection par PCR consensus



ADN
Amp

Détection et typage

PCR point final:

Séquençage : analyse phylogénétique

RFLP : profil de restriction enzymatique

hybridation par sondes spécifiques marquées :

6, 11, 16, 18, 33 (Sorin, DIG-labelling : Boehringer)

INNO-LIPA / Linear Array : hybridation *reverse* sur bandelettes (26 à 35) (difficultés d 'interprétation)

Genomica / Papillocheck : hybridation sur puce

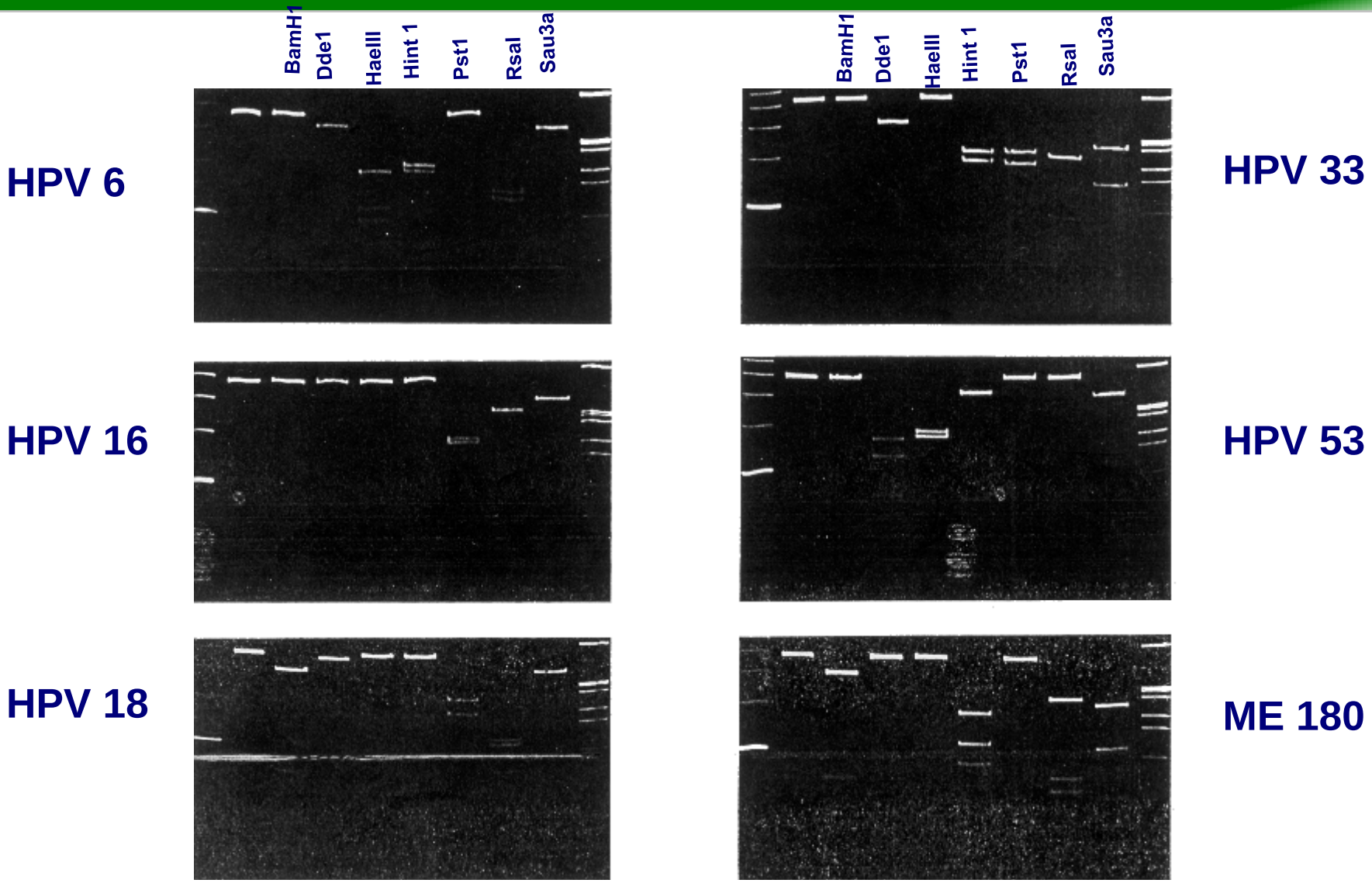
Seegene : multiplex 16, 18, HR

PCR en temps réel : Taqman

Abbott / Roche : multiplex 16, 18, HR

ADN
Amp

Analyse de profils de restriction



ADN
Amp

Séquençage et phylogénie

- Amplification par PCR consensus (L1)
- Séquençage classique (séquence consensus), problème des infections multiples
- Pyroséquençage (séquences multiples)
- Génotypage : analyses phylogénétiques avec séquences de références (typage exhaustif, comparaison de séquences)

ADN
Amp

ND

Amplicor® HPV Test (Roche)

- PCR qualitative avec hybridation (amorces X5/X7 dans L1, 165 pb)
- IC = gène bêta globine
- Détection des 13 types HR par hybridation (cocktail de sondes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)
- Sensibilité 500 copies /mL
- Milieux de transport et système de pvt

ADN
Amp

ND

HPV consensus kit®
(Argène)

- Extraction Qiagen, IC (HLA)
- PCR : Amorces L1 et E6-E7
- Hybridation en microplaque (dénaturation, AcADNsb, sondes génériques, HR, BR biotinylées +streptavidine, TMB)
- 25 génotypes (HR: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58, BR: 6, 11 et génériques: idem + 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68)

Résultats génériques ?

ADN Amp

Linear Array HPV genotyping Test (Roche)

- Amplification par PCR classique
- Différente du kit Amplicor !
- Hybridation inverse sur bandelette (37 génotypes HR et BR : 6,11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS29, CP6108)

ADN Amp

INNO-LiPA HPV Genotyping

Extra® (Innogenetics)

- PCR SPF10 (L1) - possible PCR temps réel
- Typage par hybridation inverse sur bandelette (manuelle ou Auto-LiPA)
- typage (25 puis 28 génotypes)
  - BR: 6, 11, 40, 43, 44, 54, 70
  - HR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 82
  - R?: 69, 71, 74,
  - Interprétation (réactions croisées)

Dimethylformamide, soude

ADN Amp

Seeplex® HPV4 ACE Screening (Seegene)

ND

- PCR multiplex conventionnelle avec révélation en électrophorèse capillaire (séquenceur, ScreenTape, Shimadzu, Caliper)
- HPV-16, HPV-18, HPV-HR (16,18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) et BR 6, 11.

ADN
Amp

GenoFlow HPV Array Test

(DiagCor)

- PCR puis Hybridation sur membrane
- Hybridation automatisée, lecture (30 min), série de 1 à 15 échantillons
- Génotypages : 18 HR (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 81, 82) et 15 BR (6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 70, 71, 72, 84)

ADN
Amp

Papillocheck® HPV screening

(greiner bio-one)

- PCR E1puis Hybridation sur puce à ADN
- Marquage-Hybridation-lavages-lecture (30 min)
- 24 types dont 18 HR (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) et 6 BR (6, 11, 40, 42, 43, 44)

ADN
Amp

Clinical Arrays® HPV CLART® HPV2 (genomica, Biotrin)

- PCR E1
- Amplification par PCR consensus
- Hybridation sur Puce ADN (microtube)
- Détection et typage automatiques

  35 génotypes 20 HR (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 85) et 15 BR (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 87, 89)

ADN Amp

RealTi*me* High Risk HPV (Abbott)
Cobas 4800 HPV (Roche)

- PCR multiplex temps réelle
- 14 HPV-HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) et typage 16 et 18
- Automatisation complète
  - M2000/m24 puis m2000rt
  - Cobas x480 puis cobas z48
- Validation sur différents milieux
- Préparation des échantillons spéciaux

ADN Amp

Anyplex™ II HPV28 Detection

(Seegene)

- Extraction non fournie
- PCR multiplex temps réelle
- Génotypage : 19 HR (16,18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) et 9 BR 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70.

Alternatives à la PCR

- Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)
- Rolling circle amplification (RCA)
- Utilisation de la technologie Luminex® après PCR ou HC2

ADN
Amp

Détection ADN intégré

Aucune technique commercialisée

Quantification ADN E2 / E6 (PCR ou MLPA)

Quantification Alu- gène HPV

ARN Amp

Nuclisens EasyQ® HPV (BioMérieux)

(Pretect® HPV-proofer (NorChip))

- Détection et quantification des ARNm E6/E7
- Automatisation EasyMag / EasyQ
- Amplification par transcription : NASBA temps réel
- Typage HPV 16, 18, 31, 33, 45

ARN Amp

APTIMA® HPV (Gen-Probe)

- Détection et quantification des ARNm E6/E7
- Automatisation complète (Panther/Tigris)
- Extraction, amplification par TMA puis hybridation
- Dépistage 14 HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)

Quel test en dépistage ?

FCU	Test HPV
HPV/dysplasie/cancer	HPV/dysplasie/cancer
Coût faible (15 €)	*Coût modéré (38 €)*
Spécificité +++	*Spécificité + (cancer)*
Sensibilité +	*Sensibilité ++++*
Prélèvement spé	*VPN +++*
	Prélèvement non spé
	Interprétation + ou -

Prochaines recommandations en faveur du test HPV ?

Au programme

A quoi sert un test HPV ?

Quels sont les tests disponibles ?

Critères de choix d’un test ?

Evolution des Stratégies au CHU de Toulouse

HPV n'est pas une thématique de recherche du laboratoire

En 2005 activité faible :

- 5-10/semaine essentiellement dermatologie et urologie
- Nécessité de typage (expertise) et de détection des HPV-BR

En 2012 activité modérée

- 25-40 / semaine majoritairement FCU, mais aussi biopsies (gynéco, ORL, dermato), frottis anaux, …
- Partage des plateaux techniques

Maintien d'une activité d'expertise HPV (PCR consensus L1 et typage par séquençage)

Evolution des Stratégies au Laboratoire CHU de Toulouse

PCR consensus et hybridation maison sur microplaque (HPV-6, 11, 16, 18, 33)

2005 Evaluation Hybrid capture II

PCR consensus + si HPV (+)

Amplicor HPV + extraction manuelle High Pure

Amplicor HPV + extraction automatisée sur MagnaPure

2009 Evaluation Puce ADN et Hybridation inverse

PCR conventionnelle multiplex HPV4 ACE Seeplex (SeeGene) + extraction automatisée sur COBAS Ampliprep, lecture sur Tape Station puis sur Shimadzu

2011

PCR temps réel multiplex sur COBAS 4800

Critères de choix

- Performances des tests (!?), marquage CE-IVD
- Coût (surprises des AO!)
- Automatisation et connexion bidirectionnelle au SIL
- Temps de réalisation et temps technicien
- Technologie implantée au laboratoire (extraction)
- Travail sur échantillon natif (flacon FCU), échantillons spéciaux
- Mutualisation possible (Chlamydia – Gonocoques, …)
- Sensibilité aux contaminations (ouverture de tubes, décontamination)
- Elimination des déchets (toxique?)
- Service du SAV +++

Evaluation des performances

- Matériels
  - Sur CQE (CNR Pasteur)
  - Lignées cellulaires (Hela HPV-18, Siha / Caski HPV-16)
  - Echantillons de patients

- Type validation des méthodes (iso 15189)
  - Description, Mise en œuvre, maitrise des risques
  - Performances : spécificité et sensibilité diagnostiques, limite de détection, comparaison avec la méthode déjà utilisée, contamination, robustesse et stabilité des réactifs

- Etudes publiées

Institut fédératif de Biologie, Toulouse-Purpan