

SOMMAIRE

Le virus du Papillome humain, encore bien inconnu pour bon nombre de citoyens, s'avère être assez redoutable puisqu'il n'épargne que très peu de personnes; sa transmission par voie sexuelle est même relativement commune.

Il est la principale cause du cancer du col de l'utérus (environ 99% des cas sont dus aux HPV de type haut risque), ainsi que de son précurseur, la néoplasie intraépithéliale cervicale (CIN).

Actuellement, le frottis cervico-vaginal est un outil indispensable dans le cadre de la prévention de ces deux pathologies. La détection de la présence du virus HPV lui-même est possible grâce aux analyses de biologie moléculaire, avec diverses stratégies de mise en évidence. Dans le cadre de mon travail de diplôme, il a été question du kit LINEAR ARRAY HPV Genotyping test (Roche) qui permet la mise en évidence des 37 génotypes HPV les plus fréquents.

Ce test combine 4 procédés (extraction, amplification, hybridation et détection), sur lesquels j'ai testé des modifications (raccourcissement de la détection, volume PCR réduit, extraction JetQuick,...) susceptibles de raccourcir la durée du protocole ou d'en simplifier la pratique: chaque modification testée isolément révélait un résultat satisfaisant par rapport à celui obtenu avec le protocole standard. Or, une fois ces changements regroupés, les résultats ne s'avéraient plus aussi bons. Pour atteindre l'objectif de simplification du protocole, des essais plus étendus seraient donc nécessaires.

Un autre point de mon travail fut l'adaptation du kit en real-time PCR sur le Rotor-Gene qui ne s'est malheureusement pas avéré aussi concluant qu'espéré: les courbes de fusion obtenues grâce au programme de la Melt Curve permettent de détecter le caractère positif des échantillons au stade de la PCR déjà. Toutefois, des investigations plus poussées seraient là aussi nécessaires pour garantir que la Melt Curve permet de trier les échantillons positifs et négatifs avec la même sensibilité que l'hybridation sur LINEAR ARRAY.

Nous avons néanmoins pu établir la robustesse du kit Roche par rapport à plusieurs points importants, ainsi que débroussailler quelques pistes vers un protocole simplifié et personnalisé.

Mots-clés : Réaction de polymérase en chaîne en temps réel, marqueur vert fluorescent des acides nucléiques (Syto 9), Virus du papillome humain, test de génotypage, hybridation sur bandelettes en nylon.

SUMMARY

The Human Papilloma Virus, still unknown for many citizens, is very fearsome as he spares only few people: his sexual transmission is really common.

It's the main cause of cervical cancer (about 99% of the cases due to HPV high risk types) and of cervical intraepithelial neoplasia (his precursor).

Cervical sample screening is presently the main tool for the prevention of these two pathogeneses. We can also detect the virus itself with the help of several molecular biology analysis.

Within the context of my diplom, we tested the LINEAR ARRAY HPV Genotyping test (Roche), which detects 37 frequent anogenital genotypes

This test is a combination of 4 processes (extraction, amplification, hybridization and detection), that I tried to modify (detection shortening, reduced PCR volume, JetQuick extraction and so one) with the aim of simplifying or shortening the protocol. Each modification alone tested gave a satisfying result.

Nevertheless, by combining all these modifications, the results weren't as good as with single modifications alone.

To reach our objective (simplifying Roche's protocol), other wider attempts should be necessary.

As second aim I tried to adapt this genotyping test to real-time PCR, on the RotorGene. Unfortunately this part of my work hasn't been as conclusive as expected: the melt curves, which we get with a Melt Curve program, allowed us to detect HPV positive samples already at the level of the PCR. However more investigations should be necessary to conclude to the Melt curve capacity to sort negative and positive samples with the same sensitivity as LINEAR ARRAY Hybridization.

We could nevertheless establish the robustness of the LINEAR ARRAY HPV Genotyping test in relation to some parameters and do the spadework on some tracks to a simpler and personal protocol.

Keywords : Real-time Polymerase Chain Reaction, green-fluorescent nucleic acid stain (Syto 9) Human Papilloma Virus, genotyping test, hybridization on nylon strips.