

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA-1-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Bio signalisation Cellulaire et Moléculaire, Génétique du Cancer

Thème

**INTERET DE LA PROTEINE p16^{INK4a} ET LE Ki-67 DANS LE
DIAGNOSTIC DES LESIONS INTRA-EPITHLIALES CERVICALES DU
COL DE L'UTERUS**

Présenté par :

M^{me} TAHRAT Nora

Soutenue publiquement le : **28 octobre 2015**, devant le jury:

M^{me} AMOKRANE. A	Maitre assistant A	BLIDA-1	Présidente
M^{me} AISSANI. R	Maitre assistant A	BLIDA-1	Examinatrice
M^{me} MOULAI. N	Maitre Assistant A	BLIDA-1	Promotrice

Année Universitaire : 2014/2015

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

*Ma très chère mère adorable **Chahrazed** qui ma soutenue pendant toutes mes longues années d'étude.*

*Mon très cher père **Arab** qui m'a permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'a appris a ne jamais baissé les bras.*

*Mon fils **Sid Ahmed** mon trésor dans cette vie.*

*A la mémoire de mon grand-père **Ahmed**, ma grand-mère **Malha** et ma tonte **Malika**, que Dieu le puissant les accueillent en son vaste paradis.*

*Mon mari **Amar** qui ma soutenu jusqu'au bout, qui a toujours été présent a mon coté pour m'aider, m'encourager et m'écouter.*

*Mes très chères sœurs : **Soumia, Asmaa et Safaa.***

*Mes grands-parents **Fatima Zahra et Abd elkader**, que dieu me les garde.*

Mes chers oncles, tontes, cousins et cousines.

Mes beaux parents, ma belle sœur et mes beaux frères.

*Toute la famille **TAHRAT, BAHABI.***

Mes amis et mes amies les biologistes et non biologistes ainsi que tout le groupe de BCM (biosignalisation cellulaire et moléculaire).

Remerciements

Avant tout chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force, la patience et la santé pour terminer ce travail.

*J'ai la chance d'effectuer ce travail minutieux dans laboratoire D'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES, DU PR. W. OUAHIOUNE, AU CHU -BLIDA- FRANTZ FANON grâce à **Mr TAHRAT.A et Pr BACHIR CHERIF.A.***

*Tout d'abord, je remercie **Mme MOULAI. N** pour le partage de ses connaissances, pour son soutien et pour m'avoir dirigée tout au long de ce travail.*

*J'exprime mes vifs remerciements à **Pr OUAHIOUNE. W** le chef de service pour sa contribution et son aide pour terminer cette thèse.*

*Je dois remercier aussi le personnel de laboratoire : **Les médecins, Les Résidants, les assistants de laboratoire, les biologistes** surtout **M^{me} Sadjia et M^{elle} Amel** pour leurs conseils et a toute l'équipe.*

Mes sincères remerciements aux membres du jury.

***M^{me} SAADI. L** chef de département et chef d'option.*

***M^{me} AMOKRANE. A** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.*

***M^{me} AISSANI. R** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Mes vifs remerciements à tous les Enseignants du département de biologie ainsi que tous ceux qui m'ont aidé.

Résumé

Les lésions précurseurs du cancer infiltrant du col utérin débutent généralement à la jonction entre les muqueuses malpighiennes et glandulaires. Les papillomavirus (HPV) induisent dans cette zone en remaniement permanent, des lésions condylomateuses, pures, ou associées à une transformation néoplasique du revêtement.

La protéine P16^{ink4}, régulatrice du cycle de division cellulaire est surexprimée, en compensation du blocage de P53, par les cellules dysplasiques des lésions intra-épithéliales de haut grade du col utérin. D'autre part, l'index de prolifération Ki67 ; marque les cellules en cycle.

L'objectif de notre étude est d'analyser la sensibilité et la spécificité du Ki67 et de la p16 dans le diagnostic et la classification des lésions intra-épithéliales cervicales (CIN).

Les résultats obtenus ont montré que la recherche de son surexpression pourrait constituer un test complémentaire pour améliorer le rendement de l'examen cytologique. D'autres études sont requises pour en recommander l'usage en routine.

Mots clés : HPV ; P16^{ink4} ; P53 ;Ki-67 ;CIN.

Abstract:

Invasive cervical cancer precursor lesions usually begin at the junction between mucosal squamous and glandular. Papillomavirus (HPV) induced in this area in permanent realignment, condylomateuses, pure, or lesions associated with neoplastic transformation of the coating.

The P16^{ink4}, regulatory protein of the cell division cycle is overexpressed in compensation for the blocking of P53 by intraepithelial lesions in cervical high-grade Dysplastic cells. On the other hand, the Ki67 proliferation index; marks the cells cycle.

The objective of our study is analyzed the sensitivity and the specificity of the Ki67 and the p16 in diagnosis and classification of cervical intraepithelial lesions (CIN).

The results showed that its overexpression research could constitute a complementary test to improve the performance of Cytology.

Key words: HPV; P16^{ink4}; P53 ; Ki-67 ; CIN.

المخلص:

الخلل القادم من سرطان الرحم يبدأ عادة من الاتصالات مت بين الاغشية الليجية و الغددية . الفيروس HPV يستقر في منطقة ذات تغير دائم، و الخلل في الاورام النقية يكون مرتبط مع تغيرات الاورام السرطانية.

البروتين p16 دوره تنظيم الانقسامات الخلوية في حالة الخلل او عند توقف عمل p53 التذي تسببه الخلايا النسيجية الموجودة ببطانة الرحم.

من جهة اخرى مؤشر النكاثر KI67 يظهر الخلايا و هي في حالة التجدد. الهدف من دراستنا هو تحليل حساسية و خصوصية KI67 و P16 في التشخيص و اعادة تصنيف الاورام الرحمية.

النتائج المتحصل عليها اظهرت انه توجد علاقة تكاملية ما بين KI67 و P16 في نتيجة تحاليل الفحوص الخلوية، وهناك دراسات اخرى مطلوبة يوصي بها الاطباء للاستعمال الروتيني.

كلمات مفتاحية: HPV; P16^{ink4}; P53 ; Ki-67 ; CIN.

Sommaire

Introduction.....	(2)
-------------------	-----

I. DONNES BIBLIOGRAPHIQUES

1- LES PAPILLOMAVIRUS HUMAIN

1. Structure.....	(4)
2. Genome du HPV	(5)
a. Mode de transmission.....	(6)
b. Cycle de multiplication.....	(6)
3. L'intégrité de l'ADN virale au génome humain.....	(7)
4. Les conséquences de l'intégration du genome virale du HPV.....	(8)
5. Immunité naturelle face aux HPV.....	(10)

2- CANCER DU COL UTERIN

1. Histologie du col utérin.....	(11)
1.1. L'exocol.....	(12)
1.2. L'endocol.....	(12)
1.3. Jonction exo- endocervicale (squamo-cylindrique) ou zone de transformation	(13)
2. Relation entre cancer du col et infection à Papillomavirus humain.....	(13)
3. Lésions cervicales précancéreuses.....	(13)
La Classification des CIN.....	(14)
4. Les facteurs carcinogènes.....	(16)
5. Le frottis cervic- vaginal FCV.....	(16)
6. Traitement	(17)

3- L'ONCO-PROTEINE P16^{INK4A} ET CIN

1. La protéine p16 ^{INK4a}	(19)
2. Régulation de p16 ^{INK4a} sénescence et oncogénèse.....	(20)
3. La carcinogénèse et physiopathologie	(21)
4. Limite de l'utilisation de p16 ^{INK4a}	(23)
5. Intérêt de le p16 ^{INK4a} dans les CIN cervicales	(23)

4- Le KI-67

1. Expression du Ki-67.....(24)
2. Interprétation du marquage... ..(25)
3. Limites du Ki-67.....(25)

II. METHODOLOGIE DE RECHERCHE

1. Matériels et Méthodologie(26)
 - Population d'étude.....(26)
1. Méthodologie.....(27)
 1. Prélèvements.....(27)
 2. Examen histologique standard: HE.....(27)
 - Circulation.....(27)
 - Inclusion ou confection des blocs.....(28)
 - Microtomie.....(30)
 - Étalement.....(30)
 - Déparaffinage.....(30)
 - Réhydratation.....(31)
 - Coloration.....(31)
 - Montage des lames.....(32)
 - Lecture sur microscope.....(33)
 3. Immunohistochimie.....(33)

III. Résultats

1. Données épidémiologiques.....(39)
 - 1.1. Reparation selon l'âge(39)
 - 1.2.Frottis cervico-vaginal(40)
 - 1.3.La répartition des cas selon le degré de CIN diagnostiqué initialement.....(40)
 - 1.4. Comparaison entre la fiche d'exploitation et la coloration standards (HE)(41)
 - 1.5. Comparaison des HE avec la P16^{INK4a}(41)
 - 1.6. Comparaison entre Ki67 et la P16INK4a.....(42)
 - 1.7. Comparaison des résultats obtenus avec les résultats de la fiche d'exploitation.....(43)

2.	Données d'anatomopathologiques.....	(44)
3.	Traitement des dysplasies	(49)
IV.	Discussion.....	(50)
V.	Conclusion.....	(55)
VI.	Références bibliographiques	
VII.	Annexes	

LISTE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure .1 Structure de HPV.....	(4)
Figure.2 Structure génomique de l'HPV 31.....	(6)
Figure.3 Cycle productif du HPV.....	(7)
Figure.4 Intégration de l'ADN de l'HPV dans le génome hôte.....	(7)
Figure .5 Les conséquences de l'intégration du génome viral du HPV.....	(8)
Figure.6 Schéma simplifié de la carcinogenèse induite par HR-HPV.....	(9)
Figure.7 Coupe histologique d'un utérus d'une femme.....	(11)
Figure .8 coupe histologique d'une jonction endocervicale.....	(12)
Figure.9 coupe histologique d'une jonction exocervicale.....	(12)
Figure.10 L'évolution du cancer de col utérin.....	(13)
Figure.11 Chevauchements diagnostiques dans les CIN.....	(14)
Figure.12 Coupe histologique du CIN II.....	(15)
Figure.13 Coupe histologique du CIN I.....	(15)
Figure.14 Mécanisme de la surexpression de la p16 ^{INK4a} dans les cellules cervicales dysplasiques et cancéreuses, après infection par HR-HPV.....	(22)
Figure .15 Image d'un marquage du Ki67 dans les CIN.....	(24)
Figure.16 L'inclusion d'une biopsie.....	(27)
Figure. 17 Circulateur automatique.....	(28)
Figure.18 Groupe thermoélectrique (Appareil d'inclusion).....	(29)
Figure.19 Les différents moules d'inclusion.....	(29)
Figure.20 Bloc de paraffine.....	(30)
Figure.21 microtome.....	(30)
Figure.22 ruban de coupe sur le microtome.....	(30)
Figure.23 schéma représentant le principe de montage des lames.....	(32)
Figure.24 Lame d'une coupe histologique (HE).....	(32)

Figure.25 Schéma représentant le principe de la technique d'immunohistochimie.....	(34)
Figure.26 l'Etuve.....	(34)
Figure.27 Déparaffinage et déshydratation	(35)
Figure.28 Les anticorps utilisés.....	(36)
Figure.29 Incubation de l'anticorps Ki67 et P16 dans une chambre humide.....	(36)
Figure. 30 Préparation du DAB.....	(37)
Figure.31 Coloration par l'hématoxyline de Mayer.....	(37)
Figure.34 Lame d'immunohistochimie.....	(38)

Liste des tableaux

Tableau 1 Rôles des protéines de la région E des virus HPV selon (IARC)...	(5)
Tableau 2 classification des CIN de Bethesda modifiée en 2001.....	(16)
Tableau 3, 4 et 5 Appareillages et équipement.....	(26)
Tableau 6 Représentant l'Ac I utilisés dans l'étude IHC.....	(36)

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN:	Acide desoxyribonucleique
AGC :	Atypie glandulaire de signification indeterminee
ANAES :	Agence Nationale d'Accreditation et d'Evaluation en Sante
ASCUS :	Atypie malpighienne de signification indeterminee
CSHPF	Conseil superieur d'hygiene publique de France
CDK:	Cyclin dependant kinase
CIN:	Cervical intraepithelial neoplasia
CIN1:	Cervical intraepithelial neoplasia 1
CIN2:	Cervical intraepithelial neoplasia 2
CIN2+ :	Lésion supérieure ou égale a CIN2
CIN3:	Cervical intra-épithélial neoplasia 3
E2F:	Facteur de transcription
E :	Early (gène précoce)
FCU:	Frottis cervico uterin
HIV:	Human immunodeficiency virus
HPV- :	Absence de virus HPV
HPV+:	Presence de virus HPV
HR-HPV:	High risk human papillomavirus
HSIL:	High grade squamous intraepithelial lesion
IR-HPV:	Intermediate risk human papillomavirus
IVS:	Institut de veille sanitaire
L:	Late (region Tardif)
LAST:	Lower anogenital s terminology

LR-HPV: Low risk human papillomavirus

OMS : Organisation mondiale de la sante

P53 : Protéine gardien du génome, Protéine cellulaire de 53,000 daltons

pRb: Protéine du gène du retinoblastome

Introduction

Le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde avec près de 500 000 nouveaux cas estimés en 2005 et plus de 528 000 en 2012 (**Yani, 2010**). Il a provoqué en 2005 près 260 000 décès et plus de 266 000 en 2012 dont près de 95 % dans les pays en développement, pays dans lesquels ce cancer est la première cause de mortalité par cancer dans la population féminine [(**IVS, 2008**), (**OMS, 2013**)]. En Algérie, cette maladie occupe la 3ème place des cancers qui touchent la gente féminine, après le cancer du sein (**Registre du cancer 2012, Alger**). C'est un cancer qui bénéficie d'un dépistage par des frottis cervicaux vaginaux (FCV).

Le rôle du papillomavirus (HPV) dans le cancer cervical et ses précurseurs est parfaitement établi. Les HPV oncogènes incriminés en Algérie d'après l'étude de **Fritih** sont l'HPV16 et 18. La transmission est par voie sexuelle (**Fritih et al., 2010**).

L'infection est initiée par la pénétration du virus au niveau des cellules basales cervicales de la jonction squamo-cylindrique et c'est le portage viral persistant qui représente un facteur de risque de progression lésionnelle (**M.E. McLaughlin-Drubin, K. Münger, 2009**). Les HPV oncogènes induisent une hyper expression des onco-protéines E7 qui rendent non fonctionnel le gène du rétinoblastome et induisent une hyper expression de la protéine inhibitrice de kinase cycline dépendante ou p16^{INK4a} (**Klaes et al., 2002**).

De même, les HPV oncogènes peuvent induire une hyper expression de deux classes de protéines, intervenant dans la régulation du cycle cellulaire, en particulier les familles Mini Chromosome Maintenance (MCM) ou de réparation des micro-chromosomes et topoisomérase-II-alpha.

L'immunohistochimie peut apporter actuellement une aide appréciable au diagnostic. L'utilisation de marqueurs complémentaires est utile pour permettre une bonne classification et améliorer la reproductibilité. Les marqueurs de prolifération cellulaire, en particulier le Ki-67 ou MIB-I, qui marque les noyaux des cellules en prolifération, permettent de différencier les lésions intra épithéliales des processus réactionnels ou dystrophiques [(**Kruse et al., 2002**) ,(**Baak et al., 2005**)].

La protéine du gène rétinoblastome (pRB), P16 qui est un marqueur du cycle cellulaire ; augmente la sensibilité du diagnostic des lésions de haut grade. D'ailleurs de nombreuses

publications ont démontré l'intérêt de ce marqueur dans la stratégie diagnostique des CIN. Ces deux tests sont généralement complémentaires.

Un troisième test le ProEx C est utilisé en cas de discordance entre ces deux marqueurs [(Kelly D, Kincaid E, Fansler Z, Rosenthal DL, 2006), (Shroyer KR, Homer P, Heinz D., 2006)].

L'objectif de notre travail est de démontrer la sensibilité et la spécificité du Ki67 et de la p16 dans le diagnostic et la classification des lésions intra-épithéliales cervicales.

LES PAPILOMAVIRUS HUMAINS

Les papillomavirus du latin papilla, signifiant bouton et du suffixe grec-ome désignant le caractère tumoral (**Baseman et Koutsky, 2005**), sont responsables de tumeurs bénignes et malignes chez l'homme et chez l'animal, et ont été à l'origine du premier modèle de tumeur liée à un virus à ADN découvert en 1920 chez le lapin (**Monsonogo, 1988**).

Les papillomavirus sont spécifiques de leur hôte et constituent une classe de virus ubiquitaires, résistants, très anciens, stables sur le plan génétique, et qui ont réussi à évoluer avec leurs hôtes respectifs. (**De Villiers et al., 2004**).

1. Structure des papillomavirus

Les papillomavirus sont des petits virus à ADN non enveloppés de 52 à 55 unités de diamètres. La capsid a une symétrie icosaédrique [(**Denis, 1999**) ; (**Monsonogo, 2007**)].

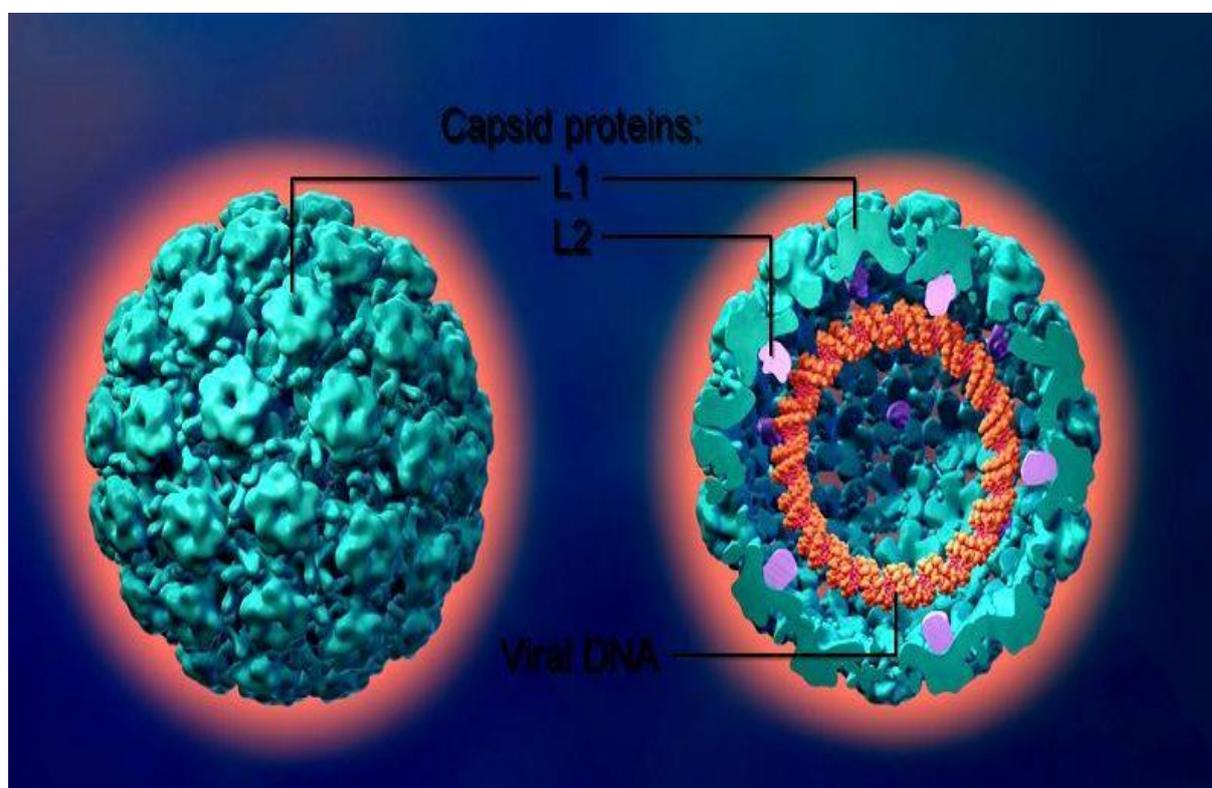


Figure .1. Structure de l'HPV (**Modis et al., 2008**)

2. Génome du HPV

Tous les HPV contiennent un ADN génomique circulaire, bi caténaire avec un seul brin codant, d'environ 8kb de taille, avec 8 à 10 phases ouvertes de lectures (POL) ou Open Reading Fragment (ORF).

La transcription des POL se fait d'une manière bi, tri ou même polycistronique sous le contrôle de deux promoteurs principaux (**Zheng et Baker, 2006**). IL existe deux régions l'une est codante, cette dernière ces séquences codant les protéines virales sont regroupées en POL dont le nombre varie en fonction de génotypes. Des POL codant pour des protéines précoce ou E (pour *Early*) et des protéines tardives ou L (pour *Late*) (**Pretet et al., 2007**).

✚ La région précoce E (Early) comporte sept POL exprimées en protéines non structurales E1, E2, E4, E5, E6, E7 et E8 dans laquelle située les protéines virales (**tableau 1**) (**Danos et al., 1982**).

✚ La région tardive L (Late) : comporte les POL des protéines de structure L1 et L2.

- **La protéine L1** : est la protéine majeure de la capside (80% de la capside) hautement conservée entre les papillomavirus (**Monsonogo, 2006**), nécessaire et suffisante à elle seule pour construire une capside synthétique identique à la capside naturelle (**Bishop et al., 2007**), par la formation des pseudo-particules virales (*Virus like-Particules* VLP).

Ces dernières présente une morphologie et des propriétés antigéniques similaires à celles des virions naïfs. Cette protéine a la propriété de se lier aux récepteurs cellulaires et porte les épitopes conformationnels responsables de l'induction des anticorps neutralisants spécifiques de type [(**Munoz, 2006**) ; (**Alain, 2010**)].

- **La protéine L2** : (protéine mineure de la capside) capable de lier l'ADN viral et de le positionner correctement au sein de la capside. En association avec la protéine L1, elle permet l'assemblage du virus et la stabilisation de la capside (**Monsonegi, 2006**).

La région non codante est appelée LCR (Long Control Region), elle comprend 400 à 1000 nucléotides selon les génotypes d'HPV et abrite les promoteurs des gènes précoces et des séquences de régulation et de la transcription de l'ADN viral [(**Denis, 1999**) ; (**Monsonogo, 2006**)].

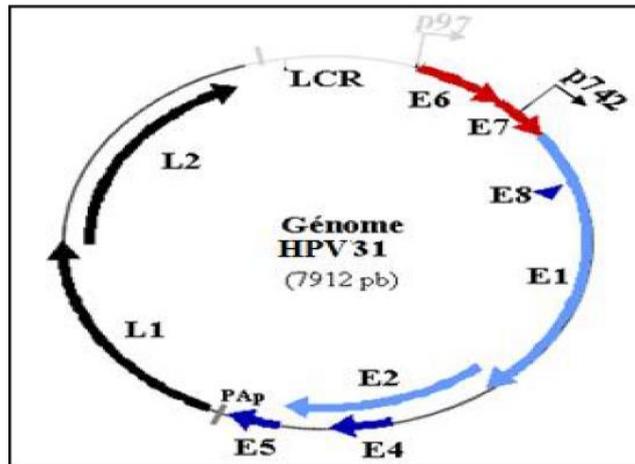


Figure .2. Structure génomique de l'HPV 31 (Fradet-Turcotte, 2011).

a. Mode de transmission

La transmission des HPV se fait souvent par :

- ✚ **contact direct** : à travers les excoriations de l'épiderme ou des muqueuses d'une personne à une autre (hétéro-inoculation) ou du sujet à lui-même (Mougin et al., 2006) . L'infection génitale à HPV est transmise par contact sexuel. (Monsonogo, 2006).
- ✚ **contacte indirecte** : par contact avec des objets et surfaces contaminés (piscines et douche favorisent la propagation des verrues plantaires) (Delloye et Gautier, 2006).

-Il existe au moment de l'accouchement des possibilités de transmission du HPV de la mère au nouveau-né. (Monsonogo, 1996).

b. Cycle de multiplication

Les cellules souches ou cellules basales de l'épithélium malpighien qui constituent le siège du renouvellement permanent de l'épithélium, sont les cibles des HPV. En effet, pour se répliquer, le virus a besoin de détourner la machinerie cellulaire de réplication de son hôte, afin de synthétiser son propre ADN viral. La réplication complète du virus ne peut donc se faire que dans les cellules épithéliales différenciées (CSHPF, 2007).

- .1. Entrée et décapsidation du virus. .2. Maintien du génome viral.
- .3.Prolifération cellulaire. .4. Amplification du génome viral. .5. Synthèse de la particule virale.

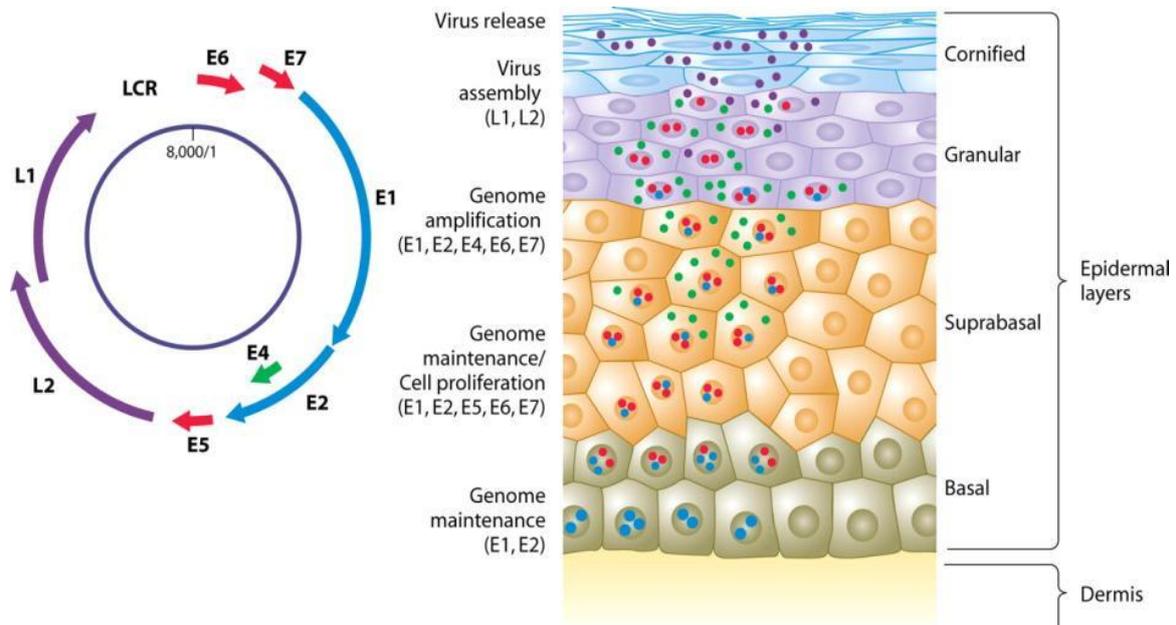


Figure .3 : Cycle productif du HPV (Fradet-Turcotte, 2011).

3. Intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire et carcinogénèse

Dans les infections produites par les HPV HR, il arrive parfois que le génome viral s'intègre au sein du génome de la cellule hôte. Cet événement semble être très important pour le processus de carcinogénèse (hebner et laimins, 2006). L'intégration et la rupture du gène E2 sont suivies par une augmentation du taux des onco-protéines E6 et E7, une diminution des protéines structurales (L1 et L2) et des protéines précoces (E4 et E5). L'abondance des protéines transformatrices (E6 et E7) provoquée par cet événement favorise la prolifération tumorale et le développement des tumeurs cancéreuses (Munoz et al., 2006).

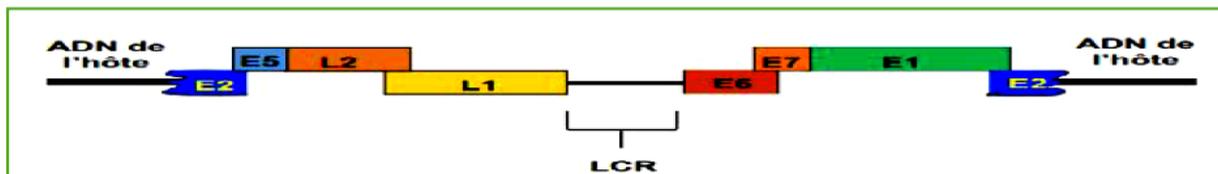


Figure .4: Intégration de l'ADN de l'HPV dans le genome hote (Isautier, 2012).

4. Les conséquences de l'intégration du génome viral du HPV

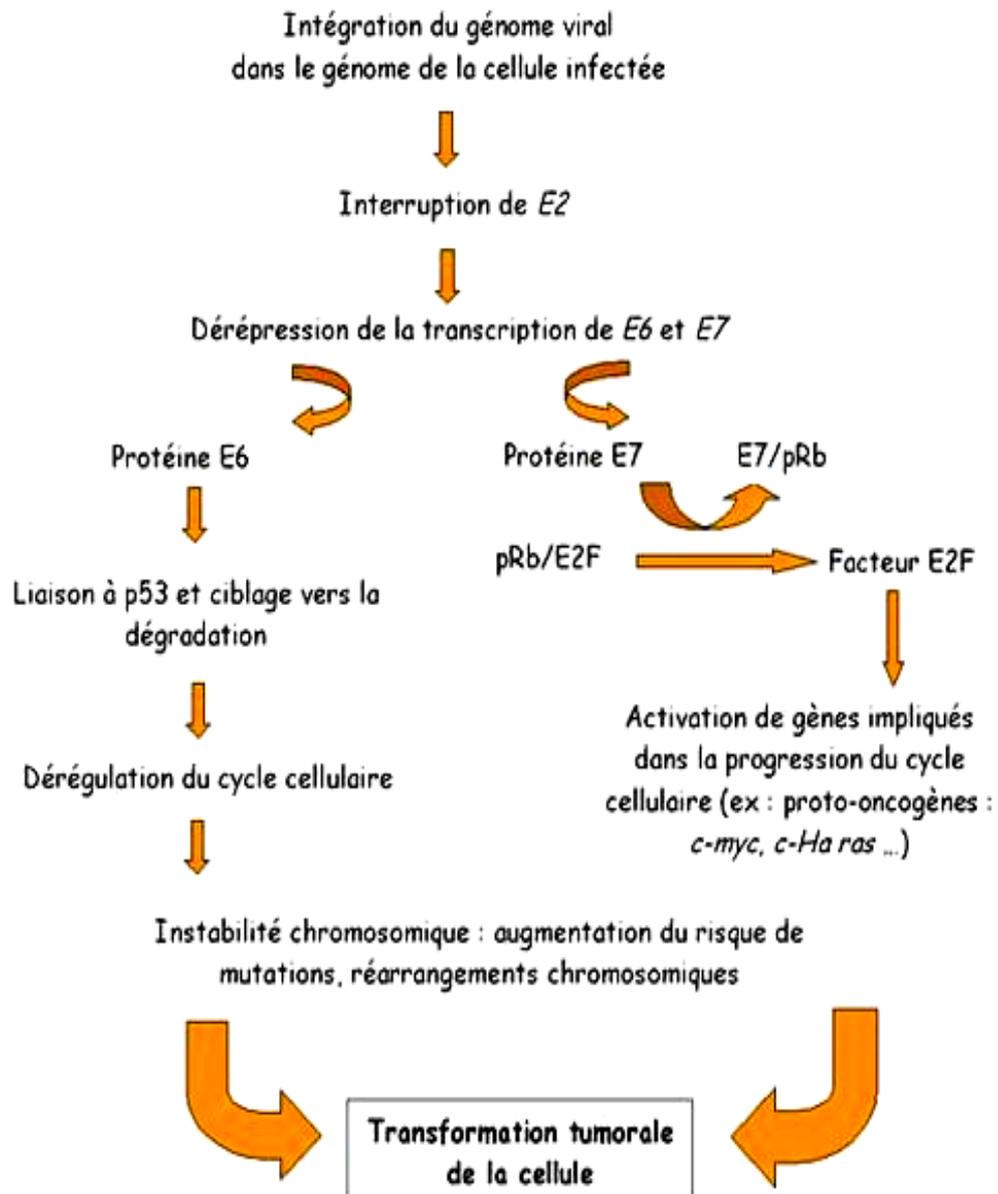


Figure .5. Mécanisme de la transformation de l'ADN de l'HPV dans le génome de la cellule hôte.

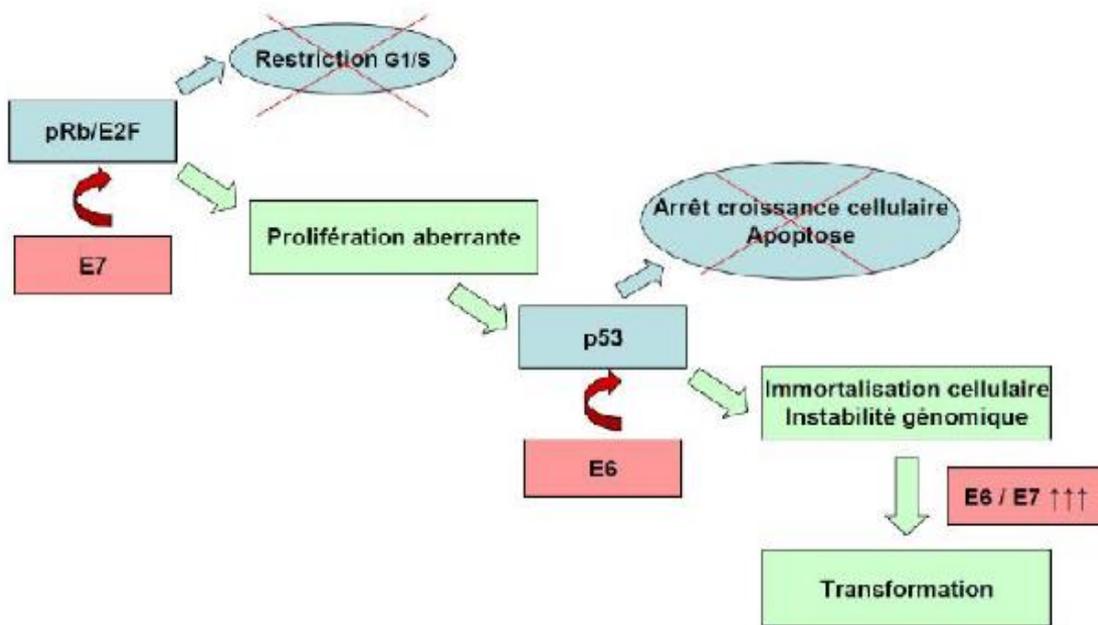


Figure.6. Schéma simplifié de la carcinogénèse induite par HR-HPV (Munger et al., 2004).

E6 se lie à P53 l'empêchant ainsi de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 et d'induire l'apoptose cellulaire en réponse à l'infection. La protéine E7, en interagissant avec la protéine suppresseur de tumeur pRb favorise la transcription de nombreux gènes cellulaires impliqués dans la replication de l'ADN et la progression de la cellule vers la phase S (Alain et al., 2010).

Les oncoprotéines E6 et E7 sont capables d'interférer également avec le système immunitaire en diminuant la réponse cytotoxique et la réponse à l'interféron (Yeni, 2010).

5. Immunité naturelle face aux HPV

L'hôte développe une réponse immunitaire naturelle spécifique face à une infection par un HPV soit :

La réponse humorale, impliquant les lymphocytes B. (la synthèse d'anticorps spécifique du type de papillomavirus dirigés contre les épitopes conformationnels portés par les protéines de capsid L1 et L2) (**Alain et al., 2010**).

La réponse immunitaire à médiation cellulaire, impliquant les lymphocytes T, cellules mémoires et cytotoxiques (**Hantz et al., 2008**). La régression des lésions étant associées à une réponse cytotoxique et T helper intense, dirigée contre les protéines E1, E2, E6, E7 et L2 (**Riethmuller et Seilles, 2000**).

Les réponses immunitaires et en particulier les réponses cellulaires T sont donc très importantes dans la régression de ces maladies viro-induites.

Ils s'agissent de lymphocytes TCD4+ et CD8+ avec une prédominance de lymphocytes T CD4+ dans l'épithélium de condylomes, de lymphocytes T CD8+ dans l'épithélium des CIN ainsi que dans la tumeur et le chorion des cancers invasifs. La fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8+ infiltrant a été montrée grâce à la mise en évidence de granzyme B et de TIA61 dans le cytoplasme de lymphocytes au cours de cancers invasifs. Par des tests de lyse, ainsi que par le marquage de ces lymphocytes par tétramères IILA-B8/peptide E7615 d'HPV16 (**Daneri et al., 2005**).

La fonction de T CD4+ *in situ* a également été caractérisé au cours de condylome : proliférations des lymphocytes T CD4+ vis à vis de L1 d'HPV 6 (**Hong et al., 2005**) de profil Th1 (synthèse d'IL-2, INF- γ et TFN- α) chez des patients traités par TFN- α et γ et répondeurs (**Arany et al., 1996**). Au cours des cancers invasifs, des synthèses de TFN- α et INF- γ ont également été observées (**Pikh et al., 2000**).

Des cytokines suppressives comme l'IL-10 et le TGF β sont augmentées *in situ* au cours des CIN de haut grade et au cours des cancers invasifs (**Giannini et al., 2002**).

LE CANCER DU COL DE L'UTERUS

Le cancer du col de l'utérus fait encore près d'un quart de million de victimes par an à l'échelle mondiale (OMS, 2013). C'est le troisième cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde avec près de 500 000 nouveaux cas estimés en 2005 (Yeni, 2010) et plus de 528 000 en 2012. Le cancer du col de l'utérus a provoqué en 2005 près de 260 000 décès et plus de 266 000 en 2012 dont près de 95 % dans les pays en développement, pays dans lesquels ce cancer est la première cause de mortalité par cancer dans la population féminine [(IVS, 2008), (OMS, 2013)].

1. Histologie du col utérin

Le col correspond à la portion basse de l'utérus. De forme cylindrique ou conique, il mesure de 3 à 4 cm de longueur, et 2,5 à 3,5 cm de diamètre. Ses dimensions et sa forme varient en fonction de l'âge de la femme, de sa parité et de son statut hormonal (Sankaranarayanan et al., 2004). Il constitue une barrière de protection de l'utérus contre les infections (INCa, 2011).

Le col utérin comporte de parties l'exocol et l'endocol ainsi une zone de jonction pavimento-cylindrique (JPC).

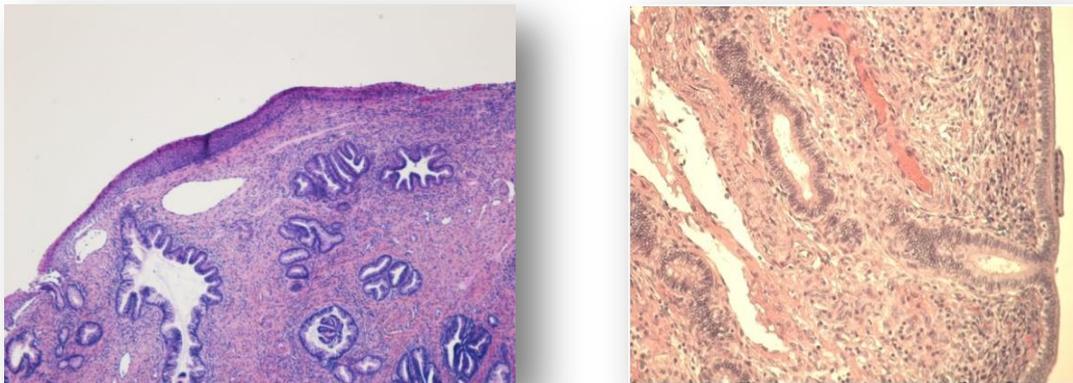


Figure. 7 Zone jonctionnelle, HE (Gx20).

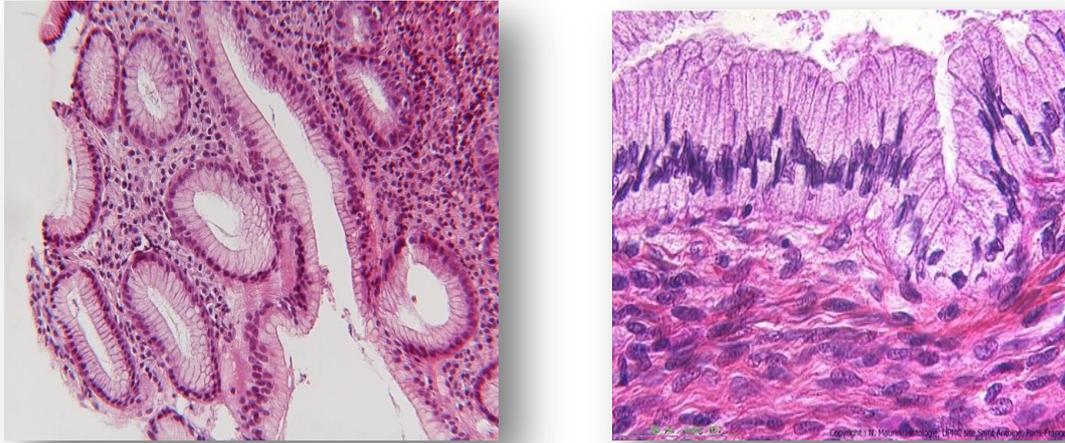


Figure. 8 Coupe histologique d'une jonction endocervicale

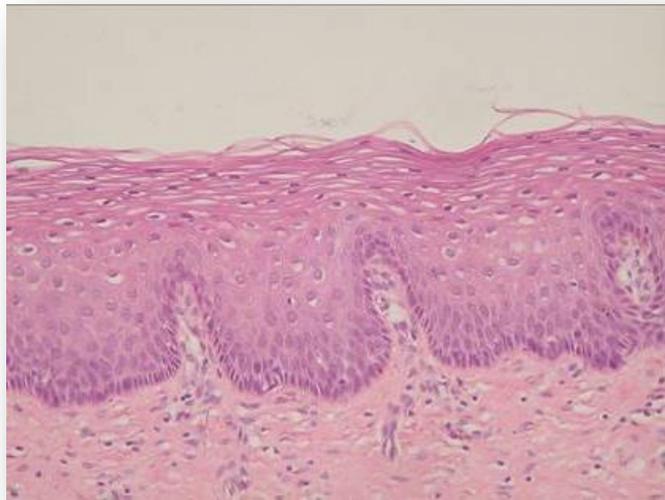


Figure. 9 Coupe histologique d'une jonction exo-cervicale

1.1 L'exocol : c'est la portion du col visible à la partie haute du vagin. Il est revêtu d'un épithélium malpighien ou pavimenteux stratifié non kératinisé (**Jhon et al., 2004**).

1.2 L'endocol : ou épithélium cylindrique endocervical est constitué d'une assise de cellules de forme cylindrique (**OMS, 2007**).

1.3 Jonction exo- endocervicale (squamo-cylindrique) ou zone de transformation

C'est le lieu de rencontre de l'épithélium malpighien et de l'épithélium cylindrique.

Cette zone de transformation a été décrite comme une zone de fragilité immunitaire (Mougin et al., 2006). C'est en général, dans cette zone que la plupart des cancers du col de l'utérus se déclenchent (OMS, 2007).

2. Relation entre cancer du col et infection à Papillomavirus humain

Le cancer du col utérin est, dans la majorité des cas, une affection tumorale d'origine infectieuse à évolution lente. Il met en moyenne entre 10 et 15 ans à se développer après une i -Il a été démontré que l'infection persistante ou chronique avec un ou plusieurs types d'HPV, dits à « haut risque » ou oncogènes, est la principale cause de développement d'un carcinome cellulaire épidermoïde (OMS, 2006). Infection génitale par certains Papillomavirus humains oncogènes (HAS, 2010).

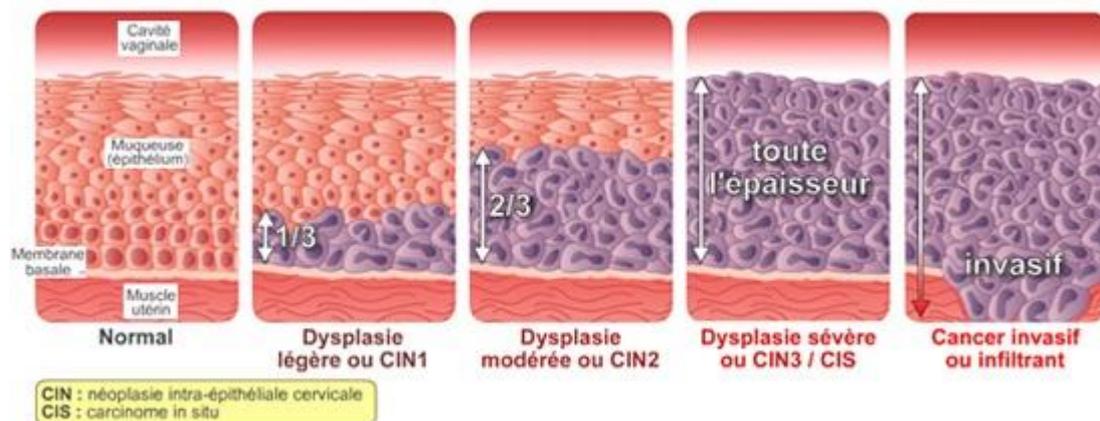


Figure. 10 L'évolution du cancer de col utérin.

3. Lésions cervicales précancéreuses

Le cancer du col utérin correspond à un carcinome épidermoïde (malpighien) dans 90 % des cas et un adénocarcinome dans 10 % des cas. C'est un cancer d'évolution lente qui est précédé par des lésions intra-épithéliales appelées néoplasies intra épithéliales cervicales (cervical intra epithelial neoplasia, CIN) (OMS, 2014).

L'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus comporte plusieurs lésions histologiques précancéreuses (les néoplasies cervicales intra-épithéliales ou CIN), faisant suite à la

persistance de l'infection génitale par un HPV à haut risque oncogène, dont certaines sont des stades facultatifs (CIN 1 et CIN 2) et d'autres des étapes nécessaires (CIN 3) à l'apparition d'un cancer invasif (**Monsonogo., 2006**).

Les CIN (néoplasies cervicales intra épithéliales) sont la traduction histologique des lésions cytologiques cervicales. La dysplasie ou CIN correspond à une transformation néoplasique de l'épithélium cervical, qui, par définition, reste cantonnée à celui-ci en respectant la membrane basale qui le sépare du chorion. Elle se traduit du point de vue morphologique par des anomalies architecturales et cytologiques :

- **Du point de vue architectural** : l'épithélium est caractérisé par une perte de la différenciation. Il est constitué de cellules jeunes, sans glycogène, avec des images de mitoses, parfois atypiques ;
- **Du point de vue cytologique** : les cellules ont des anomalies nucléaires et cytoplasmiques, visibles en histologie et décelées sur le frottis qui permet ainsi le dépistage.

Ces lésions se développent, à partir de la jonction squamo-cylindrique, suite à la persistance de l'infection a HPV dite à haut risque oncogène.

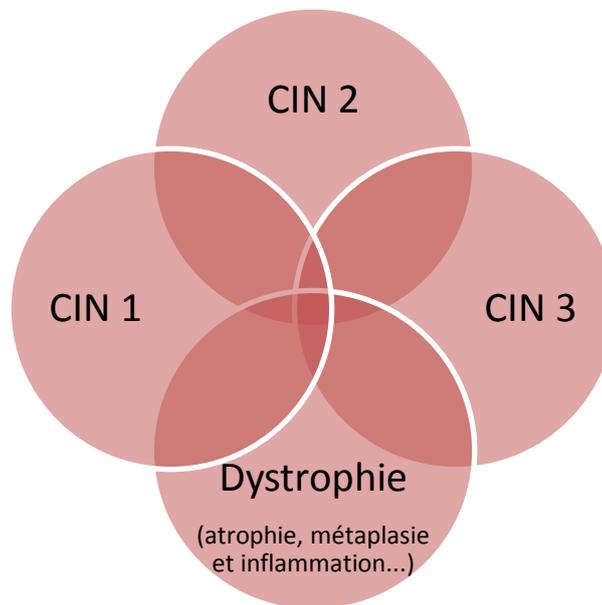


Figure .11 Chevauchements diagnostiques dans les CIN (**Clifford et al., 2003**).

Le CIN est divisé en trois grades CIN 1, 2 et 3. Le grade 1, 2 ou 3 est donné en fonction de la hauteur de la désorganisation de l'épithélium et de la présence d'atypies nucléaires et de figures de mitose anormales. La majorité des CIN 2 et 3 contiennent exclusivement des HPV à haut risque alors que les CIN 1 contiennent une hétérogénéité d'HPV avec des types à haut et à bas risque (**Clifford et al., 2003**). Ils sont caractérisés par un taux de régression important, surtout chez les femmes jeunes. Ceci explique pourquoi les termes de CIN de bas

CANCER DU COL DE L'UTERUS

grade correspondant aux CIN 1 et de haut grade incluant le CIN 2 et le CIN 3 ont été proposés pour dénommer les lésions histologiques du col utérin (Clifford et al., 2005).

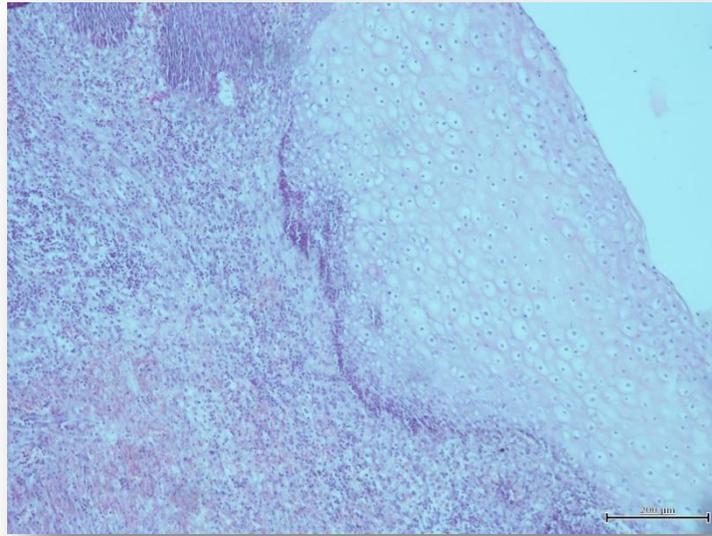


Figure .12 Coupe histologique du CIN II (Gx20)

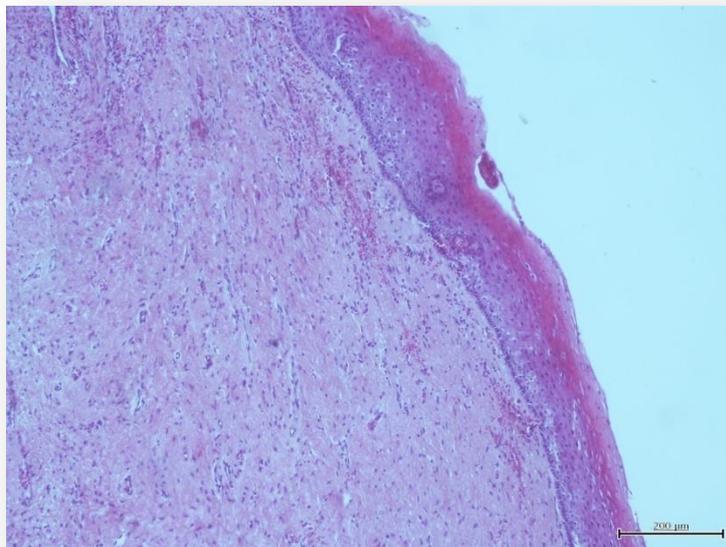


Figure .13 Coupe histologique du CIN I (Gx20)

❖ Classification cytologique des CIN

Les premières classifications étaient cytologiques, en fonction de la gravité de la dysplasie. La première classification fut celle de Papanicolaou en 1943 (**annexe1**). Elle a été longtemps utilisée, mais elle est relativement peu précise. Il y a eu ensuite la classification histologique de l'OMS en 1973 (**annexe 2**). Il y a eu une mise au point sur la nomenclature avec la naissance de la classification de Bethesda en 1988, révisée en 2001 (**tableau 2**). A côté, de la notion de dysplasie de haut grade et de bas grade, la classification de Bethesda introduit les lésions glandulaires et lésions malpighiennes de signification indéterminée. Elle est donc plus précise que la classification de Papanicolaou. Il s'agit de la classification cytologique la plus utilisée dans le monde.

4. Les facteurs carcinogènes

Le principal facteur de risque d'un cancer mortel du col utérin est le manque d'examen gynécologique et de frottis fréquents (**ESMO, 2012**). Par ailleurs, des facteurs sont importants dans le développement du cancer du col de l'utérus.

- ❖ **Facteurs viraux** : persistance de l'infection à HPV HR...
- ❖ **Facteurs exogènes** : (environnementaux) tabagisme, nutrition ...
- ❖ **Facteurs endogènes** : (propre à l'individu) les rapports sexuels non protégés ...

5. Frottis cervico-vaginal (FCV)

Examen cytologique, le FCV a un but essentiel : le dépistage des cancers du col utérin. Plus accessoirement il apportera des renseignements d'ordre hormonal et il peut également permettre de retrouver certains agents infectieux. Il est préférable qu'il soit pratiqué en début de cycle en dehors des règles et de tout épisode infectieux. Le FCV est un geste simple qui peut (devrait) être réalisé par tout médecin. L'exposition du col au spéculum va permettre de réaliser un frottis étagé à trois niveaux :

- Le prélèvement vaginal
- L'exocol le but est d'obtenir les cellules de la zone de jonction entre épithélium malpighien et glandulaire, lieu de naissance des dysplasies du col.
- L'endocol : on recueille les cellules glandulaires et le mucus endocervical.

6. Traitement

1. Prise en charge thérapeutique des dysplasies du col uterin

Comme nous l'avons développé précédemment, les lésions précancéreuses évoluent, sur un long période. Par conséquent, le traitement d'une CIN n'est pas une urgence. Il ne doit pas non plus être disproportionné, s'agissant de lésions qui, pour certaines d'entre elles ont un taux très important de régression spontanée.

La prise en charge des lésions de néoplasies intra-épithéliales ont été précisées par les recommandations de l'ANAES 2002.

Pour ce qui est des anomalies cytologiques, les possibilités de prise en charge sont développées ci-dessous.

Les frottis ASC-H correspondent dans 40 % des cas à des lésions de haut grade (CIN2, CIN3) et exceptionnellement a un cancer invasif ce qui justifie la réalisation d'une colposcopie avec contrôle histologique d'emblée.

Pour les frottis ASC-US, elles sous estiment la présence d'une lésion de haut grade dans seulement 5 a 10 % des cas, dans ce cas trois options sont possibles, soit la réalisation d'une colposcopie d'emblée, soit un contrôle par frottis 6 mois plus tard, soit une recherche d'HPV potentiellement oncogènes.

La gestion des frottis LSIL, offre quant a elle deux possibilités, la réalisation d'une colposcopie d'emblée, ou un contrôle par frottis 4 a 6 mois plus tard. La recherche d'HPV dans ce cas n'est pas recommandée.

Si l'intégralité des lésions cervicales, notamment vers le canal endocervical, n'est pas observée avec un examen colposcopique non satisfaisant, une conisation diagnostique s'impose.

Ainsi après confirmation histologique des lésions de néoplasies intra-épithéliales, le traitement est adapté au degré de sévérité lésionnelle.

Pour le traitement des lésions de bas grade (CIN1), deux options sont envisageables:

- une surveillance sans traitement si la lésion est bien vue et que la garantie d'un suivi régulier sur deux ans est obtenue, avec traitement destructeur en cas de persistance.
- réalisation d'un traitement destructeur de la lésion, la vaporisation de CO2 au laser étant la méthode la plus souvent employée, elle est efficace dans 95% des cas.

Alors que pour le traitement des lésions de haut grade (CIN 2/3) ; à ce jour aucune hésitation n'est permise. Ce sont selon l'ANANES, directement des lésions pré-invasives que l'on doit absolument détruire. Pour ce qui est du mode de traitement, un recours à la vaporisation au CO2 au laser est possible si la surface lésionnelle n'excède pas 2 cm², si la lésion est entièrement exocervicale et si la jonction squamo-cylindrique est bien vue en colposcopie (Pretorius RG., 2007).

2. Pronostique thérapeutique des dysplasies du col utérin

Le risque de récurrence après traitement de CIN est majeur dans les deux premières années, mais il persiste un risque de cancer du col supérieur à une population non traitée au-delà de 20 ans après le traitement. Il existe, par ailleurs peu de facteurs unanimement reconnus intervenant dans ce risque de récurrence. La difficulté réside dans la persistance d'anomalies cervicales.

Dans différentes publications, les résultats des traitements par exérèse sont à peu près les mêmes en termes d'efficacité quelque soit la technique utilisée, environ 90 à 95% de taux de succès et 5 à 10 % de récurrence [(Sigurdsson et al., 2007),(Martin-Hirsch et al.,2002)].

Les récurrences et persistance n'étaient pas clairement différenciées dans la littérature. Toute fois dans l'analyse des résultats les deux entités étaient souvent regroupées.

Sigurdsson et Martin-Hirsch notaient par ailleurs un taux de récurrence de CIN3 après conisation variant de 5 à 30% suivant la durée de suivi et qui ne dépendait pas de la technique utilisée.

L'hystérectomie ne protégeait pas plus du risque de récurrence après traitement d'une CIN de haut grade par rapport aux traitements conservateurs (Garcia et al., 2008).

LA PROTEINE P16^{INK4A} ET CIN

1. La protéine P16^{INK4a}

P16^{INK4a} est une protéine cellulaire impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et son expression est alors strictement contrôlée dans les cellules normales. Dans les cellules dysplasiques, la p16 est nettement surexprimée en raison, notamment, de l'activité transformant de E7 par inhibition de la protéine suppresseur de tumeur produit du gène du Rétinoblastome (pRb). Elle est aussi inhibitrice de cycline dépendent kinase (CKi), ralentissant ainsi le cycle cellulaire. Ces derniers CDK sont des activateurs du cycle cellulaire, permettant la progression de la phase G1 à la phase S. P16^{INK4a} est aussi appelée gène suppresseur de tumeur. Elle a été découverte en 1993 par Manuel Serran Gregory J Hannon et David Beach. Toutefois, si dans les cellules normales la p16 est exprimée à des taux faibles et généralement non détectables par les méthodes immunochimiques, elle peut également être transitoirement exprimée et détectée dans les cellules normales métaphasiques.

Elle est codée par le gène CDKN2A, Le locus *INK4a/ARF* humain, situé sur le chromosome 9 en 9p21 (**Krishnamurthy et al., 2006**).

Le locus *INK4a/ARF* humain, comporte deux gènes, *INK4a* et *ARF*, qui expriment respectivement les transcrits α et β : ces transcrits codent pour les protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF}, distinctes sur les plans structural et fonctionnel (**Sharpless, 1999**).

Ce gène est souvent muté dans plusieurs types de tumeur, entraînant une dérégulation du cycle cellulaire.

Lors d'une infection persistante par un papillomavirus à haut risque les onco-protéines virales E6 et E7 vont entraîner une dissociation du complexe (pRb/ E2F) (induisant la progression du cycle cellulaire) et une expression accrue de la protéine p16^{INK4a} (**Sébastien, 2012**).

Classiquement, l'augmentation de la protéine p16^{INK4a} dans la cellule entraîne une diminution de la prolifération des cellules souches. Cette réduction de la division et de la prolifération des cellules souches serait une protection contre le cancer, mais accélérerait la sénescence (**Krishnamurthy et al., 2006**).

Elle est aussi impliquée dans l'activité transcriptionnelle de la cellule à plusieurs titres :

- inhibition de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb),
- inhibition directe de NFκB (**Wolff B, Naumann M., 1999**)
- régulation de l'activité de Myc (**Haas et al., 1997**)
- inhibition de CDK7, démontrée *in vitro* (**Serizawa, 1998**).

Les conséquences d'une dérégulation de l'expression du gène *INK4a* peuvent donc être multiples, comme en témoignent la très fréquente association de sa délétion (**Nobori et al., 1994**) ou de son inactivation par méthylation (**Merlo et al., 1995**) avec les processus cancéreux, ou encore l'apoptose rapide provoquée par son hyper-expression [(**Sandig et al., 1997**), (**Ausserlechner et al., 2005**)].

L'utilisation de la p16^{INK4a} comme aide diagnostique s'est largement répandue en pathologie cervicale. De nombreuses publications ont parfaitement démontré l'intérêt de ce marqueur dans la stratégie diagnostique des CIN (**Sébastien, 2012**).

Donc l'intérêt de l'utilisation de marqueur p16^{INK4a} est : d'augmenter la sensibilité du diagnostic des lésions de haut grade (**Bergeron, 2008**).

Le marquage de la protéine p16^{INK4a} est présent au niveau des couches basales de l'épithélium malpighien dans les CIN1 et remonte dans les couches intermédiaires et superficielles dans les CIN de haut grade (CIN2 et CIN3) (**Pino et al., 2009**).

2. Régulation de p16^{INK4a} sénescence et oncogène

La protéine p14ARF, quant à elle, s'associe à MDM2 et régule le cycle cellulaire par stabilisation indirecte de p53, qui active le gène de p21^{CIP1}, un autre inhibiteur de CDK.

Les voies p16^{INK4a}/pRb et p14ARF/p53/p21 sont également impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN. Chez l'homme, en revanche, les données expérimentales suggèrent que le gène *INK4a*, plus que le gène *ARF*, serait un répresseur de tumeur majeur. Par ailleurs, dans un contexte de prédisposition familiale au mélanome, les fibroblastes diploïdes humains (FDH), qui présentent une délétion homozygote de 19 nucléotides dans l'exon 2 du locus *INK4a/ARF*, expriment une protéine p16^{INK4a}.

La régulation transcriptionnelle de l'expression de p16^{INK4a} constitue un pivot essentiel lors du vieillissement cellulaire et de la réponse à un stress, en particulier oncogénique. Cette régulation, complexe, implique des facteurs activateurs (protéines Ets1 et 2, protéine E47), dont la liaison sur le promoteur du gène *INK4a* peut être inhibée par les protéines Id-1 ou -4.

L'inhibition transcriptionnelle de p16^{INK4a} repose également sur le répresseur transcriptionnel Bmi1, ainsi que sur une régulation épi-génétique complexe, dont le

mécanisme est seulement partiellement connu : le promoteur et l'exon 1 de *INK4a* présentent tous deux un îlot CpG, qui peut être méthylé après qu'une méthylation de l'histone H3 et une désacétylation de l'histone H4 soient intervenues, tous ces événements participant à l'extinction du gène. L'inverse, le gène *INK4a* serait protégé de la méthylation de ses îlots CpG par l'hélicase A de l'ARN, et le remodelage chromatinien faisant intervenir le complexe SWI/SNF, antagoniste de Bmi1, activerait l'expression de *INK4a* (Serrano et al., 1993).

Si l'expression de $p16^{INK4a}$ ne varie pas au cours du cycle cellulaire (Hara et al., 1996), elle est augmentée dans certains cas d'inhibition fonctionnelle de pRb (Li et al., 1994), au cours de la sénescence répliquative (Hara et al., 1996) ou, encore, lors de l'activation de certaines voies oncogéniques induisant une sénescence prématurée (Serrano et al., 1997).

3. La carcinogenèse et physiopathologie

Les mutations du gène *CDKN2A* codant pour la $p16^{INK4a}$ sont associées à une augmentation du risque de différents types de cancer. Par exemple, l'adénocarcinome pancréatique est souvent associé à des mutations de ce gène. Des délétions homozygotes de ce gène sont souvent retrouvées dans les cancers gastriques et œsophagiens. (Krishnamurthy., 2008).

Des accumulations de méthylation au niveau de la zone promoteur du gène de la $p16^{INK4a}$ sont fréquemment retrouvées dans les cellules cancéreuses. Il s'agit de modifications épigénétiques qui aboutissent ainsi à une répression de l'activité de suppresseur de tumeur de la $p16^{INK4a}$, soit en bloquant directement la transcription du gène, soit en favorisant la présence de facteurs de transcription ayant une activité répressive sur le gène de la $p16^{INK4a}$. Ces modifications épi-génétiques entraînent donc une diminution de la concentration de la $p16^{INK4a}$ dans la cellule.

L'évolution de $p16^{INK4a}$ dans le processus de carcinogenèse associée à la présence du virus HPV n'est pas du tout identique à celle décrite plus haut. Rappelons que l'organisation génétique des HPV est caractérisée par la présence d'un seul brin codant avec 3 régions génomiques. La région E (early) code pour 7 ou 8 protéines non structurales qui vont interagir avec le système cellulaire et entraîner immortalisation et anomalies cellulaires.

Au niveau moléculaire, dans la cellule, pRb est habituellement liée à E2F qui bloque l'activation du cycle cellulaire par un mécanisme de phosphorylation. En phase de prolifération virale, E7 se lie à pRb ce qui entraîne le relargage d'E2F. La libération d'E2F induite par le lien entre E7 et le gène pRb aboutit à un important rétrocontrôle négatif sur la répression de la transcription du gène de la protéine $p16^{INK4a}$, ce qui entraîne donc une surexpression de $p16^{INK4a}$ qui s'accumule dans le cytoplasme et le noyau cellulaires.

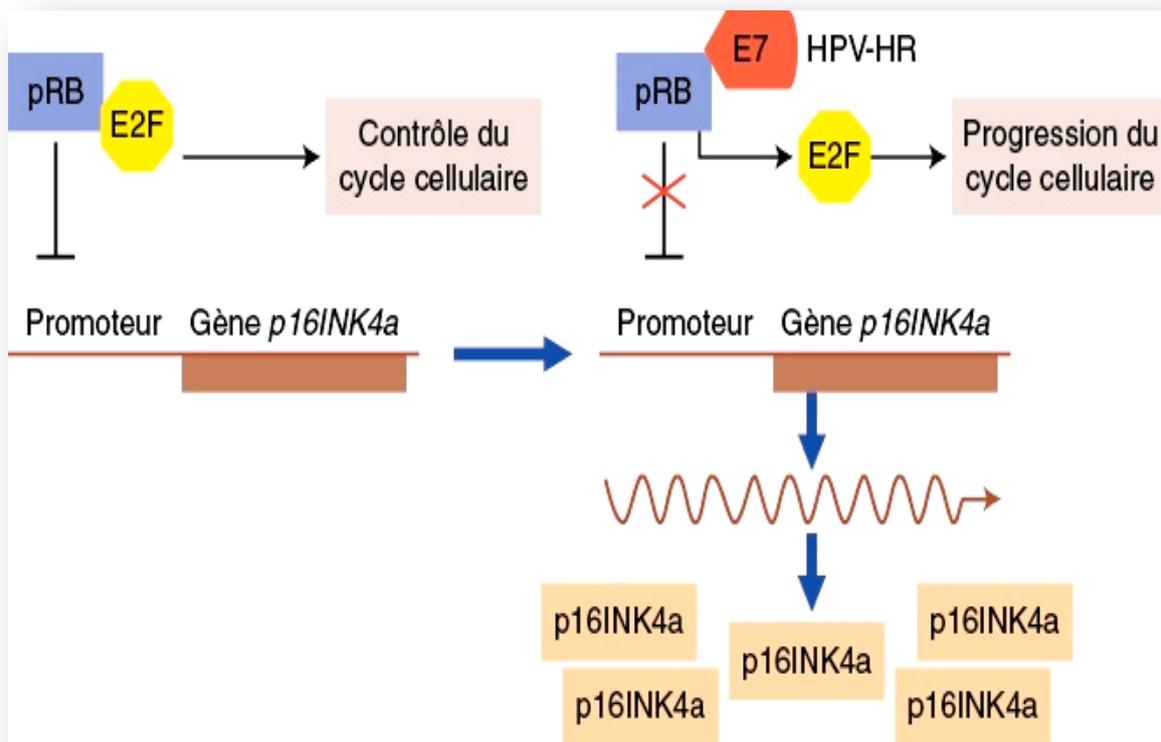


Figure.14 Mécanisme de la surexpression de la $p16^{INK4a}$ dans les cellules cervicales dysplasiques et cancéreuses, après infection par HR-HPV (Manger et al., 2004).

E2F favorise également la prolifération cellulaire anarchique. La surexpression de $p16^{INK4a}$ est donc dans ce cas un marqueur de l'infection transformant, c'est-à-dire un marqueur de l'activité de E7 et donc de l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte.

La surexpression de $p16^{INK4a}$ au cours de la phase d'infection transformant la rend intéressante pour l'affinement du diagnostic des CIN et notamment de CIN2. Elle est mise en évidence par des techniques d'immunohistochimie ou immunocytochimie. (Krishnamurthy., 2008).

4. Limite de l'utilisation de p16^{INK4a}

S'il est parfaitement établi que l'utilisation de la p16^{INK4a} augmente les performances diagnostiques, elle n'apporte pas, à elle seule, une aide au diagnostic dans ces situations diagnostiques difficiles.

Elle semble donc souhaitable de l'associer à un autre marqueur. Il est utile de signaler que l'expression de la p16^{INK4a} est une information qui peut être utile au clinicien. Dans les lésions des CIN, le risque de progression vers une lésion de haut grade est plus élevé en cas de surexpression de la p16^{INK4a}.

5. Intérêt de la p16^{INK4a} dans les CIN cervicales

Jusqu'en 2013, la détection de la protéine p16^{INK4a} ne fait pas partie des recommandations françaises pour la prise en charge diagnostique des CIN (**HAS, 2013**).

En cas de diagnostic différentiel entre une CIN1 et une CIN2, la p16^{INK4a} ne permettra donc pas toujours de trancher entre ces 2 hypothèses (**Sébastien, 2012**).

Bergeron à évoqué, dans une mise à jour des recommandations du CNGOF en 2009, La possibilité d'associer la détection de la p16^{INK4a} à l'analyse morphologique dans le dépistage du cancer du col. En l'associant à l'analyse histologique des pièces après coloration par hématoxyline et éosine (HE), elle permettrait d'améliorer la reproductibilité diagnostique de CIN2 et CIN3 (**Bergeron et al., 2010**).

Le KI-67

Le Ki-67 est une protéine nucléaire exprimée dans toutes les cellules en prolifération. Ce marqueur est constamment détectable tout au long du cycle cellulaire (seules les cellules en G0 ne sont marquées). L'anticorps Anti-Ki-67/clone MIB-1 (mais aussi SP6) est utilisé en routine.

1. Expression du Ki-67

Il est utile de rappeler qu'il s'agit d'un marquage nucléaire dont l'intensité peut être variable.

Dans un épithélium malpighien normal, le marquage est strictement limité aux cellules des assises basales.

Dans les lésions intra-épithéliales du col utérin, la prolifération des cellules malpighiennes étant anormale, des cellules en cycle, donc positives avec le Ki-67, vont être observées dans les assises parabasales.

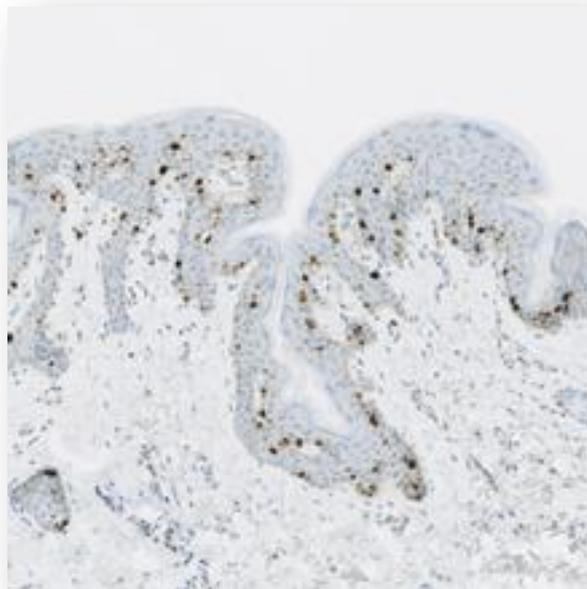


Figure .15 Image d'un marquage du Ki67 dans les CIN (**Consensus, 1998**).

Dans les lésions intra-épithéliales du col utérin, la prolifération des cellules malpighiennes étant anormale, des cellules en cycle, donc positives avec le Ki-67, vont être observées dans les assises parabasales +/- intermédiaires +/- superficielle selon la sévérité de la CIN.

2. Interprétation du marquage

Il n'y a pas de consensus dans l'interprétation de ce marquage. Les méthodes utilisées dans la littérature sont multiples.

Certains prennent en compte uniquement la hauteur de la positivité du marquage (positivité limitée au tiers inférieur du revêtement, positivité atteignant les 2 tiers du revêtement).

D'autres prennent uniquement le pourcentage de cellules lésionnelles positives, les seuils les plus communément admis étant : moins de 25%, 25 à 50 % et plus de 50%.

Il semble utile de tenir compte de ces 2 paramètres pour interpréter le marquage.

Une positivité anormale traduit simplement un renouvellement cellulaire accru et n'est en aucun cas spécifique d'une lésion néoplasique. Une expression accrue est certes observée dans les CIN mais également dans les lésions réactionnelles comme certaines métaplasies jonctionnelles ou en cas de cervicité.

L'expression du Ki-67 est d'autant plus importante ((le pourcentage de cellules marquées et en localisation dans le revêtement) que les lésions de CIN sont sévères.

3. Limites du Ki-67

En cas de doute diagnostique sur une lésion du revêtement malpighien du col utérin, le Ki-67 ne doit donc pas être utile seul. L'utilisation couplée avec un ou plusieurs autres marqueurs est alors nécessaire.

Ce travail est composé de 2 parties :

- Réévaluation du degré de CIN, sur prélèvements biopsiques.
- Recherche de l'expression couplée de la P16 et du Ki67 par immunohistochimie.

Objectifs

- ✚ Notre objectif principal est de démontrer la sensibilité et la spécificité du Ki67 et de la p16 dans le diagnostic et la classification des lésions intra-épithéliales cervicales.
- ✚ Est de reclasser ces lésions de CIN en fonction du résultat de l'expression du Ki67 et de la P16.

1. Matériels et Méthodologie

Nous avons réalisé notre étude au laboratoire d'Anatomie et cytologie pathologiques, du Pr. W. OUAHIOUNE, au CHU -BLIDA- Frantz Fanon, durant une période de cinq (5) mois (de mars 2015 – au mois de juillet 2015).

- Matériel non biologique (annexes)
- **Population d'étude**

Notre travail est une étude rétrospective d'une série consécutive de 30 cas de patientes, dont le diagnostic de lésion intra-épithéliale cervicale a été porté, sur matériel biopsique. (D'octobre 2014 – à mars 2015).

- ✓ La première étape consistait à établir une fiche d'exploitation des données cliniques, et anatomo-pathologique des dossiers.
- ✓ La seconde étape consistait à une étude histologique, des cas sélectionnés à partir de blocs de paraffine, et réévaluer le degré de CIN.
- ✓ La dernière étape consistait à la recherche de l'expression du Ki67 et de la P16 en technique d'immunohistochimie.

Les prélèvements biopsiques ont été sélectionnés (en fonction des formes anatomo-cliniques, de l'état du bloc de paraffine et de la quantité du tissu tumoral nécessaire pour les techniques ultérieures) ont été retenus, et subdivisés ainsi en des groupes relativement homogènes en nombre :

- ✚ 1 patiente a un carcinome épidermoïde.
- ✚ 21 patientes ont une dysplasie légère (CIN I).
- ✚ 4 patientes ont une dysplasie modérée (CIN II).
- ✚ 4 patientes ont une lésion HPV sans/avec lésion de dysplasie.

1.1. Méthodologie

1.1.1. Prélèvements

- Ce sont des prélèvements biopsiques déjà fixés au formol par les gynécologues. Après une lecture macroscopique (comptage du nombre et mensurations). Ces prélèvements sont déposés dans des cassettes en plastique, ces dernières sont mises par la suite dans un bocal contenant du formol à 10%, avant de les mettre dans l'appareil à circulation.



Figure16. L'inclusion d'une biopsie

- Le but de la fixation est d'obtenir une immobilisation des constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant tout en assurant d'abord sa conservation et la possibilité d'effectuer des opérations ultérieures de la technique histologique. Le fixateur histologique utilisé est le formaldéhyde à 10% ; qui se combine avec des molécules protéiques formant ainsi des édifices macromoléculaires insolubles dans les solutions utilisées au cours de la technique.

1.1.2. Examen histologique standard HE :

○ Circulation

- **But :** absorption de l'eau existante dans les tissus ; cette dernière sera remplacée par la paraffine qui donnera au tissu un support interne et le rendra solide.
- **Principe :** la circulation comprend trois étapes : la déshydratation, la clarification ou éclaircissement et l'imprégnation.



Figure17. Circulateur automatique

▪ **Modes opératoire :**

- La déshydratation

Elle consiste à chasser l'eau des tissus et de préparer ainsi le remplacement par des produits hydrophobes. Elle est assurée par les passages successifs dans des bains d'alcool à concentration croissante (durant 10 heures).

- L'éclaircissement

Etape assurée par l'immersion dans 2 bacs de xylène. Cela consiste à enlever l'alcool utilisé dans la déshydratation et par conséquent préparer le tissu à l'imprégnation.

- L'imprégnation

Elle se fait à l'aide de la paraffine liquide (point de fusion 56°C). L'eau des tissus est ainsi remplacée par la paraffine liquide et ceci afin de pouvoir confectionner des coupes fines (2 à 5 microns)

○ **Inclusion ou confection des blocs**

- **But :** maintenir les structures afin de leur donner une consistance qui empêche la fragmentation des tissus lors de la coupe et qui permettra l'obtention des sections très fines, régulières et homogènes.
- **Principe :** le fragment tissulaire est mis en bloc utilisant la paraffine.
- **Mode opératoire :** dans cette partie nous utilisons un appareil appelé « Groupe thermoélectrique » GTE constitué de trois parties :

- La première partie est chaude et contient de la paraffine en forme liquide. En dessous de cette dernière se trouvent des petits moules et les cassettes plongées dans de la paraffine.
- La deuxième partie présente une température très élevée et possède un robinet de paraffine.
- La troisième partie est froide avec une température de -9 à -10°C pour refroidir et solidifier la paraffine.



Figure 18. Groupe thermoélectrique (Appareil d'inclusion)

- Les cassettes sont plongées dans de la paraffine qui est dans la première partie du GTE. Les échantillons sont par la suite mis dans les moules correspondant à leur taille.



Figure 19. Les différents moules d'inclusion

- Les moules sont posés sous le robinet de paraffine qui s'ouvre automatiquement.
- Une fois que le moule est rempli complètement, il est mis sur la partie froide afin de le solidifier. On obtient ainsi un bloc de paraffine avec le prélèvement au centre.



Figure 20. Bloc de paraffine

○ Microtomie



Figure 21. Microtome



Figure 22. Ruban de coupe sur le microtome

- **But :** la microtomie permet l'obtention d'une coupe du tissu dans un coupeau.
- **Principe :** Consiste à utiliser un microtome pour l'obtention de coupes fines de tissu. La qualité des coupes dépend en grande partie de la fixation et de la circulation du prélèvement.
- **Mode opératoire :** Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome (coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur).

○ Étalement

- **But :** l'étalement sert à fixer la coupe sur la lame.
- **Principe :** consiste à coller les images sélectionnées sur la lame porte objet.
- **Mode opératoire :** les coupes réalisées sont étalées et fixées sur des lames de verre porte objet. Il faut éviter toute cassure ou tout pli.

○ Déparaffinage :

- **But :** éliminer la paraffine existante dans le ruban et à l'intérieur du tissu.
- **Principe :** consiste à faire fondre la paraffine sous l'effet de la température et l'éliminer par un solvant (le xylène).
- **Mode opératoire :**
 - les lames porte-objets sont placées dans un panier qui sera mis dans l'étuve (à 68°C pendant 20 min).
 - dès la sortie de l'étuve, le panier est introduit dans un bac de xylène (20 minutes) qui sert à éliminer la paraffine de la coupe.

○ Réhydratation :

- **But :** permettre la pénétration des colorants lors de la coloration.
- **Principe :** utilisation de degrés décroissants d'alcool suivie d'un rinçage à l'eau qui permet la réintroduction de cette dernière à l'intérieur de la coupe.
- **Mode opératoire :** les lames sont immergées dans des bacs d'alcool de degrés décroissants (100°C, 90°C, 70°C) puis dans l'eau distillée jusqu'au blanchissement.

○ Coloration :

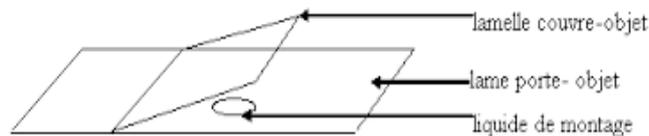
- **But :** la coloration accentue les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments morphologiques des tissus.
- **Principe :** la méthode « hématoxyline-éosine » associe un colorant basique nucléaire : hématoxyline de Harris qui colore le noyau en bleu et un colorant acide cytoplasmique : l'éosine colore le cytoplasme en rose.
- **Mode opératoire :**
 - le panier portant les lames est placé dans le bac pendant 3 à 4 minutes.
 - les lames sont rincées, par la suite, à l'eau courante pour éliminer l'excès de l'hématoxyline
 - Les lames sont passées rapidement dans le premier différentiateur : acide chlorhydrique qui assure l'élimination de l'hématoxyline existant hors du noyau et les prépare à la coloration suivante.
 - Rinçage à l'eau courante.
 - Passage rapide dans le deuxième différentiateur : l'ammoniac afin de bleuir le noyau.

- Rinçage à l'eau courante.
- Coloration à l'éosine pendant 3 à 4 minutes.
- Rinçage à l'eau courante.
- Passage rapide dans l'alcool absolu qui sert à déshydrater la coupe.
- Les lames sont par la suite essuyées et séchées.

○ Montage des lames :

- **But** : Assurer une protection contre la décoloration et la détérioration de la couleur causée par l'oxydation, en plus de protéger le tissu contre les multiples manipulations. Ceci permet d'améliorer la visualisation par le microscope.
- **Principe** : le montage consiste à recouvrir une coupe de tissu étalée sur une lame par une lamelle de verre. Ce montage est maintenu grâce à un produit adhésif.

**Figure23. schéma
représentant le principe
de montage des lames**



- **Mode opératoire** :le Recouvrement de la préparation par une lamelle protectrice en utilisant une «colle» qui est un baume ou résine de montage pour une conservation longue. Le produit généralement utilisé est l'Eukitt.



Figure 24. Lame d'une coupe histologique (HE)

○ **Lecture sur microscope**

Les « préparations microscopiques » sont observées au microscope optique permettant d'élaborer le diagnostic, et de préciser le degré de CIN dans notre cas.

2. **Immunohistochimie :**

- **But :** l'immunohistochimie consiste à mettre en évidence divers antigènes (Ag) cellulaires ou extracellulaires grâce à des anticorps (Ac) spécifiquement dirigés contre eux sur des coupes de tissus fixés et incluses en paraffine. Les Ag recherchés peuvent être des Ag membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires, ou bien encore des protéines de la matrice extracellulaire.
- **Intérêt**
 - Détection spécifique de protéines sur un matériel cytologique ou sur des coupes tissulaires
 - Localisation avec quantification d'une protéine dans une cellule ou un tissu
- **Principe :**

La méthode utilisée est une méthode immunoenzymatique indirecte, utilisant un polymère couplé à la peroxydase.

L'immunohistochimie (immunomarquage indirect) consiste à faire réagir la lame portant le coupeau avec un anticorps purifié monoclonal dirigé contre la protéine d'intérêt puis par la suite avec un anticorps secondaire anti-fragment FC couplé à une molécule enzymatique qui est la peroxydase.

La Méthode immunoenzymatique avec amplification du signal par un polymère : l'anticorps primaire se fixe à l'antigène ; l'anticorps secondaire se fixe à l'anticorps primaire et est couplé à un polymère inerte qui porte plusieurs molécules d'anticorps secondaires et de peroxydase.

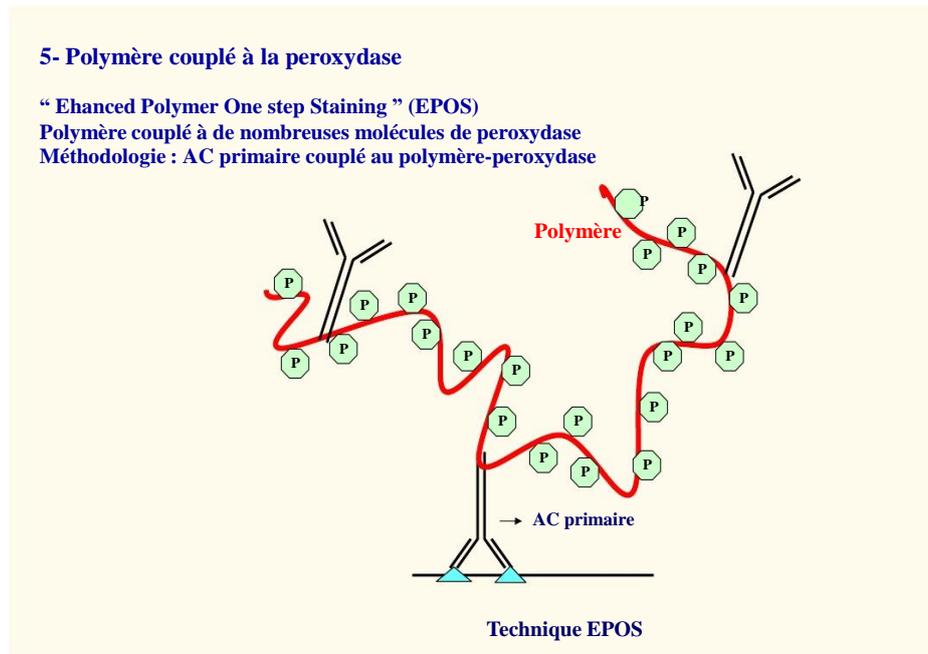


Figure 25. Schéma représentant le principe de la technique d'immunohistochimie

▪ **Mode opératoire :**

- **Réalisation de coupes :** elles sont obtenues à partir du bloc contenant la pièce opératoire. Leur épaisseur est de 3 à 4 microns et elles sont étalées sur des lames silanisées (le silane est fait à base d'acétone et d'alcool, et permet de mieux fixer le coupeau via des liaisons hydrophobes).
 - les lames sont mises dans l'étuve, réglée à 37°C, pendant une nuit.



Figure 26. Etuve

➤ Déparaffinage et Réhydratation :

Les lames passent d'abord dans les bacs de xylène après dans les bacs d'alcool de concentration décroissante (100°, 90°, 70° et 50° pendant 10, 10, 5 et 1 minutes pour chaque concentration). Puis rinçage à l'eau distillée (5min).



Figure 27. Déparaffinage et déshydratation

- **Démasquage des sites antigéniques :** C'est l'étape de restauration antigénique, par la chaleur
 - ✓ Placer les lames dans des boîtes en plastique bien remplies de solution de pH préalablement préparée (pH 7 (pour la P16) et pH9 (pour le Ki67) selon le type d'anticorps spécifique utilisé (les boîtes doivent être bien fermées).
 - ✓ Incubation dans un bain marie réglé à 97°C pendant 40 min (pour la P16) à 1 heure (pour le Ki67) au maximum.
- **Refroidissement des lames dans leur bac par l'eau de robinet pendant 20 min.**
 - ✓ Immersion des lames dans l'eau distillée (pour le Ki67) et solution de lavage (pour la P16) pendant 5 minutes.
- **Contournement du tissu à l'aide d'un stylo hydrophobe.**
- Addition de 100 µl de peroxydase endogène à la zone sélectionnée. La durée de cette étape est de 10 min.
 - ✓ Le lavage des lames par la solution de lavage 3fois pendant 5 min pour chacun.

➤ Incubation de l'Ac primaire :

-Nous avons utilisé, l'anticorps anti Ki67 (Clone SP6, cell marque) en concentré, dilué à 1/50 ainsi que l'anticorps anti Ki 67 (clone MM1, Novocastra) dilué à 1/200 et l'anticorps anti P16 (kit CINtec technology, prêt à l'emploi) (**tableau6**)

- La durée d'incubation est de 60 minutes pour les 2 anticorps anti Ki67 utilisés
- La durée d'incubation de P16 est de 30 min.
- Lavage des lames par la solution de lavage 3fois pendant 5min.



Figure 28. Les anticorps utilisés



Figure 29. Incubation de l'anticorps Ki67 et P16 dans une chambre humide

➤ Incubation du polymère (HRP) :

- Addition de l'Ac secondaire (pour la P16) commun à toutes les lames et laisser agir 30 minutes.
- Lavage avec la solution de lavage 3 fois 5 min pour chacun.
- HRP pendant 30 min (pour le Ki67).
- Lavage avec solution la de lavage 3 fois pendant 5 min pour chacun.

➤ Révélation :

- Se fait par le chromogène-substrat DAB.



Figure 30. Préparation du DAB

- Rinçage avec de l'eau distillé.

➤ Contre coloration :

- Immersion des lames pendant 2 à 5 minutes dans l'hématoxyline de Mayer



Figure 31. Coloration par l'hématoxyline de Mayer

- Rinçage a l'eau courante (5 minutes)

- Les lames passent dans les bacs d'alcool de concentration croissante (50° 70° 90° et 100° après dans le xylène pendant 3 minutes pour chacun).

➤ Montage :

Les lamelles sont déposées sur les lames à l'aide d'huile d'immersion.



Figure 17. Lame d'immunohistochimie

1. Données épidémiologiques

1.1. Répartition selon l'âge

L'âge de nos 30 patientes se situait entre 28 ans et 82 ans, avec une moyenne de 49,86 et une médiane de 51,5 ans. La tranche d'âge comprise entre 45-55 ans était la plus touchée (50%).

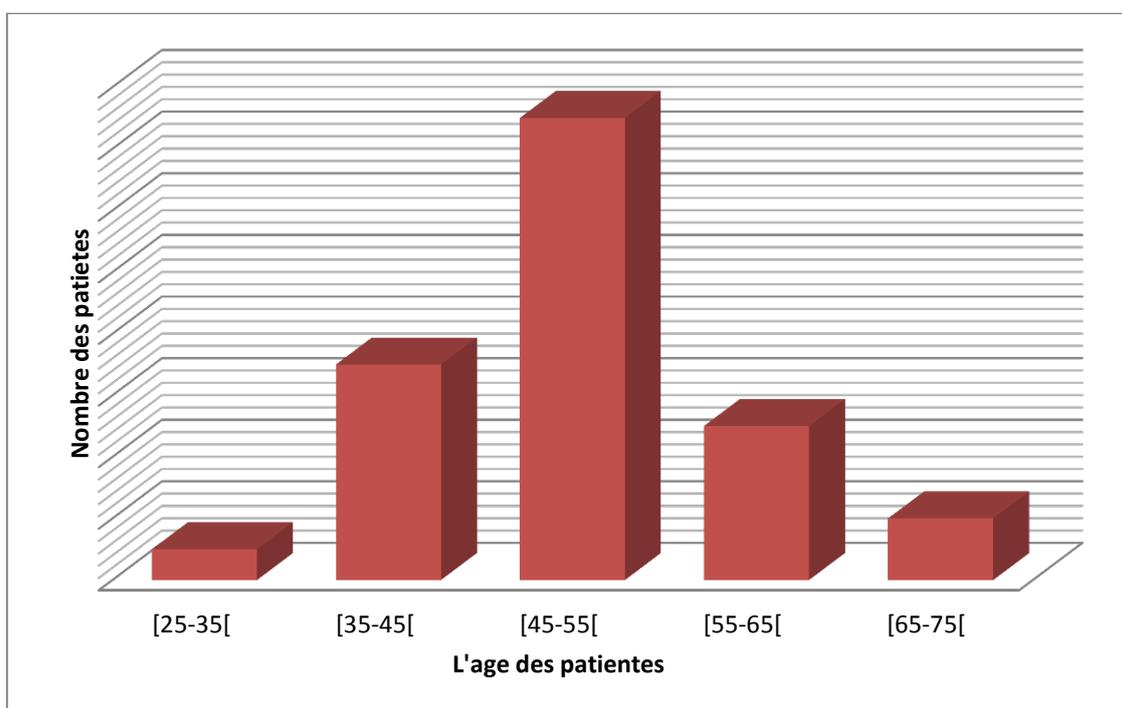


Figure .Répartition des cas selon l'âge

1.2. Frottis cervico-vaginal

Parmi les 30 patientes, 18 patientes (60%) ont bénéficié d'un examen gynécologique appel (frottis cervico vaginal) selon la fiche de renseignement. La réalisation systématique des FCV a permis de faire régresser la fréquence du cancer du col de l'utérus qui est le 4e cancer de la femme en France alors qu'il reste le premier dans les pays sous-développés qui n'ont pas mis en place de politique de dépistage.

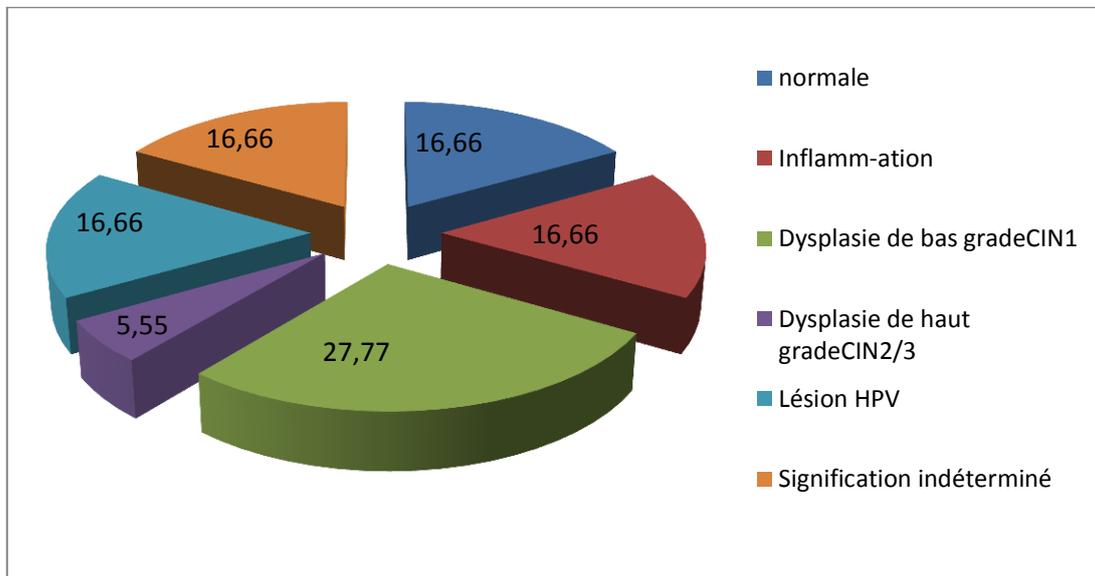


Figure : Répartition des cas ont bénéficiés d'un FCV

1.3. La répartition des cas selon le degré de CIN diagnostiqué initialement:

Parmi les 30 patientes, 21 ont une dysplasie légère, dysplasie de bas grade ou CIN1 et 4 malades ont une dysplasie modérée, sévère, de haut grade ou CIN2, 3 et 4 malades ont une lésion HPV et 1 malade à un carcinome épidermoïde.

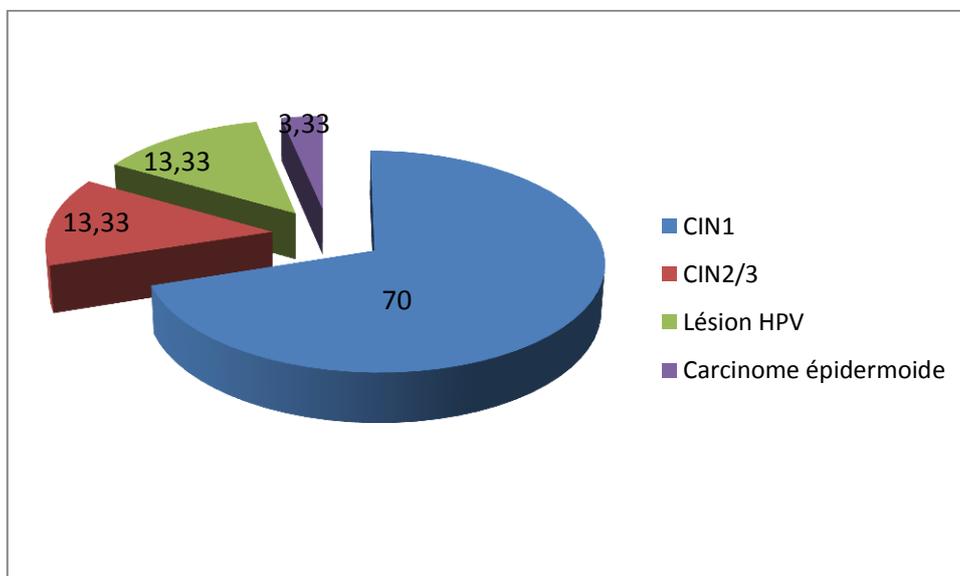


Figure : Répartition des cas selon le type de CIN

1.4. Comparaison entre la fiche d'exploitation et la coloration standards (HE) :

La comparaison était faite entre le résultat final déjà répondu sur les fiches avec les résultats d'HE qu'on a obtenu pendant notre recherche.

Il y a un reclassement dans 4 cas de CIN 1 et un reclassement dans les lésions HPV et carcinome.

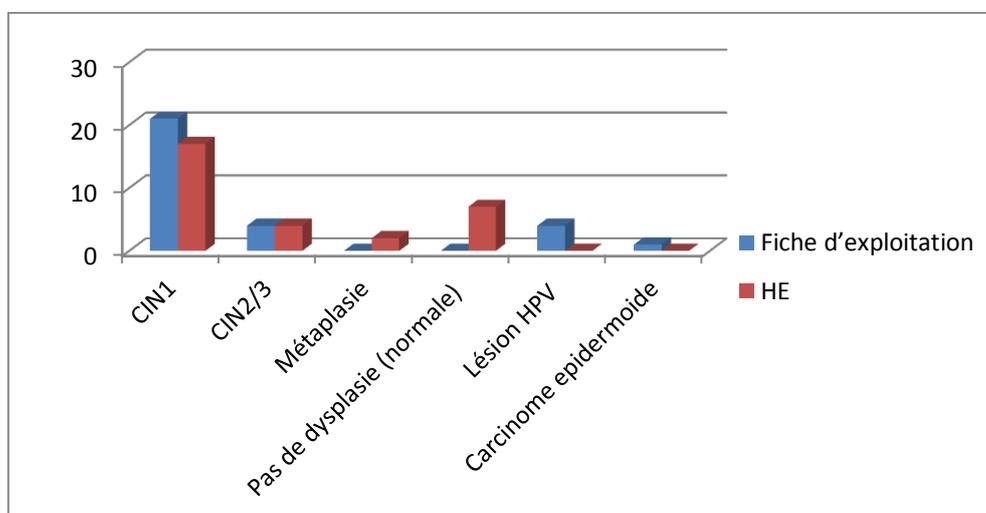


Figure. Répartition des cas selon l'HE et résultat de la fiche d'exploitation.

1.5. Comparaison des HE avec la P16^{INK4a}:

L'interprétation, sur des prélèvements histologiques du col utérin reste subjective et présente une faible reproductibilité, en particulier dans les CIN1, et entre CIN2 et

CIN 3

La détection de la protéine p16INK4a par immunohistochimie a permis une amélioration statistiquement significative de la justesse et de la reproductibilité du diagnostic de CIN2 et CIN3 par rapport à la coloration par l'hématoxyline éosine.

	CIN1	CIN2/3	Métaplasie	Pas de dysplasie (normale)	Lésion HPV	Carcinome épidermoïde
HE	17	4	2	7	0	0
P16^{INK4a}		+	-	-	/	/

Tableau 2. : Répartition de la positivité de la P16^{INK4a}

-les patientes qui ont écrits dans leurs fiches elles ont un CIN2/3 la coloration d'HE et la p16 a prouvé qu'elles ont le cancer du col par contre celle qui ont une métaplasie, une lésion HPV et un carcinome le marquage de la p16 était négatif cela veut dire qu'il n'y a pas de cancer.

- les cas de CIN dont le quel ou il y'a un reclassement parmi les 17 cas qui ont été marquer dans le HE quel sont des CIN1 la p16 a prouvé que 11 patientes ont un CIN 1 et les 6 autres ont pas de CIN1.

HE	CIN1	
P16 ^{INK4a}	Positifs	Négatifs
	11	6
(%)	64,70	35,30

Tableau 2.1 : Répartition de la positivité de la P16^{INK4a} dans CIN1

1.6. Comparaison entre Ki67 et la P16^{INK4a} :

L'utilisation de p16^{INK4a} et Ki-67 semble améliorer leur classification et leur reproductibilité

	Ki-67	P16 ^{INK4a}
Marquage dans la couche basale de l'épithélium	10	9 Négatifs
Marquage dans un tiers de l'épithélium	13	
Marquage dans 2 tiers de l'épithélium	1	1 Positif
Marquage dans la totalité de l'épithélium	6	6 positifs

Tableau 3. Comparaison selon le marquage entre Ki67 et la P16^{INK4a}

Marquage dans un tiers de l'épithélium malpighien		
P16	Positifs	Négatifs
	9	4
Pourcentage (%)	62,23	30,80

Tableau3.1. Comparaison selon le marquage entre Ki67 et la P16^{INK4a} dans un tiers de l'épithélium

1.7. Comparaison des résultats obtenus avec les résultats de la fiche d'exploitation

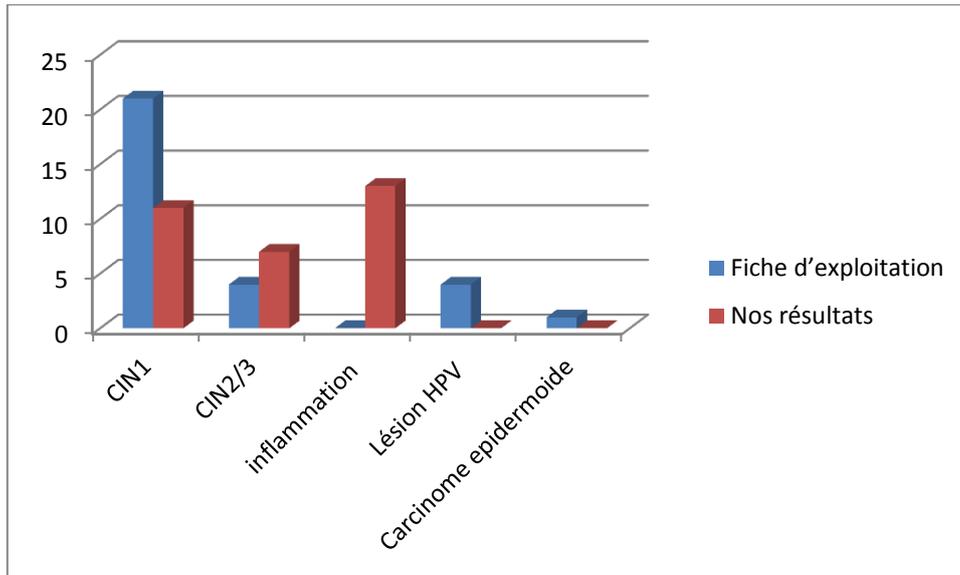


Figure. Réévaluation du degré de CIN

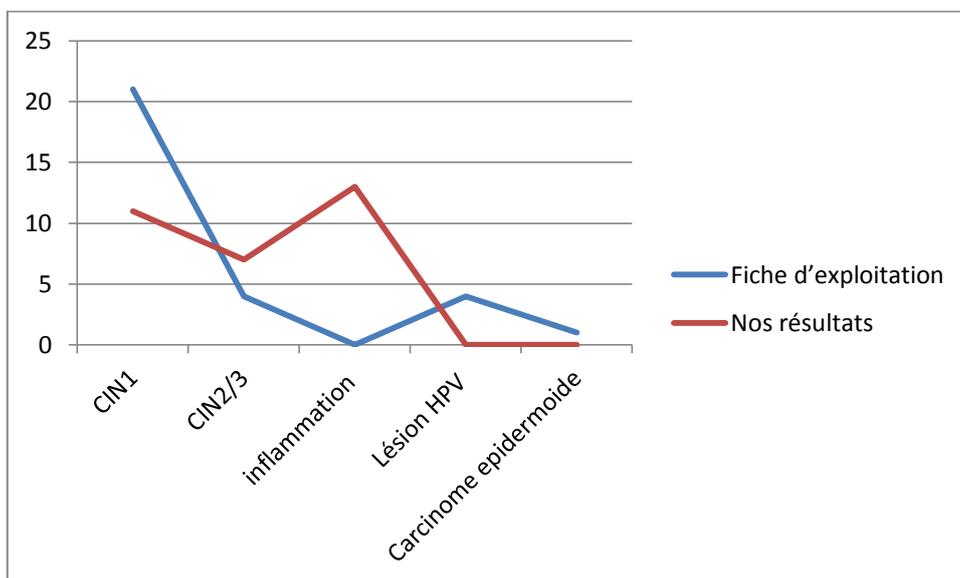


Figure. Comparaison entre le degré de CIN initial et l'expression de P16 et Ki6

2. Données d'anatomopathologiques

Toutes nos patientes avaient une confirmation histologique. 18 cas ont bénéficié d'un frottis cervico vaginal et 3 ont bénéficié d'un examen coloscopique confirmé après par l'étude histologique définitive de la pièce d'exérèse.

La dysplasie est une anomalie touche la muqueuse, elle se produit :

- Soit dans l'épithélium malpighien exocervical.
- Soit dans les zones de métaplasie épidermoïde endocervicales.

2.1.1. Histologie

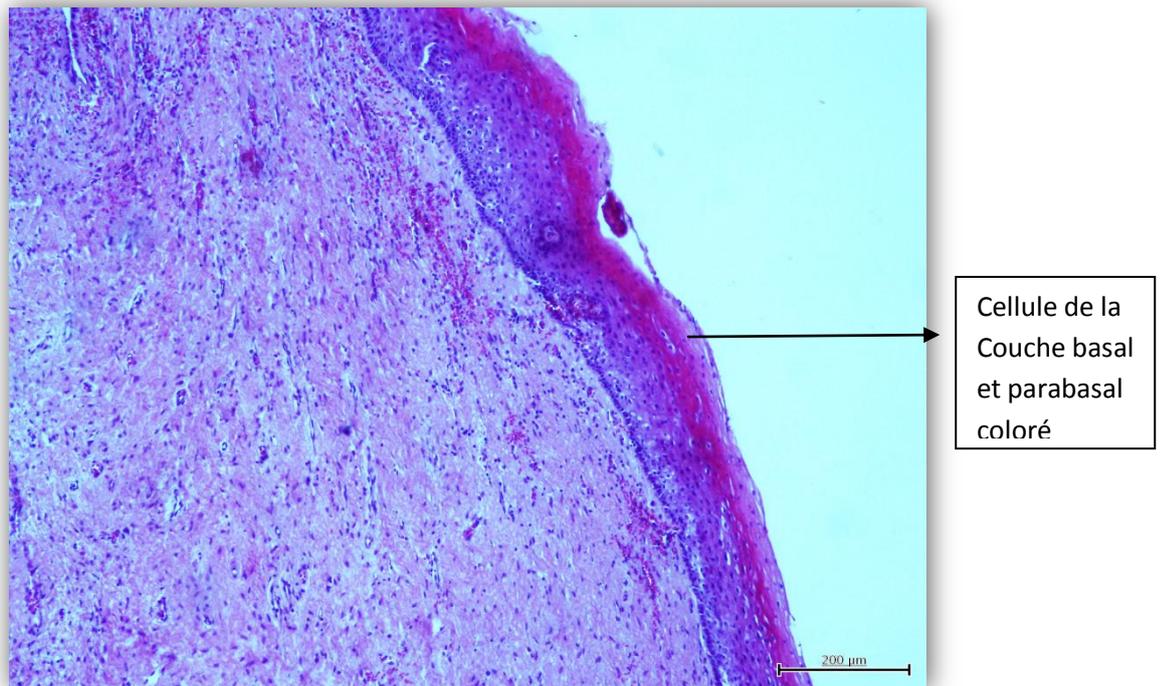
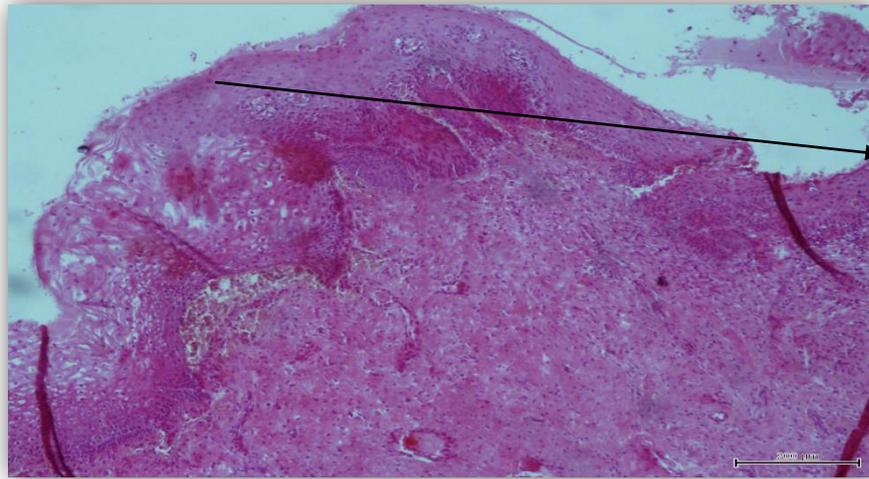
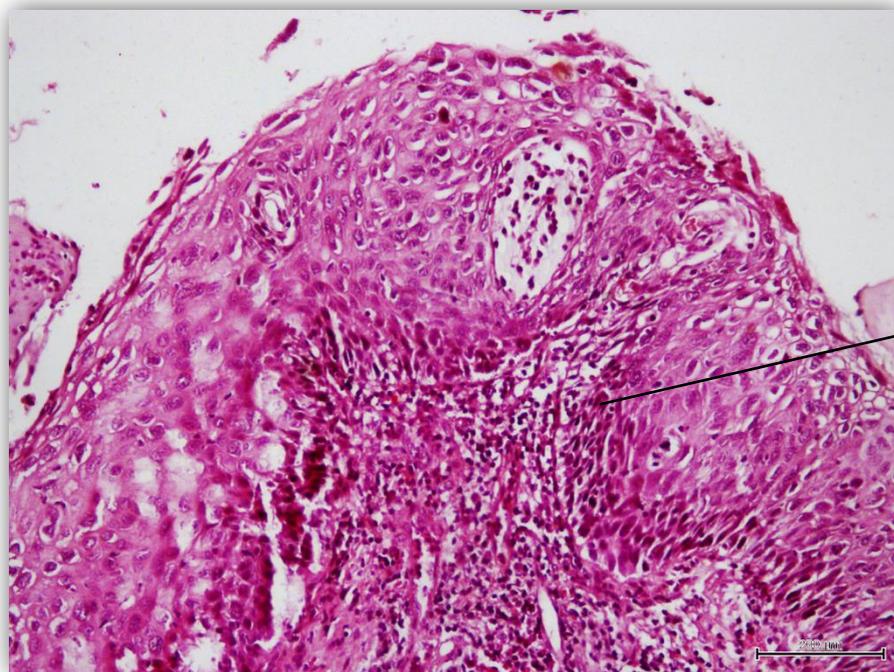


Figure. Coupe histologique obtenu par HE de CIN1 (Gx20)



2/3 inférieurs
des cellules de
l'épithélium
sont colorés

Figure. Coupe histologique obtenu par HE de CIN2 (HEx20)



La surface
de
l'épithélium
est colorée

Figure. Coupe histologique obtenu par HE de CIN3 (HEx20)

2.2. Etude immunohistochimique

2.2.1. La P16

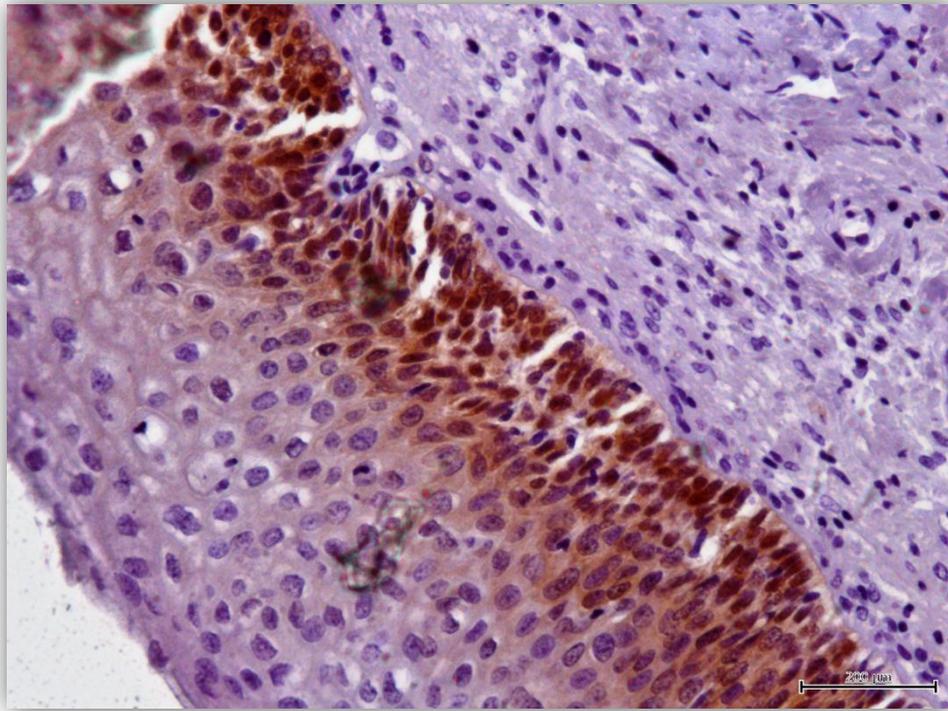


Figure. Coupe histologique obtenu par coloration de P16 : CIN1 (Gx40)

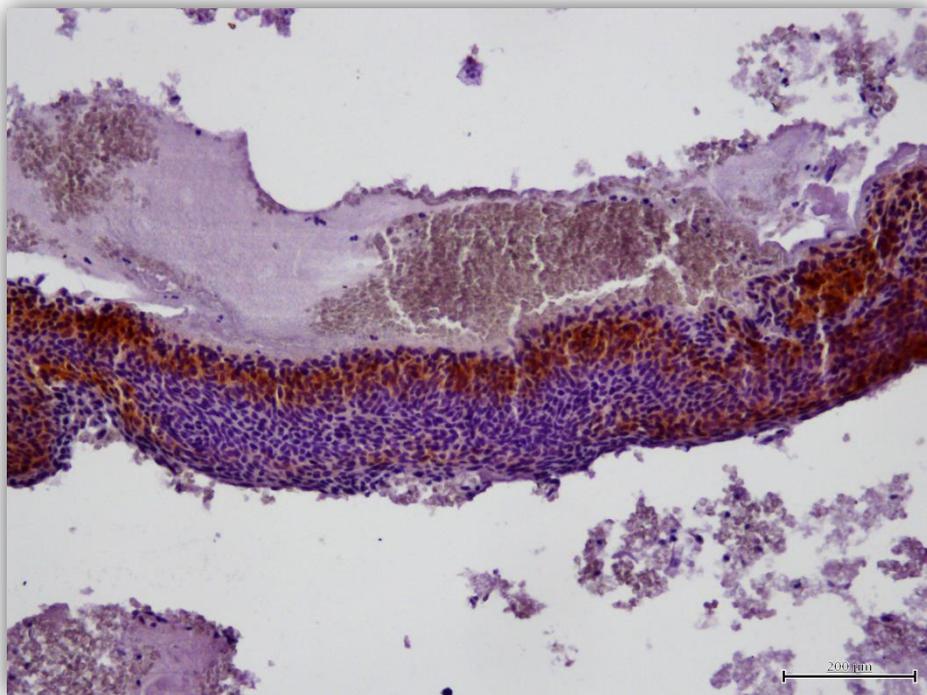


Figure. Coupe histologique obtenu par coloration de P16 CIN2 (Gx20)

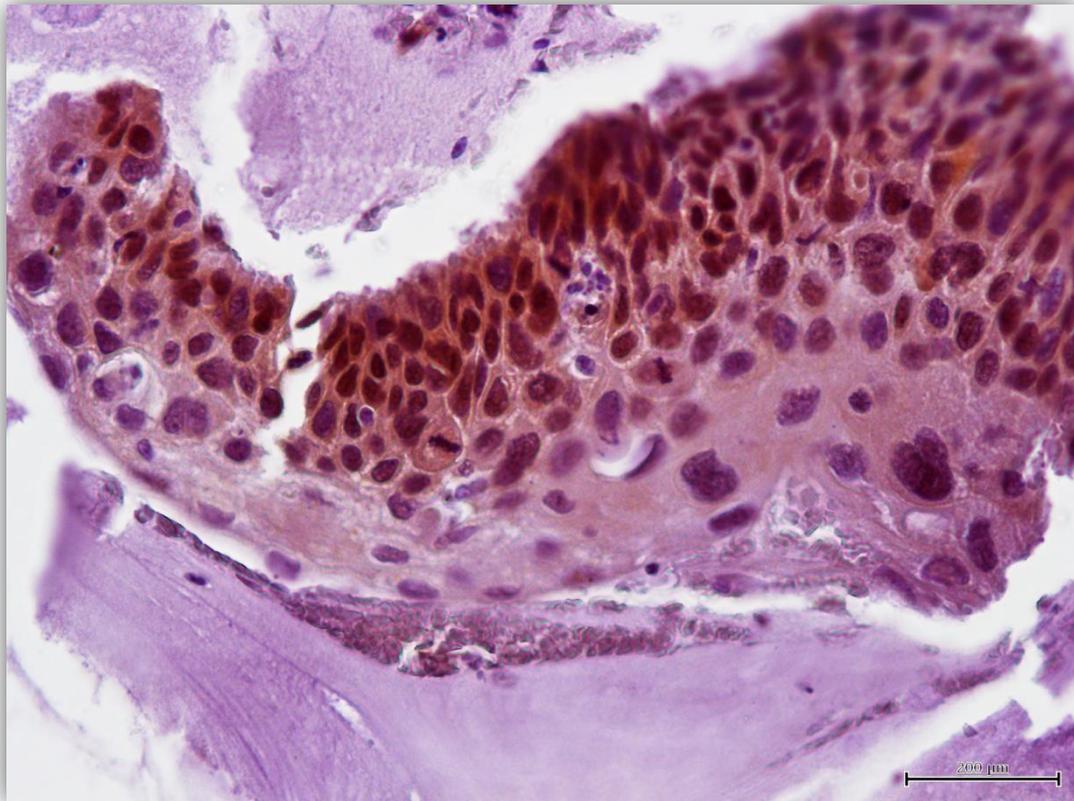


Figure. Coupe histologique obtenu par coloration de P16 : CIN3 (Gx40)

2.2.2. Le Ki-67

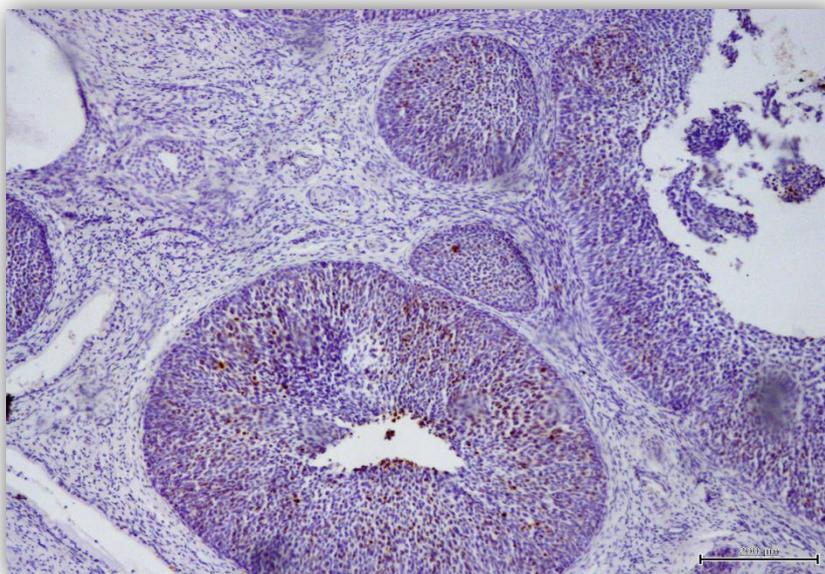


Figure. Coupe histologique obtenu par coloration de Ki-67 : carcinome epidermoide(Gx10)

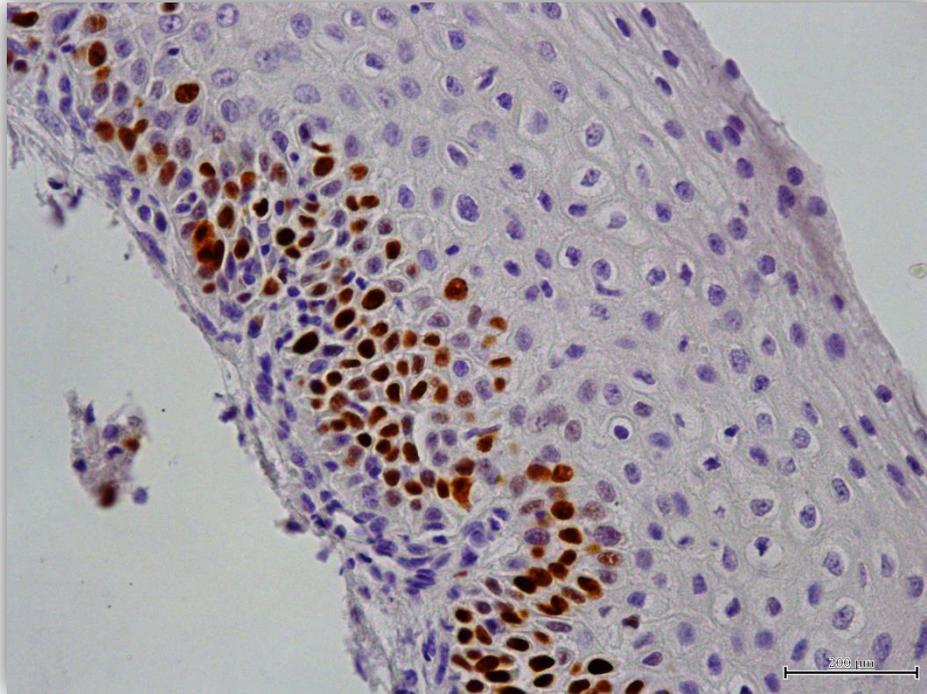


Figure. Coupe histologique obtenu par coloration de Ki-67 CIN1 (Gx40)

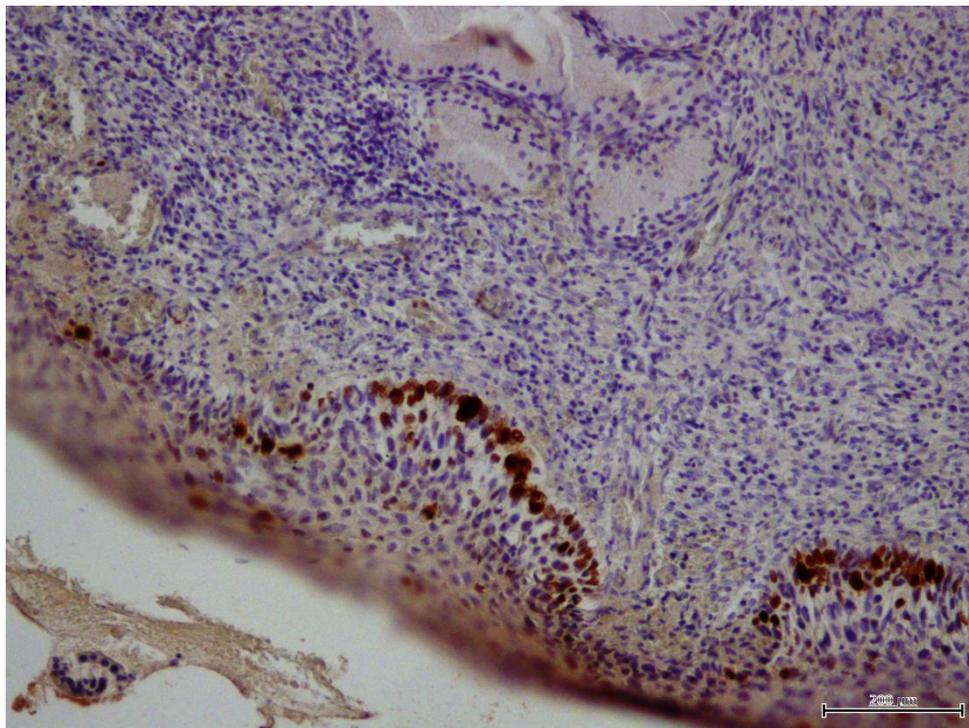


Figure. Coupe histologique obtenu par coloration de Ki-67 CIN2 (Gx20)

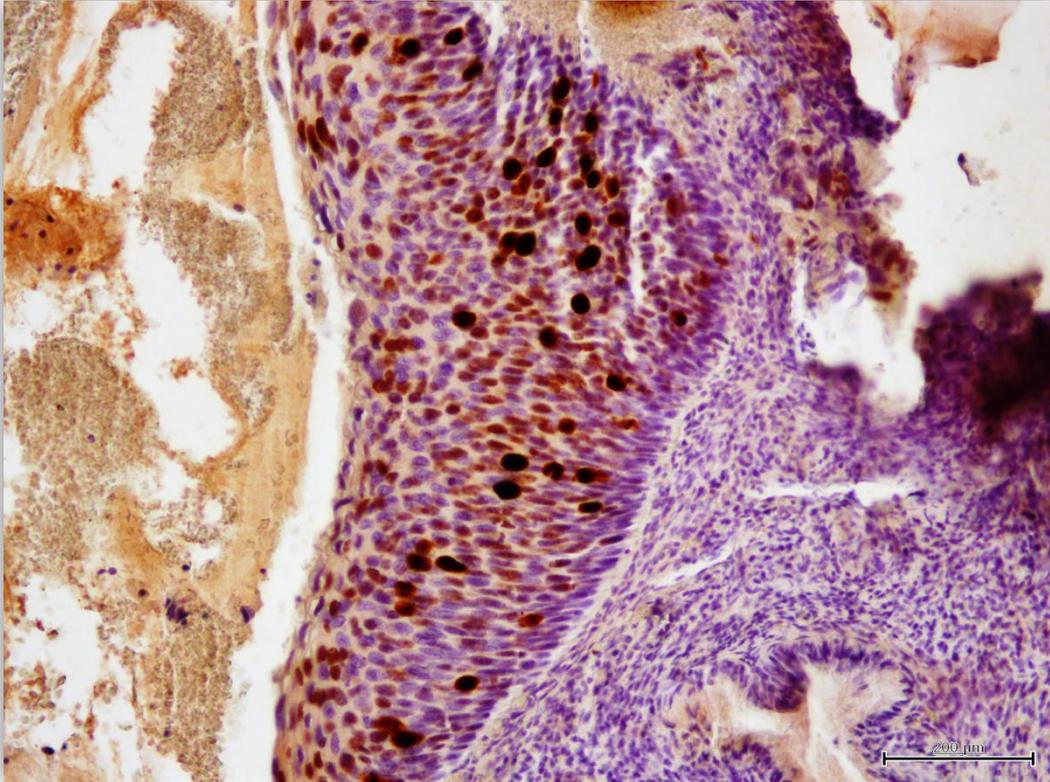


Fig. Coupe histologique obtenu par coloration de Ki-67 CIN3 (Gx20)

3. Le traitement des dysplasies

- par destruction :
 - donc nécessité d'une histologie précise avant destruction pour ne pas méconnaître une lésion invasive,
 - techniques : cryothérapie (lésions débutantes) ou laser +++,
 - échecs sous forme de récives : 6 à 8 % des cas.
- par exérèse :
 - permettant une histologie de la pièce opératoire (soit de la totalité des lésions),
 - techniques : conisation à la lame froide ou au laser, et électrorésection du col à l'anse diathermique,
 - jusqu'à 10 % d'échecs sous forme de récives.
- dans tous les cas surveillance post-opératoire par FCV à 6 mois puis 1 an.

Notre étude consiste en une réévaluation de 30 cas de néoplasies intra-épithéliales cervicales (CIN) ; ainsi que la recherche de l'expression de P16 et Ki67.

Cette étude a été menée, dans le service d'Anatomie et cytologie pathologiques, du Pr. W. OUAHIOUNE, au CHU -BLIDA- Frantz Fanon, sur une période de 1 an allant d'Octobre 2014 à Mars 2015.

Le cancer du col utérin est une tumeur maligne qui prend naissance, à partir de l'épithélium cervical. L'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus comporte plusieurs lésions histologiques précancéreuses (les néoplasies cervicales intra-épithéliales ou CIN), faisant suite à la persistance de l'infection génitale par un HPV à haut risque oncogène de l'utérus ; pouvant persister 10 à 15 années avant l'apparition du cancer.

La prise en charge adaptée des lésions précancéreuses du col doit permettre d'éviter (pour certaines d'entre elles) une évolution vers un cancer infiltrant. D'où l'importance du diagnostic initial de CIN, pour une meilleure prise en charge thérapeutique des patientes.

Cette tumeur est plus fréquente chez la femme, dans notre série la tranche d'âge est comprise entre 28 ans et 82 ans avec une moyenne de 49,86 et une médiane de 51,5 ans. La tranche d'âge comprise entre 45-55 ans était la plus touchée, 50% des cas.

Dans la littérature, ces données varient par exemple en France, l'âge moyen des patientes chez qui on diagnostique une CIN ne cesse de baisser : 35,5 ans selon **Boulanger** en 1989 contre 31,5 ans et 29,7 ans en 94 et 2004, respectivement (**Marchetta J., 2009**). L'âge moyen de notre série est légèrement supérieur à celui de ces séries. Ce résultat rejoint les données de la littérature (**OMS, 2013**).

Notre série d'étude regroupe 20(66,66%) patientes porteuses d'un CIN1, 5(16,66%) patientes porteuses d'un CIN2/3, 4(13,33%) patientes porteuses d'une lésion HPV, 1(3,33%) patiente porteuse d'un carcinome épidermoïde.

Le diagnostic de CIN, est avant tout morphologique. Les CIN se développent sur des épithéliums eux- même déjà sujets à des modifications importantes comme la métaplasie qui peut être plus au moins mûre, l'atrophie ou l'inflammation, qui sont autant de pièges et surtout sources de diagnostics erronés (**Sébastien, 2012**).

Leur interprétation, sur des prélèvements histologiques du col utérin reste subjective et présente une faible reproductibilité, en particulier dans les CIN1, et entre CIN2 et CIN 3 (**Tsoumpou et al., 2009**).

L'utilisation complémentaire et conjointe de p16^{INK4a} et Ki-67 semble améliorer leur classification et leur reproductibilité (**Mc Cluggag et al., 2012**).

Le marquage de la protéine p16^{INK4a} est présent au niveau des couches basales de l'épithélium malpighien dans les CIN1 et remonte dans les couches intermédiaires et superficielles dans les CIN de haut grade (CIN2 et CIN3).

Omori a cherché à évaluer l'intérêt de la détection de cette protéine comme marqueur prédictif de l'évolution d'une CIN2 (**Omori et al., 2007**). Il observe tout d'abord que le degré d'expression de la protéine p16^{INK4a}, étudiée par immunohistochimie, augmente significativement avec le stade de la lésion : une expression modérée à forte de la p16^{INK4a} est observée dans 8 % des CIN1 (2/25), 27 % des CIN2 (14/52), 90 % des CIN3 (18/20) et 100 % des cancers invasifs (10/10). Dans son étude, les CIN2 sont divisées en 3 groupes : groupe 1 (n = 28) chez qui on observe une régression des lésions durant le suivi, groupe 2 (n = 11) chez qui est notée une persistance des lésions de CIN2 durant plus de 2 ans, et le groupe 3 (n = 13) dans lequel une conisation est réalisée pour progression vers une CIN3.

Dans une autre étude impliquant 12 pathologistes européens, la détection de la protéine p16^{INK4a} par immunohistochimie a permis une amélioration statistiquement significative de la justesse et de la reproductibilité du diagnostic de CIN2 et CIN3 par rapport à la coloration par l'hématoxyline éosine sur 250 biopsies et 250 conisations (**Bergeron et al., 2012**). Enfin, la détection de la protéine p16^{INK4a} dans les CIN1 semble être un marqueur prédictif de progression vers un CIN de haut grade et pourrait permettre de suivre différemment les patientes selon la détection de la protéine. Ceci demande à être confirmé sur de grandes séries pour être utilisé en routine (**Pino et al., 2009**).

La littérature est riche d'études montrant toutes les limites de l'interprétation histologique des CIN en coloration standard. L'utilisation de marqueur complémentaire est utile pour permettre une bonne classification et améliorer la reproductibilité (**Sébastien, 2012**).

L'expression de la protéine p16^{INK4a} étudiée par immunohistochimie sur les 14 cas de CIN1, et sur un cas de carcinome et 4 cas de lésion HPV, était soit négative, soit moins de 10% des noyaux des cellules de l'épithélium malpighien marqué.

Le marquage intéressait essentiellement la couche basale de l'épithélium malpighien.

Dans les CIN1 typiques, le marquage est le plus souvent limité au tiers inférieur avec un pourcentage de cellules marquées inférieur à 50% et souvent inférieur à 25% (**Sébastien, 2012**).

Les 16 cas restant dont lesquels, le diagnostic de CIN2 a été porté, présentent une positivité d'immunomarquage, plus de 50% des noyaux ont été marqués sur les 2/3 ou la totalité de l'épithélium malpighien du col utérin et remontant dans les couches intermédiaires et

superficielles dans les CIN2 et CIN3. Cela signifie, que les CIN2/3 présentent une forte expression de la p16^{INK4a}.

Dans les lésions intra-épithéliales du col utérin, la prolifération des cellules malpighiennes étant anormale, des cellules en cycle, donc positives avec le Ki-67, vont être observées dans les assises parabasale +/- intermédiaires +/- superficielles selon la sévérité de la CIN (**Sébastien, 2012**).

Selon **Kruse** une expression forte de l'antigène Ki-67 dans les cellules des biopsies de CIN2 a une valeur pronostique importante et indépendante de la progression de la maladie.

Les auteurs classent des lésions de CIN (25 CIN1 et 65 CIN2) en deux groupes :

- Le groupe 1 (n = 40) ayant une faible expression du Ki-67
- le groupe 2 (n = 50) où les lésions ont une forte expression du Ki-67.

Au cours de l'étude il n'a été noté aucune progression des lésions du groupe 1, alors que 30 % (n = 15) des lésions du groupe 2 se sont aggravées (p = 0,001).

Là encore une forte expression du Ki-67 sur les biopsies CIN2 serait prédictive du risque de progression de la maladie [(**Kruse et al.,2003**),(**Kruse et al.,2004**)].

Dans un épithélium malpighien normal, le marquage est strictement limité aux cellules des assises basales.

Dans notre série 9 cas de CIN1 présentent un marquage nucléaire des cellules basales de l'épithélium malpighien dont l'intensité est variable, et avec un pourcentage moins de 25% cela signifie que le diagnostic initial, de CIN 1 a été porté en excès. D'autre part, 13 cas le marquage était sur le tiers de l'épithélium malpighien, confirmant le diagnostic de CIN1, le marquage des noyaux était entre 25 et 50%. D'autre part, dans 8 cas le marquage est typiquement présent dans tous les noyaux des cellules de l'épithélium malpighien avec un pourcentage de plus 50% des cellules présentant des lésions de haut grade CIN2/3.

L'expression conjointe de la P16 et du Ki67 ont permis dans notre série de reclasser certaines lésions intra-épithéliales diagnostiquées au départ. Parmi les 21 cas de CIN1, 11 cas ont été confirmé, 07 cas ont été reclassés en métaplasie malpighienne et 03 cas en CIN2/ 3. Les 04 lésions d'HPV diagnostiquées initialement se sont révélées inflammatoires.

Omori note que le degré d'expression de la p16^{INK4a} au moment du diagnostic initial est significativement plus élevé pour les CIN2 du groupe 3 que pour les CIN2 des groupes 1 et 2 : une expression forte de la p16^{INK4a} est retrouvée pour 6 CIN2 du groupe 3 mais pour aucun des CIN2 des groupes 1 et 2.

Le pronostic d'une CIN2 semble donc dépendre de l'intensité de l'expression de la p16^{INK4a} au moment du diagnostic initial. Une forte expression de la p16^{INK4a} serait en faveur d'une progression de la CIN2 (**Omori et al., 2007**).

Dans le CIN3, ce marquage est typiquement présent dans toutes les couches du revêtement, intéressant plus de 50% des cellules lésionnelles (**Sébastien, 2012**).

Cette positivité intéresse toutefois souvent un pourcentage de cellules lésionnelles moins important que dans un authentique CIN de haut grade.

Enfin, en pratique, il existe une grande variabilité d'expression dans les lésions de CIN1 et de CIN2 (**Sébastien, 2012**).

Donc La p16 est très souvent utilisée, en cas de diagnostic difficile entre une CIN3 et des remaniements métaphasiques immatures, une positivité de la p16^{INK4a} oriente alors vers une CIN3 (**Sébastien, 2012**).

En cas, de doute diagnostique sur une lésion du revêtement malpighien du col utérin, le Ki-67 ne doit pas être utilisé seul. L'utilisation couplée avec un ou plusieurs autres marqueurs est alors nécessaire.

Dans les 30 cas de notre série le marquage immunohistochimique du Ki67 a été positif dans tous les cas (100%).

L'expression du Ki-67 est d'autant plus importante ((le pourcentage de cellules marquées et en localisation dans le revêtement) que les lésions de CIN sont sévères.

- Dans les CIN1 typiquement, le marquage est le plus souvent limité au tier inférieur avec un pourcentage inférieur à 50% et souvent inférieur à 25% (**Sébastien, 2012**).
- Dans les CIN3, ce marquage est typiquement présent dans toutes les couches du revêtement, intéressant plus de 50% des cellules lésionnelles (**Sébastien, 2012**).

En cas de doute diagnostique sur une lésion du revêtement malpighien du col utérin, le Ki-67 ne doit donc pas être utilisé seul. L'utilisation couplée avec un ou plusieurs autres marqueurs est alors nécessaire.

Nos résultats rejoignent ceux, de la littérature.

Dans des études, en 2011 **Guo** a étudié l'association p16^{INK4a} + ProEx C. Dans les lésions de CIN1, il a observé dans 19% des cas un marquage diffus avec la p16^{INK4a} et également dans 19% des cas un marquage diffus avec le ProEx C, mais aucun des ces cas ne comportait de marquage diffus et intense avec les 2 marqueurs a la fois (**Guo et al., 2011**).

Dans une publication récente, **Walts** a proposé une stratégie diagnostique utilisant dans un premier temps la p16^{INK4a} et le ProEx C et en cas de discordance entre ces 2 marqueurs, l'utilisation d'un troisième : le Ki-67.

En revanche, dans les lésions de bas grade, la p16^{INK4a} et le ProEx C ne montrent une concordance diagnostique que dans 50% des cas. L'utilisation du Ki-67 dans un second temps aboutit alors au diagnostic avec parfois un redressement soit vers une absence de lésion, soit vers une lésion de haut grade (**Walts et al., 2013**).

Il a été noté que l'association de p16^{INK4a} du Ki67, ainsi que le ProEx C à l'analyse cytologique, permet améliorer la prédiction des CIN2+ et pourrait être ainsi intégrée dans le dépistage primaire du cancer du col. La détection de la P16 pourrait également être automatisée ce qui réduirait le temps d'obtention des résultats et le coût du dépistage. La p16^{INK4a} pourrait également simplifier le triage des ASCUS et des LSIL, permettant ainsi de diminuer l'angoisse des patientes et le coût de la prise en charge (**Castle et al., 2009**).

Dans nos 30 cas ; 18 patientes ont bénéficié d'un FCV, parmi ces dernières 3 patientes dont le frottis ne présentait aucune lésion, 3 patientes présentaient une inflammation, 5 présentaient un CIN1, 1 patiente un CIN2, 3 patientes une lésion HPV et 2 patientes AGC et 1 patiente ASCUS.

Comparant aux biopsies, il existe 33,33% de corrélation cyto- histologique.

Quelques grands principes peuvent être dégagés de ces données de la littérature :

- ✚ Le diagnostic des lésions de CIN est avant tout morphologique.
- ✚ En cas de lésion ambiguë, aucun marquage immunohistochimique n'apportera à lui seul toutes les réponses.
- ✚ L'utilisation de 2 marqueurs augmente la sensibilité diagnostique et la p16 doit faire partie de cette batterie diagnostique.

Conclusion

Le diagnostic de lésion intra-épithéliale cervicale est avant tout morphologique. Actuellement, il est nécessaire de coupler deux biomarqueurs Ki-67 et la p16^{INK4a} dans la pratique quotidienne, devant toute suspicion morphologique de CIN. Augmentant, ainsi la reproductibilité inter-observateurs, permettant de mieux classer ces lésions précancéreuses pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

La sur-expression de la protéine p16^{INK4a} peut être considérée comme un marqueur indirect de l'activité néoplasique des onco-protéines virales des HPV à haut risque.

À long terme, la détection de la protéine p16^{INK4a} par immunohistochimie pourrait se faire dans le dépistage primaire du cancer du col, en première intention ou après un test HPV. Cette approche confirmerait l'intérêt de coupler un marqueur moléculaire tel que le Ki-67 à une analyse morphologique dans le dépistage du cancer du col utérin.

De plus, le meilleur pronostic des cancers HPV positifs est également dû à une réaction immunitaire anti-tumorale plus efficace à travers une infiltration de lymphocytes T CD8- α significativement plus importante dans les cancers HPV positifs que dans les cancers HPV-négatifs (**Jung et al., 2013**).

Au moindre doute sur les aspects morphologiques, et notamment lorsqu'il existe des conséquences thérapeutiques importantes, on peut donc proposer comme stratégie diagnostique l'utilisation dans un 1^{er} temps de 2 biomarqueurs :

La p16^{INK4a} et soit le Ki-67 soit le proxEc. Si ces 2 premiers marqueurs sont concordants, on aboutit au diagnostic. En cas de discordance, le 3^e marqueur doit alors être utilisé (**brown et al., 2012**).

Enfin, la détection de la protéine p16^{INK4a} dans les CIN1 semble être un marqueur prédictif de progression vers un CIN de haut grade et pourrait permettre de suivre différemment les patientes selon la détection de la protéine.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- 1- Alain S, Hantz S, Denis F. Papillomavirus: les virus et la physiopathologie de l'infection. *Medecine therapeutique/Pédiatrie*. 2010 ;13 : p5-19
- 2- ANAES (2002). Conduit à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal. Recommandation pour la pratique clinique. Agence Nationale d'accrédiation et d'évaluation en santé. Cede, France.

-B-

- 1- Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R for the European CINtec histology study group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Path* in press. 2010
- 2- Bergeron C., Wentszensen N., Cas F., von Knebel Doeberitz M. La protéine p16^{INK4a} : un marqueur cytologique pour détecter les néoplasies intra-épithéliales de haut grade du col utérin *Ann Pathol* 2006 ; 26 : 397-402

-C-

- 1- Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L et al and the NTCC working group. Use of p16INK4a over expression to increase the specificity of HPV testing: a nested substudy of the NTCC randomized controlled trial. *Lancet Oncology* 2008;9:937-45

-D-

- 1- Denton K, Bergeron C, Klement P, Trunk T, Keller T, Ridder R. The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology versus HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL Pap cytology results. *Am J Clin Pathol* 2010;134: 12—22.
- 2- Denton K, Bergeron C, Klement P, Trunk M, Keller T, Ridder R. The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology versus HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Path* submitted

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES

-G-

- 1- Guo M., Hu L., Baliga M., He Z., Hughson M.D. The predictive value of p16^{INK4a} and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia *Am J Clin Pathol* 2004 ; 122 : 894-901
- 2- Garcia M, Mena G, Caceres E, De Ruiz A. Colpo-hystopathological correlation as quality index in colposcopy. *Ginecol. Obstet Mex.* 2008 Oct; 76(10): 587-96.
- 3- Omori M et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by P16INK4a immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 208-217.

-H-

1- Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* 2005;18:267-73.

2-Hilfrich R, Hariri J. Prognostic relevance of human papillomavirus L1 capsid protein detection within mild and moderate dysplastic lesions of the cervix uteri in combination with p16 biomarker. *Anal Quant Cytol Histol* 2008; 30:78-82.

-K-

- 1- Kruse et al. Low-and high-risk CIN 1 and 2 lesions: predictive value of grade, HPV and KI-67 immuno-quantitative variables. *J Pathol* 2003 Apr; 199 (4):462-70.
- 2- Kruse et al. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol* 2004; 26 (1-2):13.
- 3- Kim M, Katayose Y, Rojanala L, *et al.* Induction of apoptosis in p16INK4A mutant cell lines by adenovirus-mediated overexpression of p16INK4A protein. *Cell Death Differ* 2000; 7: 706-11.
- 4- Kelly D, Kincaid E, Fansler Z, Rosenthal DL, Clark DP. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx C). *Cancer* 2006; 108(6):494–500.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES

- 5- Kurman, R.J., Carcangiu, M.L., Herrington, C.S., Young, R.H. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs IARC WHO Classification of Tumours, No 6; 2014.
- 6- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Over expression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276—84.

-L-

- 1- Lu X, Toki T, Konishi I, Nikaido T, Fujii S. Expression of p21 WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* 1998; 82(12):2409–2417.

-M-

- 1- Monsonogo J. HPV and cofactors in cervical carcinogenesis. In: *Papillomaviruses in human pathology*, New York: ed. Raven Press, 1990: 31-48.
- 2- Martin-Hirsch PL, Paraskevaidis E, Kitchenner H. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia (Cochrane review). *The Cochrane library*, Issue 3 Oxford: update Software 2002.
Marchetta J. Halte aux conisations. *GynObst Fert* 2009;37:213-215.
- 3- Meyer JL, Hanlon DW, Andersen BT, Rasmussen OF, Bisgaard K. Evaluation of p16INK4a expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec p16INK4a assay, correlation with biopsy follow-up results. *Cancer* 2007 ;111: 83-92.
- 4- M.E. McLaughlin-Drubin, K. Münger, Inter- and intraobserver variation in the histopathological reporting of cervical squamous intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol* 2009

-P-

- 1- Pino M, Garcia S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A et al. Value of p16 as a marker of progression, regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 2001: 1-7.
- 2- Pretorius RG. Inappropriate gold standard bias in cervical cancer screening studies. *Int J Cancer*, 2007; 121: 2218-2224.

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES

-S-

- 1- Sigurdsson K, Sigvaldason H. Is it rational to start population-based cervical cancer screening at or soon after age 20? Analysis of time trends in preinvasive and invasive diseases. *Eur J Cancer* 2007; 43: 769-74.
- 2- Sano T., Oyama T., Kashiwabara K., Fukuda T., Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia *Pathol Int* 1998 ; 48 : 585–585.
- 3- Sahebali S, Depruydt CE, Boulet GA, Arbyn M, Moeneclay LM, Vereecken AJ et al. Immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int J Cancer* 2006; 118:1254-60.
- 4- Schneider V. CIN prognostication: will molecular techniques do the trick? *Acta Cytol* 2003;47:115-6.

-W-

- 1- Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Triage of women with ASC-US and LSIL cytology using qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high grade cervical intra epithelial neoplasia. *Cancer* 2007; 11:58-66.
- 2- Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a populationbased cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1355—60.

Protéines	Rôles
E1	Réplication du génome viral
E2	Réplication du génome viral, régulation de la transcription du génome viral
E4	interaction avec le cytosquelette, facilite l'assemblage des nouveaux virus et leur relargage
E5	Prolifération anarchique des cellules, immortalisation cellulaire, inhibe le CMH à la surface cellulaire
E6	immortalisation et transformation cellulaire, synthèse de l'ADN viral,
E7	Prolifération anarchique des cellules, immortalisation et transformation cellulaire
E8	existence non certaine, rôle non connue

Tableau 1 Rôles des protéines de la région E des virus HPV

Classification de Bethesda 2001	
Absence de lésion intra épithéliale et de malignité	
Anomalies des cellules malpighiennes	
ASCUS	Atypie malpighienne de signification indéterminée
ASC-H	Atypie malpighienne n'excluant pas une lésion de haut grade
LSII	Lésion intra épithéliale de bas grade, correspond à HPV sur condylome, dysplasie légère

HSIL	Lésion intra épithéliale de haut grade, correspond à dysplasie modérée et élevée, carcinome in situ
Carcinome malpighien invasif	
Anomalie des cellules glandulaires	
AGC	
Atypie glandulaire en faveur d'un néoplasie	Atypie glandulaire
Adénocarcinome endocervical in situ	

Adénocarcinome
invasif

Tableau 2 classification de Bethesda modifiée en 2001

-Matériels non biologiques

1. Appareillages et équipements (tableau 3 et 4) de la technique histologique standard Hémateïne éosine (HE)

Appareil d'inclusion	SLEE MPS/C
Circulateur	(LIECA TP 10 20)
Etuve	Memmer
Microscope optique	LEICA DM750
Microtome	SLEE
Bain-marie	Polyscience

Tableau 3. Appareillages et équipements

Matériel

- **Portoir de lames**
- **Moules d'inclusion**
- **Lames porte objets ordinaires**
- **Lames couvre objets (lamelles)**
- **Lames à couper**
- **Pinces**
- **Panier en métal**
- **Cassettes d'inclusion**
- **Eukitt**

Solution
<ul style="list-style-type: none"> • Formol à 10% • Xylène • Hématoxyline de Harris • Acide chlorhydrique • Eau ammoniacuée, L'eau distillée et l'eau de robinet • Eosine • Alcool absolu • Paraffine

Tableaux 4. Matériel et solutions utilisés en HE

Réactifs	Solutions & tampons	Matériel
<ul style="list-style-type: none"> • Solution de PH (7 et 9) • kit de révélation • Solution d'anticorps primaire (spécifique) : anti-P₁₆ et anti KI₆₇ • Anticorps secondairesperoxydase • Diluant • Alcool • Xylène 	<ul style="list-style-type: none"> • Solution de lavage. • Eau distillée et l'eau de robinet. • Colorant hématoxyline de Mayer • Milieu de montage (Eukitt) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lames silanisées • Micropipette de 1000µl et 100µl • Stylo DAKO PEN • Paniers en verre

Tableaux 5. Matériels et solutions utilisées en IHC

Type d'AC	PH	Dilution	clone
Ki67	9	1/50 ^{ème}	SP6
Ki67	9	1/200 ^{ème}	MM1
P16	7	Prêt à l'emploi	kit CINtotechnology

Tableau.6 Représentant l'Ac I utilisés dans l'étude IHC

ANNEXES I

Classification de Papanicolaou

Il s'agit d'une classification cytologique en 5 parties :

- I : pas de cellules anormales
- II : cytologie atypique sans signe évident de malignité
- III : cytologie suggestive mais non conclusive
- IV : cytologie très suggestive
- V : cytologie conclusive

Classification OMS des dysplasies cervicales

Première classification histologique, en 5 entrées :

B- Condylome sans dysplasie

C- Dysplasie légère

D- Dysplasie modérée

E- Dysplasie sévère

F- Carcinome in situ

ANNEXES II

Classification de Richart (Richart, RM.1967).

	Niveau des ACN	Koilocytes	Mitoses	Différenciation cellulaire
CIN1	Couche basale et parabasale jusqu'au 1/3 inférieur de l'épithélium	Présence non obligatoire	1/3 inférieur de l'épithélium	Persistance sur les 2/3 supérieurs
CIN2	Atteinte jusqu'aux 2/3 inférieurs de l'épithélium	Présence non obligatoire	Jusque dans les assises moyennes, anormales	Persistance en surface
CIN3	Marquées jusqu'en surface de l'épithélium	Présence non obligatoire	Nombreuses, anormales, jusqu'en surface	Rare persistance très superficielle Impression de symétrie de l'épithélium

ANNEXES III

Alcool à obtenir (°)	Quantité d'eau (en ml) à ajouter à 100 ml d'alcool.			
	Alcool absolu	alcool à 98°	alcool à 95°	alcool à 90°
90°	6,50	3,83		
70°	47,75	44,25	39,18	31,05
50°	107,44	102,75	95,89	84,71

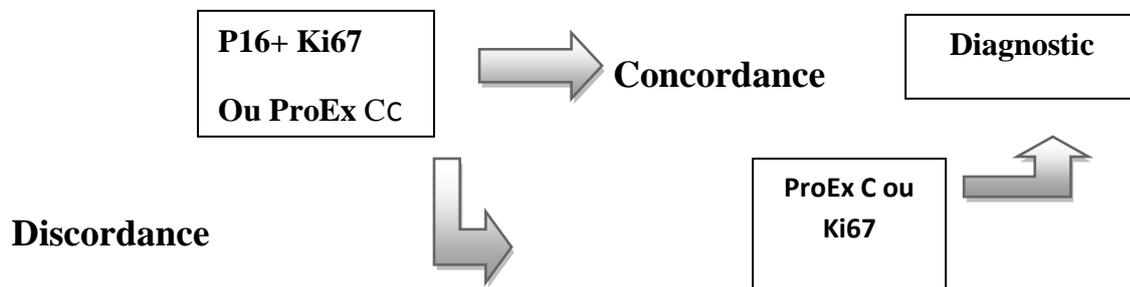
Tableau des dilutions des alcools (d'après la table de GAY-LUSSAC).

ANNEXES VI

	Sensibilité	Spécificité
p16^{INK4a} seule	84	63
Ki67 seul	94	52
ProEx C seul	87	71
p16^{INK4a} + Ki67	94	43
Ki67+ ProEx C	94	48
p16^{INK4a} + ProEx C	92	61

Tableau.Sensibilité et la spécificité des biomarqueurs dans le diagnostic des CIN (Pinto AP et collmodPathol 2008).

ANNEXE VII



Stratégie d'utilisation des marqueurs immunohistochimiques en cas d'ambiguïté diagnostique en coloration standard dans les CIN.