Détection de l'infection à papillomavirus humain chez des consultantes d'un centre tunisien de recherche de la sante de la reproduction.

Emna Ennaifer, Haifa Tounsi, Rim Ben Aissa, Khadija Kalai, Emna Fehri, Thalja Laassili, Ikram Guizani, Med Samir Boubaker.

Laboratoire d'Anatomie Pathologique Humaine et expérimentale. Institut Pasteur de Tunis
Unité de Recherche Papillomavirus humain (MERST UR02SP04). Tunis le Belvédère.

E. Ennaifer, H. Tounsi, R. Ben Aissa, K. Kalai, E. Fehri, T. Laassili, I. Guizani, M. S. Boubaker.

Détection de l'infection a papillomavirus humain chez des consultantes d'un centre tunisien de recherche de la sante de la reproduction.

LA TUNISIE MEDICALE - 2014 ; Vol 92 (n°04) : 253-257

R É S U M É

Prérequis : Le cancer du dol utérin est une cause majeure de mortalité féminine dans les pays de faibles ressources. Plus de 99 % sont liés à l'infection génitale par le Papillomavirus humain (HPV) qui constitue la maladie sexuellement transmissible la plus commune, infectant plus de 660 millions de personnes dans le monde. Les possibilités vaccinales actuelles incitent à de meilleures connaissances épidémiologiques de cette infection. Ces données sont quasi-absentes en Tunisie.

But : Evaluer la fréquence de l'infection et des divers génotypes ainsi que les données cytologiques associées au niveau d'un grand Centre de Santé de Base.

Méthodes : Ce travail explore 133 femmes tunisiennes sans critères de sélection. Les échantillons d'ADN proviennent d'un écouvillonnage à sec du col la détection est réalisée par amplification moléculaire et le génotypage par hybridation, explorant 37 génotypes différents.

Résultats : La fréquence de l'infection observée était de 7,8 %. L'unique HPV oncogène retrouvé était le type 16. Les frottis des femmes infectées étaient normaux dans 62,5% des cas. Les lésions de bas et de haut grade correspondaient à une infection par le HPV 16.

Conclusion : Ce travail constitue à notre connaissance la première étude de dépistage de l'infection cervicale à HPV dans une série de femmes du Grand Tunis. Il en résulte une prévalence moyenne, à l'instar des pays occidentaux, avec une prédominance nette du HPV 16 oncogène. Plus de la moitié des frottis des femmes infectées de montrent aucune anomalie et perd donc de sa valeur dans le dépistage de l'infection.

M o t s - c l é s

Papillomavirus humain. Prévalence. Cancer du col. Vaccin anti-HPV

E. Ennaifer, H. Tounsi, R. Ben Aissa, K. Kalai, E. Fehri, T. Laassili, I. Guizani, M. S. Boubaker.

Screening of cervical hpv infection at the reproductive health centre of ariana

LA TUNISIE MEDICALE - 2014 ; Vol 92 (n°04) : 253-257

S U M M A R Y

Background: Cervical cancer is the leading cause of cancer mortality among women in developing countries. Over 99 per cent of cases are linked to genital infection with Human Papillomaviruses (HPVs), which are the most common sexually-transmitted viruses worldwide and infect an estimated 660 million people. In light of the advances of the development of HPV vaccines in the world, the challenges to introducing and sustaining such vaccines in the public sector are faced by our countries, generating the need of understanding the local epidemiology of the disease.

Aim : This study aims to obtain some relevant data on local disease burden in a big health care centre of Tunis.

Method : In this study, 133 healthy Tunisian women are screened for HPV infection with detection of 37 genotypes. Samples are collected on dry cotton swabs and genotyping use PCR and linear array assay.

Results : 7,8 % of women were infected and HPV 16 was the only High-risk genotype encountered. 62,5% of infected women doesn't show any cytological abnormality on pap smears. Low and High grade epithelial lesions were associated with HPV 16.

Conclusion : There is currently few and sparse data in Tunisia. This work represents to our knowledge the first HPV cervical infection screening study in Tunisia in a basic health centre. The most relevant data is the High frequency of High risk HPV infections related to HPV 16. More than a half of cervical smears in infected women does not show any cytological abnormality and thus, pap smear screening is not appropriated to detect this infection

K e y - w o r d s

Human papillomavirus. Prevalence. Cervical cancer. HPV vaccine

L'infection génitale à Papillomavirus humain (HPV) constitue la maladie dite sexuellement transmissible la plus commune dans le monde. On estime à 80% des femmes et à 90% des hommes la capacité infectante de ce virus au moins une fois dans l'existence de chaque individu. Dans la majorité des situations, elle est spontanément résolutive ou induit des lésions strictement bénignes. Le passage à la chronicité d'une infection par des génotypes dits à « haut risque » ou à « potentiel oncogène élevé » peut induire chez certaines femmes l'apparition de lésions dysplasiques de degré croissant et dans certains cas, un cancer infiltrant du col de l'utérus. Le cancer du col utérin occupe dans le monde comme en Tunisie, le second rang d'incidence des cancers féminins après celui du sein et le troisième rang de mortalité par cancer après les cancers du sein et du poumon. 80% des victimes vivent dans les pays de faibles ressources où le dépistage par frottis cervical n'a qu'un faible impact. Les avancées vaccinales actuelles anti-HPV dans le monde offrent de nouvelles perspectives préventives mais aucune réflexion sur un éventuel programme vaccinal ne peut être envisagée sans qu'aucun support épidémiologique national n'y puisse être dévolu par une étude fiable et à large échelle. Seules quelques données encore rares ou éparses provenant de travaux tunisiens sont actuellement reconnus. Ce travail offre des résultats partiels en tant que préambule à des données plus larges actuellement finalisées. Il vise à octroyer à un grand centre de planning familial de Tunis, les données épidémiologiques qui lui sont propres. Le centre en question est le Centre de Recherche de la santé de la reproduction de l'Ariana, qui nous a offert à travers l'exploration d'une série de femmes consultantes et en bonne santé apparente, l'opportunité de recueillir des données de fréquence de l'infection à HPV, de distribution des différents génotypes impliqués et les aspects cytologiques qui leurs sont associés.

MATERIEL ET METHODES

Population d'étude

133 femmes consentantes, âgées de 24 à 64 ans (Moyenne : 43 ans) ont été recrutées lors d'un contrôle gynécologique de routine au Centre de recherche de la santé et de la reproduction de l'Ariana durant une période de 6 mois (01 Mars 2006 -13 septembre 2006). Les critères d'inclusion étaient l'âge (moins de 65 ans), une bonne santé et la nationalité tunisienne. Aucune restriction à la pratique des prélèvements n'a été considérée en cas de grossesse, d'allaitement, d'absence d'activité sexuelle ou de ménopause. Une fiche de renseignements incluant l'identité de la patiente ainsi que les éléments environnementaux et les facteurs de risques actuellement reconnus était systématiquement associée à l'échantillonnage individuel. Les tranches d'âges des femmes prélevées se répartissent en : 75 % de femmes de 35 à 45 ans, 15 % de femmes entre 24 et 35 ans et 10 % de femmes de 45 à 64 ans

Prélèvements

Au cours d'un examen gynécologique qui était initialement préconisé de façon systématique au niveau du Centre, les femmes consentantes ont été prélevées pour un frottis cervico-vaginal conventionnel associé à un écouvillonnage à sec et stérile du col utérin incluant l'exocol et la zone de jonction avec conservation immédiate à + 4°C. Les prélèvements étaient acheminés au laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Institut Pasteur dans les 48 heures.

Examen cytologique

Les étalements cellulaires ont été examinés en double aveugle après coloration de Papanicolaou avec une lecture cytologique conforme aux normes énoncées dans le système de Bethesda 2001.

Extraction et validation de l'ADN extrait

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon la classique méthode phénol-chloroforme. La qualité de l'ADN génomique était vérifiée par amplification du gène de la bêta-globine avec les amorces GH-20/PC-04. Les produits de PCR étaient contrôlés par électrophorèse sur gel d'Agarose à 2% puis photographiés. Les échantillons positifs à la bêta-globine se traduisent par une bande de 268 paires de bases (pb).

Détection du HPV

La détection de l'ADN du HPV a été effectuée par PCR avec les amorces MY09/MY11 spécifiques de la région consensus L1 commune à différents types d'HPV. Ont été considérés comme positifs les prélèvements présentant à l'électrophorèse une bande d'ADN de 450 pb. Le typage de la spécificité virale a été réalisé par hybridation sur sondes enclavées dans des bandes colorimétriques (Linear Array Kit Roche Amplicor) selon une méthode approuvées efficiente par des tests annuels prodigués par le Réseau des Laboratoire de Référence HPV de l'OMS dont nous faisons partie en tant que laboratoire de Référence pour la Tunisie et l'EMRO. Les sondes utilisées sont spécifiques de 37 génotypes du HPV : 24 types de bas risque et de risque intermédiaire (6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64,66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83,84, IS39 et CP6108) et 13 types à haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59, 68).

Analyse statistique

Les données recueillies ont été analysées par le test non paramétrique de Mann-Whitney (SPSS version 12).

RESULTAT

Aspects cytologiques

L'étude cytologique des frottis cervicaux a révélé 1 lésion intra-épithéliale de bas grade, 1 lésion intra-épithéliale de haut grade et 2 aspects d'atypies nucléaires de signification indéterminée (ASCUS). L'ensemble des aspects observés est répertorié dans le tableau 1.

Détection et typage du HPV

Parmi les 133 prélèvements, 31 échantillons (23.3%) se sont révélés négatifs pour le gène de la bêta-globine et ont de ce fait été exclus de l'étude. La détection de l'ADN des HPVs était

positive dans 8 cas soit **7,8 %** (Tableau 2). Les patientes dépistées pour le HPV se répartissaient en 20 femmes de 20 à 35 ans, 75 femmes de 35 à 55 ans et de 5 femmes de plus de 55 ans.

Tableau 1 : Résultats des frottis cervico-vaginaux des 133 femmes dépistées pour le HPV

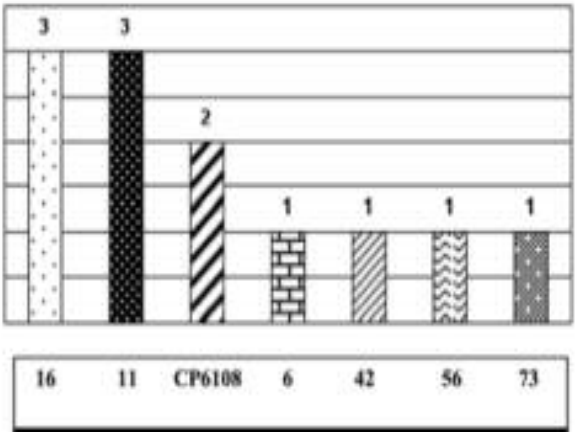
Aspect cytologique	Nombre de cas	Proportion %
Normal	44	43
Inflammatoire	46	45
Lésons d'ASCUS	2	1.9
Lésions de bas grade	1	0.9
Lésions de haut grade	1	0.9
Frottis inadéquat	7	6.8

Tableau 2 : Fréquence de l'infection à HPV parmi les femmes dépistées

	Nombre de sujets	Proportion %
HPV-	94	92
HPV+	8	7.84
Total	102	100

Sept génotypes d'HPV ont été observés (Figure 1). Les types à haut risque étaient exclusivement représentés par le HPV16 et ont été observés dans 3 cas. Un seul cas d'infection multiple a été observé, associant les HPV 16, 56, 11, 42 et CP6108. Les virus à bas risque étaient présents dans 4 cas : HPVs 6, 11, 42 et CP6108. Une infection à HPV73 classé en HPV de risque intermédiaire a été observée.

Figure1 : Distribution des différents génotypes de HPVs détectés



Corrélations entre l'infection à HPV et la cytologie

L'aspect du frottis cervical des femmes infectées est présenté dans le tableau 3. Il était normal pour cinq femmes sur 8. Les lésions de bas et de haut grade correspondaient à une infection à HPV 16. Un cas de co-infection du HPV 16 avec les HPVs 56, 11, 42 et CP6108 était accompagné d'un aspect cytologique normal (Tableau 4).

Tableau 3 : Corrélations entre les aspects cytologiques et la détection du HPV chez les femmes dépistées.

FROTTIS	normal	inflammatoire	Bas grade	Haut grade	ASCUS	Inadéquat
HPV(+)	5	1	1	1	0	0
HPV(-)	39	45	0	0	2	7

Tableau 4 : Aspects cytologiques observés chez les femmes infectées par HPV selon le génotype

Type d'HPV	Aspect cytologique
Mono-infections	
HPV 16	bas grade, haut grade
HPV 73	normal
HPV 6	normal
HPV 11	normal, inflammatoire
HPV CP6108	normal
Infections multiples	
HPV 16, 11, 42, 56, CP6108	normal

Evaluation des facteurs de risque de l'infection

L'âge moyen des femmes infectées était de 43 ans (30 à 50 ans). Il n'a pas été noté de différence significative dans la moyenne d'âge entre les femmes infectées et les femmes saines. L'âge moyen du premier rapport sexuel chez les femmes infectées, confondu avec l'âge au mariage, était de 22 ans. Le nombre moyen de grossesses était de 3. La notion de maladie sexuellement transmissible était présente dans 3 cas et celles d'anomalies cytologiques dans 2 cas (Tableau 5).

Tableau 5 : Distribution des facteurs de risque l'infection par HPV dans la série étudiée *NS : non significatif

FACTEURS	Total (n=102)	HPV+ (n=8)	P
Age moyen du mariage (ans)	23	22	NS*
Tabagisme	3	0	NS
Nombre moyen de grossesses	4	3	NS
Nombre moyen d'avortements	1	1	NS
Atcds de MST	26	3	NS
Atcds familiaux de néoplasies	3	0	NS
Niveau socio-économique			
Bas	33	3	NS
Moyen	52	4	
haut	14	1	

DISCUSSION

L'infection génitale à HPV est actuellement reconnue comme la maladie sexuellement transmissible la plus fréquente (1). Elle correspond le plus souvent à une lésion invisible à l'œil nu et dans la majorité des cas à une lésion spontanément régressive dans des délais variant entre 6 et 12 mois. Le risque de portage chronique est encore peu évaluable selon les connaissances

actuelles mais il est admis et reconnu que seul le passage à la chronicité est nécessaire à la transformation cancéreuse. L'amplification génique par réaction polymérasique en chaîne (PCR) est la méthode de choix pour la détection virale. Elle a permis d'identifier plus de 40 génotypes d'HPV qui sont pourvoyeurs d'infections génitales (2) et qui sont classés en trois groupes à risque oncogène différent faible, élevé ou intermédiaire (3). La prévalence de ces différents génotypes est variable selon la région et l'âge de la population étudiée. Quatre régions à profil génotypique différent sont actuellement reconnues par extrapolation, sans que des données spécifiques à ces régions ne soient encore publiées pour le continent africain : l'Afrique sub-saharienne, l'Europe, l'Amérique du Sud et l'Asie (4). Cette hétérogénéité de distribution des génotypes viraux est importante à considérer quant au développement des tests de détection de l'infection génitale à HPV ainsi que vis à vis des projets de vaccination qui pourraient être envisagés à l'échelle individuelle aussi bien qu'à l'échelle nationale.

La recherche de l'infection cervicale à HPV ainsi que l'identification du génotype infectant est d'une utilité sans faille dans la prise en charge des femmes présentant des anomalies cytologiques de bas grade sur le frottis cervical (5,6), la méthode de détection la plus commune, la plus sensible et la plus reconnue du HPV étant l'amplification génique par PCR (7). Dans notre étude, 37 génotypes ont été recherchés de façon individuellement dissociée, contrairement aux divers tests à visée commerciale qui sont constamment ré-évalués (8,9) qui ne font que recouvrir un spectre de types distingués en virus à haut risque et virus à bas risque . Ce travail constitue de ce fait la première étude ponctuelle et préliminaire d'incidence de l'infection cervicale à HPV dans un centre de santé publique du Grand Tunis. Les études antérieurement conduites concernaient un pool insuffisant et non représentatif liées à un échantillonnage biaisé par des divergences de facteurs de risque (10) ou des femmes sélectionnées dans un groupuscule d'individus du centre tunisien (11). La fréquence de l'infection cervicale à HPV retrouvée dans le Centre de Recherche de la santé de la reproduction de l'Ariana est de 7,8 %. Elle paraît nettement inférieure à celle qui a été rapportée dans le centre tunisien, estimée à 13.6 % sur un échantillon de 106 femmes (12). La distribution de l'infection par tranches d'âges a montré que la tranche d'âge 35 à 55 ans est nettement prédominante (87,5 % des cas). Cependant, cette ranche d'âge constitue dans cette série le plus grand nombre des consultantes ce qui introduit donc un biais de sélection. En effet, la distribution des patientes examinées a montré une majorité de femmes âgées entre 35 et 45 ans (75%), ce qui ne constitue que le reflet de l'âge majoritaire d'enrôlement des femmes dépistées dans le Centre de recherche de la santé et de la reproduction de l'Ariana. Il n'est donc pas envisageable de considérer que cette seule tranche d'âge est la seule à risque dans notre série. Ainsi et au final, bien que le caractère souvent transitoire de l'infection avant 35 ans ait été antérieurement reconnu (1), il ne peut pas être attribué à travers ces résultats à une moindre fréquence des infections aussi bien pour les moins de 35 ans que les plus de 45 ans. Ces hypothèses ont effectivement été confirmées par la suite de nos travaux qui ne peuvent figurer sur cet article. D'ailleurs, force est de constater que ceci est également attesté par les données concernant l'âge des femmes infectées rapportées dans les autres études tunisiennes antérieures (10,11) bien que non semblables de part leurs distributions aussi bien géographique que démographique. D'un autre côté, la prévalence de l'infection dans une tranche d'âge donnée au delà de 25 ans peut ne constituer que le reflet de la plus forte proportion d'infections passées à la chronicité et dites persistantes et qui sont de ce fait potentiellement pourvoyeuses de cancers cervico-utérin.

Le seul HPV à haut risque oncogène détecté dans notre série est le type 16. Ce résultat ponctuel ne peut être extrapolé à une plus large échelle d'une part et ne saurait être comparé à la littérature tunisienne antérieure d'autre part. En effet, d'autres types ont été détectés dans une série concernant 64 prostituées tunisiennes parmi lesquels le HPV de type 16 était observé dans 38% des cas, en association avec HPV 58 et HPV 82 (10). Ceci ouvre invariablement la discussion de l'intervention de facteurs de risques autres que ceux qui pourraient être usuels pour une population générale

La cytologie apporte une donnée fondamentale à considérer et qui demeure encore trop souvent méconnue des praticiens bien que déjà bien documentée dans la littérature : l'infection à HPV n'est détectée sur le frottis que chez environ la moitié des femmes porteuse du virus. Dans cette série, le virus s'accompagnait de lésions épithéliales du col dans 4 cas sur 8 alors que 50 % des femmes infectées ne présentaient aucune anomalie cytologique. Ceci implique que la moitié des femmes infectées se présentent avec un frottis normal et qu'un frottis normal ne peut en aucun cas exclure l'hypothèse qui demeurera à valider, d'une infection qui passe inaperçue par le seul examen cytologique (6). Il est impératif de garder à l'esprit que seul le dépistage moléculaire appliqué sur un prélèvement de cellules de desquamation du col utérin est à même d'authentifier une infection à HPV et que le seul rôle qui doit demeurer attribué et dévolu au frottis cervico-vaginal est de détecter les anomalies cytologiques évocatrices d'un début de transformation maligne. Ces dernières doivent impérativement conduire à une vérification biopsique pour ne passer à côté d'aucune affection maligne avérée. Ceci doit être conçu de façon parfaitement claire et éclairée comme valable et imposable sans exclusion de priorité aucune.

Les facteurs de risque sont extrêmement difficile à départager chez nos patientes compte tenu du fait qu'elles introduisent des difficultés de divulgation de secrets personnels et conjugaux. Les facteurs les plus reconnus de la persistance de l'infection à HPV dans la littérature sont l'âge jeune du premier rapport sexuel et la multiplicité des partenaires, en association avec le tabagisme, la contraception orale et les déficits vitaminiques, principalement la vitamine A (13,14,15). Ceci demeure extrêmement difficile à évaluer dans notre population et bien que l'étude de cette série n'ait pas mis en évidence un facteur de risque particulier, il n'en demeure pas moins que tout reste tributaire d'un bon interrogatoire par l'intervention d'une intervieweuse formée à cet effet.

CONCLUSION

Ce travail constitue à notre connaissance la première estimation de la fréquence de l'infection cervicale à HPV dans un échantillon de femmes de Tunis et apporte un chiffre qui doit la situer en zone de moyenne prévalence.

Cependant, pour aboutir à des éléments épidémiologiques importants à considérer dans une logique préventive et une perspective vaccinale, il est essentiel de réaliser le dépistage sur un échantillon plus large de femmes confondant toutes les tranches d'âges et de déterminer la distribution de l'ensemble des génotypes viraux circulants.

References

1. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol. 2005; 32 Suppl 1: S16-24.
2. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004; 324:17-27.
3. Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, et al. Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: prevalence and distribution of different genotypes. J Med Virol 2009; 81: 271-7.
4. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, et al. IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis Lancet. 2005; 366 : 991-8.
5. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. Vaccine 2008; 26 Suppl 10 : K29-41.
6. Baseman JG, Kulasingam SL, Harris TG, et al. Evaluation of primary cervical cancer screening with an oncogenic human papillomavirus DNA test and cervical cytologic findings among women who attended family planning clinics in the United States. Am J Obstet Gynecol 2008; 199: 26.e1-8.
7. Söderlund-Strand A, Carlson J, Dillner J. A modified general primer PCR system for sensitive A modified detection of multiple types of oncogenic Human Papillomavirus. J Clin Microbiol 2009 ; 47 : 541-6
8. Hantz S, Caly H, Decroisette E et al. Comparaison de 2 techniques de détection et de typage des Papillomavirus humains : Hybrid Capture® 2, HPV Consensus kit®. Pathologie et Biologie 2005 ;53:556-562.
9. Hantz S, Caly H, Decroisette E et al. Évaluation des performances de trois techniques de détection et de typage des papillomavirus humains : Hybrid Capture® 2, HPV Consensus kit® et Amplicor HPV® = Evaluation of accuracy of three assays for human papillomavirus detection and typing : Hybrid Capture® 2, HPV Consensus kit® and Amplicor HPV®. Pathol Biol 2008, 56 : 29-35
10. De Marco F, Houissa-Kchouk F, Khelifa R, Marcante ML. High-risk HPV types in Tunisia. A pilot study reveals an unexpectedly high prevalence of types 58 and 82 and lack of HPV 18 among female prostitutes. J Med Virol 2006 ; 78 : 950-3.
11. 11. Hassen E, Remadi S, Chouchane L. Detection and molecular typing of human papillomaviruses: prevalence of cervical infection in the Tunisian central region] Tunis Med. 1999; 77 : 497-502.
12. Hassen E, Chaieb A, Letaief M, et al. Cervical human papillomavirus infection in Tunisian women. Infection. 2003; 31:143-8.
13. Frega A, Stentella P, De Ioris A, et al. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. Cancer Lett. 2003; 196 : 127-34.
14. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Bernard HU. Cholinergic signaling through nicotinic acetylcholine receptors stimulates the proliferation of cervical cancer cells: an explanation for the molecular role of tobacco smoking in cervical carcinogenesis? Int J Cancer. 2009; 124 : 1090-6.
15. Frega A, Scardamaglia P, Piazze J, et al. Oral contraceptives and clinical recurrence of human papillomavirus lesions and cervical intraepithelial neoplasia following treatment. Int J Gynaecol Obstet. 2008; 100:175-8.