

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université BLIDA 1
Faculté des sciences de la Nature et de la vie
Département de biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

INTERET DIAGNOSTIC ET THERAPEUTIQUE DES
BIOMARQUEURS P16 ET KI67 DANS LA DYSPLASIE
CERVICO-UTERINE

Soutenu le 15-09-2020

Présenté par :

M^{lle} HAILI FATMA

M^{lle} MEDDANE CHAHINEZ

Devant le jury composé de :

<i>M^r BENYAHIAN.</i>	<i>Maitre Assistant A.</i>	<i>UB1</i>	<i>Président</i>
<i>M^{me} AISSANI R.</i>	<i>Maitre de conférences B.</i>	<i>UB1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M^{me} BENAZOUZ F.</i>	<i>Maitre Assistante A.</i>	<i>UB1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M^r BEKHTI A.</i>	<i>Professeur.</i>	<i>CHU-Blida</i>	<i>Co-promoteur</i>

2019/2020

Dédicaces

Arrivé au terme de mes études, c'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail :

*À la meilleure femme au monde, ma couronne, **maman**, tu m'as comblé avec tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Tout le vocabulaire français ne me suffira jamais pour te présenter mes remerciements. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

*À mon cher **papa**, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

*À ma très chère sœur **ISMA***

À tous mes oncles et mes tantes ainsi que leurs épouses et époux.

*À mes cousins et cousines, spécialement **BELKACEM***

*À mes très chers amis **IMENE, RACHA, SAMAR, YACINE & ABD RAHIM.***

*À mon très cher et adorable binôme **FATMA** qui a pu me supporter tout le long de notre mémoire, ainsi que toute sa famille.*

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Phahinez

Dédicaces

Premièrement je remercie DIEU de nous avoir donné le courage et la patience sans lesquels nous n'aurons jamais réussi à élaborer ce mémoire.

A mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A ma sœur **FARAH** et mes deux chers frères **AKLI** et **BELAID**.

A mes précieuses cousines **SOUHILA**, **HASSIBA**, **SYLIA** et **YAMINA** et mon cousin **ABDREZAK** et toute la famille.

A mon cher **ALI**.

A mes amis avec qui j'ai partagée des moments les plus agréables spécialement **ABDRAOUF**.

A mon binôme et ma chère amie **CHAHINEZ** ainsi que toute sa famille

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Fatma

Remerciements

Avant tout nous rendons grâce à Dieu le tout puissant et le très miséricordieux pour sa bienveillance, pour nous avoir donné la patience, le courage et la force de mener à terme notre mémoire ;

Notre travail ne pourrait avoir de valeur sans la contribution des membres du jury qui ont accepté de juger ce mémoire.

Nous avons de la reconnaissance envers :

***Mr BENYAHIA.N**, qui nous a fait l'honneur d'être le président du jury.*

***Mme AISSANI.R**, pour avoir offert le privilège d'examiner ce travail.*

*Nos profondes gratitudee à notre promotrice **Mme BENAZOUZ F.** pour ses conseils, son aide précieuse, sa disponibilité, son soutien, pour les efforts qu'elle avait consentie avec beaucoup de patience et d'enthousiasme tout le long de notre mémoire*

*Nos vifs remerciements s'adressent également aux **Professeur BAKHTIA**, le **Dr CHAOUIA** et le **Dr TACHET.A** du **CHU de BLIDA** de nous avoir aidé et d'être à nos coté jusqu'au bout de notre pratique.*

*Nos chaleureux remerciements au professeur et chef de service du laboratoire d'anatomopathologie de **DOUERA BELARBI.A** et le **DR.BENREZKI LOUIZA** ainsi que tout le personnel.*

*On tient à remercier aussi le professeur et chef de département de biologie et physiologie cellulaire **SAADI LEILA** et tous les enseignants qui nous ont suivis au cours de notre parcours universitaire.*

Nous tenons à remercier également toute la promotion

BIOLOGIE MOLECULAIRE 2019/2020

Enfin, nous voudrions adresser nos sincères reconnaissances et nos plus profondes gratitudee à tous ceux qu'on a pu côtoyer durant les cinq années d'études et à tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION..... 1

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Anatomopathologie du col de l'utérus	3
I.1.1. Rappel Anatomophysiologique du col de l'utérus	3
I.1.2. Histologie du col de l'utérus	4
I.1.2.1. Muqueuse exocervicale	4
I.1.2.2. Muqueuse endocervicale	5
I.1.2.3. Zone de jonction	5
I.2. Histoire naturelle du cancer du col d'utérus.....	6
I.2.1. Infection par des HPV haut risque	6
I.2.1.1. Structure des HPV :	7
I.2.1.2. Cycle viral.....	8
I.2.1.3. Mode de transmission des HPV.....	9
I.2.1.4. Mécanisme de cancérogenèse.....	10
I.2.2. Développement des Lésions précancéreuses	11
I.2.3. Progression des lésions précancéreuses vers le cancer invasif	12
1- Carcinome épidermoïde.....	13
2- Adénocarcinomes.....	13
I.3. Caractéristiques cytologiques et histologiques des lésions intra épithéliales	15
I.3.1. Lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade (CIN 1)	15
I.3.2. Lésions malpighiennes intra-épithéliales de haut grade (CIN2 et CIN3	16
I.3.3 Histopathologie du cancer du col de l'utérus.....	17
I.4. Immunohistochimie et les biomarqueurs P16 et Ki67	17
I.5. Techniques de dépistage et de diagnostic du cancer du col de l'utérus	21
I.6. Causes et facteurs de risque du cancer du col de l'utérus	22
1-les facteurs viraux	22
2-Les facteurs endogènes	23
3-Les facteurs exogènes	24

4-les facteurs diététiques	24
II : MATERIEL ET METHODES	
II.1 Matériel	25
II.2. Méthodes :	26
II.2.1. Technique anatomo-histologique.....	26
II.2.2. Technique immunohistochimique (IHC).....	29
III : RESULTATS ET DISCUSSION	32
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	46
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	page
1	Anatomie du col de l'utérus.	4
2	Jonction pavimenteuse cylindrique.	5
3	Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus et de l'infection par le papillomavirus humain.	6
4	Représentation d'une particule virale du HPV : modèle atomique de la capsidie et modèle schématique.	7
5	Déroulement du cycle viral des HPV après infection d'un épithélium malpighien.	9
6	Modulation des molécules du cycle cellulaire par les oncoprotéines E6 et E7.	11
7	Développement histologique du cancer du col utérin.	14
8	Expression du ki-67 dans une muqueuse normale avec positivité strictement limitée aux assises basales.	18
9	Expression du ki-67 dans une lésion de CIN3.	18
10	Mécanisme de surexpression de la P16INK4.	19
11	Marquage positif de la P16 diffus et continu prédominant dans les assises inférieures CIN1.	20
12	Marquage positif de la P16 diffus et intense dans toutes les couches du revêtement CIN 2.	21
13	Marquage positif de la P16 diffus et intense dans toutes les couches du revêtement CIN 3.	21
14	(a et b) score 1 : des cellules basales métaplasiques sont marquées par la p16.	32
15	(a et b) score 2 : des cellules basales métaplasiques sont marquées par la p16.	33
16	(a et b) score 3 : des cellules basales métaplasiques sont marquées par la p16.	33
17	(a et b) score 4: des cellules basales métaplasiques sont marquées par la p16.	33
18	Coloration à l'hématoxyline éosine dans les CIN.	34
19	Photomicrographies immunomarquées avec expression de P16.	35
20	Photomicrographies immunomarquées avec expression de Ki67.	35
21	A et B association entre l'expression de la P16, Ki67 et les CIN 2/3.	37

22	Comparaison de la charge HPV avec la P16 et le Ki67.	37
23	L'expression de la p16 dans différents types de lésions du col de l'utérus.	40
24	La positivité du Ki67 dans différents types de lésions du col de l'utérus.	40
25	Expression de E-cadherine dans les différentes lésions du col de l'utérus.	40

LISTE DES TABLEAUX

N°	titre	Page
I	Classification des HPV selon leurs potentiels oncogène.	7
II	Rôles des protéines de papillomavirus à haut risque.	8
III	Différentes classifications des lésions épidermoïdes du col utérin.	12
IV	Points de coupures de l'expression de la P16 INK4a, CK7 et ratios de cellules positives dans les LSIL dans la première biopsie, corrélés aux 3 groupes de diagnostic dans le deuxième spécimen.	39

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ASC-H : Atypical Squamous Cell evocating High grade

ASCUS : Atypical Squamous Cell of Unknowned Significance

CCU : Cancer du col de l'utérus

CDKN2A : Cyclin dependent kinase inhibitor 2A

CIN : Cervical Intra-epithelial Neoplasia

CIS : Carcinome in situ

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

DAB : Diaminobenzydine

E : Early (gène précoce)

EA50 : Eosine Azure 50

EBV : Epstein-Barr virus

E2F : Facteur de transcription

Fab : Fragment antigen-binding

Fc : Fragment crystallizable region

FCU : Frottis cervico-utérin

H-E : Hématoxyline-éosine

HLA : Human leukocyte antigen

H-SIL : High-Squamous Intraepithelial Lesion

HRP : Horse Radish Peroxydase

HPV : Human Papillomavirus

HPV-BR : Humain papillomavirus à bas risque

HVP-HR : Humain papillomavirus à haut risque

IHC : Immunohistochimie

IVA : Inspection visuelle du col de l'utérus après application d'acide acétique

JPC : Jonction Pavimento-Cylindrique

Ki67 : Antigène nucléaire et Index mitotique

L : Late (gène tardif)

LCR : Long Control Region

L-SIL : Low Squamous Intraepithelial Lesion

MIB-1 : labeling index

OG6: Orange gradient 6

OMS : Organisation Mondiale de Santé

ORF : Open Reading Frame

P16 : Protéine suppresseuse de tumeur, nhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A

P53 : Protéine 53

PAP : Papanicolaou

PBR : Peroxydase Blocking Reagent

PCR : Polymerase Chain Reaction

pRB: Protéine du gène du rétinoblastome

RLU/PC : Unités lumineuses relatives/Contrôle positif

SCC : Squamous Cell Carcinoma

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Glossaire

- **Adénocarcinome** : Cancer développé à partir de la muqueuse glandulaire endocervicale.
- **Anatomo-pathologie** : Etude des modifications de structure des organes, des tissus ou des cellules, avec différents appareils optiques.
- **Anisocaryose** : Inégalité de taille des noyaux des cellules, les uns par rapport aux autres. S'observe dans les dysplasies.
- **Atrophie** : Amincissement ou diminution du volume d'une cellule, d'un tissu ou d'une partie du corps.
- **Basaloïde** : Des cellules de petite taille, régulières au noyau ovalaire. Elles sont disposées en lobules bordées par des cellules s'organisant en palissade au pourtour des massifs tumoraux.
- **Carcinome in situ** : cancer au tout début. Il n'a pas encore envahi les tissus voisins et n'a aucun risque de métastase. Son ablation entraîne la guérison complète. Au sens strict, un carcinome in situ n'est pas encore un cancer, mais plutôt une dysplasie. Cependant, un carcinome in situ a un risque élevé de devenir un authentique cancer.
- **Condylome** : tumeur bénigne de la peau ou muqueuse au niveau des organes génitaux, provoqué par le HPV, sexuellement transmissible.
- **Cytologie** : Etude avec un microscope de l'aspect de cellules isolées.
- **Dyscaryose** : Anomalie nucléaire observée dans les dysplasies, caractérisée essentiellement par une irrégularité de la forme du noyau qui n'est plus rond comme normalement. Il est de plus, augmenté de volume et présente des anomalies de sa chromatine qui devient densifiée, c'est l'hyperchromatisme.
- **Dyskératose** : Trouble de maturation à l'échelon cellulaire, en réalité variété de mort cellulaire. Les cellules sont de petite taille, à cytoplasme éosinophile.
- **Histologie** : Examen anatomopathologique des prélèvements de tissus (biopsies, conisation, hystérectomie) qui permettent de déterminer l'envahissement en profondeur de la propagation aux vaisseaux.
- **Hyperplasie** : Augmentation anormale du nombre de cellules d'un tissu ou d'un organe. L'hyperplasie peut causer le grossissement d'un tissu ou d'un organe. Cet état n'est pas cancéreux, mais il peut le devenir dans certains cas.
- **Kératohyaline** : Substance grasseuse qui imprègne et assouplit la kératine de la peau.

- **Koïlocyte** : Cellule pathognomonique de l'infection à HPV et de la lésion condylomateuse. C'est une cellule de type intermédiaire ou superficiel dont le cytoplasme présente une large clarification et dont le noyau (siège des virus) est irrégulier.
- **Leucorrhée** : Est un écoulement non sanglant provenant de l'appareil génital féminin.
- **Métaplasie** : Transformation d'un tissu ayant une structure histologique donnée en un autre tissu. Au niveau du col la métaplasie est physiologique : en permanence la muqueuse endocervicale éversée se transforme en une muqueuse malpighienne, définissant la zone de transformation.
- **Métrorragie** : Ecoulement de sang (hémorragie) hors de l'utérus, en dehors de la période des règles (menstruation).
- **Para kératose** : Trouble de maturation du revêtement malpighien se traduisant par la conservation anormale du noyau des cellules superficielles appelées à desquamer. Cet aspect se rencontre en particulier dans des lésions virales à HPV mais aussi dans des conditions irritatives, telles que mycoses, prolapsus etc
- **Pycnose** : Altération du noyau de la cellule qui se présente sous la forme d'une masse condensée.
- **Syncytial** : Relatif au syncytium (masse de cytoplasme qui renferme plusieurs noyaux)
- **Test Pap** : Aussi appelé frottis utérin, est un test qui fait partie de l'examen gynécologique et qui permet de déceler la présence de cellules anormales dans la muqueuse du col de l'utérus avant qu'elles se transforment en lésions précancéreuses ou en cancer du col de l'utérus.
- **Zone de jonction** : C'est la jonction entre l'épithélium cylindrique endocervical et la limite supérieure de la zone de transformation de l'exocol.

RESUME

Le cancer du col de l'utérus est un véritable problème de santé publique dans le monde selon OMS, 2007. Ce cancer est causé principalement par une infection sexuellement transmissible dont l'origine est le papillomavirus humain (HPV), mais d'autres facteurs sont nécessaires à l'apparition de ce type de cancer. La stratégie de dépistage des lésions précancéreuses est basée sur un test cytologique (FCU), mais la cytologie présente une faible sensibilité pour détecter les lésions de haut grade. Pour cela de nombreux experts proposent d'accompagner ce test avec des tests d'immunohistochimie dans le but d'améliorer le diagnostic du cancer du col de l'utérus. Dans notre travail, un nombre de 20 FCU et 10 biopsies ont été prélevés au CHU de BEN BOUALI BLIDA et étudiés au laboratoire d'anatomopathologie du CHU de DOUERA dans l'objectif d'effectuer une étude cytologique, histologique puis marquer ces prélèvements avec deux protéines la P16 et le KI67 afin de voir s'il existe une corrélation entre l'expression de ces protéines et le degré de la dysplasie. Mais vu les circonstances de la pandémie mondial du covid19 et le confinement imposé par le pouvoir public ont a pas pu avancer dans notre travail expérimental et aller jusqu'aux résultats finaux. Par rapport à ces conditions nous avons travaillé sur un ensemble d'articles scientifiques. D'après les résultats de ces derniers des chercheurs ont mentionné le taux d'expression de duet P16/Ki67 dans le CIN1 qui était à 37%, dans le CIN2 il était à 96,6% et dans les CIN3 il était à 100%. Les résultats démontrent que ce double marquage aurait une très forte expression détectée dans les différents stades de la dysplasie utérine, ce qui indique une corrélation positive entre ces biomarqueurs et l'infection par des HPV-HR et le degré de dysplasie. En conclusion, Les résultats obtenus dans les travaux des scientifiques montrent que ces deux protéines P16 et Ki67 pourraient être considérées comme des biomarqueurs de différenciation entre les stades des lésions intraépithéliales dans le cancer du col de l'utérus.

Mots clés : Cancer du col de l'utérus, Papillomavirus humain (HPV), Immunohistochimie, P16/Ki67, Dysplasie.

ABSTRACT

Cervical cancer is a real public health problem in the world according to WHO , 2007. This cancer is mainly caused by a sexually transmitted infection whose origin is the human papillomavirus (HPV), but other factors are necessary for the development of this type of cancer. The screening strategy for precancerous lesions is based on a cytology test (FCU), but cytology has a low sensitivity to detect high-grade lesions. For this reason, many experts propose to accompany this test with immunohistochemistry tests in order to improve the diagnosis of cervical cancer. In our work, a number of 20 FCU and 10 biopsies were taken at the CHU of BEN BOUALI BLIDA and studied at the anatomopathology laboratory of the CHU of DOUERA with the objective of carrying out a cytological and histological study and then marking these samples with two proteins P16 and KI67 in order to see if there is a correlation between the expression of these proteins and the degree of dysplasia. However, given the circumstances of the global covid pandemic¹⁹ and the containment imposed by the public authorities, we were unable to progress in our experimental work and reach the final results. In relation to these conditions we have worked on a set of scientific papers. According to the results of the latter, researchers have mentioned the expression rate of P16/Ki67 dual in CIN1 which was 37%, in CIN2 it was 96.6% and in CIN3 it was 100%. The results show that this dual labeling would have a very high expression detected in the different stages of uterine dysplasia, indicating a positive correlation between these biomarkers and HPV-HR infection and the degree of dysplasia. In conclusion, the results obtained in the scientists' work show that these two proteins P16 and Ki67 could be considered as biomarkers of differentiation between the stages of intraepithelial lesions in cervical cancer.

Keywords : Cervical cancer, Human papillomavirus (HPV), Immunohistochemistry, P16/Ki67, Dysplasia.

ملخص

يعتبر سرطان عنق الرحم مشكلة صحية عامة حقيقية في العالم وفقاً لمنظمة الصحة العالمية (2007). ينتقل هذا السرطان عن طريق العلاقات الجنسية، وسببه الأساسي الفيروس الحليمي البشري (HPV) إلا أن هناك عوامل أخرى ضرورية تساهم في تطوير هذا النوع من السرطان. تعتمد استراتيجية الكشف المبكر عن المراحل ما قبل سرطانية على اختبار مسحة عنق الرحم، لكن هذا الاختبار يفقد للنوعية لكشف المراحل المتطورة لهذا المرض. ولهذا الغرض، يقترح الكثيرون أن يصاحب هذا الاختبار أو الفحص اختبارات تعتمد على التقنية المناعية-النسجية-الكيميائية من أجل تحسين تشخيص سرطان عنق الرحم.

من أجل اكتشاف هذا السرطان المذكور تم في هذه الدراسة أخذ 20 مسحة عنق رحم و10 خزعات بمستشفى حسبية بن بوعلي البلدية ليتم بعد ذلك دراستها في مختبر علم التشريح الباطني بمستشفى الدويرة بهدف إجراء دراسة خلوية ونسجية ثم تمييز هذه العينات مع اثنين البروتينات P16 و KI67 لمعرفة ما إذا كان هناك ارتباط بين التعبير عن هذه البروتينات ودرجة خلل التنسج. ولكن نظراً لظروف وباء كوفيد 19 العالمي والحصار الذي تفرضه السلطات العامة، لم يتمكن من المضي قدماً في عملنا التجريبي والوصول إلى النتائج النهائية. فيما يتعلق بهذه الشروط عملنا على مجموعة من المقالات العلمية. وبحسب نتائج هؤلاء الباحثين المذكورة تم تقييم معدل التعبير عن البروتينات P16/Ki67 المزدوج بنسبة 37% في خلل التنسج الرحمي CIN1 وبنسبة 96.6% في CIN2 و100% في CIN3.

أظهرت النتائج أن المعدل الإيجابي للتعبير عن البروتينات p16 و ki67 كان عالياً في المراحل المتقدمة من سرطان عنق الرحم. مما يشير إلى وجود علاقة إيجابية بين هذه المؤشرات والعدوى بفيروس الحليمي البشري (HPV-HR) ودرجة خلل التنسج الرحمي.

كخلاصة، النتائج المتحصل عليها من خلال دراسات العلماء تبين أن البروتينات p16 و ki67 يمكن أن تشكل مؤشرات حيوية ثنائية للكشف بين مراحل خلل التنسج الحلمي في سرطان عنق الرحم.

الكلمات المفتاحية: سرطان عنق الرحم- الفيروس الحليمي البشري - التقنية المناعية النسجية الكيميائية- P16/Ki67 - خلل التنسج الرحمي.

INTRODUCTION

Le cancer du col de l'utérus est un lourd fardeau socio sanitaire dans le monde. Il entraîne une morbidité et une mortalité importantes, avec plus de 500 000 nouveaux cas et plus de 300 000 décès par an dans le monde (Bosch et *al.*, 2013). En Algérie, cette maladie occupe la 2^{ème} place des cancers qui touchent les femmes, après le cancer du sein (Fritih et *al.*, 2010).

Ce cancer est, dans la majorité des cas, une pathologie d'origine infectieuse à évolution lente. Il met en moyenne entre 10 et 15 ans à se développer après une infection génitale persistante par certains *papillomavirus* humains oncogènes. Cette infection, sexuellement transmissible est favorisée par la précocité des rapports sexuels et la multiplicité des partenaires, constitue le facteur de risque majeur de ce cancer. L'infection persistante se traduit ensuite par des néoplasies cervicales intra-épithéliales (ou CIN) de différents grades. Ces lésions peuvent régresser spontanément, persister ou évoluer vers un cancer du col utérin (Centre Obstétrique et chirurgie gynécologique, 2010).

Du fait de son évolution lente et de l'existence de nombreuses lésions précancéreuses curables, le cancer du col peut être dépisté à un stade précoce et même être prévenu dans la quasi-totalité des cas s'il est dépisté aux premiers stades asymptomatiques. Le dépistage repose sur un test cytologique : le frottis cervico-utérin (FCU), lorsqu'il est anormal ce dernier doit être suivi d'investigations diagnostiques complémentaires (FCU de contrôle, test *Human papillomavirus* (HPV), coloscopie-biopsie, curetage de l'endocol, conisation, etc.) (Centre Obstétrique et chirurgie gynécologique, 2010).

Cependant, le test de Papanicolaou a une faible sensibilité pour la détection des maladies cervicales de haut grade et nécessite une formation et une expérience approfondie, ce qui peut générer de nombreux résultats équivoques, des cellules malpighiennes atypiques de signification indéterminées (ASCUS), qui nécessitent des tests répétés et un travail supplémentaire (Mayrand MH et *al.*, 2007). Ce qui a conduit au développement du test ADN-VPH pour améliorer les stratégies de dépistage du cancer du col de l'utérus. Il est utilisé comme test complémentaire pour tous les échantillons de cytologie cervicale. Mais des recherches plus approfondies ont montré que le triage des ASCUS à l'aide du test ADN-VPH n'était généralement pas considéré comme efficace en raison du manque de spécificité pour les lésions intraépithéliales cervicales de haut grade (Schiffman M et *al.*; 2010). Justifiant ainsi la nécessité de lier les marqueurs immunohistochimiques pour l'optimisation du diagnostic (Rokita et *al.*, 2012).

La p16 (p16INK4a) est une protéine suppresseur de tumeur qui inhibe les kinases dépendantes de la cycline qui régulent la progression dans le cycle cellulaire par phosphorylation de la protéine du rétinoblastome. L'expression immunohistochimique de p16INK4a peut être impliquée dans une boucle de rétroaction négative avec la protéine du rétinoblastome dans laquelle la fonction du rétinoblastome est réduite (inactivation par le HPV E7), ce qui entraîne une immunoexpression accrue de p16INK4a (Quint KD et *al.*, 2013 ; Liao GD et *al.*, 2014).

Le Ki67 est un marqueur de prolifération cellulaire, présent pendant toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, synthèse, G2 et mitose) mais absent dans la phase (G0). Des études ont décrit l'expression de Ki-67 dans le col normal, métaplasique et anormal, telle que détectée par immunohistochimie, Il est utile pour confirmer le diagnostic dans les cas ambigus (Yuanhang Zhu et *al.*, 2019).

Sur ce nous avons posé la problématique suivante : existe il une corrélation entre l'expression de ces bio marqueurs et le degré des dysplasies utérines et comment ces protéines peuvent elles intervenir dans le diagnostic ?

Pour répondre à cette question nous avons initialement collecté des prélèvements du col utérin. Ensuite nous avons réalisé une étude cytologique, histologique sur ces prélèvements. Puis nous voulions marquer ces échantillons par les protéines P16 et Ki67 en utilisant la technique d'immunohistochimie pour observer l'expression de ces protéines dans la dysplasie. Mais vu les circonstances de la pandémie mondiale du covid19 nous n'avons pas pu avancer dans notre travail expérimental et aller jusqu'aux résultats finaux. Par rapport à ces conditions nous avons travaillé sur un ensemble d'articles scientifiques qui montraient l'implication des protéines P16 et Ki67 dans les dysplasies cervico-utérines.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Anatomopathologie du col de l'utérus

I.1.1. Rappel Anatomophysiologique du col de l'utérus

Le col utérin est la portion fibromusculaire basse de l'utérus. Il est de forme cylindrique ou conique, et mesure de 3 à 4 cm de long pour 2.5 cm de diamètre (Figure 1) (Sellors et *al.*, 2004). Après un accouchement, il prend une forme en tonneau. L'accouchement déchire transversalement l'orifice externe du col qui perd son aspect circulaire caractéristique de la nullipare (Stevens et Lowe., 2002).

La portion du col s'étendant à l'extérieur de l'orifice externe est appelé "exocol". C'est la partie aisément visible du col lors d'un examen visuel avec le spéculum. La portion du col située à l'intérieur de l'orifice externe est appelée "endocol" (Sellors et *al.*, 2004).

Le col donne insertion au vagin qui le divise en trois parties : sus vaginale, vaginale et intra vaginale où cette dernière est accessible au toucher vaginale et au speculum. (Stevens et Lowe, 2002).

La physiologie du col de l'utérus concerne plusieurs fonctions principales, comme la sécrétion du mucus endocervical (Glaire cervicale) qui agit comme une barrière de protection prévenant contre les infections. Dans la cavité endométriale, il contribue à la lubrification vaginale pendant l'acte sexuel. Par ailleurs, au cours du cycle menstruel, pendant la phase de l'ovulation, le mucus devient très fluide avec un PH alcalin pour faciliter le déplacement des spermatozoïdes du vagin vers l'utérus (Stevens et Lowe, 2002).

Ainsi, le col de l'utérus joue un rôle important lors delà grossesse et de l'accouchement, il s'ouvre pour faciliter le passage du bébé (Institut National du Cancer ,2011).

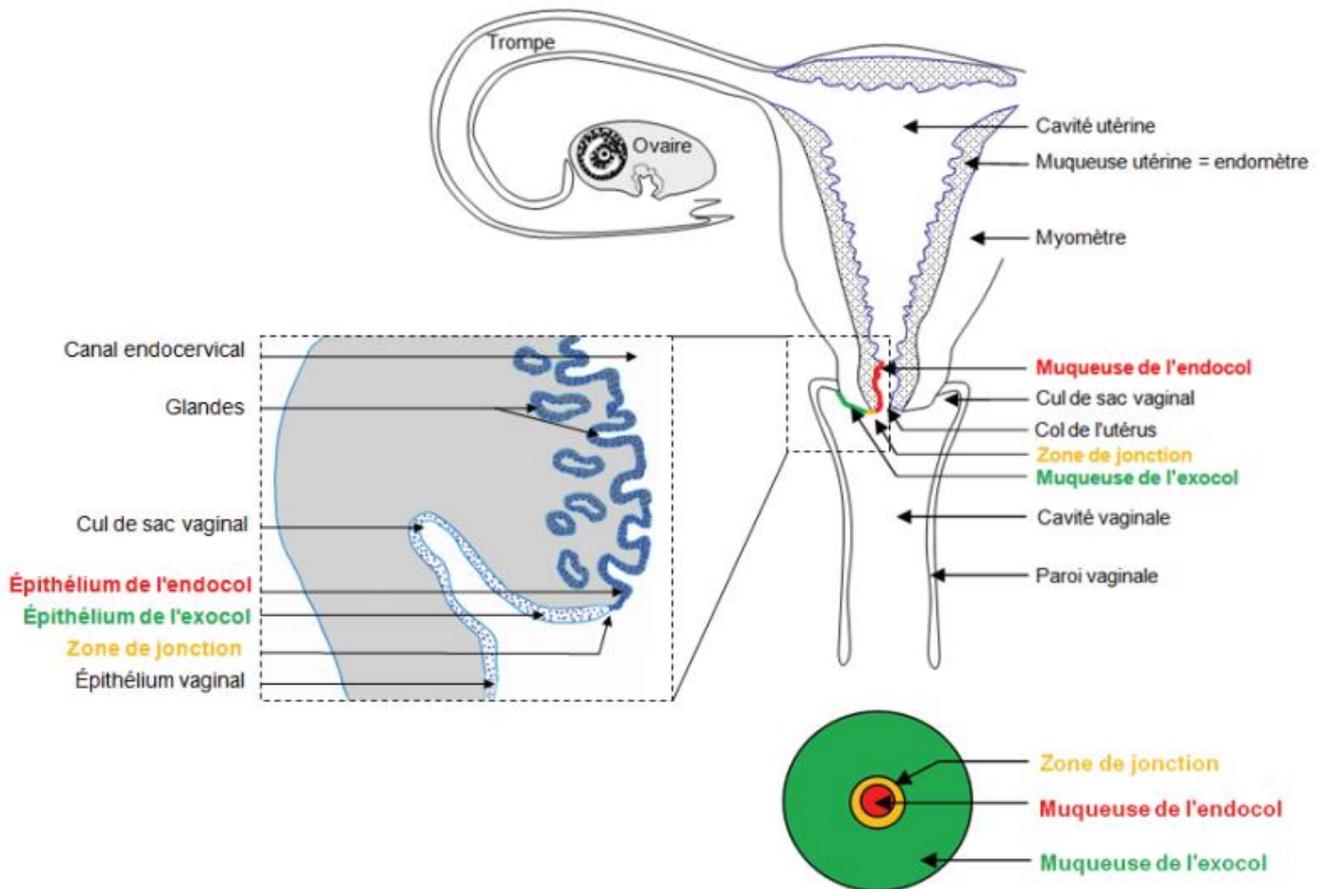


Figure 1 : Anatomie du col de l'utérus (Beaudin., 2015).

I.1.2. Histologie du col de l'utérus

Sur le plan histologique la paroi du col de l'utérus constituée de : l'exocol et l'endocol sont deux parties caractérisées par des structures cellulaires différentes. Le contact entre ces deux dernières est appelé la jonction squamocylindrique ou pavimento-cylindrique (Figure 2) (Lansac et *al.*, 2002).

I.1.2.1. Muqueuse exocervicale

C'est la portion la plus facilement visible, il est recouvert par un épithélium en continuité de celui du vagin. Comme l'épithélium pavimenteux du vagin, l'épithélium de l'exocol est pavimenteux stratifié appelé épithélium malpighien non kératinisant de couleur rose constitué de plusieurs couches de cellules, riche en glycogène durant la période de maturité sexuelle (Stevens et Lowe, 2002).

I.1.2.2. Muqueuse endocervicale

C'est la portion la moins visible, il est revêtu par un épithélium simple, cylindrique haut, muco-sécrétant (Stevens et Lowe, 2002). L'épithélium de l'endocol est plissé en cryptes ressemblant faussement à des glandes. Son renouvellement s'effectue à partir de cellules de réserve encore indifférenciées, disposées en couche discontinue. Dans certaines conditions pathologiques, ces éléments se multiplient et présentent une différenciation malpighienne à l'origine des épithéliums métaplasiques (Lansac *et al.*, 2002).

I.1.2.3. Zone de jonction

La jonction pavimento-cylindrique (JPC) est la zone de rencontre de deux types d'épithélium pavimenteux et cylindrique. La différence d'épaisseur entre ces deux épithéliums est marquée par une dénivellation. La localisation de la JPC originelle varie avec l'âge de la femme, son statut hormonal, l'utilisation ou non d'une contraception orale (OMS, 2007). Ainsi, cette zone est considérée comme la cible des HPV et le lieu de naissance de la majorité des lésions cervicales (Burghardt et Ostor, 1983). Elle est composée de cellules malpighiennes métaplasiques dérivées des cellules souches de l'endocol (Deng *et al.*, 2019).

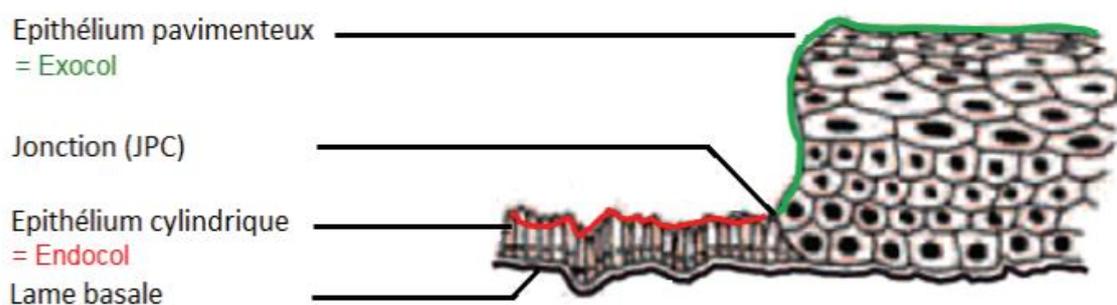


Figure 2 : Jonction pavimento-cylindrique (Beaudin, 2015).

I.2. Histoire naturelle du cancer du col d'utérus

Le cancer du col de l'utérus représente l'une des causes qui provoquent le décès chez les femmes dans le monde (Parkin, 2006). Il résulte de la prolifération anormale des cellules du col. Ainsi, il se développe de manière lente >> 15 à 20 ans. La plupart des anomalies cervicales sont induites après une persistance de l'infection papillomavirus à haut risques oncogène qui induit une transformation néoplasique du revêtement qui peuvent évoluer vers un cancer du col (Sellors et al., 2004).

Quatre-vingt-dix pour cent (90%) sont des carcinomes cellulaires épidermoïdes qui débutent au niveau de la zone de remaniement de l'exocol ; les 10 % restants sont des adénocarcinomes qui se développent dans la couche cylindrique glandulaire de l'endocol (OMS 2007).

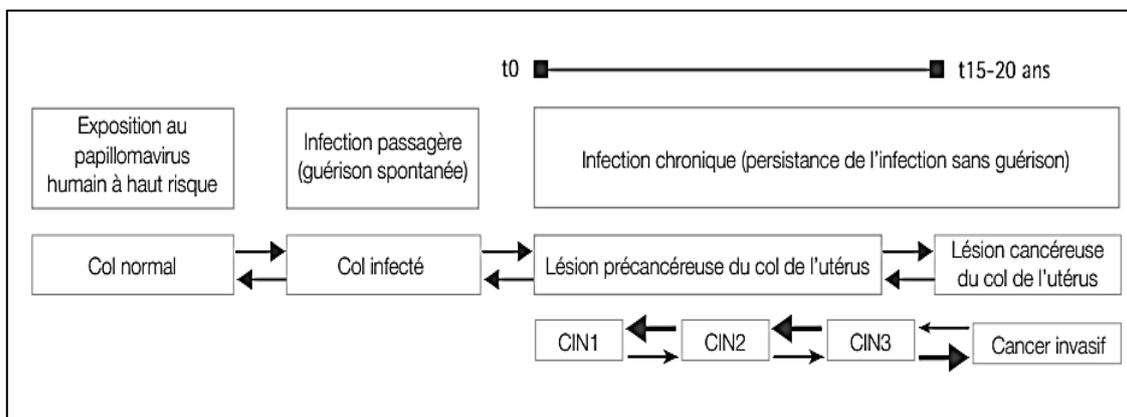


Figure 3 : Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus et de l'infection par le papillomavirus humain (Haute Autorité de Santé, 2013).

I.2.1. Infection par des HPV haut risque

Les infections par certains papillomavirus dites à haut risque sont la cause principale de la plupart des cancers du col de l'utérus et des lésions précancéreuses. Ils peuvent pénétrer dans les cellules basales de la zone de transformation et donner naissance à une lésion condylomateuse, pure, associée à une transformation néoplasique du revêtement (Tranbaloc, 2008). Les types 16 et 18 sont les plus fréquemment persistants dans le cancer invasif, ainsi qu'il y a d'autres types de HPV à haut risque (Type 31, 33, 45 et 58) qui sont moins fréquents et non associés à la survenue d'un cancer du col de l'utérus (OMS, 2007). Contrairement, les deux types de HPV à faible risque (6 et 11) sont responsables de la majorité des verrues génitales appelées condylomes (OMS, 2007).

Ces virus sont classés selon deux critères : en fonction de leurs tropisme cutané et tropisme muqueux et aussi en fonction de leur potentiel oncogène (Tableau I), cette classification étant basée sur le risque de cancer du col de l’utérus associé à HPV (Segondy,2013).

Tableau. I : Classification des HPV selon leur potentiel oncogène .

Classification	Types
Haut risque	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Haut risque probable	26, 53, 66, 68, 73, 82
Bas risque	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

(Segondy, 2008).

I.2.1.1. Structure des HPV :

Les HPV sont des virus non enveloppés, de petite taille, très résistants. Leur génome est une molécule d’ADN circulaire, constituée d’environ 8 000 paires de nucléotides (Schiffman et al., 2005). Ils possèdent une capsid à symétrie cubique en structure icosaédrique, de 55 nm et ils se répliquent dans le noyau cellulaire (Figure 4). Virus nus, ils sont particulièrement résistants dans le milieu extérieur (froid, solvants organiques, détergents) (Bernard et al., 2010). Plus de 200 génotypes de PVH ont été identifiés et la séquence nucléotidique complète du génome de 96 d’entre eux (PVH1 à PVH96) a été établie (Schiffman et al 2005).

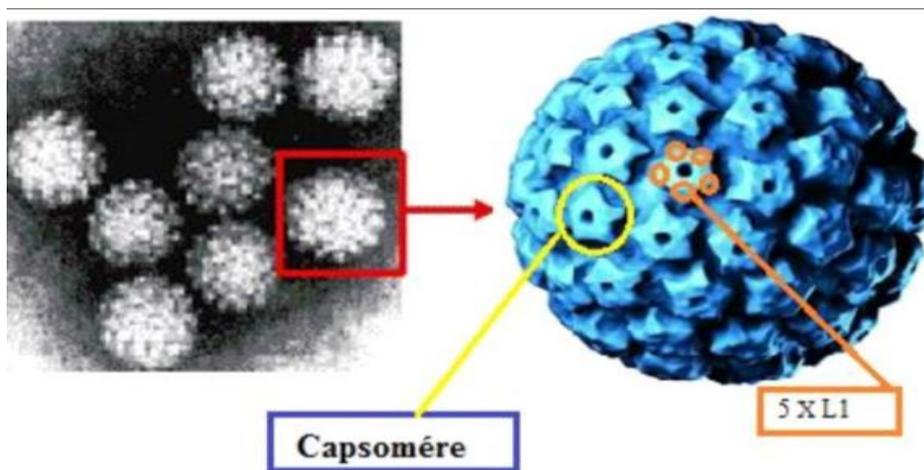


Figure 4 : Représentation d’une particule virale de HPV : modèle atomique de la capsid et modèle schématique (Bousarghin, 2009).

Les séquences codant les protéines virales sont regroupées sur un seul brin d'ADN en phase ouverte de lecture (Open Reading Frame, ORF). Les ORF sont groupées en une région E (pour Early), codant les protéines non structurales dites « précoces », E1, E2, E4, E5, E6 et E7 et en région L (pour Late), codant les protéines de capsid, L1 et L2 (tableau II). Il existe une région non codante appelée LCR (Long Control Region) qui contient principalement des séquences régulatrices de la réplication et de la transcription (Essaada Belglaiiaa, 2015).

Tableau II : Rôle des protéines de Papillomavirus à haut risque

Protéine	Fonction
E1	Réplication de l'ADN viral
E2	Réplication, régulation de la transcription
E3	Pas de fonction connue
E4	Maturation des virions
E5	Stimulation de la prolifération cellulaire
E6	Protéine oncogène, favorise la dégradation de la protéine p53
E7	Protéine oncogène, favorise la dégradation de la protéine de susceptibilité au rétinoblastome p105Rb
E8	Pas de fonction connue
L1	Protéine majeure de capsid
L2	Protéine mineure de capsid

(Monsonogo, 2006).

I.2.1.2. Cycle viral

Le cycle de vie du VPH commence par l'infection des cellules souches dans la couche basale de l'épithélium. Après l'entrée dans les cellules, le virus a besoin de l'expression des gènes E1 et E2 pour maintenir un faible nombre de copies du génome. Ces protéines se lient à l'origine virale de la réplication et recrutent les ADN-polymérase cellulaires et d'autres protéines nécessaires à la réplication de l'ADN (Hamid et *al.*, 2009). Dans la couche suprabasale, l'expression des gènes E1, E2, E5, E6 et E7 contribue au maintien du génome viral et induit une prolifération cellulaire, augmentant le nombre de cellules infectées par le HPV dans l'épithélium, ce qui se traduit par un nombre plus élevé de cellules qui finiront par produire des virions infectieux (Figure 5) (Hamid et Gston, 2009 ; Lazarczyk et *al.*, 2009). Dans les cellules les plus différenciées de cette même couche de l'épithélium se produit

l'activation du promoteur dépendant de la différenciation et le maintien de l'expression des gènes E1, E2, E6 et E7. En outre, il y aura une activation de l'expression du gène E4, dont le produit induira une amplification de la réplication du génome viral, augmentant considérablement le nombre de copies du virus par cellule, en même temps que se produit l'expression des gènes L1 et L2 (Nakahara et *al.*, 2005 ; Lazarczyk et *al.*, 2009). Dans la couche granulaire, les produits des gènes tardifs, les protéines majeures et mineures de la capside virale, respectivement L1 et L2, se rassemblent pour assembler les capsides virales et les formations de virions, qui atteignent la couche cornée de l'épithélium et sont libérés (Lazarczyk et *al.*, 2009). Pour une meilleure compréhension, le cycle de vie du HPV a été divisé en deux parties : une phase de maintien et une phase dépendant de la différenciation (Bodily et Laimins, 2011).

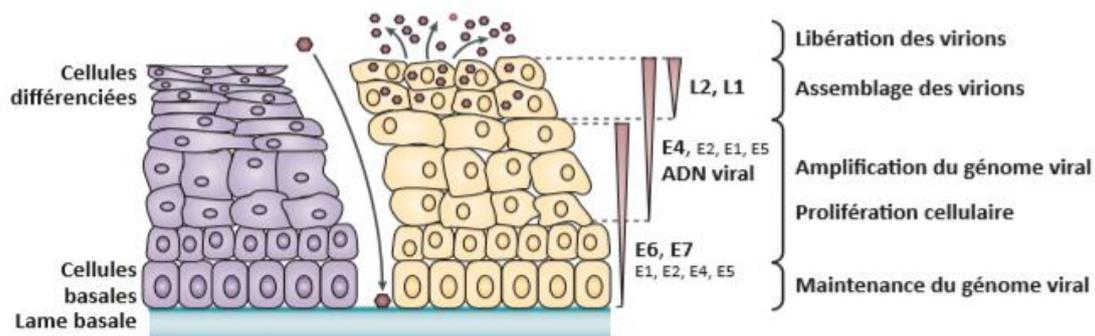


Figure 5 : Déroulement du cycle viral des HPV après infection d'un épithélium malpighien.
Schéma modifié d'après (Middleton et *al.*, 2003; Moody et Laimins, 2010).

I.2.1.3. Mode de transmission des HPV

***Contact direct :** Tandis que l'infection à HPV est exceptionnelle chez la femme vierge, dont la prévalence est de 2%, elle est très fréquente chez les femmes en période d'activité sexuelle (Gavillon et *al.*, 2010). 70 à 80% des femmes sont exposées au moins une fois à ce virus au cours de leur vie sexuelle, ce qui montre une importante contagiosité (Monsonogo, 2007). Cette transmission se fait directement par contact peau à peau et non par le sperme ou le sang (Monsonogo, 2006).

***Contact indirect :** Contact avec des objets (vêtements, serviettes de toilette, draps...) et surfaces contaminés (piscines et douches favorisent la propagation des verrues plantaires).

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

I.2.1.4. Mécanisme de cancérogenèse

Un autre événement important dans la progression des lésions associées à HPV est la surexpression anormale des oncogènes viraux (Gray et *al.*, 2010). Plusieurs mécanismes moléculaires ont été décrits pour expliquer la dérégulation de E6 et E7, comme la mutation et l'intégration du génome viral, la modification des marques épigénétiques contrôlant l'expression du génome viral, mais aussi l'entrée du virus dans un type de cellule non-permissive à la réplication virale (Steenbergen et *al.*, 2014; Groves et Coleman, 2015; Schiffman et *al.*, 2016). Les oncoprotéines E6 et E7, sont des protéines multifonctionnelles majeures des HPV à haut risque, elles induisent de nombreux changements au sein de la cellule hôte. Cette dernière possède des protéines suppresseur de la tumeur, la pRb et la P53 avec lesquelles elles vont interagir (Robinson, 2005).

L'oncoprotéine E7 se lie avec une forte affinité aux protéines suppresseurs de tumeur de la famille pRb qui est une protéine de régulation du cycle. Les formes hypophosphorylées de pRb agissent comme des inhibiteurs de la prolifération et empêchent l'entrée en phase S des cellules. Les protéines E7 des HPV à haut risque forment préférentiellement des complexes avec la forme hypophosphorylée de pRb. Cela conduit à l'inactivation fonctionnelle de pRb, au passage de G1/S, et à la progression dans la phase S (Aubin et *al.*, 2003).

L'oncoprotéine E6, en coopération avec E7, joue aussi un rôle important dans l'immortalisation et la transformation des cellules. E6 a la propriété d'interagir avec la protéine suppresseur de tumeur p53. Cette protéine fonctionne comme un intégrateur de signaux et peut percevoir un stress cellulaire tel que des agressions génotoxiques ou cytotoxiques. La protéine p53 est notamment impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN et retarde la progression du cycle des cellules lorsque l'ADN est altéré afin de permettre sa réparation. Si les lésions sont irréversibles, p53 peut initier la voie apoptotique conduisant à la mort cellulaire. E6 favorise la dégradation de p53, ce qui stimule la progression cellulaire (Figure 6) (Aubin et *al.*, 2003).

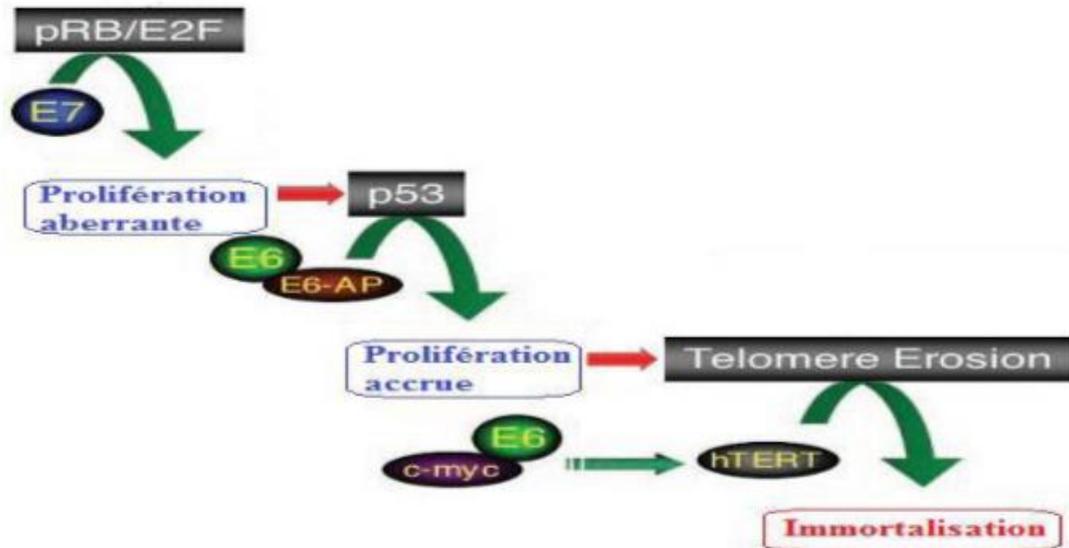


Figure 6 : Modulation des molécules de cycle cellulaire par les oncoprotéines E6 et E7
(Münger et *al.*, 2004)

I.2.2. Développement des Lésions précancéreuses

Les HPV vont favoriser le développement de lésions précancéreuses qui débutent le plus souvent à la zone de jonction et s'étendent plus rarement le long de l'exocol et du canal endocervical (Aubin, 2003; Dachez, 2008).

Parmi les lésions liées à l'infection à HPV productive : les condylomes et les néoplasies intra-épithéliales

- **Les condylomes :** acuminés correspondent à des verrues bénignes dont l'aspect le plus fréquent ressemble à des « crêtes de coq ». Ils sont très fréquents mais n'entraînent aucun risque d'évolution vers une lésion précancéreuse car elles sont associées à des HPV à bas risque qu'ont ne détecte presque pas dans les cancers du col (Gompel et Koss 1996).
- **Les néoplasies intra-épithéliales :** Les lésions précancéreuses sont appelées soit dysplasies (légères, moyenne ou sévères) selon L'OMS, soit néoplasies cervicales intra-épithéliales selon la classification de Ralph Richart (CIN 1, 2 et 3). elles se définissent par la présence d'anomalies cellulaires et architecturales de l'épithélium pavimenteux, au niveau de la zone de jonction du col de l'utérus suite a la persistance a l'infection HPV à haut risque (Mélanie,2009).

Diverses classifications ont été proposées pour caractériser les différentes lésions dont la classification de Richart 1990 qui est une classification histologique et la classification de

Bethesda 2001 considéré comme étant la plus récente est la plus recommandée pour la formulation cytologique , qui divise plutôt les lésions pré invasives en deux groupes :

- les lésions de bas-grade ou (L-SIL) : (Low Squamous Intraepithelial Lesion) lésions malpighiennes intra épithélial de bas grade correspondant à CIN1
- les lésions de haut-grade (H-SIL) : (High-Squamous Intraepithelial Lesion) lésions malpighiennes de haut grade regroupant CIN2 et CIN3

Ces classifications sont illustrées dans le tableau III :

Tableau III : Différentes classifications des lésions épidermoïdes du col utérin

OMS	Richart	Bethesda
Dysplasie légère	Condylome Néoplasie cervicale intra-épithéliale de grade 1 (CIN1) avec Koilocytose	Lésion épidermoïde intra-épithéliale de bas grade (LSIL)
Dysplasie moyenne	CIN2 avec ou sans Koilocytose	Lésion épidermoïde intra-épithéliale de haut grade (HSIL)
Dysplasie sévère	CIN3 avec ou sans Koilocytose	
Carcinome <i>in situ</i> (CIS)		
Carcinome épidermoïde invasif	Carcinome épidermoïde invasif	Carcinome épidermoïde invasif

(Walker et al, 2001).

Pour chaque lésion cervicale précancéreuse, il existe une probabilité de régression (de 32 à 57%) en fonction de la gravite de la lésion) vers un épithélium normal accompagnant la clairance virale (Duport,2008) et 2/3 des CIN 3 évoluent vers un cancer invasif dans un délai de 3 à 20 ans si elles restent non traitées (Rampale,2000).

I.2.3.Progression des lésions précancéreuses vers le cancer invasif

Le Cancer du col de l’utérus est dans 80 à 90% des cas un carcinome épidermoïde (se développant à partir de l’épithélium malpighien de l’exocol) et dans 10 à 20% des cas un adénocarcinome (se développant à partir de l’épithélium cylindrique de l’endocol) (Duport et al., 2014).

1- Carcinome épidermoïde

Il est développé dans l'exocol à partir des cellules épidermoïdes et surtout à partir de la zone de jonction et dans l'endocol, après changement de la muqueuse glandulaire en muqueuse épidermoïde (Boubli et *al.*, 2005).

Le carcinome épidermoïde peut être soit : in situ – micro-invasif ou invasif

1-1 Carcinome in situ

Dans le carcinome in situ il y a une prolifération de cellules épithéliales sans masse tumorale apparente, sans franchissement de la membrane basale.

A l'examen histologique, ce carcinome peut être détecté par l'existence de signe cytologique de malignité touchant toutes les couches cellulaires de l'épithélium et à l'origine d'une discontinuité nette entre l'épithélium tumoral et l'épithélium normal, il s'agit d'une forte densité cellulaire, une basophilie cytoplasmique et une augmentation du rapport nucléocytoplasmique (Stevens et *al.*, 2004).

1-2 Carcinome micro-invasif

Dans le carcinome micro-invasif il existe une rupture de la membrane basale et une invasion du stroma par les cellules malignes, le potentiel métastatique de la lésion est encore limité (Stevens et *al.*, 2004).

1-3 Carcinome invasif

Lorsque les cellules malignes ont perforé la lame basale et envahi le tissu conjonctif sous-jacent, il s'agit d'un cancer invasif (Baldauf., 2006).

2- Adénocarcinomes

Ils sont développés à partir des cellules épithéliales du canal endocervical et des glandes. Ces adénocarcinome se développent dans l'endocol à partir des cellules normalement présentes dans les revêtements épithéliaux et dans les glandes et sont mucosécrétantes.

2-1-Adénocarcinome « in situ »

Il présente le précurseur immédiat de l'adénocarcinome infiltrant, caractérisé par une exfoliation de cellules malignes allongées ou cylindriques hyperchromatiques. Ces cellules pouvant être ciliées, sont isolées ou regroupées en petits amas empilés de manière pseudo stratifiée. Les nucléoles sont proéminent et assez nombreux, alors que le cytoplasme présente des vacilles ou du mucus (Bouhadeh et *al.*,2005).

2-2 Adénocarcinome invasif

C'est un carcinome développé à partir des glandes endocervicales après rupture de la membrane basale des glandes et les plans musculaires sous-muqueux (Boubli et *al.*,2005). Ces adénocarcinomes sont classés selon leurs degrés de différenciation en trois catégories :

- a- L'adénocarcinome bien différencié
- b- L'adénocarcinome bien différencié à mucus
- c- L'adénocarcinome peu différencié

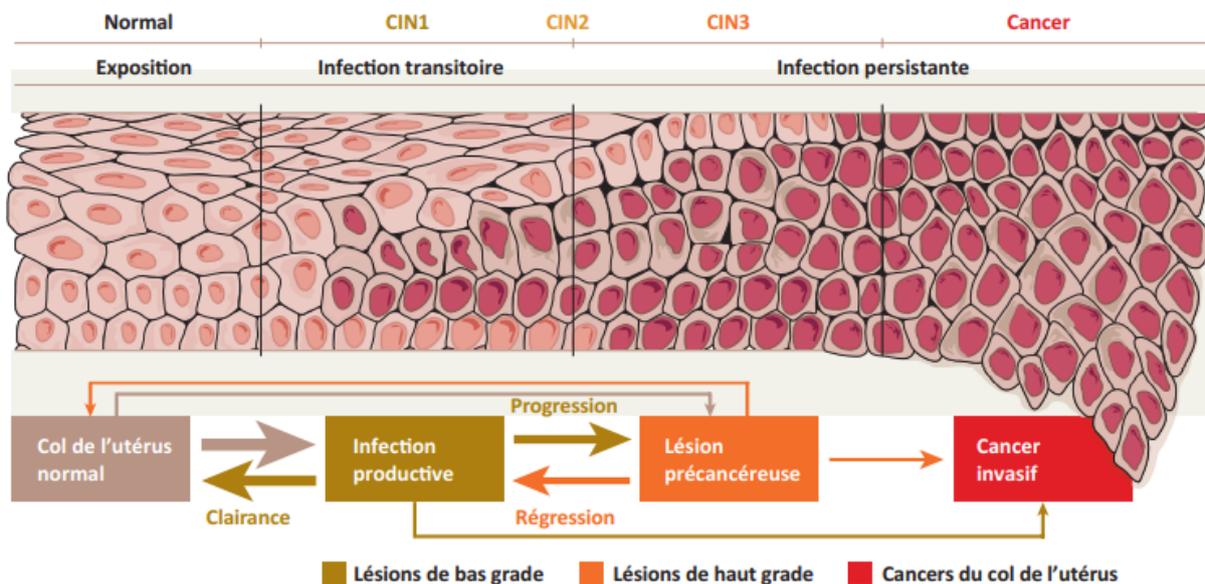


Figure 7 : Développement histologique du cancer du col utérin (Crow, 2012)

I.3. Caractéristiques cytologiques et histologiques des lésions intra épithéliales :

Les dysplasies cervicales sont caractérisées par une prolifération cellulaire anormale, une maturation épithéliale anormale et une atypie cytologique (Joseph *et al.*, 2006). Seul l'examen histologique d'une biopsie cervicale ou d'une pièce d'exérèse permet d'établir un diagnostic définitif de CIN (Sellors, *et al.*, 2004). Donc pour diagnostiquer la CIN histologiquement, il est nécessaire qu'il y ait, sur toute l'épaisseur de l'épithélium un certain degré d'anomalie nucléaire. Le degré dépend du large mesure, du niveau de l'épithélium où commence la maturation cytoplasmique et du niveau auquel s'étendent les cellules indifférenciées « basaloides » (Joseph *et al.*, 2006).

I.3.1. Lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade (CIN 1) :

○ Cytologie :

Les modifications cellulaires intéressent les cellules superficielles et intermédiaires. Pendant les différentes étapes de la réplication virale, la cellule malpighienne de l'hôte subit plusieurs types de modifications :

- **Modifications nucléaires** : présence d'une dyskaryose qui correspond à l'augmentation du volume nucléaire (jusqu'à trois fois la normale), à la densification de la chromatine et à l'irrégularité des contours, avec ou sans binucléations ou multi-nucléations (Baldauf *et al.*, 2013).
- **Modifications cytoplasmiques** : présence d'un halo clair périnucléaire et d'une densification cytoplasmique périphérique qui définissent les koilocytes (en grec koilos signifie vide, terme introduit par Kross et Durfee en 1956) (Annexes 1, figure 26) (Baldauf *et al.*, 2013).
- Modifications nucléaires et cytoplasmiques caractérisant la parakératose qui associe pycnose, allongement, hyperchromatisme, irrégularité nucléaire associée à une densification et éosinophilie du cytoplasme avec augmentation du rapport nucléocytoplasmique. La parakératose atypique n'est pas spécifique d'une lésion intra-épithéliale de bas grade, elle peut accompagner une lésion de grade plus élevé ou un carcinome malpighien invasif kératinisant. Pour le diagnostic d'une lésion intra-épithéliale de bas grade, deux des trois critères sont nécessaires (Baldauf *et al.*, 2013).

○ **Histologie :**

La lésion siège sur une muqueuse métaplasique de type malpighien. L'épithélium est généralement d'épaisseur normale. Il existe dans l'épaisseur du tiers profond du revêtement une hyperplasie cellulaire. Les cellules de la couche basale sont plus nombreuses que normalement, étagées sur plusieurs assises. Leurs noyaux sont augmentés de taille et présentent des mitoses en nombre modéré (Annexes 1, figure 27) (HUGOL, 2002). Dans les CIN1, les modifications cyto-nucléaires (dyskaryose, koïlocytose, parakératose) concernent les couches superficielles et intermédiaires associées à une légère hyperplasie des cellules basales et parabasales, sans perte de la maturation (Baldauf et *al.*, 2013).

I.3.2. Lésions malpighiennes intra-épithéliales de haut grade (CIN2 et CIN3) :

○ **Cytologie :**

Les cellules atypiques sont d'aspect immature de type basal ou parabasal, c'est-à-dire de taille plus petite que celles d'une LSIL et révèlent un rapport nucléocytoplasmique et une densité nucléaire augmentés. Les noyaux sont de taille augmentée, hyperchromatiques avec contours irréguliers de la membrane nucléaire. Le cytoplasme est réduit, pâle ou dense, orangeophile dans les cellules dyskératosiques atypiques provenant de la parakératose atypique (Baldauf, J et *al.*, 2013).

Les cellules atypiques peuvent être de taille très petite. Elles sont souvent isolées ou regroupées en amas syncytiaux. Leur ressemblance avec des cellules métaplasiques immatures, glandulaires dystrophiques ou atrophiques est parfois responsable d'un diagnostic faux négatif ou faux positif (Annexes 1, figure 28) (Baldauf, J et *al.*, 2013).

○ **Histologie:**

La caractéristique principale des HSIL est la perte de maturation du revêtement avec des cellules parabasales/basales atypiques occupant les deux tiers de l'épaisseur épithéliale dans les CIN2 (Annexes 1, figure 29) et la totalité de l'épaisseur dans les CIN3 (Annexes 1, figure 30).

Ces cellules se caractérisent par:

- Un aspect syncytial dans les couches basales et parabasales ;
- Des koïlocytes rares ou absents, et à petit halo clair ;
- Un rapport nucléocytoplasmique élevé des cellules superficielles ;

- Des mitoses fréquentes jusqu'aux deux tiers dans les CIN2, sur toute l'épaisseur dans les CIN3 (Baldauf, J et *al.*, 2013).

I.3.3 Histopathologie du cancer du col de l'utérus

A l'examen microscopique, on distingue dans la plupart des types du cancer du col de l'utérus, une grande diversité tant du point de vue des caractéristiques tumorales, des types cellulaires et du degré de différenciation.

○ **Le carcinome épidermoïde invasif kératinisant**

Le carcinome épidermoïde kératinisant est constitué de volutes caractéristiques de cellules épidermoïdes contenant des nids centraux de kératine (perles de kératine) (Annexes1, figure 31). Leurs noyaux sont volumineux et hyperchromatiques, avec une chromatine sous forme de grains. On distingue des ponts intercellulaires, ainsi que des granules de kératohyaline et une kératinisation cytoplasmique. Il y a peu de figures mitotiques visibles (Sellors, et *al.*, 2004).

○ **Adénocarcinome invasif**

Adénocarcinome invasif débute à partir de l'épithélium glandulaire au niveau du canal endocervical. L'adénocarcinome de type endocervical est la forme la plus fréquente. On observe alors des glandes anormales de forme et de taille variées avec des bourgeonnements et des ramifications (Annexes 1, figure 32). La plupart de ces tumeurs sont modérément à bien différenciées. Les éléments glandulaires sont agencés en un motif complexe. Il peut y avoir des projections papillaires dans la lumière glandulaire et en surface. Quelques-unes des cellules contiennent parfois une quantité modérée ou importante de mucine (Sellors, et *al.*, 2004).

I.4. Immunohistochimie et les biomarqueurs P16 et Ki67

Comme l'HPV à haut risque est associé à des altérations du cycle cellulaire, il existe une corrélation décrite entre les niveaux d'expression de Ki67 et la progression du HPV infectieux dans les dysplasies utérines (Keuting, et *al.*, 2001). Ainsi, une association a été identifiée entre l'expression des biomarqueurs P16 et Ki67 chez les patientes diagnostiquées avec le HPV (Ziemke, et *al.*, 2012).

Ces biomarqueurs peuvent être utilisés comme compléments à l'histopathologie pour démontrer la capacité de surmonter les problèmes avec des résultats faux positifs et faux négatifs ce qui améliore la précision diagnostique et le classement des CIN associés au HPV

(Hu.L et *al.*, 2005 ; Klaes.R et *al.*, 2002). Ils peuvent être appliqués sur un matériel cytologique et histologique.

○ La protéine Ki67

Ki67 est une protéine nucléaire et nucléolaire exprimée pendant les phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) sauf la phase G0 où les cellules sont dans un stade quiescent, ainsi elle est considérée comme un indicateur de prolifération cellulaire. Dans la muqueuse malpighienne normale, l'expression du marqueur de prolifération Ki67 se trouve limitée aux cellules basales et parabasales de l'épithélium (Figure 8). Sa détection immunohistochimique se fait par un antigène monoclonale MIB-1 (Brown ,2012).

En effet, au cours d'une infection par un HPV oncogène la protéine Ki67est surexprimée dans les lésions néoplasiques intraépithéliales(CIN), mais aussi elle peut être exprimée dans les cellules basales normales qui ont une capacité proliférative (Figure 9) (Grigore et *al.*, 2013).

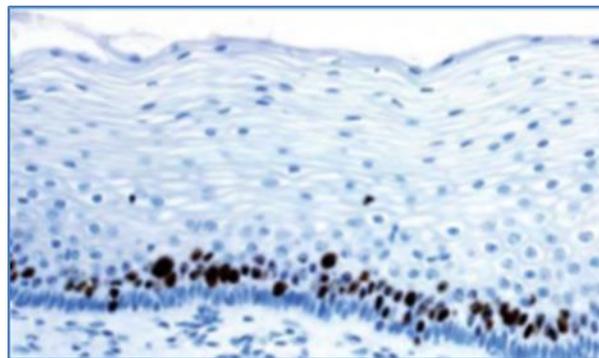


Figure 8 : Expression du Ki-67 dans une muqueuse normale avec positivité strictement limitée aux assises basales. (Sebatien, 2010).

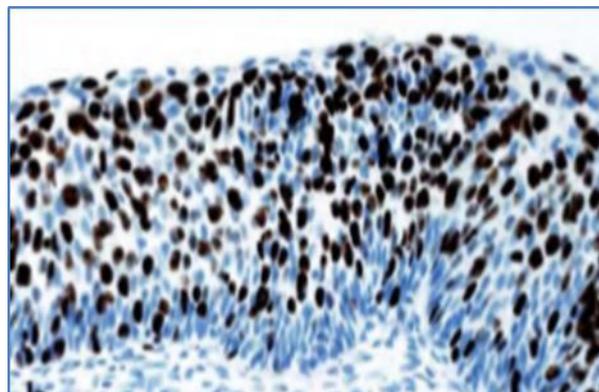


Figure 9 : Expression du Ki-67 dans une lésion de CIN3 avec expression de plus de 50% des cellules dysplasiques sur toute la hauteur du revêtement. (Sebatien,2010).

o La protéine P16

La protéine P16 représente un suppresseur de tumeur, est un inhibiteur des kinases qui régule la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Ortega et *al.*, 2002). Ainsi, la P16 est un biomarqueur moléculaire qui témoigne l'expression des onco-protéines virales E6 et E7 dans les cellules dysplasiques au cours d'une infection persistante par HPV à haut risque (Bergeron, 2010). Ces onco-protéines virales des HPV oncogènes se fixent spécifiquement à des protéines cellulaires codées par des gènes suppresseurs du cancer, respectivement P53 et pRb (Scheffner et *al.*, 1990).

A l'état normal, au niveau moléculaire, la fixation de la protéine de gène rétinoblastome (pRb) au facteur de transcription E2F empêche la transcription des gènes qui favorisent l'activation du cycle cellulaire (Figure 10). Lors d'une infection persistante par l'HPV à haut risque, l'onco-protéine E7 prend la place de E2F et associé au pRb ce qui entraîne la libération de facteur de transcription E2F. Cela aboutit à un important rétrocontrôle négatif sur la répression de la transcription du gène P16 (Figure 10) (Bergeron, 2010).

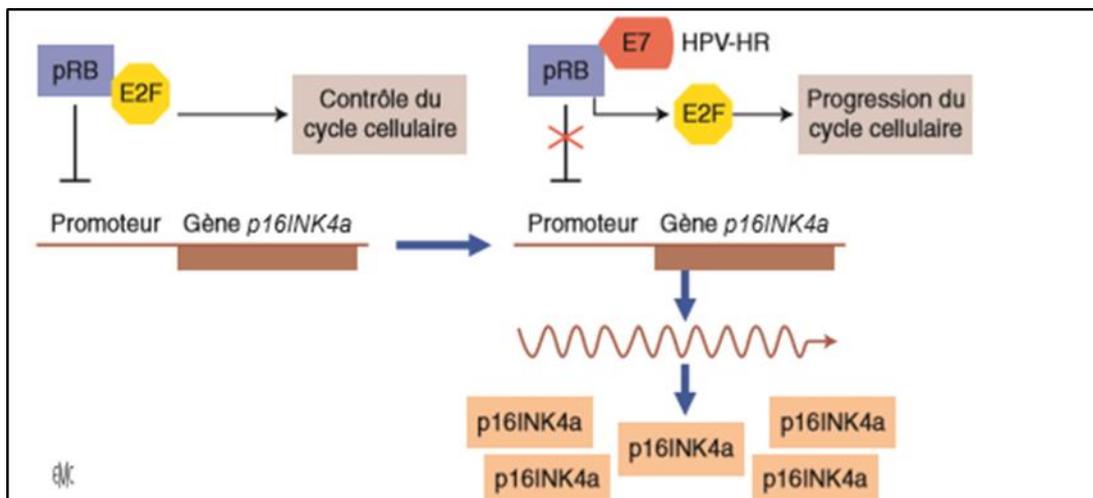


Figure 10 : Mécanisme de surexpression de la P16INK4a (D'après mtm laboratories)
(Baldauf et *al.*, 2013).

Par ailleurs, l'onco-protéine virale E6 a la propriété de se lier à la protéine P53 et contribue à la dégradation de cette dernière (Crook et *al.*, 1991).

La surexpression de la P16 est donc un outil aide diagnostic, montrant non seulement la présence d'une infection par HPV oncogène, mais aussi l'expression de l'onco-protéine E7 correspondant à une infection transformante (Bergeron , 2010).

La grande majorité des tumeurs cervicales HR-HPV positives présentent une forte expression de P16INK4a . La surexpression de P16INK4a est un indicateur de l'expression aberrante des oncogènes viraux et de la transformation induite par le HPV des cellules épithéliales. Parallèlement à la détection de l' expression de P16INK4a dans la majorité des tumeurs cervicales HR-HPV positives, une hyperméthylation du promoteur p16 INK4a a été démontrée dans 25 à 57% des carcinomes cervicaux par PCR spécifique de méthylation. L'hyperméthylation du promoteur p16 INK4a est un mécanisme bien connu de suppression de la transcription génique, donc la coexistence à la fois de la surexpression de p16 ink4a et de l'hyperméthylation du promoteur du gène dans un cancer du col de l'utérus doit être examinée plus avant (Ivanova et *al.*, 2007).

L'interprétation des prélèvements histologiques du col utérin reste subjective et présente une faible reproductibilité, en particulier dans le diagnostic des CIN1. L'immunomarquage de la p16 est présent au niveau des couches basales de l'épithélium malpighien de manière diffuse dans les CIN de bas grade (CIN1) (Figure 11) et remonte dans les couches intermédiaires et superficielles dans les CIN de haut grade (CIN2 et CIN3) (Figure12,13). La détection de la p16 a donc été utilisée pour tester la reproductibilité du diagnostic histologique sur des prélèvements du col utérin avec un diagnostic de CIN1, CIN2 ou CIN3 (Bergeron, 2010).

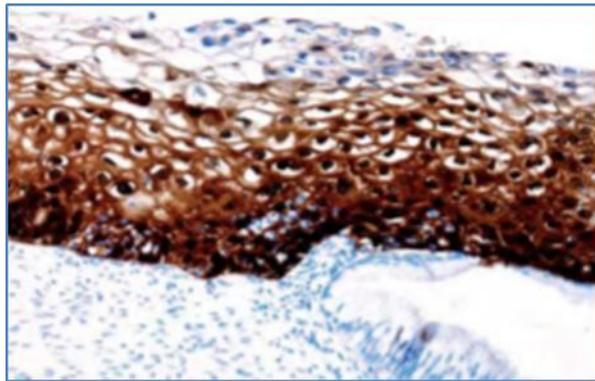


Figure 11 : Marquage positif de la p16 diffus et continu prédominant dans les assises inférieures (lésion de CIN1). (Sebatien, 2010)

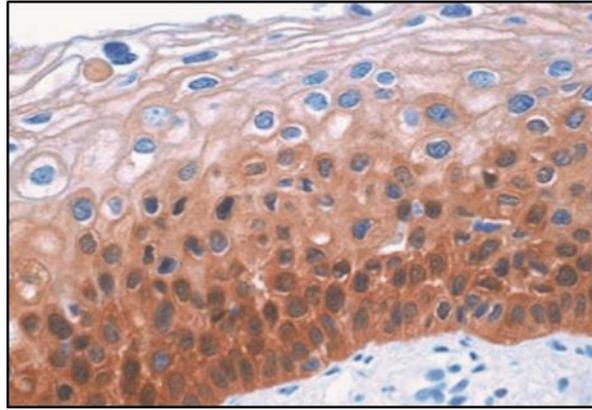


Figure 12 : Marquage positif de la p16 diffus et intense dans toutes les couches du revêtement (lésion de CIN2) (Bergeron et *al.*, 2010).

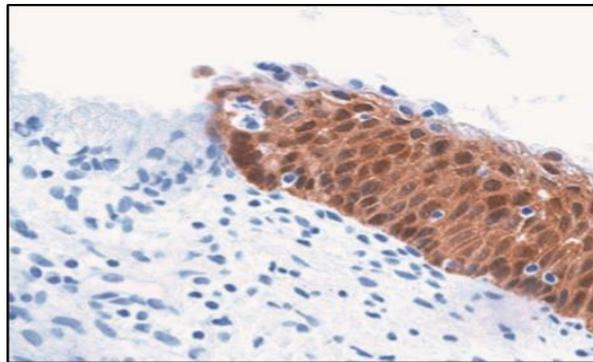


Figure 13 : Marquage positif de la p16 diffus et intense de toutes les couches du revêtement (lésion de CIN3) (Bergeron et *al.*, 2010).

I.5. Techniques de dépistage et de diagnostic du cancer du col de l'utérus:

Le dépistage du cancer du col de l'utérus est l'utilisation systématique d'un test pour déceler les anomalies du col de l'utérus dans une population asymptomatique. Les femmes ciblées par ce dépistage peuvent se sentir en parfaite santé et ne voir aucune raison de se rendre dans une structure de soins (OMS, 2013).

Le cancer du col de l'utérus est l'un des cancers rares que l'on peut diagnostiquer et traiter tôt car il est asymptomatique (le cancer in situ est totalement asymptomatique, tandis que le cancer micro-invasif peut également être asymptomatique), cependant, ils peuvent parfois entraîner des symptômes qui pousseront le patient à consulter le médecin (Isautier, 2012).

Ces différents symptômes peuvent être :

- Une métrorragie provoquée, post-coïtale, c'est-à-dire un saignement génital survenant après une relation sexuelle ;
- Une métrorragie spontanée, survenant en dehors de la période des règles ;
- Une leucorrhée ;
- Une dyspareunie, douleur lors des rapports sexuels ;
- Des douleurs et une difficulté à uriner (Isautier, 2012).

Après un examen clinique et en fonction de la situation de la patiente Le médecin effectue différents examens.

- **Examens cytologiques** : cet examen concerne le frottis cervico-utérin (FCU), le frottis conventionnel (dit Papanicolaou) et frottis en milieu liquide (frottis sur couche mince).
- **Examens histologiques** : Ils reposent sur la biopsie échoguidée .
- **Test HPV**
- **Immunohistochimie** : Par utilisation des biomarqueurs tumoraux.

I.6.Causes et facteurs de risque du cancer du col de l'utérus :

L'insuffisance de suivi gynécologique (frottis cervico-utérin FCU), est considérée comme un véritable facteur de risque. Par ailleurs, le HPV a été décrit comme étant le facteur étiopathogénique nécessaire mais non suffisant pour l'apparition du cancer du col (Nyitray et al., 2013).De nombreuses études ont suggéré que plusieurs agents synergiques avec le HPV peuvent être incriminés dans la genèse du cancer du col utérin.

1-les facteurs viraux

a. Génotype viral

Il est démontré que les femmes qui ont acquis des *Papillomavirus* à risque (16 ou 18) ont un risque accru de développement de néoplasies cervicales, comparées à celles qui ont été en contact avec d'autres types viraux (Aubin, 2003).

b. Persistance virale

La persistance virale se traduit par l'expression de certains gènes viraux, en particulier E6 et E7 des HPV à risque, dont le rôle dans l'immortalisation des cellules est démontré par leur action sur les protéines inhibitrices du cycle cellulaire (Blanc, 2005).

c. Charge virale

Une charge virale élevée (la quantité importante de virus) est associée à une diminution de la probabilité de clairance de l'infection à HPV et est un indicateur de CIN sous-jacente (Monsonogo, 2006).

d. Coïnfection

Il a été démontré que la coïnfection par plusieurs types d'HPV ou par d'autres virus sexuellement transmissibles tels que l'Herpès Simplex Virus 2, l'Epstein-Barr virus (EBV) ou encore *Chlamydiae trachomatis* favorise le développement du cancer du col de l'utérus (Koskela et al., 2000).

2-Les facteurs endogènes : (Propre à l'individu)

a. Immunodépression

Les femmes immunodéprimées sont plus susceptibles à l'infection à HPV, que ce soit en raison d'un traitement immunosuppresseur ou en raison de l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Frisch et al., 2000). Dans ces cas, l'évolution du cancer invasif du col utérin est plus rapide (Denny et al., 2012).

b. Comportement sexuel

La précocité du premier rapport du fait de l'immaturation de la zone de jonction exocol-endocol les antécédents de maladies sexuellement transmissibles, un grand nombre de partenaires sexuels, les rapports réguliers avec un partenaire ayant des antécédents d'infections sexuellement transmissibles, sont autant de facteurs de risque d'infection à HPV (Drolet et al., 2013).

c. Multiparité :

Il est décrit une augmentation du risque de développement de carcinomes épidermoïdes du col utérin chez les patientes multipares au-delà de 7 grossesses menées à terme. De même, le jeune âge lors d'une première grossesse est un facteur de risque (Hinkula et al., 2004).

d. Les facteurs génétiques

Il s'agit de facteurs endogènes propres à chaque individu, beaucoup de gènes ont été à ce jour mis en évidence à l'étiologie du cancer du col de l'utérus (CCU). Nous citerons les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité humain (CMH) codant pour les protéines présentatrices d'antigène de surface, le système HLA (humane leucocyte antigène). Certaines combinaisons alléliques particulières seraient associées à une augmentation de risque du cancer du col utérin : par exemple l'expression de l'allèle HLA-DQBI*0301 seul ou combiné avec l'allèle HLA1*0401 (Duport, 2007).

3-Les facteurs exogènes :

a. Tabagisme

Le tabagisme passif majore de 2 fois le risque de développement de cancer du col (Zeng et *al.*, 2012). Il diminue la réponse immunitaire, en augmentant les risques d'infections persistantes (Blanc, 2005).

b. Contraception hormonale

Pour les femmes utilisant l'hormonothérapie contraceptive, le risque augmente avec la durée d'utilisation et diminue après l'arrêt du contraceptif (Luhna *et al.*, 2013). Le risque semble être multiplié par 2,42 dès lors qu'elles utilisent une telle contraception pendant au moins 10 ans (Yoo et *al.*, 2013).

4-les facteurs diététiques :

Des études ont souligné que les fruits et légumes riches en vitamine C, folates ou caroténoïdes, auraient un effet protecteur et favoriseraient la régression des lésions de bas grade. En revanche, un déficit en vitamine A favoriserait le développement des lésions intraépithéliales (Monsonogo, 2006).

MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été réalisée pour mettre en évidence l'intérêt des deux molécules p16 et ki67 dans le dépistage du cancer du col de l'utérus par des techniques cytologique, histologique et immunohistochimique tout en pratiquant les différents protocoles. Le début du travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'anatomopathologie du centre hospitalier universitaire DJILALA BOUNAAMA DOUERA et au CHU HASSIBA BEN BOUALI BLIDA sur 30 patientes ayant un âge entre 30 à 75 ans.

Patientes :

A travers notre stage au niveau du service gynécologique de l'hôpital CHU HASSIBA BEN BOUALI, nous avons colligées 30 cas qui présentaient des problèmes gynécologiques après un diagnostic. Ces 30 patientes ont été suspectées d'avoir des lésions au niveau du col utérin par différentes méthode d'exploration et diagnostic.

II.1 Matériel

II.1.1. Matériel biologiques

a. Frottis cervico-vaginal :

Nos prélèvements cytologiques ont été réalisés au niveau du centre de dépistage du CHU HASSIBA BEN BOUALI BLIDA sur 20 femmes par un prélèvement des cellules de la jonction exocol-endocol du col de l'utérus.

b. Biopsies :

Vu que nous n'avions pas beaucoup de temps pour attendre les résultats des frottis à cause des circonstances de la pandémie mondial du covid19, donc nous avons rajouté à nos frottis 10 biopsies prélevées sur d'autres femmes qui présentaient déjà des frottis anormaux .

II.1.2. Matériel non biologiques :

Il s'agit de tout le matériel utilisé pour la réalisation des différentes techniques cytologique, anatomohistologique et immunohistochimique. (Voir annexes 2, tableau V).

II.2. Méthodes :

II.2.1. Technique anatomo-histologique

Cette technique permet d'analyser les prélèvements tissulaires tels que les pièces opératoires et les biopsies utérines. Elle a été faite selon le Protocole de Hould (1984) qui a été modifié d'après les conditions du laboratoire.

L'étude histopathologique a été réalisée sur 10 échantillons reçus au niveau du laboratoire d'anatomopathologie du CHU de DOUERA entre février 2020 et avril 2020. Les différents prélèvements traités ont ciblé des biopsies du col utérin.

- **Fixation**

La fixation, étape essentielle dans la préparation tissulaire. Son but est de s'opposer à l'autolyse tissulaire, de conserver aux tissus une structure la plus proche possible de la structure "in vivo", Préserver la réactivité des cellules pour une étude immuno-histochimique et préparer l'inclusion en paraffine. Elle se fait par immersion du prélèvement dans le Formol a 10% La fixation répond à des règles strictes qui motivent le transfert rapide des prélèvements vers le laboratoire d'anatomopathologie.

L'opération de fixation doit être immédiate, et doit se faire dans un volume suffisant de fixateur correspondant à 10 fois le volume de la biopsie. La durée de fixation dépend de la taille de prélèvement. Elle est de 2 à 5h pour une biopsie.

Cette étape est considérée comme le stade essentiel qui déterminera la qualité de tout le processus, la fiabilité du diagnostic et la rapidité du résultat.

- **Examen macroscopique et inclusion**

Tout d'abord les fragments sont dénombrés, orientés, mesurés et leur aspect externe est décrit cela dans le but de localiser et d'observer la lésion, évaluer son étendue , éventuellement déterminer sa nature et le choix de la partie la plus suspectée afin de faire un échantillonnage bien diriger sur les foyers lésionnels à analyser .Ces échantillons servent a l'étude microscopique ils sont déposés dans des cassettes, perforées en plastique. Elles comportent le numéro de dossier du patient et sont directement placées dans du formol pur avant leur passage dans l'appareil à circulation.

- **Circulation**

La circulation peut se faire manuellement ou à l'aide d'un automate. Elle a pour but le remplacement de l'eau présente dans le tissu par la paraffine afin de faciliter la découpe et elle s'effectue en 3 étapes (Voir annexes 2, tableau VII).

A la fin de la circulation qui dure 24 heures, les prélèvements se trouvent dans un panier plongé dans de la paraffine chaude, ils sont alors récupérés et introduits au niveau de la station d'enrobage.

- **Enrobage**

L'enrobage dit aussi « inclusion » consiste à former des blocs de paraffines pour conserver les rapports architecturaux des structures tissulaires et de fournir un support rigide pendant et après la coupe. Pour se faire, les cassettes sont ouvertes, les couvercles jetés, le fragment est ensuite récupéré et placé dans un moule adapté à sa taille. Celui-ci est recouvert d'une petite quantité de paraffine, il est important de bien orienter le fragment et veiller à son adhérence. Le moule est placé sur une plaque refroidissante.

La cassette est déposée sur le moule, de la paraffine est coulée extemporanément sur cette dernière afin de s'assurer de l'homogénéité du bloc pour une découpe de qualité (Voir annexes 2, figure 37).

Les moules sont placés sur une plaque refroidissante pour figer la paraffine. Une fois que cette dernière durcit les blocs sont démoulés.

- **Coupes et étalement sur lame**

Les blocs ayant refroidi sur la plaque réfrigérante de la station d'enrobage, la découpe peut être réalisée. A l'aide d'un microtome, des coupes allant de 1 à 5 μ d'épaisseur sous forme de ruban sont réalisées. Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser la préparation et d'éviter la superposition tissulaire (Voir annexes 2, figure 38).

Les Fines coupes sont étalées sur des lames et ces lames sont numérotées avec les mêmes chiffres des blocs. Elles subissent le déparaffinage des coupes sur la plaque chauffante pour éliminer les résidus d'eau et les préparer à la coloration.

- **Coloration**

Avant de passer à la coloration, il existe quelques étapes qui servent à préparer la coupe aux différents colorants:

a. **Étuvage lames :**

Toutes les lames sont déposées dans l'étuve à 40°C pendant 24 heures, pour une meilleure adhérence du tissu. Cette étape est dite séchage, elle permet d'éliminer la fine couche d'eau qui se dépose entre la lame et le tissu.

b. **déparaffinage :**

Pour cela, il est nécessaire de préparer le tissu. Tout d'abord les lames doivent être plongées dans trois bains de xylènes de 5 minutes chacun afin d'éliminer la paraffine des tissus. Cette étape permet une meilleure imprégnation de ces derniers par le colorant.

c. **Réhydratation :**

S'en suit l'étape de la réhydratation dont le but est de chasser le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau étant donné que la plus part des colorants sont de nature aqueuse (Affinité tinctoriale). Elle se traduit par le passage dans cinq bains d'éthanol, les deux premiers contenant de l'éthanol absolu durent 3 à 5 minutes et sont suivis de trois bains décroissant de 95°C, 80°C et 70°C. Enfin, les lames sont rincées à l'eau courante pendant 3 minutes.

Cette étape comporte un haut risque de décollement du fragment dû aux forces de courants créés par la sortie de l'éthanol du tissu et l'entrée de l'eau.

Un contrôle qualité peut être effectué en relation avec l'opacité du fragment, les parties du tissu n'ayant pas subi une bonne réhydratation apparaissent translucide alors que le reste du fragment est opaque.

d. **la coloration proprement dite :**

Dans les laboratoires d'anatomopathologie la plus utilisée en tant que coloration topographique de routine est l'HE, le noyau est révélé en bleu par l'hématoxyline de Harris alors que l'éosine permet d'obtenir un cytoplasme rose.

La coloration à l'H-E est réalisée de la manière suivante (Voir annexes 2, tableau VIII, figure 39).

- **Montage**

L'étape finale est donc le montage des lames. Elle est réalisée sous une hotte aspirante et consiste à fixer une lamelle couvre objet sur la lame préalablement traitée avec quelques gouttes de résine synthétique (Eukitt), afin de protéger la coupe de la dégradation (Voir annexes 2, figure 40). Il est à noter qu'il faut éviter toute bulle d'air qui pourrait gêner la lecture au microscope. Ainsi nos lames sont prêtes à être interprétées.

Toutes ces étapes d'anatomopathologie sont résumées dans (Voir annexes 2, figure 41).

II.2.2. Technique immunohistochimique (IHC) (Marck.,2010 ;KHALISSA.D. ,2019)

L'étude immunohistochimique est une méthode auxiliaire importante pour les pathologistes car, elle permet de visualiser spécifiquement la distribution et la quantité d'une certaine protéine c'est-à-dire déterminer leur présence et leur localisation sur un matériel cytologique ou des coupes tissulaires. Une quantification de ces dernières est tout à fait possible et est réalisée à de fin diagnostic. Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique qui se lie à la molécule d'intérêt par le fragment Fab et sur lequel va pouvoir se fixer un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc du premier anticorps (Voir annexes 2, figure 42).

Dans notre étude, Deux anticorps monoclonaux ont été utilisés :

- *L'anticorps monoclonal de souris anti-protéine humaine p16

- *L'anticorps monoclonal de souris anti-protéine humaine Ki-67

- **La préparation des lames :**

Les lames conservées à 37°C et qui ont été déjà préparées (fixation, circulation, enrobage et microtome) comme celle de la coloration usuelle. Elles sont utilisées dans les réactions immunohistochimique pour la détection de deux protéines différentes situées dans différents compartiments cellulaires. Cependant, l'étalement des fragments doit se faire sur des lames silanisées afin d'améliorer l'adhérence et de réduire le risque de décollement des coupes lesquelles sont séchées à 37°C pendant 24h.

- **Prétraitement :**

Pour prétraiter les lames, il faut réaliser le déparaffinage, la réhydratation et le démasquage pour cela les préparations sont déparaffinées et réhydratées en les immergeant successivement dans les solvants suivants :

- Xylène : trois bains de 10min ; 20min et 20min respectivement
- Ethanol absolu : trois bains de 5min ; puis l'éthanol 95%, deux bains de 5min ; l'éthanol 75%, un bain de 5min ; puis dans l'eau distillée pendant 5min ou plus.
- Le démasquage a été fait par la chaleur en immergeant les lames dans un tampon de citrate à pH 6.1, pendant 3min dans une cocotte-minute.
- Laisser les coupes refroidir, puis les plongées dans un récipient de l'eau distillée pendant 5min.

- **Blocage des peroxydases endogènes :**

Avant de réaliser cette étape, le fragment doit être délimité à l'aide du stylo hydrophobe (Dako Pen).

Afin de bloquer les peroxydases endogènes qui ont les mêmes récepteurs que le DAB (3,3' Diaminobenzidine), on dépose 200 μ L PBR (Peroxydase Blocking Reagent) à base H₂O₂ à 3% pendant 15min. Le rinçage est effectué par l'utilisation du wash buffer dans trois bains de 5min chacun pour éliminer l'excès de PBR.

- **Action de l'AC primaire spécifique :**

Les anticorps primaires (de chaque marqueurs P16 et Ki67) dilués dans du PBST/ 1%BSA puis on les déposés (200 μ L d'AC primaire) sur la partie encadrée de la lame ou est contenu le tissu ; incubées pendant 30min dans une chambre obscure et humide, puis rincées dans trois bains de wash buffer pendant 5min chacun.

- **Addition de l'AC secondaire non spécifique :**

Ajouter sur les lames 200 μ L de l'AC secondaire conjugué à la peroxydase (HRP) dilué au 1/200ème (de chaque marqueurs), puis on les incubées pendant 20min à 30min, après ça le rinçage est effectué dans trois bains de wash buffer pendant 5min.

- **Révélation :**

Se fait par l'addition de quelques gouttes (200 μ L) d'un révélateur marron DAB (Diaminobenzidine) sur les lames, incubation pendant 5 à 10min, puis rinçage à l'eau distillée pour éliminer l'excès de DAB.

- **Contre coloration :**

Les sections sont ensuite contre coloré pour faire ressortir le marquage d'un élément particulier. Cependant, cet élément doit être localisé par rapport aux autres éléments (noyaux, cytoplasme, fibre conjonctives). Ainsi, elle a un rôle important qui sert de point de repère lors de l'interprétation microscopique.

- Les lames sont émergées dans un bain d'une solution hématoxyline de Mayer pendant 5min pour donner une coloration bleue aux noyaux puis les rincées à l'eau distillées.

- Ensuite les lames sont déshydratées dans bains de l'éthanol en ordre croissant (70, 90 et 100%) pendant 2min chacun, puis éclaircies dans trois bacs de xylène d'une minute chacun.

- **Montage :**

Une gouttes de résine (Eukitt) est déposée sur la lame puis recouverte par lamelle.

- **Observation :**

L'observation au microscope photonique est réalisée aux différents grossissements. Des photos sont prises à l'aide d'un Smartphone.

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre étude est réalisée dans le but de vérifier si 'il existe réellement une corrélation entre l'expression des biomarqueurs p16 et ki67 et le degré des dysplasies cervico utérines. Mais vu les circonstances de la pandémie mondial du covid19 et le confinement imposé par le pouvoir public ont a pas pu avancer dans notre travail expérimental et aller jusqu'aux résultats finaux. Par rapport à ces conditions nous avons travaillé sur un ensemble d'articles scientifiques de l'année 2006 à 2020 qui montraient l'aspect moléculaire et cellulaire du cancer du col utérin par l'étude de deux protéines impliquées dans le phénomène de la carcinogenèse. Il s'agit dans notre étude de la P16 et du Ki67.

Les résultats selon la synthèse bibliographique

D'après l'étude de Bergeron et *al*, (2006) sur 210 frottis, 108 d'entre eux étaient normaux, 52 présentaient des LSIL et 50 des HSIL. la différence qui réside entre les frottis normaux et les autres revenait aux aspects cellulaires de chacun. La taille du noyau des cellules basales anormales était grande avec une forme irrégulière, leurs rapport nucléo-cytoplasmique était élevé, la chromatine avait une texture granuleuse était dense et irrégulière et l'anisonucléose était généralement présente dans des amas de cellules basales anormales. Des scores ont été mis en place pour rassembler chaque aspect. le score 1 qui comprenait les cellules basales normales (Figure 14), le score 2 qui comprenait une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique (Figure 15), le score 3 qui comprenait une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique (Figure 16) et une des anomalies et le score 4 comprenait une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique et plus d'une seule anomalie (Figure 17). En ajoutant ces scores nucléaires à la détection d'un marquage de la protéine p16 Bergeron et al ont observé que le comptage des cellules marquées a été corrélé avec la gravité du diagnostic LSIL, HSIL.

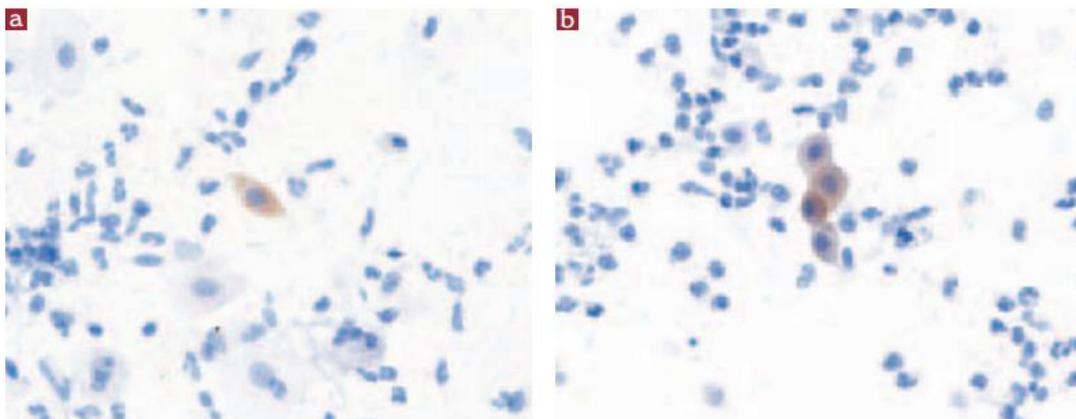


Figure. 14. a et b) Score 1 : des cellules basales métaplasiques sont marquées par la p16 INK4a. Elles ne comportent aucune anomalie nucléaire (Bergeron et *al*,. 2006).

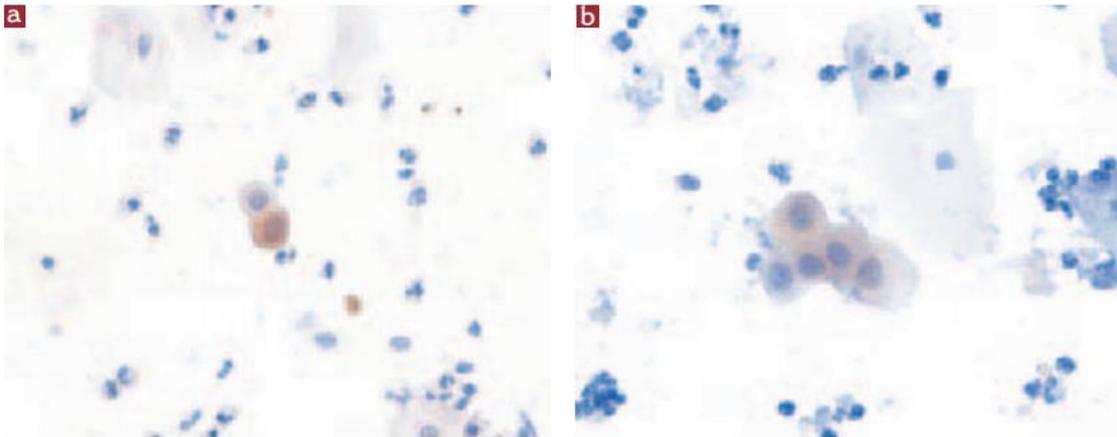


Figure. 15. a et b) Score 2 : Les cellules basales marquées par la p16 INK4a présentent une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique (Bergeron et *al.*, 2006).

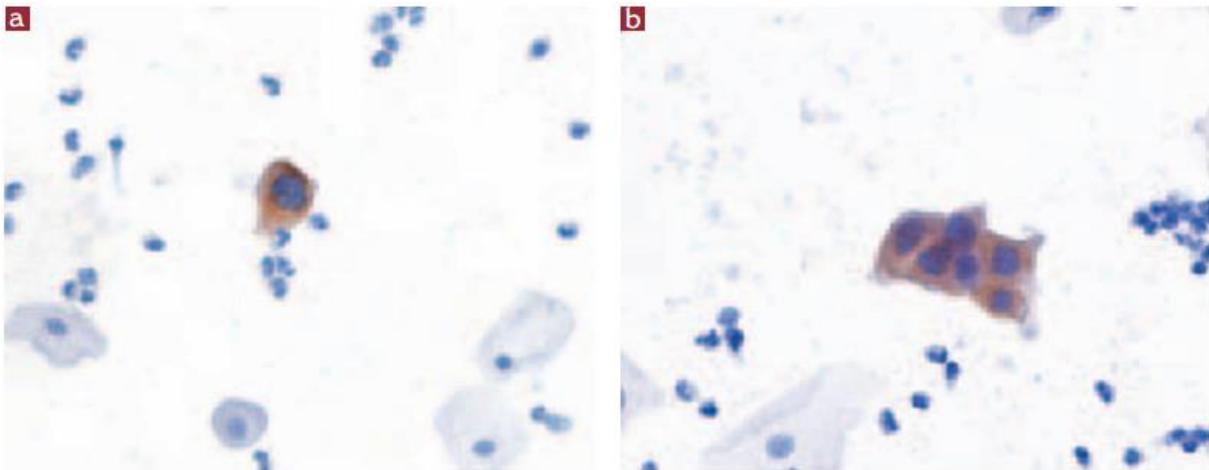


Figure. 16. a et b) Score 3 : les cellules basales marquées par la p16 INK4a présentent une augmentation du rapport nucléocytoplasmique et une chromatine densifiée (a) ou une anisonucléose (b) (Bergeron et *al.*, 2006).

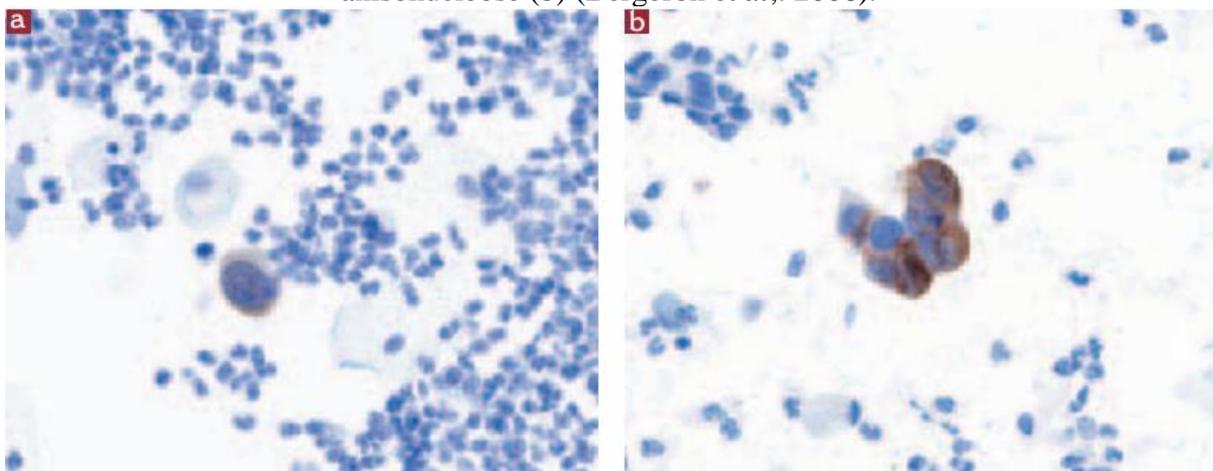


Figure. 17. a et b) Score 4 : Les cellules basales marquées par la p16 INK4a présentent une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique, une chromatine anormale, des contours nucléaires irréguliers (a) ou une anisonucléose (b) (Bergeron et *al.*, 2006).

L'étude de Diya Das *et al* (2018), est menée sur 536 patients, 483 (90,1 %) ont été diagnostiqués en surveillance de charge non intrusive, 15 (2,8 %) ont eu un ASC-US, 5 (0,9 %) un ASC-H, 12 (2,2 %) une LSIL, 11 (2,0 %) une HSIL et 10 (1,9 %) un carcinome épidermoïde invasif.

Un marquage par les protéines p16 et ki67 a été effectué sur les cellules de ces frottis et les résultats ont révélé que le taux des cellules marquées est faible dans les frottis normaux et frottis LSIL comparé au taux des cellules marquées dans les HSIL qui est plus élevé. Donc la positivité de la p16/Ki-67 augmente également avec la gravité cytologique.

Dans d'autres travaux de Martin *et al*, (2011). la gradation histologique (Figure 18) précise les néoplasies intraépithéliales cervicales (CIN). Elle est importante pour la prise en charge clinique des patients, parce que les lésions CIN1 et CIN2 et 3 sont traitées différemment.

En général, la reproductibilité inter et intra-observateurs de l'évaluation du grade CIN est faible chez les pathologistes. En particulier, le diagnostic différentiel entre les patients malpighiens immatures et les métaplasie et CIN1 et 2, ou entre la catégorie inférieure (CIN1) et les lésions de haut grade (CIN2 et 3), ont tendance à être difficiles. Ces difficultés signifient que les patients ont tendance à être surtraités pour les lésions CIN, qui vont naturellement régresser.

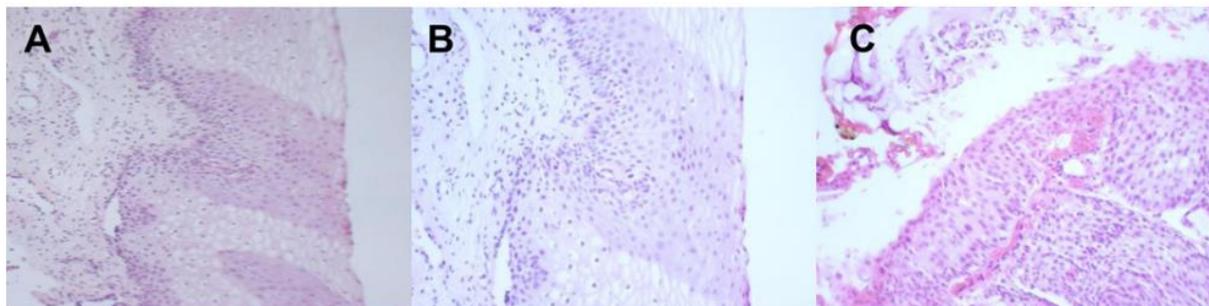


Figure 18 : coloration a l'hématoxyline éosine dans les CIN : (A) ET (B) représente un cas de CIN1, (C) représente une liaison de CIN 2/3 dans le col de l'utérus (Martin *et al.*, 2011).

D'après l'étude de A.Sangwaiya *et al* (2018), sur 60 échantillons cervicaux, dont 10 cas avec une cervicité chronique, 29 cas avec de CIN et 21 cas des carcinomes épidermoïdes. Ils ont été observés le taux d'expression de P16 et Ki67 dans tous les cas.

Aucune expression de ces biomarqueurs n'a été observée dans 10 cas (100%) de cervicité chronique, alors que l'expression de la P16 dans les cas des CIN elle s'est exprimée dans 25

cas (86,20%) et dans le cas du carcinome a été s'exprimée dans 20 cas (95,23%). Il y a eu une différence statistiquement significative dans l'expression de P16 entre cervicité chronique, CIN et carcinome indiqué par une valeur ($P < 0,05$), (Figure 19).

Le Ki67 a été exprimé dans 28 cas (96,55%) dans les CIN et 100% dans les cas de carcinome (Figure 20).

Les données obtenues sont significatives sur le plan statistique ($P < 0,05$) et ont montrées une association positive entre le grade histologique des lésions cervicales et l'expression de P16 et Ki67.

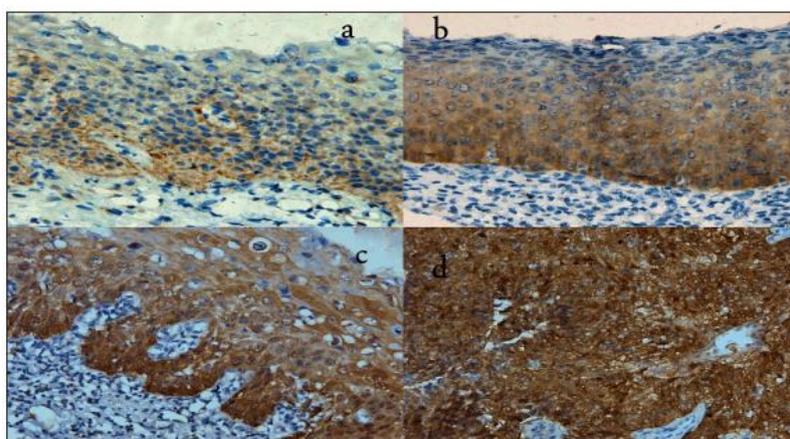


Figure 19 : Photomicrographies immunomarquées avec expression de la P16 : (a) CIN I – grade 2, coloration cytoplasmique, (b) CIN II - grade 3, coloration nucléaire et cytoplasmique, (c) CIN III - grade 3, coloration nucléaire et cytoplasmique, (d) carcinome du col de l'utérus – grade 3, coloration nucléaire et cytoplasmique (coloration IHC, 200X)(Sangwaiya et *al.*,2018)

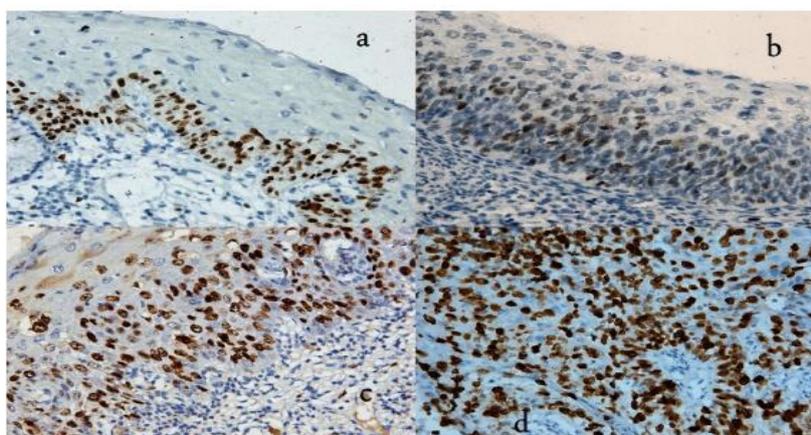


Figure 20 : Photomicrographies immunomarquées avec expression du Ki-67 : (a) CIN I - indice d'étiquetage I, coloration nucléaire, (b) CIN II - indice d'étiquetage II, coloration nucléaire, (c) CIN III - indice d'étiquetage III, coloration nucléaire, et (d) carcinome du col - indice d'étiquetage III, coloration nucléaire (coloration IHC, 200X) (Sangwaiya et *al.*,2018).

L'étude de S-H. Song et *al* (2007), a été effectuée sur 49 patients qui ont subi une conisation avec des marges positives. L'HPV à haut risque a été identifié chez 27 patients (100,0 %) avant la conisation avec des marges. La charge virale de base a montré 7 (25,9%) femmes à faible charge (100 RLU/PC) et 20 (74,1%) avec une charge élevée (500 RLU/PC). L'évaluation histologique des échantillons de conisation ont montré 12 (24,5%) femmes avec CIN 2 et 37 (75,5%) femmes avec CIN3. L'association entre l'expression des marqueurs immunohistochimiques et le grade CIN est illustrée dans la figure 21.

Au total, 17 (34,7 %) femmes présentant une maladie résiduelle confirmée par l'histologie ont été retrouvées au cours du suivi pendant 24 mois, dont 11 femmes atteintes de CIN 1 et 6 femmes de CIN 3, les 32 autres (65,3%) femmes ne présentait aucune lésion résiduelle.

La charge moyenne du HPV dans chacun des cas associée à la coloration de la p16 (INK4a) était de 9,5 (unités lumineuses relatives/contrôle positif) RLU/PC pour la coloration négative, 531,8 RLU/PC pour 11 colorations, 140,2 RLU/PC pour 21 colorations et 545,1 RLU/PC pour 31 colorations. Les charges HPV diffèrent significativement selon l'expression p16 (INK4a) ($P=0,0021$) (Figure 22).

Ainsi, les charges moyennes du HPV dans les cas de coloration du Ki-67 étaient de 28,2 RLU/PC pour 11 colorations, 189,6 RLU/PC pour 21 colorations, et 563,3 RLU/PC pour 31 colorations. Les charges de HPV différaient significativement selon l'expression Ki-67 ($P=0,0259$) (Figure 22).

L'expression de p16 (INK4a) ($P=0.0012$) et de Ki-67 ($P=0.0006$) a été associée de manière significative à les CIN.

D'après song et *al* ont montrés que dans l'analyse de régression logistique univariée et multiple, âge, parité, cytologie, grade de la lésion dans le cône, la charge de HPV-HR, et l'expression de p16 (INK4a) et de Ki-67 n'ont pas été associées de manière significative à des lésions résiduelles après conisation avec des marges positives ($P > 0,05$).

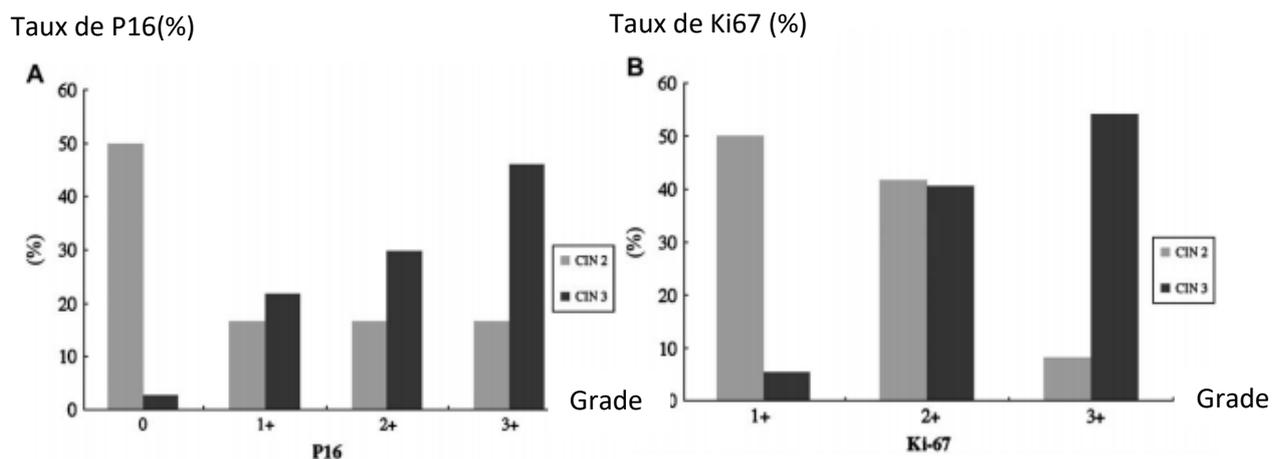


Figure 21 : A et B) Les associations entre l'expression des marqueurs immunohistochimiques et les CIN 2/3 ont été évaluées sur la base du test de Chisquare ou du test exact de Fisher (Song et al.,2007)

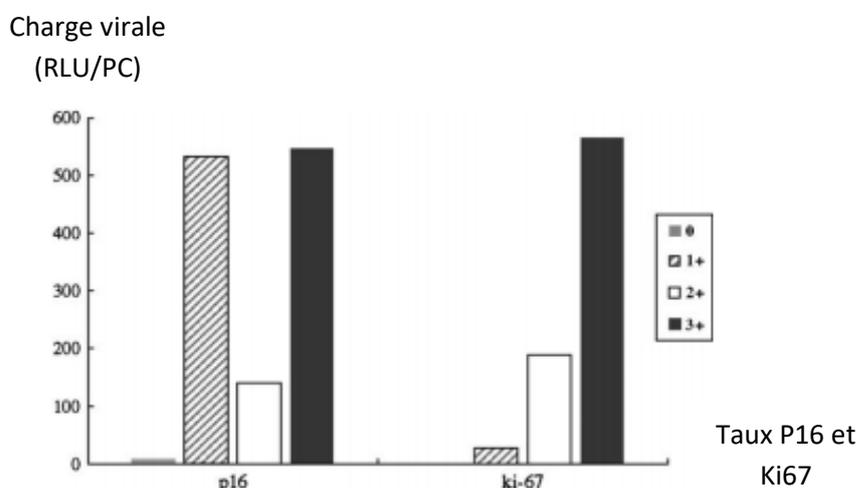


Figure 22 : Comparaisons de la charge du HPV avec la p16 (INK4a) et le Ki-67. Comparaisons de la charge du HPV dans les marqueurs immunohistochimiques ont été évaluées à l'aide du test d'analyse de la variance. Les mêmes lettres indiquer $P < 0,05$ par le test de comparaison multiple de Tukey (Song et al.,2007).

Xing et al (2017), ont étudiés l'expression de la géminine, P16 et Ki67 sur 95 échantillons, y compris CIN1 (n=45), CIN2/3 (n=40) et les tissus cervicaux normaux (n=10) par immunohistochimie.

L'expression du géminin était négative dans tous les tissus normaux et exprimée dans 13,3% des CIN1 et 90% dans les CIN2/3.

L'expression de la P16 est exprimée comme suit : dans 24,4% dans les CIN1 et 87,5% dans les CIN2/3. Ainsi, l'expression Ki67 correspondante était de 35,6 % et 95 %.

La spécificité de gémimine pour différencier entre les CIN1 et CIN2/3 était de 86,7%, tandis que pour p16 et Ki67 les valeurs correspondantes étaient de 75,6% et 64,4%.

La sensibilité de la gémimine, de la p16 et du Ki67 était respectivement de 90,0 %, 87,5 % et 95,0 %. La valeur prédictive positive (PPV) et la précision de la gémimine était supérieure à p16 et Ki67. Cela, a montré que l'expression de la gémimine a une faible corrélation avec le statut HPV.

Dans l'article de Silva et al (2017), les résultats ont été pris à partir d'un examen systématique des études sur les femmes avec et sans lésions cervicales afin d'évaluer s'il y a surexpression des biomarqueurs P16, Ki67 et P53. Au total, 28 publications ont répondues aux critères, dont 6005 femmes.

L'analyse a montré que l'expression de ces biomarqueurs est plus élevée au niveau de l'IHC, associée avec les lésions les plus graves. Dix-neuf des 22 études évaluées ont montré que l'expression de p16 est plus élevée dans les lésions plus graves (CC), tandis que dans l'expression de P53 seule 4 sur 9 études ont montré une expression plus élevée chez les cas les plus sévères. Ainsi, l'expression de Ki67, il a été observé que 9 études sur 14 ont montré une expression plus élevée. Dans les lésions plus graves. Une absence totale ou juste un minimum d'expression dans l'IHC a été observé dans l'épithélium cervical normal, tandis qu'une augmentation significative de l'expression de ces biomarqueurs a été détectée en fonction de la gravité des lésions.

Larissa et al (2017), ont effectué une étude sur 66 patientes : 22 (33,4%) d'entre elles ont progressé jusqu'au HSIL, 25 (37,9%) ont maintenu leur LSIL, et 19 (28,7%) ont régressé dans la deuxième biopsie. L'âge moyen des patientes avec et sans progression était de 33 ans et 27 ans ($P = 0,006$), respectivement. L'évaluation qualitative a indiqué une tendance de progression, mais sans signification statistique. Cependant, par histomorphométrie, l'analyse de la courbe ROC caractéristique de fonctionnement du récepteur a montré des points de coupure de 0,396, 0,345 et 0,026 pour p16INK4a, CK7, et Ki-67, respectivement, ainsi, prédicteurs de la progression ($P = 0,003$, 0,03, et .002, respectivement) (Tableau IV). Dans une analyse de régression logistique, p16INK4a, CK7 et le rapport des cellules positives Ki-67 a montré une corrélation significative avec la progression ($P = 0,036$, 0,012 et 0,006, respectivement).

Tableau IV: Points de coupure de l'expression de 16INK4a, CK7, et Ratios de cellules Ki67 positives des LSIL lors de la première biopsie, corrélés aux 3 groupes de diagnostic dans le deuxième spécimen

Cutoff point (ROC curve)	Progression to HSIL, %	LSIL maintained, %	Regression, %	<i>P</i> ^a
p16 ^{INK4a} cell ratio ≥ 0.396	54.5	40	5.2	.003
CK7 cell ratio ≥ 0.345	40.9	10.5	12	.03
Ki-67 cell ratio ≥ 0.026	81.9	26.3	48	.002

HSIL indicates high-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; CK7, cytokeratin 7.
^aPearson χ^2 ; level of significance, $P \leq 0.05$.

(Larissa et al.,2017).

D'après l'étude de Natália et al (2009) sur les 54 biopsies du col utérin qui ont été classées en plusieurs groupes (5 cas normaux) - (12 cas CIN I) - (12 CIN II) - (13 CIN III) - (12 cas cancer épidermoïde invasif) et soumises à une étude immuno-histochimique, avec des biomarqueurs p16, Ki-67 et E-cadherin.

-La figure (23) montre la distribution de la positivité pour la p16 dans les différents groupes. Les coupes histologiques du col utérin normal n'ont montré aucune expression de p16.

Grâce au test ANOVA, nous avons observé une différence statistiquement significative entre les pourcentages moyens des groupes. Les CIN I (27,94 %) et II (47,93 %) présentaient une expression de p16 inférieure à celle des CIN III (73,47 %) et des carcinomes invasifs (72,70 %) ($p < 0,0005$).

-La figure (24) montre les différentes positivités au Ki-67 évaluées dans les groupes. La différence n'est statistiquement significative qu'entre la médiane du groupe normal (6,6 %) et les lésions néoplasiques. Le carcinome invasif (57,8 %), était très positif pour le Ki67 par rapport à la CIN I (35,6 %), la CIN II (51,9 %) et la CIN III (40,9 %), mais aucune différence statistiquement significative n'a pu être trouvée entre eux ($p = 0,005$).

-La figure (25) montre la positivité pour l'E-cadherine dans les cas diagnostiqués de CIN III était la plus faible observée parmi les lésions pré-néoplasiques (55,96%), alors que dans les cas de CIN I, elle était de 82,18%, pour la CIN II, de 77,39% et dans le groupe témoin, de

89,05%. Une différence statistiquement significative a été observée en comparant les cas positifs de carcinome invasif (46,15 %) avec les CIN I et II ($p < 0.0005$).

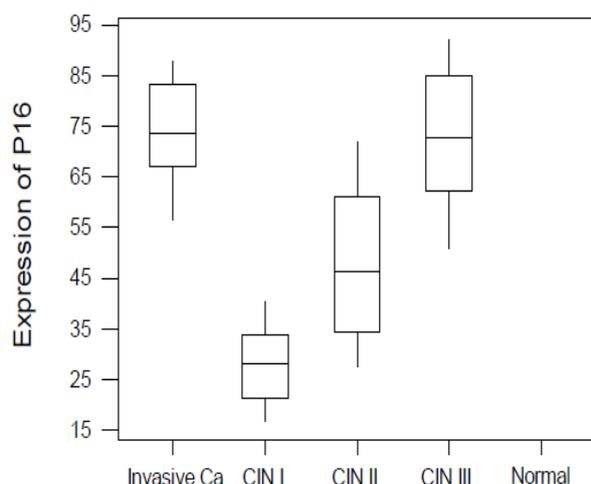


Figure 23 : expression de p16 dans les différents types de lésions du col de l'utérus. il y a une augmentation de p 16 selon le degré de malignité des lésions ($p < 0.0005$). les tissus normaux ne présentaient pas d'expression de p16 (Natália et al., 2009).

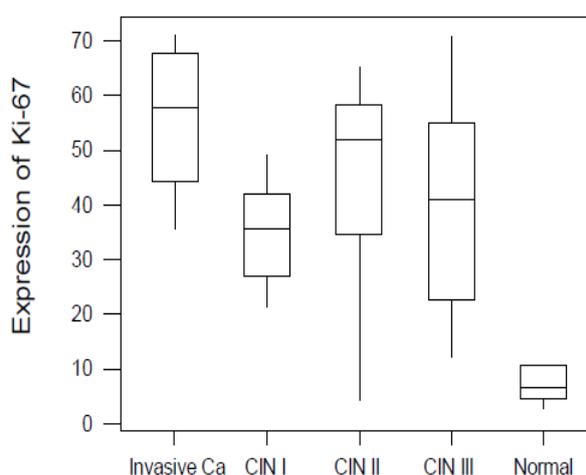


Figure 24 : Positivité du Ki-67 dans différents types de lésions du col de l'utérus. Le Ki-67 est plus exprimé dans les groupes néoplasiques que dans les biopsies cervicales normales ($p = 0,005$) (Natália et al., 2009).

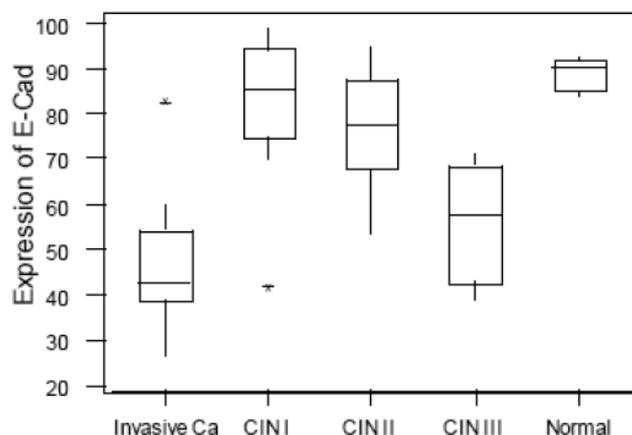


Figure 25. Expression de la E-cadhérine dans différents types de lésions du col de l'utérus. Une différence statistiquement significative a été observée en comparant les cas positifs de carcinome invasif (46,15 %) avec les CIN I et II ($p < 0,0005$) (Natália et al., 2009).

Selon l'étude de T. A. Dimitriad et al (2020), sur 71 biopsies, les résultats de l'immunohistochimie ont permis de déterminer les profils moléculaires les plus caractéristiques des degrés de dysplasie : CIN1 - Ki-67-15-25%, p16/INK4a 10-15% ; CIN2 -

Ki-67-70-80%, p16/INK4a - 65-70% ; CIN3 - Ki-67-85-90%, p16/INK4a - 90-95%. Une hétérogénéité a été révélée dans l'expression de ces marqueurs dans le groupe CIN 2 : dans 7 cas (22,6%), le profil moléculaire correspondait à CIN 1, dans 1 cas (3,6%) à CIN 3. Des exemples cliniques d'utilisation du profil IHC pour clarifier le degré de CIN sont donnés.

Il ressort des données ci-dessus que la plus grande dispersion des données, de la valeur minimale à la valeur maximale, a été observé à la CIN2 (15-100%), ce qui est également attesté par le coefficient de variation. Il est également évident que les données du groupe CIN2 aux points de valeurs minimales et maximales se chevauchent avec les groupes voisins. Dans les recherches statistiques les valeurs du coefficient de variation dans le groupe CIN1 étaient de 27,2% pour Ki-67 et de 22,8% pour P16/INK4a - la variabilité des données est significative, mais acceptable. Pour les CIN3, le coefficient de variation du Ki-67 était de 11,7 %, tandis que pour le P16/INK4a, il était encore plus faible - 8,9 %, ce qui indique une homogénéité des deux valeurs chez les patients. Dans le même temps, la variabilité de l'expression des deux marqueurs dans le groupe CIN2 était plus de 2 fois supérieure au seuil de 33%, ce qui indique une grande variation des données au sein du groupe étudié.

En tenant compte de ces informations, le groupe CIN 2 a été divisé en 3 sous-groupes, indiquant conditionnellement : faible (n=7) avec le niveau d'expression de Ki-67 $24\pm 2\%$, P16/INK4a - $20\pm 3,1\%$, typique (n=31) avec le niveau d'expression de Ki-67 $76,8\pm 2,5\%$, P16/INK4a - $66,8\pm 2,6\%$ et élevé (n=1) avec le niveau d'expression de Ki-67 100%, P16/INK4a-90%. Les différences d'indicateurs sont statistiquement significatives entre les sous-groupes ($P<0,001$). Les indicateurs statistiques de 7 cas avec des valeurs faibles d'expression des deux marqueurs IHC étaient sans aucun doute caractéristiques de la CIN1, et 1 cas avait des valeurs élevées caractéristiques de la CIN 3.

Ainsi, cette étude montrait que le groupe CIN 2, est extrêmement hétérogène, ce qui peut expliquer un tel écart dans l'évolution clinique des patients présentant ce degré de CIN, de l'auto-régression au résultat dans les cas de CIN 3 et de SCI ou une progression dans le cas de CIN 1, le degré d'expression de ces marqueurs est directement lié à l'évolution clinique de la CIN. Donc cette technique proposée peut aider à la prédiction de flux de CIN2.

L'objectif de notre étude repose sur l'intérêt des deux protéines P16 et Ki67 dans la confirmation et les limites des lésions intra épithéliales.

L'étude cytologique de Bergeron et *al* (2006) a démontré que les frottis normaux se caractérisent par des cellules basales normales et les frottis HSIL, LSIL, ASCUS présentaient plusieurs anomalies cytologiques avec des noyaux anormaux de grande taille et une forme irrégulière, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, une chromatine dense, irrégulière ayant une texture granuleuse et une anisonucléose qui est généralement présente dans ces types de frottis. Concernant les cellules marquées à la p16, elles avaient une faible expression (Inferieur à 10) dans les frottis normaux. Par contre dans les HSIL leurs expression était remarquablement élevée (supérieur à 100). Donc Bergeron et *al* ont établi un score nucléaire avec un simple marquage de la protéine p16 qui montre que le comptage des cellules marquées a été corrélé avec la gravité du diagnostic.

Parallèlement à ce travail l'étude de Diya Das et *al* (2018) a montré que suite au marquage des cellules des frottis révélant un LSIL, HSIL, ASCUS et carcinome invasif par les deux protéines p16 et ki67. Il a été observé qu'à chaque fois qu'il ya plus d'anomalies cytologiques et nucléaires qui se manifestent dans ces frottis plus le taux du duel p16 et ki67 est important et évolutif.

D'autres études ont soulevé un autre profil qui est l'expression des deux protéines et le type histologique. Par l'étude de martin et *al* (2011), différents critères tissulaires des lésions intraépithéliales du col de l'utérus ont été distingué. Les CIN sont susceptibles d'avoir un épithélium plus épais composé de cellules indifférenciées avec une couche étroite de cellules matures indifférenciées à la surface. Les anomalies nucléaires, telles que les noyaux hypertrophiés, l'hyperchromie et les caractéristiques des cellules mitotiques sont également évaluées. Les infections à HPV sont également courantes dans les CIN, et sont caractérisé par la présence de koïlocytose.

Dans la CIN1, les cellules indifférenciées sont confinées à la couche inférieure de l'épithélium. Il tend à être des anomalies nucléaires minimales et peu de caractéristiques mitotiques, dans les CIN2 il y a des modifications cellulaires dysplasiques limitées à la moitié inférieure de l'épithélium et aussi des changements nucléaires et des caractéristiques plus mitotiques et dans les CIN3, la différenciation et la stratification peuvent être totalement absent ou seulement présent dans le quart superficiel de l'épithélium. Les anomalies

nucléaires peuvent être vues dans toute l'épaisseur de l'épithélium. Des caractéristiques mitotiques sont présentes partout, avec des pertes de polarité.

Les divers travaux de Yuanhang Zhu *et al* (2019), A.Sangwaiya *et al* (2018) ont démontré que le double marquage immuno-histochimique de la p16 et du ki-67 est révélé négatif dans les tissus du col utérin normal et dans les cervicites chroniques. Par contre ce marquage est positif dans les tissus anormaux. Les patients atteints de CIN1 37,0 % (40/108) étaient positifs à l'immunocytochimie p16/Ki67, les patients atteints de CIN2 96,6 % (28/29) étaient positifs à l'immunocytochimie p16/Ki67, 100 % (22/22) des patients atteints de CIN3 étaient positives à l'immunocytochimie p16/Ki67 et 100% (3/3) des patients atteints d'un cancer du col de l'utérus étaient positifs à 100% (3/3) à l'immunocytochimie p16/ki67 selon l'étude de Yuanhang Zhu *et al* (2019). Par ailleurs, la P16 dans les cas des CIN a été exprimée dans 25 cas (86,20%) et dans le cas du carcinome elle a été exprimée dans 20 cas (95,23%) selon A.Sangwaiya *et al* (2018). Il y a eu une différence statistiquement significative dans l'expression de P16 entre cervicite chronique, CIN et carcinome indiqué par une valeur ($P < 0,05$) donc l'expression de ces biomarqueurs en plus qu'elle est positive elle semble évoluée et varie selon la gravité des lésions.

Dans d'autres études les chercheurs ont mentionné une étroite relation entre le double p16/ki67 et le degré d'HPV comme l'étude de Lu-Lu Yu *et al* (2016) où il a été observé que les résultats de l'immuno-histochimie montrent que la positivité globale du test de double coloration p16/Ki-67 (33,1 %) était un peu plus faible que celle du HR-HPV (35,9 %) dans l'ensemble de la population ($p < 0,05$) et augmentait de manière significative avec la gravité de la maladie. Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de Calil (2014) et celle de Song S-H (2007). Donc la positivité pour le HPV était fortement associée à la double coloration p16/Ki-67 dans l'ensemble de la population. Par rapport aux HR-HPV négatifs, l'expression de p16/Ki-67 dans le groupe positif pour le HPV16/18 et les autres 12 types de HR-HPV était significativement plus élevée.

Par ailleurs, d'autres scientifiques ont trouvé des résultats opposés aux résultats mentionnés précédemment. Dans l'étude de Xing *et al* (2017), ils démontrent que la gémimine (Protéine intervenant dans le cycle cellulaire) a un rôle plus important que la p16 vu que son taux était élevé dans les CIN par rapport aux deux biomarqueurs p16 et ki-67 et elle a la spécificité de différencier entre les CIN. Donc elle pourrait être considérée comme un nouveau biomarqueur substitutif dans les lésions intra-épithéliales.

Dans d'autres travaux, l'analyse immuno-histochimique révèle d'autres protéines qui pourraient contribuer à l'évolution de la dysplasie. Parmi ces dernières la P53, la cytokératine 7 (Ck7) et la E-cadherine.

La p53 est citée dans l'article de Daliana et al (2017) où l'on détermine qu'elle est généralement mutée dans le cancer du col utérin et provoque des changements structuraux au niveau des tissus. L'intensité de son expression augmente avec la gravité des CIN. cela pourrait représenter un marqueur immuno-histochimique potentiel de la progression de la lésion à un degré plus élevé.

Dans d'autres cas Larissa et al (2017) ont découvert qu'il y'avait une corrélation positive entre le groupe (cytokératine 7, ki-67 et p16) et d'après leurs résultats la combinaison de ces trois est utile et présente des bio-marqueurs fiables qui pourraient conduire à un modèle différent de classification des LSIL.

Pour ce qui concerne la E-cadherine évoquée dans l'étude de Natália Gaspar Munhoz et al (2009) .c'est une protéine d'adhésion qui assure l'attachement des cellules squameuses de l'épithélium du col utérin les unes aux autres et à la membrane du sous sol. L'expression de cette dernière est respectivement directement et inversement liée à la p16 dans les CIN III. Ce fait pourrait aider au diagnostic différentiel et pourrait être un bon marqueur en plus de la p16 pour détecter le risque de développement d'un carcinome cervical.

Pour finir, la dernière étude de Dimitriadi et al (2020) a révélé que les résultats statistiques montrent que les valeurs du coefficient de variation de la p16 et du ki-67 dans le groupe CIN1 et CIN3 étaient significative mais acceptable et faible respectivement ce qui indique une homogénéité des deux valeurs chez les patients .En parallèle , la variabilité de l'expression des deux marqueurs dans le groupe CIN2 était plus de 2 fois supérieure au seuil de 33%, ce qui indique une grande variation des données au sein du groupe étudié ce groupe est hétérogène. Il est également évident que les données du groupe CIN2 aux points de valeurs minimales et maximales se chevauchent avec les groupes voisins (CIN1 et CIN3). Plus les 2 bio-marqueurs s'expriment simultanément dans les mêmes cellules plus la probabilité de cellules transformées est élevée. Donc cette technique statistique proposée pourrait être un outil efficace pour prédire le flux de CIN2.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le cancer du col de l'utérus constitue un véritable problème de santé publique, surtout dans les pays en voie de développement où il représente la cause majeure de décès chez la femme. Pourtant, il est provoqué par une infection résultant d'un agent sexuellement transmis, le virus du papillome humain (HPV), qui peut être facilement évité en détectant et en traitant les femmes atteintes de lésions précancéreuses du col provoquées par le HPV.

Notre recherche avait pour objectif d'élucider l'intérêt des bio marqueurs p16 et ki-67 dans les dysplasies cervico-utérine. Selon les résultats de plusieurs scientifiques, l'expression de ces bio marqueurs en plus qu'elle est positive elle semble évoluée et varie selon la gravité des lésions. Donc il existe bien une corrélation significativement positive entre ces deux protéines et les dysplasies utérine.

En plus de ces deux biomarqueurs y'a d'autres molécules qui apparaissent dans les articles consultés précédemment comme la géminine, cytokératine 7 et la E- cadérine. Elles pourraient être utilisées en plus de la coloration avec P16et Ki67 et avoir une aide précieuse pour l'identification et l'interprétation de l'histologie du cancer du col de l'utérus.

Malgré tous ces avantages de l'immunomarquage, nous ne pouvons pas la considérer comme une technique suffisante pour dépister les lésions précancéreuses de l'utérus car ces marqueurs ne sont pas spécifiques que pour les lésions du col utérin, donc d'autres études plus approfondies sont nécessaires, d'autres techniques peuvent avoir une meilleure sensibilité et appréciation, par conséquent, en prévenir l'évolution cancéreuse.

À la lumière de notre travail de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- la généralisation du FCU de dépistage et l'amélioration de la qualité de prélèvement et de la lecture de ces frottis
- la surveillance et le suivi des femmes présentant un FCV anormal.
- l'introduction de test de détection des HPV à haut risque dans de grand centre de santé devrait permette une meilleure prévention du cancer du col de l'utérus.
- La combinaison du marquage de la géminine ou la cytokératine 7 ou la E-cadhérine avec celui de la p16 et ki67 sur une population plus élargie pour préciser encore plus le degré des CIN et améliorer le diagnostic.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1-Aubin, F., Pretet, J.L. et Mougin, C.H. (2003). Papillomavirus humains - Biologie et pathologie tumorale : Éditions EM inter, Éditions , TEC & DOC.

B

2-Baldauf. (2006). Cancer du col de l'utérus. Polycopie : module10- Cancérologie clinique oncohematologie, faculté de médecine de Strasbourg, p180-190.

3-Baldauf, J.-J., Averous, G., Baulon, E., Thoma, V., Talha-Vautravers, A., Sananes, N., & Akladios, Y. C. (2013). Néoplasies intraépithéliales du col. EMC - Gynécologie, 8(2), 1–21

4-Beaudin, S. (2015). Histologie de l'utérus et classification des lésions (pré)cancéreuses du col. P.1.

5- Benchimol (2015). «endoscopie de l'utérus avec curetage» [photo], dans Docteur Benchimol le (5 avril 2015) [banque d'image], sur le site le Docteur Benchimol [Gynécologue-obstétricien à Paris](https://www.docteur-benchimol.com/hysteroscopie-operatoire.html) . <https://www.docteur-benchimol.com/hysteroscopie-operatoire.html> (page consultée le 30 mai 2020)

6- Bergeron C, Wentzensen N, Cas F, von Knebel Doeberitz M. (2006). La protéine p16INK4a : un marqueur cytologique pour détecter les néoplasies intraépithéliales de haut grade du col utérin. Ann Pathol ; 26 : 397-402.

7- Bergeron, C. (2008). HVP et cancer : classification des lésions. Revue Francophone Des Laboratoires, (405), 43–50.

8-Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk M, Keller T, Ridder R. (2010). Conjunctive p16ink4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Path;133:395-40

9-Bernard, H., Burk, R., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., and de Villiers, E. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomie amendments Virology 401, 709.

10-Blanc B. (2005). Cancer du col de l'utérus. Pathologie gynécologique et obstétricale, p 296-297

11-Blanc, B. (2005) Le dépistage du cancer du col de l'utérus. Springer P 107.

12- Bodily J. & Laimins, LA. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. Trends in Microbiology, Vol. 19, No. 1, pp. 33-39, ISSN 0966-842X.

13-Bosch, F., Broker, T., Forman, D., Moscicki, A., Gillison, M., Doorbar, J., Stern, P., Stanley, M., Arbyn, M., Poljak, M., Cuzick, J., Castle, P., Schiller, J., Markowitz, L., Fisher, W., Canfell, K., Denny, L., Franco, E., Steben, M., Kane, M., Schiffman, M., Meijer, C., Sankaranarayanan, R., Castellsagué, X., Kim, J., Brotons, M., Alemany, L., Albero, G., Diaz, M., de Sanjosé, S. (2013). of the ICOMonograph Comprehensive Control of HPV Infections,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A., and Diseases, R. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 31 ,1–31.

14-Boubli L,Blanc B, Taranger-Charpin C. (2005). La classification des types du cancer du col de l'utérus. Tumeurs du col utérin, tumeurs du corps utérin ; Faculté de Médecine de Marseille. France, volume 2, P 147. Disponible sur: <http://medidacte.timone.Univ-mrs.fr> ; (page consultée le 13-03-2020)

15-Bouhadef A, Asselah. F, Boudriche,A. (2005). Histologie du col utérin. Cytopathologie des précurseurs et des cancers du col de l'utérus, Ministère de la santé, de la population et de la forme hospitalière direction de la population, p 214.

16-Bousarghin, L., Touza, A., Gaud, G., Iochmann, S. et Coursaget, P. (2009). Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Ther* 8 :357-65.

17-Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. (2012). Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol*;289315.

18-BSIP SA, (2015).« conisation du col utérin » [photo], dans Alamy le (27 août 2015) [banque d'images], sur le site Alamy . <https://www.alamyimages.fr/photo-image-conisation-du-col-88672942.html> (page consultée le 30 mai 2020).

19-Burghardt, E., & Ostör, A. G. (1983). Site and origin of squamous cervical cancer: A histomorphologic study. *Obstetrics and Gynecology*, 62(1), 117–127. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6856213?dopt=Abstract>.

C

20-Calila,b, M.I.A. Edelweissa,c, L. Meurerc, C.N. Igansic, M.C. Bozzettia,ca. (2014). p16INK4aand Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplasticuterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection . la revue Elsevier *Pathology – Research and Practice* ;(6).

21- Centre Obstétrique et Chirurgie Gynécologique(2010). «cancer du col de l'utérus », sur le site centre obstétrique et chirurgie gynécologique . Consulté le 17aout. 2020. <https://www.chirurgie-gynecologie-obstetrique.com/cancer-du-col-de-luterus>

22- Crook T, Tidy J, Vousden K. (1991). Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and transactivation. *Cell*; 67: 547-6.

23- Crow JM (2012). HPV: The global burden. *Nature* 488: S2-3.

D

24-Dachez, R. (2008). Le cancer du col de l'utérus (Presses Universitaires de France - PUF).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 25-**Daliana Caldas Silvaa, Ana Katherine Gonçalvesa, Ricardo Ney Cobuccib, Roberta Cecília Mendonçac, Paulo Henrique Limac et Geraldo Cavalcanti Júniora. (2017). Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions – A systematic review. *Pathology - Research and Practice*, 213(7), 723–729.
- 26-**Das D, Sengupta M, Basu K, Tirkey M, Datta C, Chatterjee U. (2018). Role of p16/Ki-67 Dual immunostaining in detection of cervical cancer precursors. *J Cytol*;35:153-8.
- 27-** Deng Han, Sumona Mondal, Shantanu Sur and Craig D Woodworth. (2019) *J CellPhysiol: Establishment and optimization of epithelial cell cultures from human ectocervix, transformation zone, and endocervix optimization of epithelial cell cultures.* 234 (6), 7683-7694.
- 28-**Denny, L., Franceschi, S., de Sanjosé, S., Heard, I.,Moscicki, A., and Palefsky, J.(2012), Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. *Vaccine* 30 .168–174.
- 29-**Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzhenkova E.A., Gudtskova T.N., Dvadnenko K.V. (2020). Prognostic relevance of Ki-67 and P16/INK4a markers in histological diagnosis of cervical dysplasia. *Research and Practical Medicine Journal.*;7(1):8-15. (In Russ.)
- 30-**Drolet, M., Boily, M., Greenaway, C., Deeks, S., Blanchette, C., Laprise, J., and Brisson, M. (2013). Sociodemographic inequalities in sexual activity and cervical cancer screening : implications for the success of human papillomavirus vaccination. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22, 641–52.
- 31-**Duport N. (2007). Les données épidémiologiques sur le cancer du col de l’utérus état des connaissances. *Maladies chroniques et traumatismes, Maisons-Alfort*, p56
- 32-**Duport N. (2008). Institut National de Veille Sanitaire. Données épidémiologique sur le cancer du col de l’utérus. Etat des connaissances. INVS

E

33-Essaada Belglaiiaa, (2015). Génotypage moléculaire des papillomavirus humains chez la femme à risque de cancer du col de l’utérus : Implication pour le dépistage et la prévention. Thèse du diplôme d’état de docteur en biologie. Université IBN ZOHR AGADIR et FRANCHE -COMTE. Faculté des sciences médicales et pharmaceutiques. P16. Consulte le 14/03/2020.

F

- 34-**Frisch, M., R.J. Biggar, et J.J. Goedert, (2000). Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 92(18): p. 1500-10.
- 35-**Fritih R., Yousfia Y., Malouma N., Hadj Hammoua F., Benserai F., Amir-Tidagini Z.C., Benamiroucheb A., Oukrifb S., Khiatti N., Bendib A., & Asselaha F. (2010). Cancer du col de l’utérus en Algérie. *Annales de pathologie* 30S, S123-S125.

G

- 36-**Gavillon, N., Vervaet, H., Derniaux, E., et al. (2010). How did I contract human Papillomavirus? *Gynecol Obstet Fertil* 38 199–204.
- 37-**Gompel,C. Koss LG .(1996). *Cytologie gynécologique et ses bases anatomo-cliniques pradel* ,Paris, p200.ISBN2-907516-76-0.
- 38-**Gray E, Pett MR, Ward D, Winder DM, Stanley MA, Roberts I, Scarpini CG et Coleman N. (2010). In vitro progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis. *Cancer Res.* 70: 4081–4091.
- 39-**Grigore.M, S Teleman, D Ungureanu, and A Mares. (2013). Molecular markers in cervical screening a promise for the future. *Revista Română de medicină de laborator*, 21: 231-9.
- 40-**Groves IJ & Coleman N (2015). Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J. Pathol.* 235: 527–538

H

- 41-**Hamid, NA., Brown, C. & Gaston K. (2009).The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cellular and Molecular Life Science*, Vol. 66, No. 10, pp. 1700-1717, ISSN 1420-682X.
- 42-**HAS. (2013). Dépistage et prévention du cancer du col de l’utérus. Actualisation du référentiel de pratiques de l’examen périodique de santé. Consulte 11/03/2020
- 43-**Hinkula, M., Pukkala, E., Kyyrönen, P andLaukkanen, P., Koskela, P.,Paavonen, J., Lehtinen, M., and Kauppila, A. (2004), A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. *Br J Cancer* 90. 1025–9.
- 44-** Hould, R. (1984). *Techniques d’histopathologie et de cytopathologie*. Décarie éditeur Inc. P 24.
- 45-**HUGOL.D. (2002). Lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade et de haut grade : Critères cytologiques et corrélations histopathologiques, *Diagnostic différentiel*. Revue française des laboratoires, N°346.
- 46-**H u L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. (2005). Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* ;18:267–73.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I

47-INCA. (2011). Institut National De Cancer : Les Traitements Du Cancer Invasif Du Col de L'utérus. <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/cancer-du-col-de-luterus>. Consulté le 11/03/2020 . (page Consultée le 13/03/2020).

48-Isautier, S. (2012). place de la vaccination antipapillomavirus humain dans la prévention du cancer du col de l'utérus. Thèse de doctorat. l'île de la Réunion. Pharmacie. Université de Lorraine .218 p.

49-Ivanova, T. A., Golovina, D. A., Zavalishina, L. E., Volgareva, G. M., Katargin, A. N., Andreeva, Y. Y., ... Kisseljova, N. P. (2007). Up-regulation of expression and lack of 5' CpG island hypermethylation of p16 INK4a in HPV-positive cervical carcinomas. *BMC Cancer*, 7(1).

J

50-Joseph A. Jordan and Albert Singer. (2006). *The cervix, SECOND EDITION.* Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK. ISBN-13: 978-1-4051-3137-7.

K

51-Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D (2001). Ki-67, cyclin E, and p16 INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.*, 25(7): 884.

52-Khaliss ,D. (2019). Marqueurs moléculaires et immunologiques du cancer du col de l'utérus. Thèse de doctorat en science. Filière : Biologie Spécialité : Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. p.146.

53-Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. (2002). p16INK4a immunohistochemistry improves inter- observer agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.*;26:1389–99.

54-Koskela, P., Anttila, T., Bjorge, T., Brunsvig, A., Dillner, J., Hakama, M., Hakulinen, T., Jellum, E., Lehtinen, M., Lenner, P., Luostarinen, T., Pukkala, E., Saikku, P., Thoresen, S., Youngman, L., and Paavonen, J.(2000) Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 85, 35-39.

L

55-Lanasc, J., Lecomat, P., Merret, H. (2002). *Gynécologie .6ème édition* Masson. Paris, France .p 591.

56-Larissa Bastos Eloy da Costa, MD, PhD, Renata De Marchi Triglia, MD, PhD, and Liliana A. Lucci De Angelo Andrade, MD, PhD .(2017). p16INK4a, Cytokeratin 7, and Ki-67 as Potential Markers for Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Progression. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 21(3), 171–176.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

57-Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y. & Favre, M. (2009). The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 73, No. 2, pp. 348-370, ISSN 092-2172.

58-Liao GD, Sellors JW, Sun HK, et al. (2014). p16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a prospective study in China. *Int J Cancer*;134: 1715–24.

59-Luhna, P., Walker, J., Schiffman, M., Zuna, R., Dunne, S., Gold, M., Smith, K., Mathews, C., Allen, R., Zhang, R., and Wang, S and Wentzensen, N. (2013), The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 128 265–70

60-Lu-Lu Yu¹, Wen Chen¹, Xiao-Qin Lei¹, Yu Qin¹, Ze-Ni Wu¹, Qin-Jing Pan², Xun Zhang², Bai-Feng Chang², Shao-Kai Zhang³, Hui-Qin Guo² and You-Lin Qiao¹. (2016). Evaluation of p16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China . *Oncotarget.*; 7 (16).

M

61-Marck, V. (2010). Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie Théorie et pratique. Elsevier Masson, Paris: Pp : 51-59

62-Martin, C. M., & O'Leary, J. J. (2011). Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(5), 605–615.

63- Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. (2007). Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.*;357:16. 8. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal.

64-Mélanie Pisaneschi. (2009). Le frottis cervico-vaginal au cours du suivi obstétrical : démarche d'amélioration du dépistage du cancer du col de l'utérus par les sages-femmes à la Maternité Régionale Universitaire de Nancy. Médecine humaine et pathologie. fhal-01888424f .

65-Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N et Doorbar J (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* 77: 10186–10201.

66-Monsonogo, J. (1996). Papillomavirus et cancer du col de l'utérus. *Médecine /Science.* 12, 733-744.

67-Monsonogo J. (2006). Infections à papillomavirus. Etat des connaissances, pratiques et prévention vaccinale. Springer, 236 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

68-Monsonogo, J. (2006) Infections à papillomavirus. État des connaissances, pratiques et prévention vaccinale. Éditions Springer, Paris. P 195.

69-Monsonogo, J. (2007). Prévention traité des infections et pathologies génitale à papillomavirus, Springer. Paris. France

70-Monsonogo, J. (2007). Prévention du cancer du col utérin (I): apport du dépistage, récents progrès et perspectives. La Presse Médicale, 36(1), 92–111.

71-Moody CA & Laimins LA (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat. Rev. Cancer 10: 550–560

72-Morice P., Zafrani Y., Uzen C., Gouy S., Pautier P., Lhomme C., Duvillard P., Castaigne D., HAIE Meder. (2007) : prise en charge actuel du carcinome invasif du col uterin. Paris. Springer-Verlag France .P 276-288

73-Münger, K., Baldwin, A., Kirsten, E.M., Hayakawa, H., Christine, L.N., Owens, M., Grace M. et Huh, K.W. (2004). Mechanisms of human papillomavirus -induced oncogenesis. *J Virol* 78:11451-11460.

N

74-Nakahara, T., Peh, WL., Doorbar, J., Lee, D. & Lambert, PF. (2005). Human papillomavirus type 16 E1/E4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *Journal of Virology*, Vol. 79, No. 20, pp. 13150-13165, ISSN 0022-538X.

75-Natália Gaspar Munhoz, Damaris Aparecida Rodrigues, Juliana Figueiredo Pedregosa, Juliana Olsen Rodrigues, Melissa Silva Garcia Junqueira, Patrícia Tiemi Kamiya Yonamine, Sabrina Fontanele Pereira, Simone Uezato, Thiago Pandossio, Elaine Keid Leso Martins, Flavia Borges de Oliveira, Jose Antonio Cordeiro, Jane Lopes Bonilha and Patrícia Maluf Cury. (2009). The Use of Molecular Markers (p16, Ki-67 and E-Cadherin) in Uterine Cervical Biopsies . *The Open Pathology* ; 3 : 10-17

76-Nicolas Duport , Isabelle Heard, Stéphanie Barré, Anne-Sophie Woronoff. (2014). Le cancer du col de l'utérus : état des connaissances en 2014 [Internet]. Disponible sur: http://www.invs.sante.fr/beh/2014/13-14-15/pdf/2014_13-14-15_1.pdf (page consultée le 13 mars 2020) .

77-Nyitray, A., Lin, H., Fulp, W., Chang, M., Menezes, L., Lu, B., Abrahamsen, M., Papanicolaou, G., Gage, C., Galindo, C., and Giuliano, A. (2013), The Role of Monogamy and Duration of Heterosexual Relationships in Human Papillomavirus Transmission. *J Infect Dis* 209 1007–15.

O

78-OMS. (2007). la lutte contre le cancer du col de l'utérus. Guide des pratiques essentielles. Organisation mondiale de santé. Suisse, Genève. P 149-284.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

79-OMS. (2013) la lutte contre le cancer du col de l'utérus Guide des pratiques essentielles. Organisation mondiale de santé. Suisse, Genève. P 149-284.

80-OMS. (2017). la lutte contre le cancer du col de l'utérus. Guide des pratiques essentielles. Deuxième édition. Organisation mondiale de santé. Suisse, Genève. P 149-284.

P

81- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12).

Q

82- Quint KD, de Koning MN, Quint WG, et al. (2013). Progression of cervical low grade squamous intraepithelial lesions: in search of prognostic biomarkers. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*;170:501–6.

R

83-Rampal A. (2000). Tumeurs du col utérin. Polycopié d'anatomie-pathologie. Faculté de Médecine de Nice.

84-Robinson, P. (2005). Cancer du col de l'utérus: Adressage tumoral et définition de ligands peptidiques de l'oncoprotéine E6 de HPV16. Thèse de Doctorat, L'Université Louis Pasteur de Strasbourg. France. Paris. P 12 ; 17-172.

85- Rokita.W, Kedzia.W, Pruski.D, Friebe.Z, Nowak-Markwitz.E, Spaczyński.R, et al. (2012). Comparison of the effectiveness of cytodiagnosics, molecular identification of HPV HR and CINtecPLUS test to identify LG SIL and HGSIL, *Ginekol. Pol.*83 ,894–898.

S

86-Sandrine Beaudin, Christine Montixi, Marianne Naspetti, et Gérard Vidal (2014). Les papillomavirus humains : Actualisation des connaissances. Dossier scientifiques à destination des enseignants. Ecole Normale Supérieure de Lyon- INSERM U1111.

87-Sangwaiya A, Gill M, Bairwa S, Chaudhry M, Sen R, Prakash Kataria S. (2018). Utility of P16/INK4a and Ki-67 in Preneoplastic and Neoplastic Lesions of Cervix. *Iranian Journal of Pathology*; 13(3): 308-316.

88-Sankaranarayanan R., Ramani M.D. S., Wesley, MD.(2004). Guide pratique pour le dépistage visuel des Néoplasies cervicales. Rapport technique 41 du CIRC, Lyon, France

89-Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*; 63: 1129-38.

90-Schiffman M, Herrero R, DeSalle R et al. (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 337: 76-84

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

91-Schiffman M, Wentzensen N. (2010). From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol.*;116:1.

92-Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA et Franceschi S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2: 16086

93-Segondy, M. (2008) Classification des papillomavirus (HPV). *Revue francophone des laboratoires.* - N°405.P. 24.

94-Segondy, M. (2013). Papillomavirus et cancer. *Revue Francophone Des Laboratoires*, (456), 57–66.

95-Segondy, M. (2013). Agents infectieux et cancers. *Revue francophone des laboratoires papillomavirus et cancer* - N°456.

96-Sellors, J.W. et Sankaranarayanan, R. (2004). Colposcopie et Traitement des néoplasie Cervicale Intraépithéliales : Manuel à l'usage des débutants. Lyon, France, IARC Press.

97-Song S-H, Park H-M, Eom D-W, Lee J-K, Lee N-W, Kim A-R, Hur J-Y, Lee K-W, Park Y-K, Saw H-S. (2007). The expression of p16 (INK4a) and Ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins. *Int J Gynecol Cancer*;17:858–867.

98-Steenbergen RDM, Snijders PJF, Heideman DAM & Meijer CJLM (2014). Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* 14: 395–405

99-Stevens, A., Lowe, G. (2002). *Histologie Humain.* Ed DeBoeck. Paris, France. P. 332.

100-Stevens A, Lowe James. (2004). Cancer du col de l'utérin. *Histologie humaine.* 2e ed Paris, France , p 327-350.

T

101-TRANBALOC.P., (2008). Histoire naturelle des lésions précurseur du cancer du col utérin *Gynécologie obstétrique & fertilité* 36, 650-655.

W

102-WALKER.F ; ANNIE CORTEZ . (2001). *Histologie d'un col normal et des néoplasies intra épithéliales*

X

103-Xing, Yan MD; Wang, Chaojun MD; Wu, Jie MD, PhD. (2017). Expression of geminin, p16, and Ki67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. *Medicine*, 96(26), e7302.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Y

104-Yoo, Y.A., et al., (2013). Progesterone signaling inhibits cervical carcinogenesis in mice. *Am J Pathol.* 183(5): p. 1679-87

105- Yuanhang Zhu, Chenchen Ren, Li Yang, Xiaoan Zhang, Ling Liu and Zhaoxin Wang. (2019). Performance of p16/Ki67 immunostaining, HPV E6/E7 mRNA testing, and HPV DNA assay to detect high-grade cervical dysplasia in women with ASCUS. *BMC CANCER.*

Z

106-Zeng, X., Xiong, P., Wang, F., Li, C., Yao, J., et Guo, Y. (2012) : Passive Smoking and Cervical Cancer Risk : A Meta-analysis Based on 3,230 Cases and 2,982 Controls. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 2687–94. 1

107-Ziemke P, Marquardt K (2012). Immunocytochemistry of p16 (INK4a) and Ki-67 as adjunctive method for routine gynecological cytology of mild and moderate dysplasia. *Pathologe*, p. 4.

ANNEXES

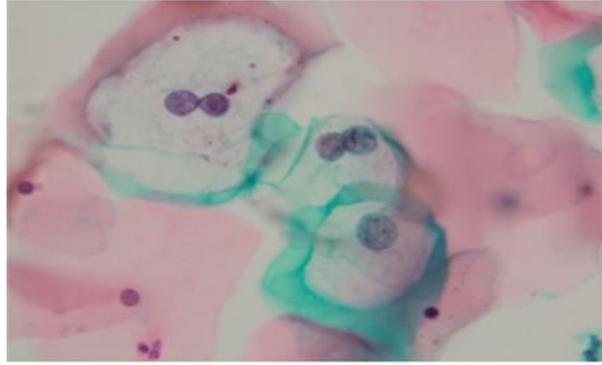


Figure 26 : Coupe cytologique de koilocytes. (Technique monocouch SurePath®×1000)
(Baldauf et *al.*, 2013).

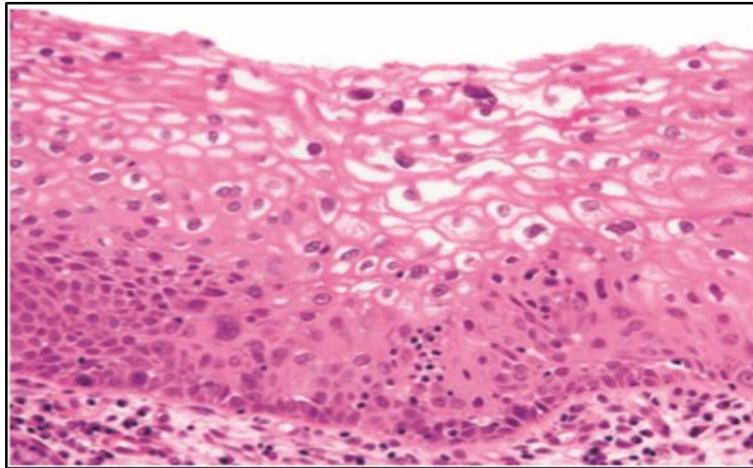


Figure 27 : Coupe histologique de néoplasie cervicale intra-épithéliale grade 1 (CIN1) avec koilocytes. (Hématoxyline et éosine × 400) (Baldauf, J et *al.*, 2013)

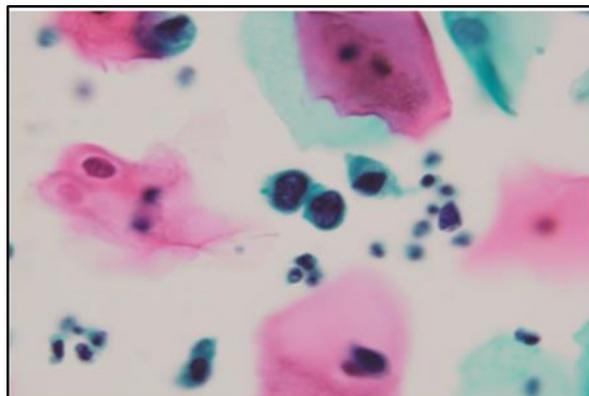


Figure 28 : Coupe cytologique d'une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade.
(Technique monocouche SurePath® × 1000) (Baldauf, J et *al.*, 2013).

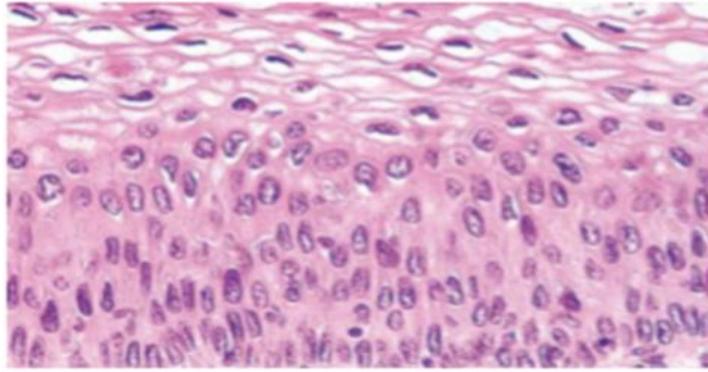


Figure 29: Coupe histologique d'une CIN2. Les couches basales anormales remontent jusqu'à la moitié de la hauteur de l'épithélium et les couches superficielles contiennent des koilocytes. (Hématoxyline et éosine x 200) (Bergeron, 2008).

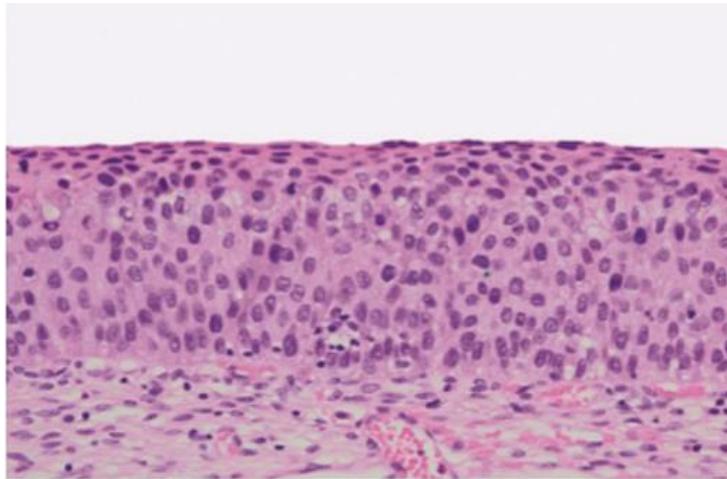


Figure 30 : Coupe histologique de néoplasies intra-épithéliales de grade 3. (Hématoxyline et éosine $\times 400$) (Baldauf, Jet *al.*, 2013).

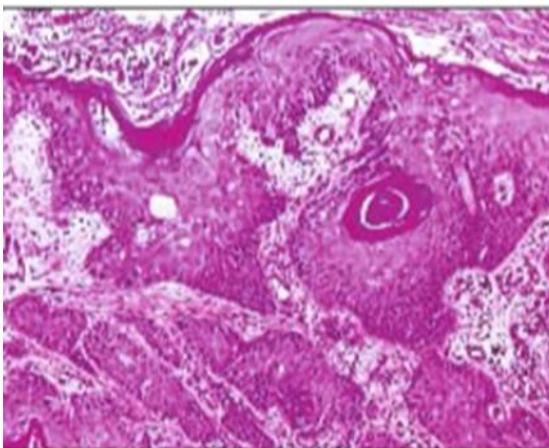


Figure 31 : Aspect histologique d'un carcinome cellulaire épidermoïde invasif kératinisant bien différencié (x 10) (Sellors, et al., 2004).

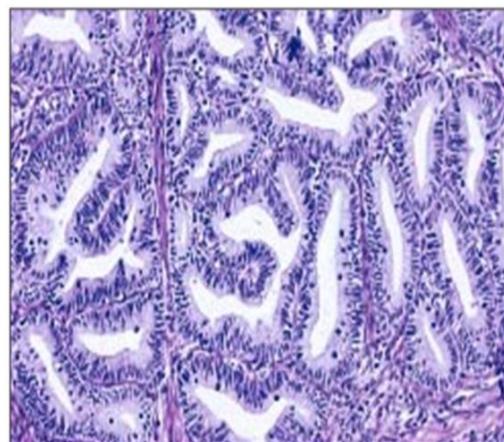


Figure 32 : Coupe histologique d'un adénocarcinome invasif bien différencié (x 20) (Sellors, et *al.*, 2004).

Centre de dépistage des cancers génitaux
CLINIQUE HASSIBA BEN BOUALI CHU BLIDA

Fiche technique : FCU (BETHESDA 2001)

Date du prélèvement :

Nom : prénom : Age :

Age du mariage : Durée de mariage : Gestite : Parité : DDR :

Polygamie : Non* oui* Durée de la ménopause :

Age du 1^{er} FCU : Motif du prélèvement : Dépistage contrôle*

Antécédents gynécologique/thérapeutique :

Chirurgie gynécologique* hormonothérapie*

Chimiothérapie* Radiothérapie*

Bain : oui* Non* Tabac : Non* Oui actif Oui passif*

Contraception : Orale* Mécanique*

Signes cliniques : Leucorrhées* Métrorragie* douleurs pelviennes

Qualité du prélèvement :

FCU interprétable ; FCU intréprétables mais limité par

Résultat du FCU

Infection HPV* Autre infection

NIL/M*

ASCUS*

LSIL/CIN1*

CIN2*

AGC* :

NB :*=cocher.

Lecture le :

Autre infection

ASC

ASCHR*

HSIL

CIS*

AIS* :

NOS* :

CIN3*

Anatomopathologiste : CHU* privé*

Tableau V : Le matériel utilisé pour les techniques cytologique et histologiques durant notre pratique au sein du laboratoire

Techniques	Cytologique	Histologique
Matériel divers	Spatule d'Ayre , cytobrosse ou écouvillon , Lames et Lamelles.	Table de macroscopie, cassettes, couteau,règle,pince,bistouri,étiquettes. Cassettes, Panier, Moules métalliques, Règle,Pince,Bistouri,Lames,Lamelles, étiquettes,Bande de gaze, Stylo hydrophobe, spéculum, flacons des biopsies, pince à biopsie.
Produits et colorants	Eau, alcool à différentes concentrations, xylène, hématoxyline, EA50, OG6, eukitt.	Formol pur (36%) (Formaldéhyde), eau, paraffine liquide (fondue), eau distillée, éthanol, xylène, hématoxyline éosine (HE), acide chlorhydrique, eau Ammoniacale, résine (Eukitt), tampon de citrate à Ph 6.1, PBR, Wash buffer, DAB, hématoxyline de Harris, Anticorps monoclonal de souris anti-protéine humaine Ki-67, Anticorps monoclonal de souris anti-protéine humaine p16, Anticorps secondaire conjugué, Acide acétique à 3 ou 5 %, Lugol.eau acidifiée .
Appareils	Microscope optique Zeiss et Leica.	Automate a circulation (Leica), microtome, distributeur de paraffine, étuve,Plaque refroidissante, Microtome, Microscope optique,Plaque chauffante,Hotte aspirante, Cocotte-minute, Colposcope

(Original, 2020)

A. Technique de prélèvement d'un frottis cervico-vaginal (prélèvement cytologique)

Le frottis cervico-vaginal consiste à prélever des cellules du col de l'utérus. Le prélèvement doit intéresser la jonction exocol-endocol. le matériel prélevé est ensuite étalé et fixé sur une lame, coloré et examinée sous microscope (Figure 33).



Figure 33 : Etalement des cellules sur lames (Original, 2020)

But : Analyser l'aspect des cellules de la muqueuse cervicale et déceler d'éventuelles modifications qui peuvent être signe de lésions précancéreuses, susceptibles d'évoluer en cancer si elles ne sont pas traitées.

- Exposer et moucher le col à l'aide d'une pince longuette avec coton hydrophile et débarrasser le col de ses sécrétions physiologiques
- Prélever les cellules au niveau de la jonction entre la muqueuse de l'endocol et celle de l'exocol avec une spatule d'Ayre dont la forme permet de se déposer à la surface de l'exocol et de pénétrer dans l'endocol qu'elle balaye par un mouvement de rotation
- Effectuer un ramonage au niveau de l'endocol fait à l'aide d'un écouvillon ou d'une brosse.
- Etaler les prélèvements sur une lame en verre dans un sens unique régulier avec une bonne épaisseur et rapide pour prévenir le dessèchement
- Fixer les prélèvements immédiatement en les vaporisant avec un cyto-spray dans le but de préserver la morphologie des cellules et éviter la dessiccation qui les déforme et modifie leurs affinités tinctoriales.
- Transporter les lames dans une enveloppe en carton accompagnées de leurs fiches de dépistage vers le service d'anatomopathologie du CHU de DOUERA.
- Enregistrer les prélèvements dans le laboratoire d'anatomopathologie en leur attribuant un numéro d'identification unique qui sera retranscrit sur les lames.
- Colorer les lames par la méthode de Papanicolaou universelle (Tableau VI).

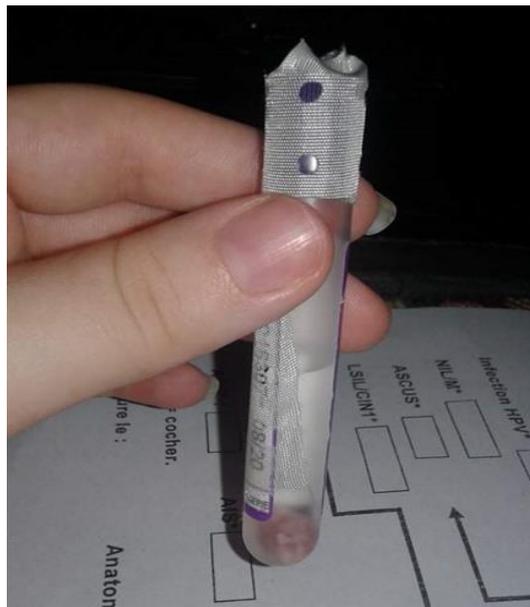
Tableau VI : Protocole de la coloration cytologique de Pap

Étape	Durée
éthanol	2min
Rinçage	/
Hématoxyline de Harris (Pap 1)	4min
Rinçage à l'eau	/
éthanol	1 immersion - 2min
Coloration à l'Orange G-6	5min
Rinçage à l'eau	/
éthanol	1 immersion - 2min
Coloration a l'EA50	7min
Rinçage à l'eau	/
Ethanol	1 immersion - 2min
Ethanol + xylène (50%/50%)	1 immersion - 3min

(Original,2020).

B. Technique de prélèvement d'une biopsie :

La biopsie du col de l'utérus consiste à prélever de petits échantillons de tissu anormal afin de les examiner au microscope pour obtenir un diagnostic. Elles sont généralement dirigées au colposcope et peuvent être prélevées dans des régions du col de l'utérus pour lesquelles l'examen par inspection visuelle avec l'acide (IVA) s'avère positif ou qui présentent des anomalies faisant suspecter l'existence d'un cancer (Figure 34).

**Figure 34** : Biopsie du col utérin (Original 2020)

- Insérer le spéculum dans le vagin de la patiente.
- Examiner le col de l'utérus avec une loupe médicale grossissant fortement toutes les différentes zones du col.
- Révéler les lésions en appliquant deux colorants qui rendent opaques les zones anormales alors que le reste du col est rosé.

* Acide acétique à 3 ou 5 % : l'acide acétique permet de faire réagir les cellules anormales qui changent de couleur. Il les colore en blanc (coagulation des protéines). Il s'agit d'une étape essentielle pour explorer la limite interne de la lésion et la jonction endocol-exocol (Figure 35).

* Lugol : (test de Schiller) : le lugol se fixe sur le revêtement normal de l'exocol porteur de glycogène, cette fixation colore l'exocol en couleur brunâtre, sauf les lésions du revêtement de l'exocol qui sont dépourvues de glycogène et qui ne prennent pas cette coloration (test négatif) (Figure 36).

- Prélever les fragments en plein centre des lésions opaques visualisées soit au niveau de l'endocol, de l'exocol ou dans la zone de jonction.
- Fixer les prélèvements dans des flacons de biopsies contenant du formol à 10% et les transporter dans le laboratoire d'anatomie pathologie pour un examen histologique.



Figure 35 : Col positif à l'acide acétique (*Sankaranarayanan R, et all., 2004*)

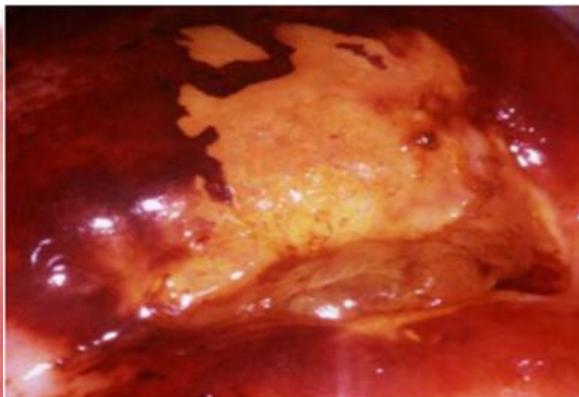


Figure 36: Col positif au soluté de lugol (*Sankaranarayanan R, et all., 2004*)

Tableau VII : Différentes étapes de la circulation

Etapes	Bain	Temps nécessaire
Déshydratation Débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient en utilisant l'éthanol	1 ^{er} éthanol (70°)	2h
	2 ^{ème} éthanol (95°)	2h
	3 ^{ème} éthanol (100°)	2h
Eclaircissement (transparence) le remplacement de l'éthanol présent dans les tissus par un solvant de la paraffine qui est le xylène (agent moins toxique que le toluène et miscible à la paraffine et l'agent déshydratant)	1 ^{er} xylène	2h
	2 ^{ème} xylène	2h
	3 ^{ème} xylène	2h
Imprégnation le remplacement du xylène présent dans les cellules par la paraffine liquide à 60°	1 ^{ère} paraffine	1h
	2 ^{ème} paraffine	1h
	3 ^{ème} paraffine	1h

(Original, 2020).

Tableau VIII : les étapes de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

Etapes	Temps nécessaire et nombre d'immersion	But
Hématoxyline de Harris	5 à 10min	Coloration du noyau
Rinçage à l'eau	/	Enlever l'excès d'hématoxyline
Eau acidifiée	2 immersions	la différenciation entre le noyau et le cytoplasme
Rinçage à l'eau	/	
Eau ammoniacale	2 immersions	Bleuissement du noyau
Rinçage à l'eau	/	Eliminer l'excès des substances précédentes
Eosine	4 à 6 min	Coloration du cytoplasme en rose
Rinçage à l'eau	/	Eliminer l'excès d'éosine
Ethanol	3 bains 80°C- 95°C - 100°C (5min chacun)	Pour déshydrater le tissu
Xylène	1 immersion 5min	Eclaircissement du tissu

(Original, 2020)



Figure 37 : Bloc avant et après l'inclusion (Asloune et bouakaz ; 2017)



Figure 38 : Confection des coupes histologiques à l'aide du microtome (Asloune et bouakaz ; 2017)

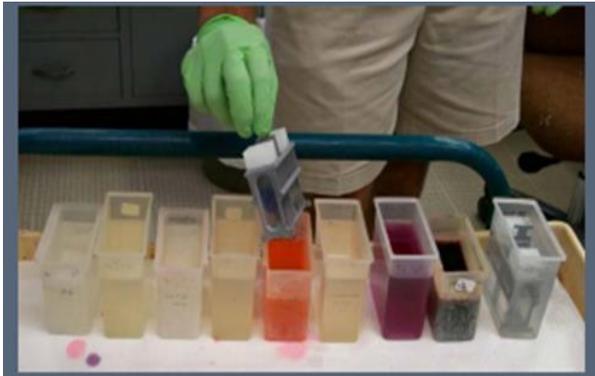


Figure 39: Etapes de coloration a l'hématoxyline et à l'éosine (Julie Hinsinger ; 2019)



Figure 40 : Montage des échantillons entre lame et lamelle (Asloune et bouakaz ; 2017)

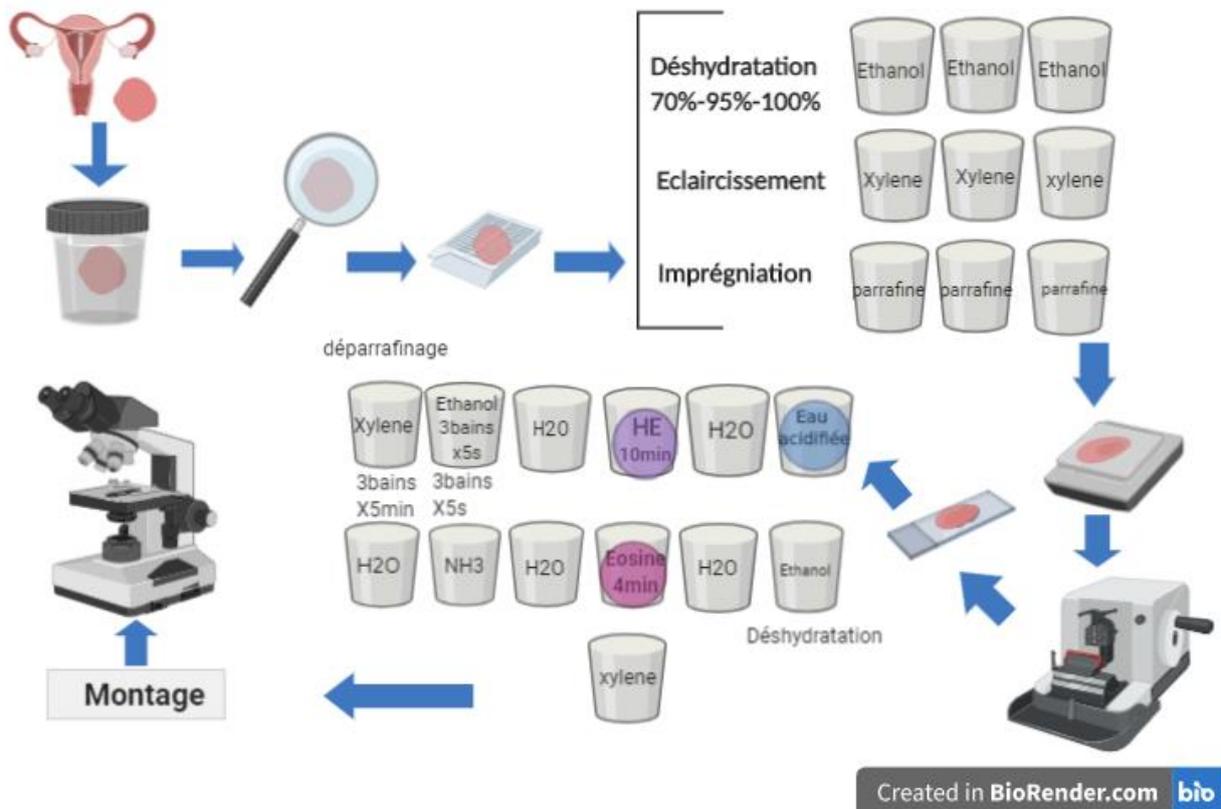


Figure 41: Résumé des étapes de la technique usuelle d'anatomopathologie (Original, 2020).

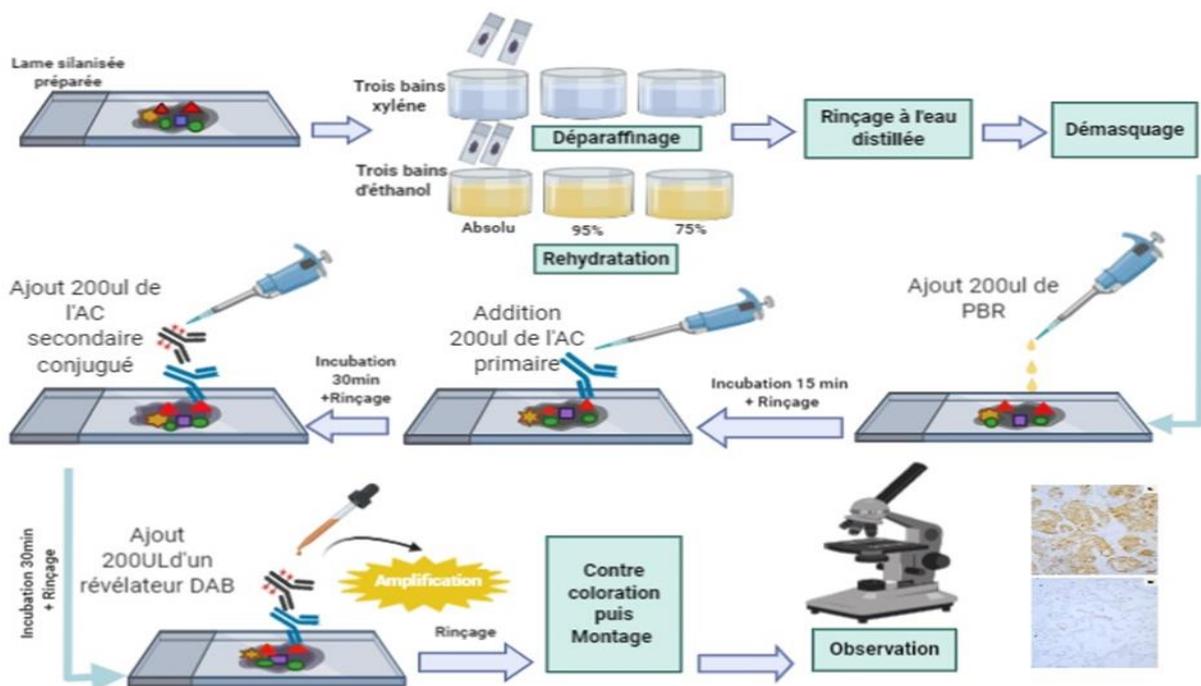


Figure 42 : Résumé de principe de la technique immunohistochimie indirecte (Original, 2020).