



HAL
open science

Études des profils viraux et de la protéine p16 dans les néoplasies intra épithéliales du col de l'utérus

Valérie Metang Ngansop

► **To cite this version:**

Valérie Metang Ngansop. Études des profils viraux et de la protéine p16 dans les néoplasies intra épithéliales du col de l'utérus. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01088560

HAL Id: dumas-01088560

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01088560>

Submitted on 28 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R des sciences Médicales

Année 2014

thèse n° 3081

Thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine

Discipline : Gynécologie-obstétrique

Présentée et soutenue publiquement le 15 octobre 2014

par **Valerie METANG NGANSOP** née le 08/06/1984 à Yaoundé(Cameroun)

**Etude des profils viraux et de la protéine P16
dans les néoplasies intra épithéliales du col de
l'utérus**

Directeur de thèse

Pr Jean-Luc BRUN

Rapporteur

Dr Anne Gaëlle KAEMMERLEN

Jury

Pr Dominique DALLAY, président et juge

Pr Claudine MATHIEU, juge

Dr Isabelle GARRIGUE(MCU), juge

Dr Sabrina CROCE, juge

Pr Jean-Luc BRUN, directeur de thèse et juge

A Augustin et Paulette METANG,
les premiers amours de ma vie

A notre Maître et Président du jury

Monsieur Dominique DALLAY

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Chef de service de Gynécologie Obstétrique, maternité C, CHU de Bordeaux

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Nous avons apprécié votre bienveillance tout au long de notre internat et vous remercions de la confiance que vous nous accordez. Votre rigueur dans le travail et votre gentillesse ont suscité notre admiration.

Veillez trouver dans ce travail, l'expression de notre considération et de notre plus profond respect.

A notre Maître et Directeur de thèse

Monsieur Jean-Luc BRUN,

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Service de Gynécologie Obstétrique, maternité C, CHU de Bordeaux

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail.

Nous vous remercions de l'avoir dirigé et de nous avoir encouragé lors de sa réalisation.

Nous vous remercions pour votre enseignement, vos conseils avisés et votre soutien pendant l'internat.

Veillez trouver dans ce travail, l'expression de notre profonde gratitude et notre respect

A notre rapporteur de thèse,

Madame le Docteur Anne Gaëlle KAERMMERLEN

Praticien Hospitalier

Service de Gynécologie chirurgicale, CHU de Clermont-Ferrand

Vous nous avez fait l'honneur et le plaisir d'évaluer ce travail. Vous avez su nous accueillir dans votre ville et nous enseigner votre art. Votre ouverture d'esprit, votre gentillesse et votre savoir sont pour nous un exemple, et nous ont redonné le goût de l'effort. Que ce travail soit l'expression de notre profonde gratitude et de notre respect.

A notre Maître et Juge,

Madame Claudine MATHIEU

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Service de Gynécologie médicale, chirurgicale et de Médecine de la Reproduction

CHU de Bordeaux

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.

Votre accueil, votre savoir et votre gentillesse nous ont permis d'acquérir des connaissances en gynécologie médicale.

Recevez à travers ce travail, le témoignage de notre plus grand respect.

A notre Juge,

Madame le Docteur Isabelle GARRIGUE

Maître de conférences des Universités

Praticien Hospitalier

Service de virologie, CHU de Bordeaux

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.

Votre simplicité, votre disponibilité et votre savoir ont boosté notre motivation et ont enrichi notre travail.

Recevez à travers ce travail, toute notre gratitude et notre respect.

A notre Juge,

Madame le Docteur Sabrina CROCE

Praticien Hospitalier

Service d'anatomopathologie de l'Institut Bergonié

Vous nous faite l'honneur de juger ce travail.

Votre savoir, vos compétences et votre disponibilité ont suscité notre admiration.

Que ce travail soit l'expression de notre profonde gratitude et de notre respect

Au Dr Christine TUNON DE LARA,

merci pour ton soutien tout au long de ce travail et de mes deux dernières années d'internat. Merci pour tes conseils avisés et pour ta patience à toute épreuve. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta pédagogie. Tu es un modèle pour moi.

Au Dr Marion Marty,

l'anatomopathologiste qui interprète plus vite que son ombre, merci pour ton aide précieuse et pour les images d'illustration.

A Benjamin Bonhomme,

pour ta gentillesse et ta disponibilité, j'espère que j'aurai à nouveau le plaisir de travailler avec toi.

A Olivier Delorme,

merci pour les dossiers, tes trucs et astuces d'ARC, ta bonne humeur.

Au Dr Marion Fournier,

pour tes conseils, ton soutien, ta sagesse, ton ouverture d'esprit, tes futurs enseignements

A tous mes Maîtres et chefs,

le Dr Tania LABES, le Dr Mona MASRI, le Dr Corinne BELCIKOWSKI, le Dr Florence MAZERES, le Dr Lydie CHERRIER, le Dr Pierre CHABANIER, le Dr Eberhard STOECKLE, le Dr Noémie BAGET, le Professeur Serge EVRARD, tous mes chefs clermontois, en particulier le Professeur CANIS, le Dr Nicolas BOURDEL, le Professeur Benoit RABISCHONG, le Dr Sandrine CAMPAGNE, le Dr Clara COMPAN (et ses trucs et astuces pour retrouver les articles introuvables !), et tous ceux que j'oublie : votre présence tout au long de mon internat m'a aidé à tenir pendant les moments difficiles. Vous m'avez beaucoup appris et vous continuez encore d'ailleurs.

A tous mes collègues internes de toutes les spécialités que j'ai côtoyés,

en particulier Bérénice, Marie, Paméla, Céline, Lucie, l'autre Bérénice, Pauline, Aurélie, Mathieu, Clémence, Guillaume, l'amitié et l'émulation qui nous ont habité ont été des moteurs pour moi pendant tout mon internat.

A toutes les infirmières, les aides-soignantes, les ASH, les sages-femmes,
en particulier l'équipe de Bergonié, j'aime beaucoup travailler à vos côtés, merci pour vos conseils, votre gentillesse, votre compréhension et votre compétence.

Aux patientes,
merci de nous permettre d'apprendre notre métier et de prendre soin de vous.

A mes amis,
ma petite Mireille, ma sœur de cœur, ma mère pendant mes 6 mois d'inter CHU, Dominique, mon autre sœur de cœur, incorrigible optimiste et fine psychologue, Thierry, mon petit frère, bientôt médecin, Anne-élise et sa maman, leur gentillesse, leur paradis sur terre, Julie et Alcyone, qui m'ont tenu la main pendant une période très difficile, Yvan le poète, Catherine, avec qui on a commencé l'aventure médecine, Hoby et Vola et tous les autres, je ne vous oublie pas ! Merci d'être là...

A papa Daniel et maman Nicaise,
Merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté, toutes les histoires marrantes qui nous aidaient à nous changer les idées, votre présence. Vous êtes partis trop tôt...

A mes frères et sœurs, ma belle sœur, mes neveux et nièces,
Nathalie, Lionel, Patrick, Solange, Gérémie, Stéphanie, Hilary, Brad, Shandra, Valerie, Elora,
merci pour votre amour inconditionnel.

A mes cousins et toute ma famille, à Anne, Pierre, A, B, C et D BESSEAS, ma famille clermontoise,
merci de m'avoir aidé à grandir.

A Oberlain, mon chéri, mon statisticien, mon conseiller, mon ami,
merci d'avoir travaillé jusqu'à pas d'heure avec moi, merci pour ton optimisme, ta bienveillance et pour ton amour.

Et à mon Dieu qui ne m'a jamais abandonné,
Je Te remercie et Te rend grâce, en espérant avoir fait fructifier le talent que tu m'as offert.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	13
I- INTRODUCTION GENERALE	15
1- HPV : DE L'INFECTION AU CANCER DU COL DE L'UTERUS	15
A. Généralités.....	15
B. cancerogenese.....	18
2- DÉTECTION VIRALE ET GÉNOTYPAGE.....	20
A. définitions.....	20
B. principes de la détection de l'ADN viral.....	20
C. techniques de génotypage.....	21
D. Intérêts et indications du génotypage viral.....	22
3-CIN2 ET PARTICULARITES.....	23
A. Généralités sur les CIN.....	23
B. Difficultés diagnostiques des CIN2.....	25
C. Histoire naturelle de CIN2.....	29
4- P16INK4A ET CIN	31
A. définition.....	31
B. Physiologie.....	31
C. Physiopathologie	32
D. Intérêts de la P16 dans les dysplasies cervicales	33
II- ETUDE DES PROFILS VIRAUX DES CIN SUR UN ECHANTILLON DE 120 PATIENTES, ETUDE DU PROFIL P16 DES CIN2 SUR UN ECHANTILLON DE 45 PATIENTES	35
1. JUSTIFICATION DU TRAVAIL.....	35
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	37
A. Recrutement des patientes.....	37
B. Génotypage viral	39
C. Analyse histologique et immunohistochimique.....	40
D. Analyse statistique.....	42
3. RÉSULTATS	43

A.	<i>Données démographiques et cliniques</i>	43
B.	<i>Génotypage viral et CIN</i>	45
C.	<i>P16 et CIN2</i>	50
4.	DISCUSSION	51
A.	<i>Infection à virus HPV et données cliniques</i>	51
B.	<i>Epidémiologie des HPV et CIN</i>	52
C.	<i>Génotypage HPV et perspectives diagnostiques des CIN</i>	55
D.	<i>P16 et CIN2</i>	56
III-	CONCLUSION	61
	BIBLIOGRAPHIE	63
	ANNEXES	68
	SERMENT D'HIPPOCRATE	78



LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN: acide desoxyribonucléique

AGC : atypie glandulaire de signification indéterminée

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

ASCUS : atypie malpighienne de signification indéterminée

CDK: cyclin dependant kinase

CIN: cervical intraepithelial neoplasia

CIN1: cervical intraepithelial neoplasia 1

CIN2: cervical intraepithelial neoplasia 2

CIN2+ : lésion supérieure ou égale à CIN2

CIN3: cervical intraepithelial neoplasia 3

CNGOF : collège national des gynécologues obstétriciens de France

E2F: facteur de transcription

FCU: frottis cervico utérin

FISH: fluorescent in situ hybridation

HCII: Hybrid Capture II Test HPV

HIV: human immunodeficiency virus

HPV- : absence de virus HPV

HPV+: présence de virus HPV

HR-HPV: high risk human papillomavirus

HSIL: high grade squamous intraepithelial lesion

HSV 1 et 2: herpes simplex virus 1 et 2

IARC: international agency for research in cancer

IR-HPV: intermadiate risk human papillomavirus

LAST: lower anogenital s terminology

LR-HPV: low risk human papillomavirus

OMS : organisation mondiale de la santé

PCR : polymerase chain reaction

pRb: protéine du gène du rétinoblastome

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

1- HPV : DE L'INFECTION AU CANCER DU COL DE L'UTERUS

A. GÉNÉRALITÉS

Le Human Papilloma Virus (HPV) est un virus à ADN de la famille des papillomaviridae, à tropisme pour les épithéliums malpighiens. C'est un virion non enveloppé avec une structure de capsid e le rendant très résistant dans le milieu externe à la congélation et à la dessiccation. Cette propriété de résistance favorise donc la transmission du virus.

Il existe plus de 200 génotypes dont 120 identifiés et séquencés. Harald Zur Hausen (1) (prix Nobel de médecine en 2008) a été le premier à suggérer que certains génotypes d'HPV étaient des facteurs obligatoires dans le développement du cancer du col de l'utérus. En effet, les HPV sont impliqués dans au moins 93% des cancers du col utérin (2).

L'infection à HPV est l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente dans le monde. Le taux de transmission per coïtale est estimé entre 0,4 et 0,8, ce qui est très élevé par rapport à la transmission d'autres virus génitaux comme le Human Immunodeficiency Virus (HIV) ou l'Herpes Simplex Virus type 2 (HSV2).

La transmission de l'HPV se fait soit par contact direct interhumain (buccal, rapport sexuel), soit par contact indirect (objets et surfaces contaminés).

Les infections génitales et muqueuses sont les plus étudiées, du fait de leur grande fréquence et également du risque de néoplasie. En effet, le HPV est impliqué non seulement dans les cancers du col de l'utérus, mais aussi les cancers anorectaux, du vagin, de la vulve, du pénis, du pharynx et de l'œsophage (annexe 1).

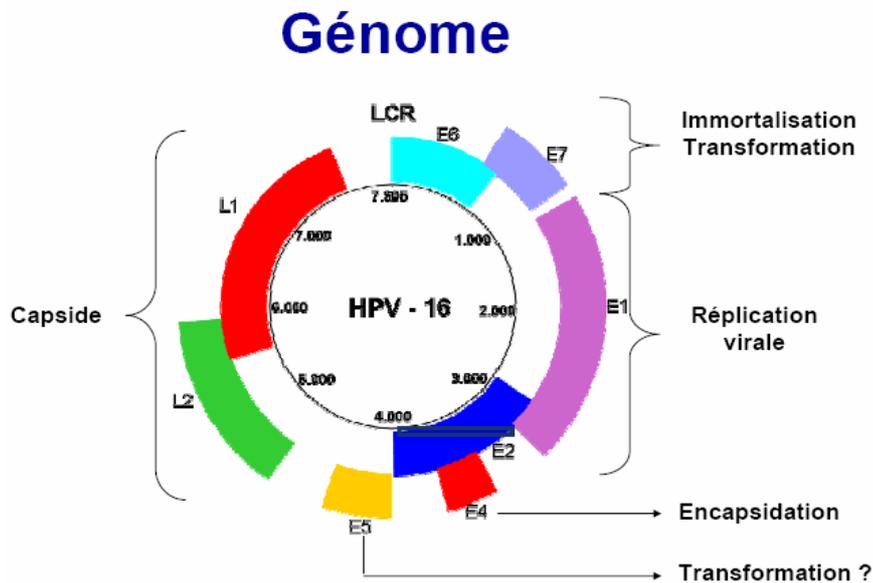
Il existe 4 grands groupes¹ d'HPV (3) (4) :

- Types muqueux et génitaux à potentiel cancérigène élevé : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 56, 59 ;
- Types muqueux et génitaux à potentiel cancérigène intermédiaire (comprenant les HPV probablement et/ou possiblement oncogène): 26, 30, 34, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85, 97 ;
- Types muqueux et génitaux à potentiel cancérigène faible : 6, 11, 32, 61, 13, 44, 74 ;
- Types cutanés : 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 27, 57, 60.

Le génome des HPV génitaux compte 8000 paires de gènes mais un seul de ses brins est codant. Il possède également 3 régions génomiques (**figure 1**) :

¹ Les listes des HPV par groupe ne sont pas exhaustives

Figure 1 : organisation du génome des HR-HPV basé sur le modèle de HPV16, selon Monsenego (5), et Agius (6)



- La région L (Late), codant pour les protéines de la capsid L1 et L2 ;
- La région E (Early), codant pour 7 à 8 protéines non structurales de E1 à E7 ou 8 ;
- Une région non codante, comportant des promoteurs des gènes précoces et des séquences de régulation de la réplication et de la transcription.

Les gènes de la région E codent pour des protéines non structurales, impliquées dans les mécanismes de multiplication virale et de carcinogénèse (**tableau 1**) :

Tableau 1 : Rôles des protéines de la région E des virus HPV selon (3)

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

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; ADN : acide désoxyribonucléique

Les lésions induites les plus fréquentes sont bénignes. Elles sont représentées par les condylomes acuminés pour les virus à tropisme génital et les verrues plantaires et vulgaires pour les virus à tropisme cutané.

Le cancer du col est le deuxième cancer féminin le plus fréquent à l'échelle mondiale. En 2002, l'incidence était de 493000 femmes dans le monde dont 20% dans les pays développés et 80% dans les pays en voie de développement, avec 274000 morts estimées (5).

En France métropolitaine, selon les données 2012 de l'INCA (7), il s'agit du dix-huitième cancer chez la femme en terme d'incidence, avec 3028 cas par an, et du onzième en terme de mortalité, avec 1102 décès par an. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 54 ans, la médiane est à 51 ans. L'âge moyen au moment du décès est de 66 ans. Le pic de fréquence du cancer du col est à 40 ans, et le pic de mortalité à 54 ans. Ce cancer reste exceptionnel avant 30 ans, même si il est en augmentation chez les femmes de moins de 40 ans en France notamment(5).

Le dépistage actuel en France se fait par FCU de 25 à 65 ans, tous les 3 ans après deux frottis consécutifs à un an d'intervalle sans anomalie (8). Le taux global de couverture du dépistage par FCU sur la période 2006-2008 est de 56,6%. Ce taux est de 52% entre 50 et 54 ans, qui est la tranche d'âge du diagnostic moyen du cancer du col (8).

B. CANCEROGENESE

L'infection par un virus HPV à haut risque est le facteur majeur dans le développement du cancer du col utérin. En 1995, Bosch (2) retrouve dans son étude la présence d'une infection à HPV dans 93% des cancers du col, avec un risque de cancer augmenté de 65 fois si présence de HPV, de 130 fois en cas de HPV de type 16. Les HPV 16 et 18 sont responsables à eux seuls de 70% des cancers du col. Les HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 sont responsables de 95% des cancers du col (9). Mais l'infection n'est pas un facteur suffisant.

La persistance de l'infection par HR-HPV (HPV à haut risque) est l'autre facteur majeur dans le processus vers la transformation maligne. Moins de 5 % des femmes infectées par HPV 16 développeront un cancer du col utérin au cours de leur vie (10). Il n'existe pas de définition consensuelle de la persistance : en général elle est définie par deux prélèvements positifs entre 12 et 18 mois d'intervalle (11). Dans la plupart des cas, en particulier chez la femme de moins de 30 ans, les infections à HPV sont transitoires et s'accompagnent de la disparition des anomalies cytologiques et histologiques qu'elles avaient pu induire. En effet, la clairance virale (élimination de l'infection virale) des HPV est assez rapide et fréquente, en moyenne 70 % des infections disparaissent en 12 mois et 90 % en 24 mois (10). Une infection persistante est retrouvée dans 3 à 10% des cas (12)

Certains facteurs favorisent la persistance de l'infection ou sont des cofacteurs de la carcinogenèse (modérés en comparaison de l'infection persistante à HPV oncogène). Ils peuvent être subdivisés en 3 catégories :

- **Les cofacteurs viraux** : ils sont liés à l'infection par le virus HPV. Il s'agit du génotype viral (les HPV 16 et 18 sont les plus virulents), de la charge virale élevée, de certains variants viraux à plus haut risque au sein d'un génotype (par exemple, HPV 16 E6-350G).

- **Les facteurs endogènes (propres à l'individu)** :
 - o Facteurs génétiques : principalement le groupe de gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), codant pour les protéines présentatrices d'antigènes de surface (le système HLA : human leucocyte antigen) ;
 - o Hormones endogènes : la multiparité, le statut ménopausique ;
 - o Capacités de réponse immunitaire propres à l'individu (déficits immunitaires constitutionnels) ;
 - o En revanche, les caractéristiques de la vie sexuelle (l'âge du premier rapport, le nombre de partenaires au cours de la vie, l'historique des IST) ne constituent pas des facteurs de risque de persistance de l'infection ou des cofacteurs de carcinogenèse, mais sont plutôt des facteurs de risque de l'infection à HPV (10).

- **Les facteurs exogènes** : en dehors des facteurs viraux HPV (7) :
 - o le tabac : rôle cocarcinogène et immunosuppresseur ;

- l'infection à HIV : rôle immunosuppresseur majeur, autres causes d'immuno-suppression ou – dépression acquise.
- la contraception hormonale : induisant une métaplasie des cellules malpighiennes pouvant faire le lit d'une dysplasie.

Après contact entre le virus et les cellules basales de l'épithélium cervical, le virus entre dans la cellule hôte. Les mécanismes qui contrôlent les étapes clés de l'expression du potentiel oncogène des HPV sont mal connus. Ils sont probablement de deux ordres (13) :

- la régulation de l'expression du génome viral par les protéines cellulaires ;
- la réaction immunitaire de la cellule hôte face aux protéines virales.

Contrairement à ce qui a été longtemps pensé, l'intégration du génome viral dans la cellule et son expression est un phénomène tardif dans la dérégulation des cellules basales et la progression des lésions précancéreuses vers un carcinome invasif (14).

Une fois que le virus est intracellulaire, 3 types d'infection sont possibles :

- **Infection latente** : réplication du virus au niveau des cellules basales, sans expression de gène viral dans aucune cellule de l'épithélium ;
- **Infection productive** : expression des gènes viraux tardifs L1 et L2 dans les couches moyennes et superficielles de l'épithélium. Cela permet la réplication et l'expression complète des virus dans les couches superficielles de l'épithélium. Le virus ne s'exprime pas au niveau des cellules des couches basales. Elle est susceptible de régresser ;
- **Infection transformante** : elle s'effectue soit après, soit de façon concomitante à une infection aiguë productive au niveau des cellules de la couche basale. L'expression des gènes précoces E6 et E7 au niveau de la couche basale de l'épithélium entraîne une instabilité chromosomique, avec des anomalies qui peuvent persister et évoluer vers un carcinome invasif.

Les infections productives et transformantes peuvent se traduire par des dysplasies cervicales qui régressent spontanément la plupart du temps. Si elles persistent, elles peuvent évoluer très lentement sur au moins 10 ans en moyenne vers la forme invasive (13).

2- DÉTECTION VIRALE ET GÉNOTYPAGE

A. DÉFINITIONS

L'étude des virus HPV en pathologie cervicale utérine peut s'effectuer de plusieurs façons, parmi lesquelles la détection de l'ADN viral et le génotypage viral.

La détection de l'ADN viral est une méthode d'étude qualitative, qui indique la présence ou l'absence de virus HPV de haut risque.

Le génotypage englobe les différentes techniques permettant de déterminer l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique, sur tout ou partie du génome. Il permet d'identifier le ou les génotypes HPV présents dans le prélèvement.

B. PRINCIPES DE LA DETECTION DE L'ADN VIRAL

La détection de l'ADN viral repose sur 2 techniques (12) :

- **L'hybridation en phase liquide** : L'hybridation en phase liquide repose sur la formation d'hybrides ADN/ARN capturés sur des microplaques recouvertes d'anticorps spécifiques. Une amplification du signal est ensuite réalisée à l'aide d'anticorps couplés à la phosphatase alcaline. La détection de la réaction est effectuée par chemiluminescence. C'est la technique utilisée par le test Hybrid Capture II test HPV (HCII) (Digene Corporation, Gaithersburg, MD).
- **L'amplification génomique par PCR (Polymerase Chain Reaction)** : il s'agit de l'amplification de l'ADN in vitro après extraction de l'ADN. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée puis une élongation grâce à l'action de l'ADN Polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. La grande diversité des HPV a conduit à l'utilisation d'amorces à large spectre permettant l'amplification de nombreux génotypes du virus. Ces amorces ont été choisies dans les régions les plus conservées entre les différents types d'HPV, au niveau des gènes E1, E6 (région régulatrice non codante) et L1 (région tardive codant pour les protéines de la capsid). La présence des amplicons ainsi obtenus est ensuite révélée (par des sondes fluorescentes par exemple).

La technique de détection la plus utilisée en France est le test Hybrid Capture II test HPV (HCII) (Digene Corporation, Gaithersburg, MD) (12) . Elle permet de détecter la présence de 18 HPV à l'aide de deux sondes pour cocktails de génotypes HPV à haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) et à faible risque (6, 11, 42, 43 et 44), sans les identifier individuellement.

C. TECHNIQUES DE GENOTYPAGE

Le génotypage viral peut être complet (détection du génome de tous les HPV présents) ou partiel (détection seule de HPV 16 et 18 par exemple).

Pour effectuer un génotypage, il faut au préalable une étape d'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) après extraction de l'ADN par des techniques de dénaturation. Les régions choisies pour l'amplification doivent être suffisamment conservées à leurs extrémités pour être reconnues par les amorces de PCR quel que soit le génotype présent. Mais ces régions doivent être aussi suffisamment variables entre les extrémités pour permettre une différenciation entre les types. On obtient ainsi de courts fragments d'ADN double brin identiques ou amplicons qui peuvent être retravaillés pour le génotypage.

Les amplicons obtenus après PCR peuvent être hybridés sur différents supports ou séquencés (15).

Hybridation

Les techniques d'hybridation sont les plus utilisées en France. Parmi les troussees existantes, ce sont les troussees Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) et INNO-LIPA HPV Genotyping Extra kit (INNOGENETICS, Les Ulis, France) qui sont les plus utilisées (16). Pour ces deux troussees, il s'agit d'hybridation sur bandelettes, avec lecture de bandes révélées de façon colorimétrique. La lecture visuelle des résultats est donc assez simple, avec la possibilité d'utilisation d'un logiciel d'interprétation pour la trousse INNO-LIPA Genotyping Extra Kit.

Le séquençage peut être effectué dans des laboratoires équipés d'un séquenceur. La séquence exacte des acides nucléiques est identifiée et soumise à une base de données, qui réalise un alignement par rapport aux types de HPV connus. Il ne met en évidence que les types de HPV majoritaires.

D. INTERETS ET INDICATIONS DU GENOTYPAGE VIRAL

Actuellement, la détection du virus HPV par test HPV est une des options de prise en charge des frottis ASCUS (17). Elle est également recommandée par les sociétés savantes dans le suivi post-thérapeutique (17). La technique de détection la plus utilisée en France est le test Hybrid Capture II test HPV (HCII) (Digene Corporation, Gaithersburg, MD) (12).

Le génotypage en revanche, n'a pas encore d'indication recommandée par l'HAS ou le CNGOF dans la prise en charge actuelle des CIN. Il est cependant souvent effectué en routine lorsque le test de détection du virus HPV est positif. Le génotypage présente plusieurs intérêts :

- Epidémiologie virale ;
- Indication sur le pouvoir oncogène de chaque HPV ;
- Indications sur le potentiel évolutif des lésions dysplasiques en fonction du type de HPV.

Muszinski a proposé en 2010 des possibilités d'intégration du génotypage en pratique clinique (15) :

- **Dans la prise en charge de CIN1 (cervical intraepithelial lesion 1)** : l'ANAES propose en 2002 (17) pour les CIN1 après un FCU inférieur à HSIL (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion) : 2 FCU à un an d'intervalle ou un test de détection à HPV. Si le test HPV est positif ou si on a ASCUS persistant à un an d'intervalle, une colposcopie avec biopsie est prévue. Le génotypage pourrait remplacer ces 2 possibilités, en repérant les génotypes persistants si présents ;
- **Dans la prise en charge des CIN2** : choix de la surveillance ou du traitement en fonction du génotype viral HPV impliqué ;

- **Dans la prise en charge des CIN3** : pas d'indication selon Muszinski. L'étude multicentrique (Bordeaux, Toulouse et Limoges) SUIVICOL en cours actuellement étudie l'intérêt pronostique du génotypage viral dans les récives de dysplasie après conisation pour CIN3. Les résultats sont attendus pour fin 2016.

3-CIN2 ET PARTICULARITES

A. GENERALITES SUR LES CIN

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

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

Les premières classifications étaient cytologiques, en fonction de la gravité de la dysplasie. La première classification fut celle de Papanicolaou en 1943 (annexe 2). Elle a été longtemps utilisée, mais elle est relativement peu précise. Il y a eu ensuite la classification histologique de l'OMS en 1973 (annexe 3). Il y a eu une mise au point sur la nomenclature avec la naissance de la classification de Bethesda en 1988, révisée en 2001 (**tableau 2**). A côté de la notion de dysplasie de haut grade et de bas grade, la classification de Bethesda introduit les lésions glandulaires et lésions malpighiennes de signification indéterminée. Elle est donc plus précise que la classification de Papanicolaou. Il s'agit de la classification cytologique la plus utilisée dans monde.

Tableau 2 : classification de Bethesda modifiée en 2001

Classification de Bethesda 2001	
Absence de lésion intra épithéliale et de malignité	
Anomalies des cellules malpighiennes	
ASCUS	Atypie malpighienne de signification indéterminée
ASC-H	Atypie malpighienne n'excluant pas une lésion de haut grade
LSIL	Lésion intra épithéliale de bas grade, correspond à HPV sur condylome, dysplasie légère
HSIL	Lésion intra épithéliale de haut grade, correspond à dysplasie modérée et élevée, carcinome in situ
Carcinome malpighien invasif	
Anomalie des cellules glandulaires	
AGC	Atypie glandulaire
Atypie glandulaire en faveur d'une néoplasie	
Adénocarcinome endocervical in situ	
Adénocarcinome invasif	

Classification et modifications détaillées de la classification de Bethesda 2001 en annexe 4

En 1967, Richart (18) a mis au point une classification histologique, plus utilisée de nos jours que la classification de l'OMS. Elle est basée sur les anomalies histologiques observées ainsi que sur la hauteur de ces anomalies sur l'épithélium malpighien (**tableau 3**).

Tableau 3 : Classification de Richart

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

ACN: anomalies cytonucléaires comprenant : anisocaryose, anisocytose, hyperchromatisme, augmentation du rapport cytonucléoplasmique, augmentation de la densité cellulaire, anomalies des mitoses; CIN1, 2 et 3: cervical intra epithelial neoplasia 1, 2 et 3 ; l'impression de symétrie de l'épithélium est liée à la perte de la différenciation cellulaire des couches superficielles de l'épithélium.

B. DIFFICULTÉS DIAGNOSTIQUES DES CIN2

Définition floue

La définition anatomopathologique de CIN2 est en quelque sorte une étape intermédiaire entre CIN1 et CIN3. Elle n'a pas de correspondance anatomopathologique claire. En histologie, l'anisocaryose et l'anisocytose sont plus marquées que pour CIN1, et le rapport cytonucléoplasmique est proche de 50%, quand celui de CIN1 ne dépasse pas 1/3 et celui de CIN3 est supérieur à 2/3. L'hyperchromatisme reste modéré comme pour CIN1 et la chromatine est irrégulièrement répartie, tandis que pour CIN3, les noyaux sont franchement hyperchromatiques et la chromatine se condense en mottes irrégulièrement réparties. La forme du cytoplasme est irrégulière pour CIN2 et CIN3 alors qu'elle est plutôt régulière pour CIN1. Pour CIN1, la densité cellulaire ainsi que l'activité mitotique est faible. CIN2 et CIN3 en revanche, se caractérisent par des mitoses anormales avec une forte densité cellulaire, avec la présence de ces anomalies jusque dans les 2/3 de l'épaisseur de l'épithélium pour CIN2 et au-delà pour CIN3.

Images A, B, C : histologiques de CIN1, CIN2 et CIN3 respectivement, en coloration HE

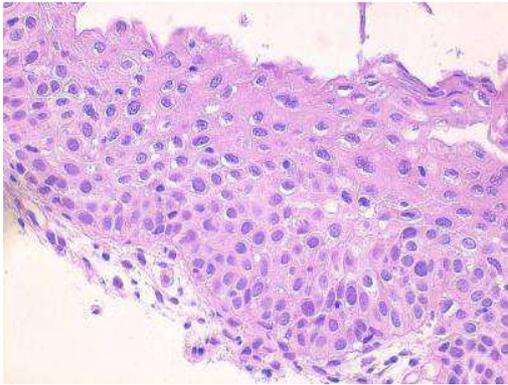


Image A : CIN1:

Anisocariose et anisocytose au niveau des cellules du tiers inférieur de l'épithélium. Conservation de la différenciation cellulaire sur le reste de l'épithélium. Pas de mitose visualisée, pas de koilocytes, non obligatoire.

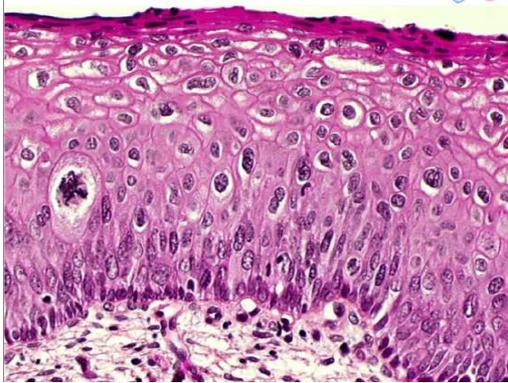


Image B : CIN2

Anomalies cytonucléaires jusqu'à la partie moyenne voire les deux tiers de l'épithélium. Présence d'un koilocyte : cellule volumineuse, avec un gros noyau et un halo périnucléaire pathognomique d'une infection par HPV. Mitoses anormales à mi hauteur de l'épithélium. Persistance d'une différenciation cellulaire au niveau des couches superficielles.

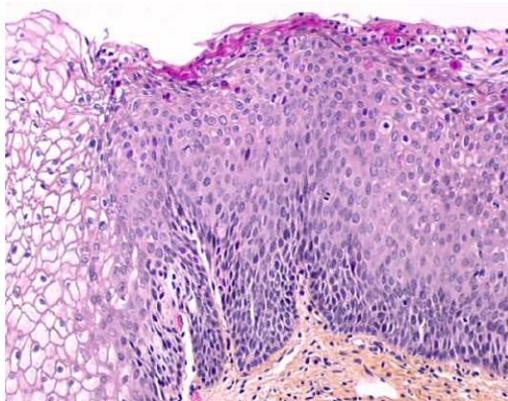


Image C : CIN3

CIN3 : anomalies cytonucléaires sur la totalité de l'épithélium. Epithélium en miroir. Mitoses anormales et sur toute la hauteur de l'épithélium.

A l'origine, la classification histologique de Richart avait uniquement une valeur descriptive, et ne comportait aucune connotation pronostique ou implication thérapeutique (18). Pour Buckley et al en 1982, il s'agit d'une classification subjective et arbitraire (19).

Richart a donc apporté une nuance à sa classification de 1967, dans un article publié en 1990 (20). Il constatait que l'évolution des CIN vers le cancer n'était pas toujours un continuum allant de CIN1 à CIN3 en passant obligatoirement par CIN2. Pour ne pas méconnaître une forme CIN3 débutante classée en CIN2, il a considéré que les dysplasies de haut grade englobent aussi bien CIN2 que CIN3. Donc selon lui, l'état des connaissances sur l'histoire naturelle de l'infection à HPV et des CIN permet de désigner 2 classes :

- **lésion de bas grade ou CIN1**, pouvant être causée par des HPV de haut et de bas grade et qui représente diverses lésions dont l'évolution est imprévisible,
- **lésion de haut grade ou CIN2 et 3**, nécessitant l'intégration du génome du virus dans celui de la cellule, entraînant ainsi des modifications histologiques significatives.

La plupart des études actuelles sur les CIN utilise la classification modifiée de Richart (CIN1, CIN2-3). Wright TC et al (21) reconnaît dans les Guidelines américaines de 2006 que la CIN2 est plus hétérogène et plus à même de régresser pendant le suivi que la CIN3, mais il estime que la CIN2 présente suffisamment d'atypies pour être considérée comme le seuil à partir duquel il faut un traitement actif.

En cytologie, la CIN2 correspond dans le système de Bethesda comme une lésion de haut grade (HSIL). Mais cette classification de CIN2 en HSIL ne fait pas l'unanimité (22). Dans son étude rétrospective de 2010, Milčić-Juhas V (23) évalue l'intérêt de la classification de Bethesda modifiée (division de HSIL en dysplasie modérée et sévère), utilisée en Croatie depuis 13 ans (en 2010). Selon elle, HSIL devrait avoir une subdivision en dysplasie « modérée » et « sévère » correspondant respectivement en histologie à CIN2 et CIN3. Il s'agissait d'une étude rétrospective sur 3110 femmes ayant eu un dépistage cytologique de 1993 à 2005. Elle a calculé entre autres les différentes valeurs prédictives positives (VPP) des diagnostics cytologiques de dysplasies légère, modérée et sévère, associées aux diagnostics histologiques de CIN2, CIN3, et carcinome invasif. Elle retrouve que pour CIN3, ces VPP augmentent de façon significative en fonction de la sévérité de la dysplasie. Ainsi, 40,3% des dysplasies modérées en cytologie correspondent à du CIN3 histologique, contre 90,1% des dysplasies sévères cytologiques et 23,7% des dysplasies légères cytologiques. De même, le diagnostic histologique de CIN3 est moins fréquemment retrouvé sur les lésions cytologiques de dysplasie modérée que sur les lésions cytologiques de dysplasie sévère (38,9% contre 84,2%). La CIN3 est également plus fréquemment diagnostiquée au sein des dysplasies sévères que des dysplasies légères (38,9% contre 22,8%).

Apport de la colposcopie mitigé

Après le diagnostic cytologique de HSIL, une colposcopie est effectuée pour affiner le diagnostic et faire des biopsies ciblées pour le diagnostic histologique. Il s'agit de l'examen de référence pour le diagnostic des CIN. La colposcopie possède de bonnes sensibilités pour LSIL et HSIL, respectivement 96 et 85%. Mais les spécificités sont médiocres avec seulement 48% pour LSIL et 60% pour HSIL (24). Donc la colposcopie ne permet pas d'éliminer le risque de méconnaître une lésion micro infiltrante et infiltrante du col. Ce risque est de 0,5 à 8% selon la Cochrane Data Base (25).

Il existe des scores comme l'index colposcopique de Reid (annexe 5) qui tente de prédire la gravité des lésions colposcopiques mais reste peu précise. Ci-dessous, la prédiction colposcopique du diagnostic histologique à partir du score de l'index colposcopique de Reid :

- De 0 à 2 : probablement une CIN1;
- De 3 à 4 : classification intermédiaire, CIN1 ou 2 ;
- De 5 à 8 : probablement CIN2-3.

La colposcopie est complétée par des biopsies de la zone suspecte. Cela améliore les performances diagnostiques de la colposcopie car permet d'avoir un diagnostic histologique, même s'il ne s'agit que d'une analyse partielle de la zone de transition atypique ou de la zone suspecte qui peut être très étendue. Elle est préconisée si le FCU est de haut grade et/ou s'il existe des signes de gravité à la colposcopie.

La colposcopie présente de nombreux avantages qui la rendent incontournable dans la prise en charge actuelle des FCU de haut grade ou douteux, ou de bas grade persistant, mais elle présente des limites diagnostiques qui ne permettent pas de l'utiliser comme seul arsenal pour affiner le diagnostic des CIN2 en particulier.

Reproductibilité et concordance inter observateurs médiocres

La reproductibilité diagnostique de CIN est assez médiocre. Robertson AJ (26) retrouve des kappas de 0,2 et 0,11 pour respectivement CIN1 et CIN2, de 0,52 pour CIN3 pour la reproductibilité inter observateur. Carreon et al. (27) a comparé la concordance des diagnostics de CIN2 et CIN3 entre des pathologistes au Costa Rica et 2 pathologistes « reviewers » aux USA. Son étude met en évidence une correspondance à 84% et 81% respectivement, pour le diagnostic initial de CIN3. Cette correspondance n'est que de 13% et 31%

respectivement, pour la CIN2. Cette étude montre aussi que seulement 61% de CIN2 étaient corrélés aux HSIL, alors que 81% de diagnostic de CIN3 correspondent aux HSIL. Donc 39% au moins des CIN2 sont considérés à tort comme des dysplasies de haut grade et reçoivent le même traitement invasif que CIN3. A noter que 72% des CIN2 diagnostiquées par les pathologistes américains étaient en relation avec des HPV oncogènes contre 94% des CIN3.

C. HISTOIRE NATURELLE DE CIN2

L'histoire naturelle des CIN est de mieux en mieux connue, surtout chez les femmes jeunes en âge de procréer. Nous avons vu dans le chapitre B concernant la cancérogenèse le rôle de l'HPV dans la genèse des dysplasies cervicales. Les CIN1 correspondent la plupart du temps à des lésions liées à une infection productive, et les CIN3 correspondent clairement à une infection transformante, résultant de l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule. Des altérations épi génétiques se rajoutent à ce phénomène et potentialisent les anomalies. La genèse de CIN2 est moins bien définie. Elle correspond à un mixte de lésions qui peuvent être productives, mais également dont le processus de carcinogenèse a déjà commencé. La traduction anatomopathologique du phénomène est soit comme décrite dans la définition classique d'une CIN2, soit très ambiguë, expliquant la grande variabilité inter observateur du diagnostic.

Les stades CIN1 et 2 sont des étapes facultatives de l'évolution vers le cancer. Seule la CIN3 est une étape nécessaire (5) (28). Pour chaque lésion cervicale précancéreuse, il existe une probabilité de régression (de 32% à 57 % en fonction de la gravité de la lésion), accompagnant la clairance virale, et une probabilité de persistance ou de progression vers un stade plus avancé (**tableau 4**) (29).

Tableau 4 : Probabilités de régression, de persistance et d'évolution des CIN selon Ostör AG (29)

Lésion	Régression	Persistance	Evolution vers une CIN supérieure	Evolution vers un carcinome invasif
CIN1	57%	32%	11%	1%
CIN2	43%	35%	22%	5%
CIN3	32%	<56%		>12%

La clairance virale signifie que les tests ne détectent plus l'ADN viral, cependant, les connaissances actuelles ne nous permettent pas de dire avec certitude que le virus a complètement disparu ou qu'il est plutôt dans un état latent indétectable (10).

La CIN2 a donc un potentiel de régression intermédiaire. Son potentiel de progression vers le cancer est bien inférieur à celui de CIN3 et cependant supérieur à CIN1. Matsumoto a obtenu des résultats similaires (30).

Les recommandations de 2006 de la société américaine de coloscopie (21) pour la prise en charge des CIN ont enrichi les recommandations internationales de la conférence de consensus de 2001 (31), lors de laquelle la classification de Bethesda avait été modifiée. Wright TC et al. définissent deux populations spéciales, en fonction de l'évolution des CIN au sein de ces 2 populations (21) :

- **Adolescentes** : il s'agit le plus souvent de filles entre 15 et 25 ans. Les CIN sont fréquemment rencontrées mais souvent de bas grade. La plupart des lésions même de haut grade régresse ;
- **Les femmes enceintes** : le taux de régression dans le post partum semble très important. Le risque d'invasion est minimal pendant la grossesse. Le col subit beaucoup de modifications pendant la grossesse rendant la zone de jonction et ou les zones suspectes plus ou moins reconnaissables et facilement accessibles au traitement. Donc le traitement pendant la grossesse est associé à un risque accru de complication et un taux élevé de persistance ou de récurrence. Seul le traitement du carcinome invasif est légitime chez la femme enceinte.

Carcopino et Al (22) en 2011 définissent des facteurs influençant l'évolution des CIN2 après revue de la littérature. Il s'agit :

- **De l'âge** : c'est un paramètre essentiel comme on l'a vu plus haut avec la population des adolescentes. La régression est plus importante chez les femmes jeunes, comme l'ont observé Fuchs K (32), Moscicki AB (33), et Castle PE (34). De plus, le bénéfice du traitement des CIN2 chez les moins de 30 ans n'est pas prouvé (32) ;
- **Du type de HPV** : influence directement la probabilité de régression spontanée. Des HPV à bas risque ont été identifiés dans 12% des CIN2. La régression serait plus faible pour CIN2 avec HPV 16 impliqué, avec 10,6% de régression contre 29,2% pour les autres cas ($p=0,0004$). Si l'infection persiste, le risque d'évolution de CIN2 s'élève significativement (OR=18,6 avec un IC95% :2,5 à 136,5) ;
- **FCU de contrôle** : c'est l'élément indispensable du suivi actuellement. Un FCU de haut grade à 6-12 mois de suivi augmente le risque de progression de CIN2 (à 6 mois : OR=47,1 avec un IC95% entre 17,3 et 128,7 ; à 12 mois : OR=21,5 avec un IC 95% entre 5,1 et 90,8) ;
- **Charge virale** : l'étude de sa cinétique serait prédictive de la persistance, de l'évolutivité ou de la clairance de l'infection à virus HPV. Donc on pourrait dire que le risque de CIN2 et 3 est plus important chez les patientes dont la charge virale évolue avec le temps ;

- **Les biomarqueurs** : ils peuvent être classés en 5 grandes catégories: les marqueurs du cycle cellulaire dont la protéine P16, les facteurs de transcription, les marqueurs de l'infection HPV, les marqueurs de l'apoptose et les marqueurs de prolifération cellulaire dont le Ki67. P16 et Ki67 font partie de ceux utilisés dans la pratique quotidienne. Ce sont des outils intéressants pour le diagnostic des CIN. une forte expression de P16 ainsi que sa persistance pourrait être un facteur prédictif de progression de CIN2.

A ces facteurs on peut également ajouter l'infection par le VIH, et toutes les causes d'immunodépression possibles (infectieuses, médicamenteuses, auto-immunes).

Ainsi, la CIN2 constitue bien une classe dont le diagnostic et l'histoire naturelle sont intermédiaires, moins tranchées que pour la CIN1 et la CIN3. Elle nécessite donc plus que les autres un affinage de son diagnostic et de sa prise en charge.

4- P16INK4A ET CIN

A. DÉFINITION

P16INK4a est une protéine inhibitrice de cyclin dépendent kinase (CDK) 4 et 6, ralentissant ainsi le cycle cellulaire. Ces derniers CDK sont des activateurs du cycle cellulaire, permettant le passage de la phase G1 à la phase S. Elle est aussi appelée suppresseur de tumeur. Elle a été découverte en 1993 par Manuel Serrano, Gregory J Hannon et David Beach.

Elle est codée par le gène CDKN2A, porté par le chromosome 9. Ce gène est souvent muté ou lésé dans plusieurs types de tumeur, entraînant une dérégulation du cycle cellulaire. Classiquement, l'augmentation de la protéine P16 dans la cellule entraîne une diminution de la prolifération des cellules souches, comme l'effet de l'âge sur notre organisme. Cette réduction de la division et de la prolifération des cellules souches serait une protection contre le cancer, mais accélérerait la sénescence (35).

B. PHYSIOLOGIE

CDK 4 et 6 forment un complexe protéique actif en se liant avec la cycline D. Ce complexe phosphoryle la protéine du gène du rétinoblastome (pRb). Une fois phosphorylée, le facteur de transcription E2F est libéré et

peut rentrer dans le noyau cellulaire. Il y favorise la transcription de gènes ciblés, dont le produit est utile pour l'activation du cycle cellulaire.

En se liant à CDK4/6, P16 empêche la liaison de ces CDKs à la cycline D et ralentit ainsi l'activation du cycle cellulaire.

La régulation de P16 est très complexe car elle entraîne l'intervention de nombreux facteurs de transcription et autant de protéines. Ces dernières sont impliquées dans les modifications épi génétiques au niveau du gène promoteur de P16. PRC1 et 2 sont les principaux complexes protéiques interagissant avec des facteurs de transcription, permettant ainsi de réduire la sénescence cellulaire liée à P16.

C. PHYSIOPATHOLOGIE

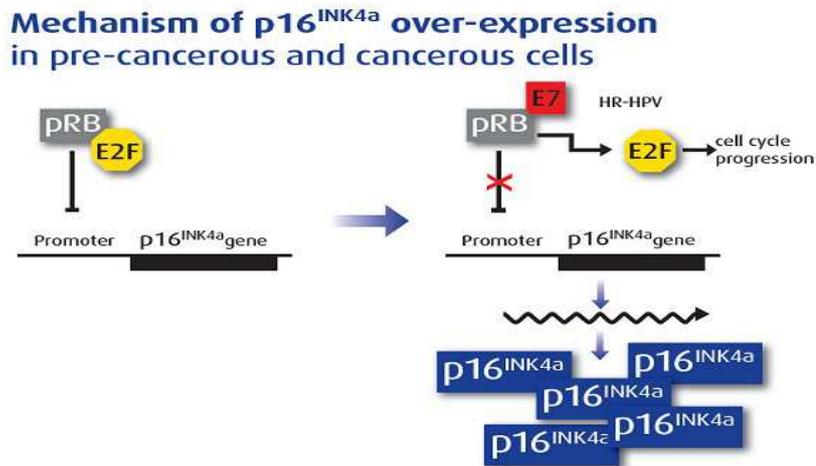
Les mutations du gène CDKN2A codant pour la P16 sont associées à une augmentation du risque de différents types de cancer. Par exemple, l'adénocarcinome pancréatique est souvent associé à des mutations de ce gène. Des délétions homozygotes de ce gène sont souvent retrouvées dans les cancers gastriques et œsophagiens.

Des accumulations de méthylation au niveau de la zone promoteur du gène de la p16 sont fréquemment retrouvées dans les cellules cancéreuses. Il s'agit de modifications épi génétiques qui aboutissent ainsi à une répression de l'activité de suppresseur de tumeur de la P16, soit en bloquant directement la transcription du gène, soit en favorisant la présence de facteurs de transcription ayant une activité répressive sur le gène de la P16. Ces modifications épi génétiques entraînent donc une diminution de la concentration de la P16 dans la cellule.

L'évolution de P16 dans le processus de carcinogenèse associé à la présence du virus HPV n'est pas du tout identique à celle décrite plus haut. Rappelons que l'organisation génétique des HPV est caractérisée par la présence d'un seul brin codant avec 3 régions génomiques. La région E (early) code pour 7 ou 8 protéines non structurales (cf **tableau 1**) qui vont interagir avec le système cellulaire et entraîner immortalisation et anomalies cellulaires.

Au niveau moléculaire, dans la cellule, pRb est habituellement liée à E2F qui bloque l'activation du cycle cellulaire par un mécanisme de phosphorylation. En phase de prolifération virale, E7 se lie à pRb ce qui entraîne le relargage d'E2F. La libération d'E2F induite par le lien entre E7 et le gène pRb aboutit à un important rétrocontrôle négatif sur la répression de la transcription du gène de la protéine P16, ce qui entraîne donc une surexpression de p16 qui s'accumule dans le cytoplasme et le noyau cellulaires (**figure 2**).

Figure 2 : Mécanisme de la surexpression de la P16 dans les cellules cervicales dysplasiques et cancéreuses, après infection par HR-HPV



The oncoprotein E7 of high risk HPV-types binds to pRB, thereby inactivating pRB which is no longer able to bind E2F. This unblocks the single transcription factor E2F inducing cell cycle progression and cell replication. The synchronized synthesis of p16^{INK4a} is also no longer blocked and this leads to simultaneous overexpression of p16^{INK4a} and uncontrolled cell replication.

E2F favorise également la prolifération cellulaire anarchique. La surexpression de P16 est donc dans ce cas un marqueur de l'infection transformante, c'est-à-dire un marqueur de l'activité de E7 et donc de l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte.

La surexpression de P16 au cours de la phase d'infection transformante la rend intéressante pour l'affinement du diagnostic des CIN et notamment de CIN2. Elle est mise en évidence par des techniques d'immunohistochimie ou immunocytochimie.

D. INTERETS DE LA P16 DANS LES DYSPLASIES CERVICALES

Jusqu'en 2013, la détection de la protéine 16 ne fait pas partie des recommandations françaises (12) pour la prise en charge diagnostique des CIN. Bergeron (36) a évoqué, dans une mise à jour des recommandations du CNGOF en 2009, la possibilité d'associer la détection de la P16 à l'analyse morphologique dans le dépistage du cancer du col. En l'associant à l'analyse histologique des pièces après coloration par hématoxyline et éosine (HE), elle permettrait d'améliorer la reproductibilité diagnostique de CIN2 et CIN3.

En l'associant à l'analyse cytologique, elle pourrait améliorer la prédiction des CIN2+ et pourrait être ainsi intégrée dans le dépistage primaire du cancer du col. Elle possède une meilleure spécificité que le test de détection de HPV et le FCU. La détection de la P16 pourrait également être automatisée ce qui réduirait le

temps d'obtention des résultats et le coût du dépistage. La P16 pourrait également simplifier le triage des ASCUS et des LSIL, permettant ainsi de diminuer l'angoisse des patientes et le coût de la prise en charge.

II- ETUDE DES PROFILS VIRAUX DES CIN SUR UN ECHANTILLON DE 120 PATIENTES, ETUDE DU PROFIL P16 DES CIN2 SUR UN ECHANTILLON DE 45 PATIENTES

1. JUSTIFICATION DU TRAVAIL

La meilleure connaissance de l'histoire naturelle des lésions précancéreuses du col utérin et des lésions invasives entraîne une interrogation croissante de la communauté scientifique sur la nécessité d'affiner le diagnostic des CIN. Cela aurait pour but d'améliorer leur pronostic et leur prise en charge. Actuellement, le diagnostic des dysplasies cervicales est essentiellement morphologique. Il s'appuie sur la classification de Bethesda en cytologie (Cf. **tableau 2**) et la classification de Richart (Cf. **tableau 3**) modifiée en histologie. Le diagnostic histologique des CIN se base d'une part sur la caractérisation d'une prolifération et d'une maturation cellulaires anormales, associées à des atypies nucléaires, et d'autre part sur le degré d'extension de ces modifications sur l'épithélium. Ainsi, la CIN1 est reconnue comme une dysplasie de bas grade. Cette anomalie est le plus souvent surveillée, sauf cas clinique particulier. Les CIN2 et CIN3 sont considérées comme des lésions de haut grade (8) (20) (21). Ces lésions nécessitent une prise en charge thérapeutique invasive, à type de conisation.

Mais il existe des difficultés diagnostiques histologiques des CIN qui entraînent un risque d'erreurs diagnostiques non négligeables. De nombreuses études ont mis en exergue une importante variabilité inter observateur (26) (27) (37) (38), ceci à tous les stades de lésions. En effet, Bergeron (38) et Dalla Palma (37) mettent en évidence un risque de sous diagnostic de respectivement 29% et 22% (CIN2+ diagnostiquée comme biopsie normale ou CIN1), et un risque de sur diagnostic de respectivement 30% et 28% (CIN1 diagnostiquée comme CIN2+). L'une des difficultés diagnostiques les plus fréquentes et ayant un impact thérapeutique majeur correspond à la différence entre CIN1 et CIN2 (39).

CIN2 est la classe soumise à la plus grande variation. Il s'agit d'une classe très hétérogène, tant sur le plan morphologique que sur le plan de l'histogénèse. Pour certains auteurs (20), il faudrait supprimer cette classe et considérer d'emblée ces lésions comme des lésions de haut grade. On n'aurait plus qu'une classification dichotomique : Lésion de bas grade/lésion de haut grade. Mais l'histoire naturelle des CIN2 montre une plus grande régression des CIN2 par rapport aux CIN3, allant jusqu'à 92% chez les femmes jeunes (32). Faisant suite à ces constats, les recommandations américaines (21) préconisent l'expectative en cas de CIN2 chez les patientes jusqu'à 25 ans, tout en considérant tout de même la CIN2 comme étant le seuil de prise en charge invasive des dysplasies pour les autres. D'autres équipes encore comme celle de Mergui (40) souhaiteraient

également dissocier la prise en charge de CIN2 et de CIN3 en proposant une méthode « d'évaluation du risque et d'aide à la décision thérapeutique » Cette méthode est basée sur les données cliniques de la patiente, la coloscopie et l'histologie classique avec la classification en CIN, données qui restent subjectives.

L'enjeu diagnostique est important. Le traitement standard des patientes CIN2 et CIN3 est invasif et consiste en une conisation le plus souvent à l'anse diathermique. Avec l'élévation de l'âge moyen de la première grossesse en France (30ans), la conisation expose ces femmes à des risques obstétricaux accrus, et donc à une grossesse plus angoissante et plus coûteuse. Parmi les risques les plus fréquents, il y a la rupture prématurée des membranes, la menace d'accouchement prématuré, la fausse couche tardive, et le petit poids de naissance (41) (42). Il ne faudrait pas non plus ignorer le risque de lésion précancéreuse plus avancée voir d'invasion inhérent au CIN2 et donc faire un sous diagnostic, induisant ainsi un sous traitement. Rappelons que le cancer du col de l'utérus occupe le deuxième rang des cancers de la femme à l'échelle mondiale en terme d'incidence, et fait 274000 morts estimées par an (5). En France, il est responsable de 1102 décès par an (7).

Le géotypage viral HPV peut non seulement améliorer les connaissances épidémiologiques et de l'histoire naturelle des dysplasies, mais peut également être un marqueur pour affiner le diagnostic des CIN2 notamment. L'étude de l'expression des virus HPV a été initiée depuis la découverte de la relation entre HPV et cancer par Zur Hausen (1). Actuellement, seule la détection des HR-HPV par test d'hybridation capture est recommandée dans la prise en charge des frottis ASCUS (17). Il existe de nombreuses études d'envergure comme les études françaises EDITH (43) (44) (45), la méta analyse de Clifford (46), l'étude canadienne de Coutlée (47), qui étudient la distribution des géotypes des virus HPV en fonction du degré de sévérité des dysplasies cervicales et des lésions invasives. Mais la plupart de ces études ne dissocient pas dysplasies intermédiaires et dysplasies sévères, en accord avec la classification de Bethesda modifiée en 2001 (31) (Cf. **tableau 2**) et la classification modifiée de Richart (20). Peu d'études considèrent donc les CIN2 et CIN3 comme étant deux entités distinctes, comme celle de Zuna et al en 2007 (48), divisant les HSIL en HSIL-M (dysplasie modérée, CIN2) et HSIL-S (dysplasie sévère, CIN3). Elle met ainsi en évidence un profil viral de HSIL-M différent de HSIL-S.

La réflexion actuelle est également tournée vers l'intérêt de certains marqueurs immunohistochimiques. Ceux-ci peuvent en effet permettre d'affiner le diagnostic en améliorant la reproductibilité (39), et en servant d'arbitre en cas de doute entre plusieurs diagnostics (49). La protéine P16 semble être le marqueur le plus prometteur (49) (50). Il s'agit d'un bio marqueur moléculaire qui témoigne de l'expression de l'oncogène viral E7 au cours d'une infection par un virus HPV à haut risque. Sa surexpression dans la cellule est donc le témoin d'au moins une infection transformante, et pas seulement de la présence d'un virus HPV à haut risque. Selon certaines études, la P16 augmente la sensibilité du diagnostic des lésions de haut grade (38). La reproductibilité inter observateur dans le diagnostic des CIN2 est de 62% en histologie classique contre 75% après marquage P16. Il n'existe cependant pas à l'heure actuelle de classification consensus internationale pour l'interprétation de P16. En effet, Tsoumpou (50), dans sa méta analyse de 2008 met en évidence la grande confusion qui règne

sur l'interprétation de cet immunomarquage. La classification la plus souvent retrouvée dans la littérature jusqu'en 2009 est semi quantitative, il s'agit de celle proposée par Klaes (51). La classification proposée par Bergeron en 2010 (52) présente une simplicité d'application et surtout une excellente reproductibilité. C'est celle que nous avons utilisée. Il ressort de la méta analyse de Tsoumpou que la P16 doit d'être évaluée avec une question clinique spécifique pour envisager son utilisation en routine dans le dépistage du cancer du col utérin

Les **objectifs** de notre étude sont donc les suivants :

- Définir l'ADN viral des lésions CIN1, CIN2 et CIN3 par génotypage et discuter de son intérêt dans le diagnostic des CIN2 ;
- Définir le marquage par protéine P16 au sein des CIN2 et discuter de l'intérêt de ce marqueur pour l'amélioration du diagnostic des CIN2.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Il s'agit d'une étude rétrospective, uni centrique, portant sur 120 patientes porteuses de néoplasies cervicales intra épithéliales. Les patientes ont été prises en charge dans le service de gynécologie obstétrique du CHU de Bordeaux.

A. RECRUTEMENT DES PATIENTES

Les patientes ont été recrutées à partir de 2 études en cours, permettant ainsi d'avoir d'emblée un génotypage viral pour toutes les patientes :

- L'étude SUIVICOL qui analyse le rôle pronostique de la détection du papillomavirus humain dans les récurrences de dysplasie cervicale après conisation pour CIN3 à la biopsie: nous avons utilisé les données de 25 patientes CIN1 et CIN2 qui ont été exclues de cette étude, recrutées entre septembre 2012 et avril 2014. Nous avons également utilisé les données de 20 patientes CIN3, ayant terminé leur protocole de suivi (24 mois), et ayant été incluses en 2012.
- L'étude MMP-HPV qui s'intéresse à l'expression des métalloprotéases sur les pièces de biopsies et de conisation pour dysplasies de haut grade, comparée à celles des cancers: nous

avons utilisé les données de 82 patientes CIN1, CIN2 et CIN3, recrutées entre 2007 et 2010.
Les patientes présentant un cancer invasif n'ont pas été incluses dans notre étude.

Ces 2 études ont été agréées par le comité d'éthique à Bordeaux. Le consentement oral et écrit des patientes a été recueilli. Les pathologistes ayant effectué l'analyse histologique n'avaient pas connaissance des résultats du génotypage.

Les critères d'inclusion sont les mêmes pour les 2 études et sont les suivants :

- Plus de 18 ans;
- Cytologie anormale ;
- Diagnostic histologique de CIN 1, 2 et 3 effectué sur biopsie cervicale ou sur conisation ;
- Génotypage viral effectué sur FCU ou sur pièce tissulaire (biopsie ou conisation).

Les critères d'exclusion sont les suivants :

- Antécédent de CIN2 ou 3 déjà pris en charge ;
- Carcinome invasif diagnostiqué;
- Infection active par le VIH, l'hépatite B ou C ;
- La prise de tout traitement immunomodulateur comme un traitement stéroïdien ;
- La grossesse, l'allaitement.

Dans les 2 études, les patientes ont eu une colposcopie après un dépistage par FCU révélant des anomalies cytologiques. Les lésions acidophiles ont été révélées par la coloration à l'acide acétique, et les limites lésionnelles ont été révélées par la coloration au lugol. L'étendue de la lésion est mesurée par le nombre de quadrant atteint. Puis les patientes ont eu une biopsie post colposcopie. Ces biopsies étaient ciblées au niveau des zones suspectes de dysplasie de haut grade et étaient effectuées à l'aide d'une pince à biopsie métallique. Elles étaient fixées dans le formol puis envoyées au laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Bordeaux pour analyse. Les patientes présentant des lésions CIN2 ou 3 à la biopsie ont eu une prise en charge thérapeutique par conisation. Certaines patientes porteuses de CIN1 ont également eu une conisation. Il s'agissait soit de patientes de plus de 50 ans, soit des patientes avec une colposcopie non contributive, soit de patientes avec des lésions de bas grade persistantes. La conisation s'effectuait en général en ambulatoire, sous anesthésie générale, à l'aide d'une anse diathermique de Fischer, et sous contrôle colposcopique. Les pièces de conisation étaient repérées par un fil à midi.

B. GÉNOTYPAGE VIRAL

Il a été effectué dans le cadre des études MMP-HPV et SUIVICOL. Les FCU, les biopsies et les conisations avaient été adressées au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux. Pour les patientes qui étaient incluses de façon prospective dans l'étude MMP-HPV et dans l'étude SUIVICOL, le typage de l'ADN viral a été fait à partir des prélèvements cytologiques (FCU pré-colposcopie). Pour les patientes incluses de façon rétrospective dans l'étude MMP-HPV (dix patientes), la recherche d'ADN viral a été effectuée sur les pièces de conisation ou sur les biopsies. Cela a été également le cas pour 10 patientes CIN2 de l'étude SUIVICOL qui ont été exclues de cette étude avant que le génotypage ait été effectué.

Le génotypage a été réalisé suite à une amplification de l'ADN par PCR. Une hybridation sur bandelette a été effectuée à l'aide de 2 trousseaux différentes :

- LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne), suivant les instructions du laboratoire Roche®, utilisée pour les patientes issues de l'étude MMP-HPV ;
- INNO-LiPA HPV Genotyping Extra kit (INNOGENETICS, Les Ulis, France), suivant les instructions du laboratoire, utilisée au CHU de Bordeaux depuis 2011. Elle a été utilisée pour les patientes de l'étude SUIVICOL.

Les génotypes retrouvés étaient classés selon le niveau de risque de cancérogenèse proposé par l'IARC (3), à savoir :

- Types muqueux et génitaux à potentiel cancérigène élevé (HR-HPV) : 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59 ;
- Types muqueux et génitaux à potentiel cancérigène intermédiaire ou indéterminé (IR-HPV) : 26, 30, 34, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85, 97 ;
- Types muqueux et génitaux à potentiel cancérigène faible (LR-HPV) : 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, et 81.

A noter que la trousse LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test peut détecter les 13 HR-HPV suivants : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. L'HPV 68 étant considéré comme un HPV de risque intermédiaire dans la classification de l'IARC que nous avons utilisé pour notre étude. La trousse INNO-LIPA HPV Genotyping détecte quant à elle 18 HR-HPV et 3 HPV de risque « indéterminé » Les HR-HPV sont : 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51,

52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82. Les HPV 26, 53, 66 et 73 sont considérés comme à risque intermédiaire dans la classification de l'IARC et seront considérés comme tel dans notre étude.

La présence de certains génotypes dans le prélèvement étudié peut masquer la présence d'autres génotypes :

- Pour la trousse LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test, la présence des HPV 33, 35 et ou 58 peut masquer la présence de l'HPV 52 ;
- Pour la trousse INNO-LiPA HPV Genotyping Extra kit, la présence de l'HPV 18 peut masquer celle de l'HPV 39. La présence des HPV 31 et 33 peut masquer celles des HPV 52 et 54. La présence des HPV 58, 68 et 73 ne permet pas d'exclure celle de l'HPV 52.

Nous avons choisi de considérer ces génotypes comme absents parce qu'il n'y a pas d'HPV de bas risque qui peut masquer la présence d'HPV à haut risque, il n'y a donc pas de mauvaise estimation du grade des HPV impliqués dans les dysplasies de notre échantillon.

Dans chaque série :

- un témoin négatif permet de vérifier l'absence de contamination ;
- Un témoin positif valide la réalisation correcte des étapes d'amplification et hybridation ;
- Un contrôle interne (ADN humain) est amplifié dans chaque prélèvement, parallèlement à l'amplification de l'ADN viral. Sa positivité (présence d'ADN humain) permet de vérifier la qualité du prélèvement et l'absence d'inhibiteur de PCR dans le prélèvement. Si le contrôle interne est négatif, le test est rendu ininterprétable.

C. ANALYSE HISTOLOGIQUE ET IMMUNOHISTOCHEMIE

Les biopsies cervicales et les conisations arrivaient au laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Bordeaux déjà fixées dans du formaldéhyde. Elles étaient ensuite incluses dans de la paraffine, puis coupées et analysées après coloration à l'hématoxyline et éosine (HE) pour effectuer l'analyse histologique classique, au microscope optique, c'est-à-dire :

- o Recherche d'anomalies cytonucléaires (anisocaryose, anisocytose, degré d'hyper chromatisme du noyau, taille du noyau, verticalisation du noyau, augmentation du rapport cytonucléoplasmique) et leur étendue sur l'épithélium ;

- Recherche de koïlocytes : marqueurs de l'infection au virus HPV. Ce sont des cellules de grande taille avec un noyau également augmenté de taille, à contour irrégulier, avec un halo péri nucléaire ainsi qu'un hyper chromatisme ;
- les mitoses cellulaires : augmentation de leur nombre, niveau de présence des mitoses sur l'épithélium, mitoses anormales ;
- Niveau de différenciation cellulaire.

Les lésions histologiques ont été reportées en utilisant la classification des CIN selon la classification de Richart (cf. **tableau 3**).

Les pathologistes ont considéré que la CIN3 et le carcinome in situ constituaient la même entité.

Nous avons effectué une recherche immunohistochimique de la P16 sur tous les CIN2 de notre étude. Nous avons utilisé la technique d'immunoperoxidase utilisant le clone E6H4 (CINtec kit) de Mtm® and Dako®. Les blocs d'intérêt (blocs contenant l'anomalie histologique CIN2) ont été identifiés après relecture des lames et sélection des lames porteuses de CIN2. Ils ont été ensuite désarchivés. Les blocs ont été coupés au microtome et déposés sur des lames de verre, puis déparaffinés. Les pièces sur les lames ont ensuite été réchauffées. Un réactif à base d'anticorps monoclonaux visant spécifiquement la protéine P16 et un réactif témoin négatif composé d'un anticorps du même isotype (IgG2a) ont été utilisés.

La procédure d'immunomarquage a été effectuée à l'aide d'un automate Dako Autostainer®. L'anticorps primaire spécifique de la protéine p16 et un anticorps secondaire lié à une enzyme sont utilisés successivement. La réaction chromogène se base sur une conversion médiée par la peroxydase de Raifort d'un chromogène DAB. La réaction est visible au niveau du site de liaison antigène-anticorps. Après contre coloration, la lame est recouverte d'une lamelle et les résultats sont évalués sous microscope optique. Les lames d'immunomarquage sont interprétées en relation avec des lames de coloration HE, préparées à partir de la même pièce de biopsie.

L'interprétation des lames de P16 s'effectue selon la classification suivante utilisée actuellement au CHU de Bordeaux:

- Marquage **négatif (image D)** : aucun marquage dans l'épithélium malpighien (absence de marquage), ou quelques cellules isolées des couches superficielles marquées de manière non continue (marquage focal)
- Marquage **positif (image E)** : les couches de cellules basales et parabasales de l'épithélium malpighien montrent un marquage continu (cellules jointives), avec ou sans marquage des cellules superficielles. Le marquage peut être au niveau du noyau et/ou au niveau du cytoplasme.

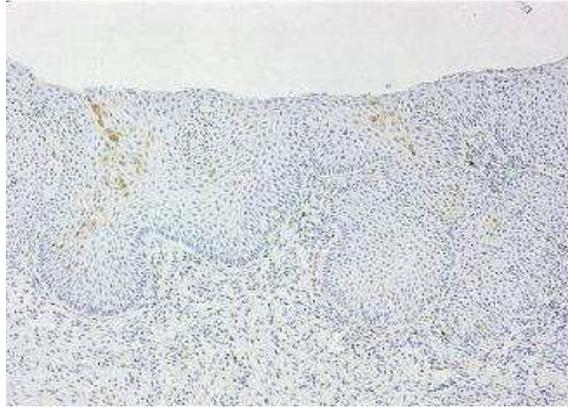


Image D : marquage négatif de la P16. Marquage discontinu, sporadique, n'intéressant pas les cellules des couches basales et parabasales



Image E : marquage positif de la P16. Marquage diffus et intense, des cellules jointives partant des assises basales jusqu'à la partie moyenne de l'épithélium.

D. ANALYSE STATISTIQUE

Etude descriptive:

- des données cliniques et démographiques de notre échantillon (date de naissance, âge, gestité et parité, âge du premier rapport sexuel) ;
- De la consommation tabagique;
- des données cytologiques et virologiques (résultats de la biopsie guidée par la colposcopie et du génotypage viral) ;

- des données de la P16 sur notre échantillon de CIN2, en fonction des données virologiques et histologiques

histologiques.

Etude analytique

Les variables qualitatives ont été analysées à l'aide du test de Khi-deux ou de Fisher, en fonction de la taille de l'échantillon. Nous avons étudié:

- la détection des HPV en fonction des groupes de CIN ;
- la distribution des HPV à haut risque en fonction des groupes de CIN ;
- la distribution des infections à HPV uniques et multiples en fonction de la gravité des CIN ;
- la distribution des génotypes à haut risque 16, 18 et 31 en fonction de la gravité des CIN ;
- l'association entre la consommation tabagique et la gravité des CIN ;
- la corrélation entre P16 et détection de HR-HPV ;
- l'association entre P16 et les résultats de la biopsie des patientes CIN2.

L'analyse était considérée comme significative lorsque p était inférieur ou égal à 0,05.

Les recherches bibliographiques ont été effectuées par requête sur Pubmed, Cochrane Library et EMC.

3. RÉSULTATS

A. DONNÉES DÉMOGRAPHIQUES ET CLINIQUES

Nous avons recueilli les données de 82 patientes de l'étude MMP-HPV et 38 patientes de l'étude SUIVICOL (23 patientes exclues de cette étude à l'issue de la conisation, et 15 patientes CIN3 ayant terminé leur protocole d'étude), obtenant ainsi une population de 120 patientes. L'échantillon comprend 35 CIN1, 45 CIN2 et 40 CIN3.

L'âge médian est de 33 ans (20 à 65 ans) pour l'échantillon global. L'âge médian des premiers rapports sexuels est de 17 ans (13 à 23 ans). La gestité médiane globale est de 2 (0-7) et La parité médiane globale est de 1.

Ces données cliniques sont détaillées en fonction des groupes de CIN dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Données cliniques et démographiques.

	CIN1(n=35)	CIN2(n=45)	CIN3(n=40)
Age	32(21-65)	35(20-65)	31(22-53)
Médian			
Gestité médiane	1(0-6)	2(0-5)	1(0-7)
Parité médiane	1(0-4)	1(0-5)	1(0-7)
Age PRS médian	16(14-21)	17(13-23)	17(13-34)

n= effectif ; PRS= premier rapport sexuel ;intervalle de données entre parenthèse

Il n'existe pas de différence significative entre les différents groupes

Nous avons étudié **l'âge des patientes** en fonction du groupe de CIN, selon qu'elles avaient moins de 40ans, ou plus de 40ans (**tableau 6**).

Tableau 6_: répartition des CIN en fonction des tranches d'âge de l'échantillon.

tranche d'âge	CIN1n(%)	CIN2 n(%)	CIN3 n(%)	total
<40 ans	23(27%)	30(35%)	32(38%)	85(100%)
> ou égale à 40 ans	12(34%)	15(43%)	8(23%)	35(100%)

n: effectif; 40 ans est l'âge du pic d'incidence du cancer du col de l'utérus

85 patientes de notre population (soit 71% de notre population) ont moins de 40 ans. Il n'y a pas de lien entre la tranche d'âge et la gravité des CIN.

Le tabagisme actif était présent chez 59,1% de la population globale. La répartition de la consommation tabagique en fonction des CIN est présentée dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : répartition des fumeurs en fonction du sous groupe de CIN.

TABAC	CIN1 n (%)	CIN2 n (%)	CIN3 n (%)
Oui	17(48%)	29(64%)	25(63%)
Non	15(43%)	14(32%)	15(37%)
Autre	3(8%)	2(4%)	0(0%)
Total	35(100%)	45(100%)	40(100%)

n: effectif

Il n'y a pas de lien statistiquement significatif entre le tabagisme et la gravité des CIN.

B. GÉNOTYPAGE VIRAL ET CIN

L'ADN du virus HPV était détecté dans 85% de la population globale (102 patientes). La détection des HPV en fonction de la gravité des CIN est présentée dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : détection des HPV en fonction du niveau de gravité des CIN.

	CIN1 n (%)*	CIN2 n (%)*	CIN3 n (%)
HPV+	25(71%)	41(91%)	36(90%)
HPV-	10(29%)	4(9%)	4(10%)
Total	35(100%)	45(100%)	40(100%)

n= effectif ; *significatif avec **p=0,03** ; HPV+ : HPV détecté ; HPV- ; HPV non détecté

Il existe une différence significative entre le taux de détection des HPV pour les CIN1 et le taux de détection pour les CIN2 ($p=0,03$). En revanche, il n'existe pas de différence significative sur cette détection entre CIN2 et CIN3.

L'infection à virus HPV était unique dans 74,5% des patientes HPV+, et multiple dans 25,5% des HPV+. La répartition des infections uniques et multiples en fonction de la gravité des CIN est présentée dans le **tableau 9**.

Tableau 9 : répartition des infections uniques et multiples en fonction du niveau de gravité des CIN.

Infection	CIN1 n (%)	CIN2 n (%)	CIN3 n (%)
Unique	20(80%)	27(66%)	29(72%)
Multiple	5(20%)	14(34%)	11(28%)
Total	25(100%)	41(100%)	40(100%)

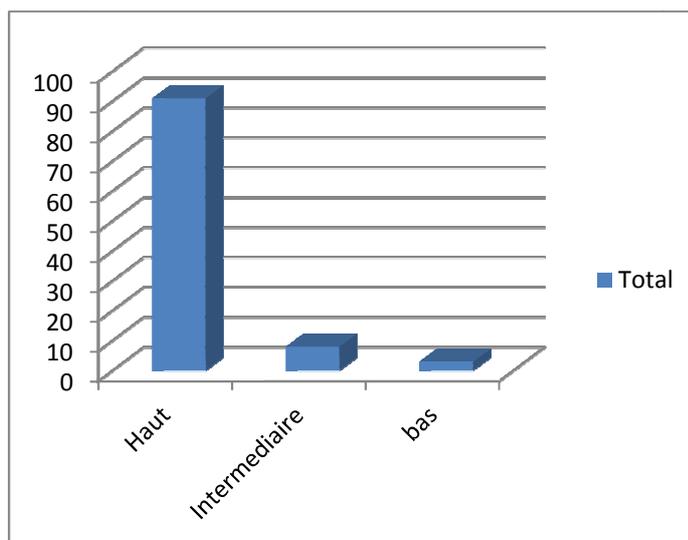
n: effectif

Il n'y a pas de différence significative ni entre CIN2 et CIN1, ni entre CIN2 et CIN3.

Seule une infection multiple de notre échantillon n'associe pas un HPV à haut risque (association de HPV 61 et 7 qui sont des HPV de bas risque).

Dans 89% des cas des HPV+ sur l'échantillon global, il s'agissait d'HR-HPV. Il s'agissait d'IR-HPV dans 8% des HPV détectés sur l'échantillon global. 3% des HPV détectés enfin étaient de bas grade. (**Figure 3**).

Figure 3_ : Répartition des HPV détectés par niveau de risque dans la population des HPV+.



La répartition des HR-HPV en fonction du niveau de gravité des CIN est présentée dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Répartition des HR-HPV en fonction du niveau de gravité des CIN.

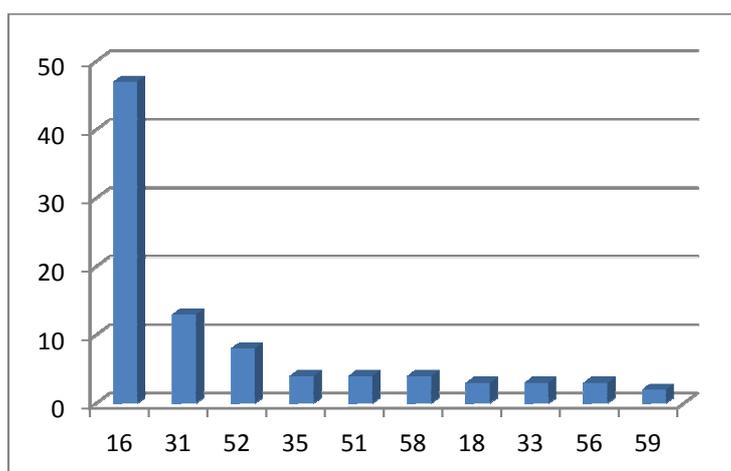
	CIN1 n (%) [*]	CIN2 n (%) [*]	CIN3 n (%)
HR-HPV	16(46%)	39(87%)	36(90%)
HPV IR-LR	9(26%)	2(4%)	0(0%)
HPV-	10(28%)	4(9%)	4(0%)
Total	35(100%)	45(100%)	40(100%)

n: effectif ; HR-HPV : HPV à haut risque ; HPV IR-LR : HPV de risque intermédiaire et bas ; HPV- : Absence de détection de HPV ou détection ininterprétable; * : différence significative entre CIN2 et CIN1, avec $p < 0,0001$

Il y a significativement plus de HR-HPV associé à CIN2 par rapport à CIN1 ($p < 0,0001$). En revanche, la différence observée entre CIN2 et 3 n'est pas significative. A noter que tous les HPV+ dans les CIN3 étaient des HR-HPV.

L'HPV le plus fréquemment détecté au sein de notre échantillon est **HPV 16**, correspondant à un peu moins de la moitié (46%) de l'ensemble des HPV+. Il est suivi de **HPV 31**, correspondant à 12% des HPV+. La **figure 4** présente la répartition des HR-HPV de notre population.

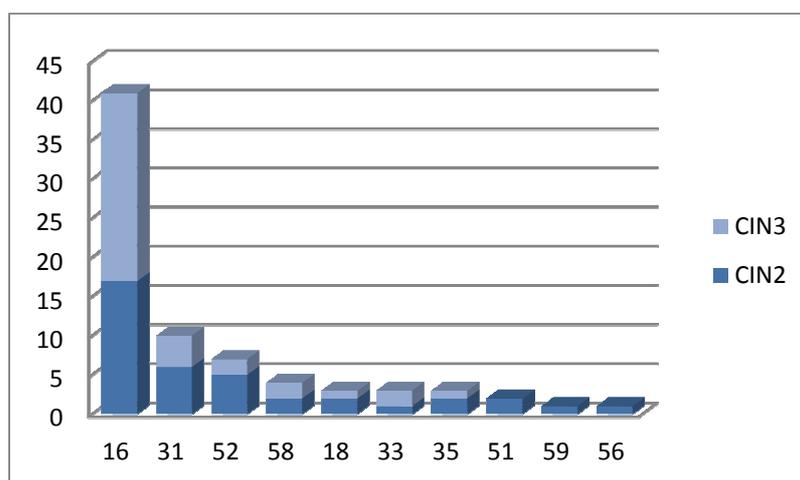
Figure 4 : répartition des HR-HPV dans notre population.



Nombre de HR-HPV en valeur absolue par ordre décroissant: HPV16=47 ; HPV31=13 ; HPV52=8 ; HPV35=4 ; HPV51=4 ; HPV58=4 ; HPV18=3 ; HPV33=3 ; HPV56=3 ; HPV59=2.

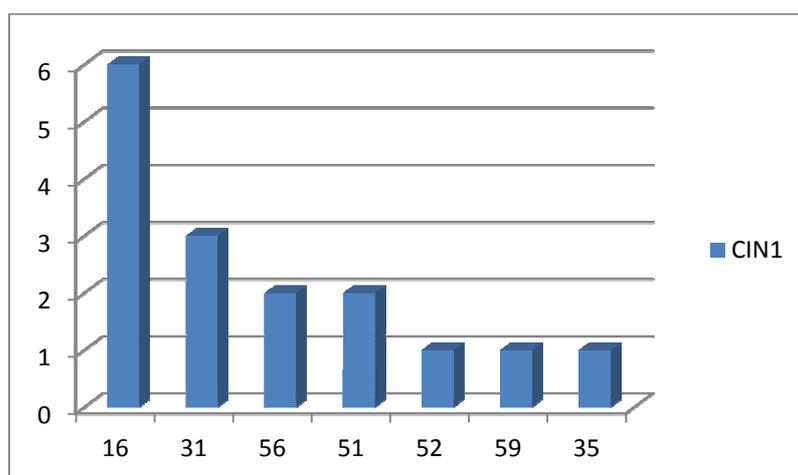
Le virus HPV 16 était aussi le plus fréquent dans chaque sous groupe de CIN, représentant 24% des CIN1, 41% des CIN2 et 67% des CIN3. Le virus HPV 31 est le deuxième génotype le plus fréquent dans notre échantillon, y compris dans le groupe des CIN1. Le virus HPV18 est peu représenté dans notre population et n'est présent que chez les CIN2 (2 fois) et les CIN3 (1 fois). Les **figures 5 et 6** présentent la répartition des HR-HPV en fonction d'une part les CIN2/3 et d'autre part les CIN1.

Figure 5 : Répartition des HR-HPV au sein des CIN2 et CIN3.



Nombre de HR-HPV en valeur absolue par ordre décroissant : HPV16=41(CIN2=17, CIN3=24) ; HPV31=10 (CIN2=6, CIN3=4) ; HPV52=7 (CIN2=5, CIN3=2) ; HPV58=4(CIN2=2, CIN3=2) ; HPV18=3 (CIN2=2, CIN3=1) ; HPV33=3 (CIN2=1, CIN3=2) ; HPV35=3 (CIN2=2, CIN3=1) ; HPV51=2 ; HPV59=1 ; HPV56=1 ; Il n'y avait pas de virus HPV 51, 59 et 56 dans les CIN3.

Figure 6 : Répartition des HR-HPV au sein des CIN1.



A noter la faible prévalence des HR-HPV dans les CIN1 par rapport au CIN2 et 3 ; Nombre de HR-HPV en valeur absolue par ordre décroissant : HPV16=6 ; HPV31=3 ; HPV56=2 ; HPV51=2 ; HPV52=1 ; HPV59=1 ; HPV35=1.

Les profils HPV 16 et HPV 31 pour chaque sous groupe de CIN sont représentés dans le **tableau 11**.

Tableau 11: profil des HPV 16 et 31 selon le niveau de gravité des CIN.

	CIN1n*	CIN2n*	CIN3n
HPV16	6(24%)	17(41%)	24(67%)
HPV31	2(8%)	6(16%)	4(11%)
Autres HR-HPV	8(32%)	16(39%)	8(22%)
IR-HPV	7(28%)	1(2%)	0(0%)
LR-HPV	2(8%)	1(2%)	0(0%)
Total	25(100%)	41(100%)	36(100%)

n : effectif ; *différence significative avec **p=0,02**.

Il existe une différence significative entre les profils de CIN1 et CIN2 concernant HPV 16 et 31 ($p=0,02$). En revanche, il n'existe pas de différence significative entre CIN2 et CIN3 concernant ces 2 HPV.

Les profils HPV 16 et 18 des différents groupes de CIN sont représentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12: profils des HPV 16 et 18 selon le niveau de gravité des CIN.

	CIN1n*	CIN2n*	CIN3n
HPV16	6(24%)	17(41%)	24(67%)
HPV18	0(0%)	3(6%)	1(3%)
AUTRES HR-HPV	10(40%)	20(49%)	11(30%)
IR-HPV	7(28%)	1(2%)	0(0%)
LR-HPV	2(8%)	1(2%)	0(0%)
Total	25(100%)	41(100%)	36(100%)

n:effectif; *différence significative entre CIN1 et CIN2, avec **p=0,01**.

Il existe une différence significative entre CIN1 et CIN2 concernant ces deux profils, avec un p à 0,01. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre CIN2 et CIN3.

C. P16 ET CIN2

Quatorze patientes (31%) porteuses de CIN2 dans notre échantillon présentaient un immunomarquage négatif pour la P16, correspondant à 31% de l'échantillon. Chez 31 patientes CIN2, la détection de la P16 est positive.

28 patientes CIN2 et HPV+ (68%) ont un immunomarquage de P16 positif. Il n'existe cependant pas de lien significatif entre la détection de l'HPV et un immunomarquage positif à P16. Le **tableau 13** présente la détection des HPV en fonction du résultat de l'immunomarquage.

Tableau 13 : distribution de HPV en fonction des résultats de l'immunomarquage par P16.

	HPV+ n	HPV- n
P16+	28	3
P16-	13	1

HPV+ : HPV détecté ; HPV- : HPV non détecté ; P16+ : immunomarquage P16 positif ; P16- : immunomarquage négatif ; n : effectif.

Nous avons étudié les résultats de l'immunomarquage par P16 en fonction des résultats de la biopsie préopératoire (**tableau 14**).

Tableau 14 distribution de P16 en fonction de la gravité des CIN sur la biopsie préopératoire.

	CIN1n*	CIN2n	CIN3n*
P16+	1	17	10
P16-	3	6	0

P16+ : immunomarquage positif à P16 ; P16- : immunomarquage négatif à P16 ; * : différence significative entre CIN1 et CIN3 avec $p=0,01$; n : effectif. L'effectif dans ce tableau n'est que de 37 patientes parce que pour les 8 autres patientes, aucune CIN n'a été retrouvée sur les biopsies, les rendant non contributives.

On observe une tendance à plus de positivité de l'immunomarquage P16 pour les CIN2 par rapport aux CIN1. On observe également plus de positivité de P16 pour les CIN3 par rapport aux CIN2. Toutefois, il n'y a pas de différence significative (p est respectivement égal à 0,09 et 0,14). Seule la différence entre CIN1 et CIN3 est significative, avec un p à 0,01.

4. DISCUSSION

A. INFECTION A VIRUS HPV ET DONNEES CLINIQUES

Âge

Notre population de patientes était jeune (âge médian du diagnostic de 33ans et 70,8% des patientes ayant moins de 40 ans), reflétant l'âge de la majorité des patientes participant au dépistage par FCU en France. Elle reflète aussi la majeure partie des patientes concernées par les lésions précancéreuses du col utérin (17). En effet, 40 ans représente le pic de prévalence du cancer du col, qui reste faible avant cet âge, voire exceptionnel avant 30 ans (22) (10) .

Avant 30 ans, les lésions précancéreuses ont un fort taux de régression spontanée. La régression est plus importante chez les femmes jeunes, comme l'a observé Fuchs (32). Dans son étude, elle décrit un taux de régression des CIN2 notamment à 92% après un suivi de 3 ans, chez des patientes de moins de 25 ans. Moore et al en 2007 (53), retrouve un taux de régression des CIN2 à 65%. Carcopino rajoute que le bénéfice du traitement de CIN2 notamment avant 30 ans n'a pas été démontré (22). Après 25 ans par contre, les taux de régression de CIN2 notamment sont toujours conséquents mais moins importants avec un taux de 15-23% sur deux ans, jusqu'à 55% pour les CIN2 entre 4 et 6 ans (34) (54) . D'où la nécessité de rechercher des marqueurs permettant de sélectionner les CIN2 à risque de progression.

La population concernée par la régression mais aussi le risque de progression des CIN (notamment les CIN2) est donc une population en âge de procréer. La prise en charge des lésions CIN2+ telle que recommandée à ce jour

en France est invasive, à type de conisation. Kyrgiou (41) a montré dans une méta analyse en 2008 que ce geste est significativement associé à un risque d'accouchement prématuré, de rupture prématurée des membranes, de petit poids de naissance. Le risque d'accouchement prématuré est le plus fréquent (42). Il est surtout lié au type et à la profondeur de la conisation (55). Même si l'importance de ces risques est discuté et doivent être mis en balance avec le risque d'invasion inhérent aux lésions précancéreuses (56), leur présence justifie la nécessité d'affiner la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces patientes.

Tabac

Notre étude met en évidence une légère tendance à plus de consommation tabagique chez les patientes ayant des lésions CIN2 et 3, non significative. Dans la littérature, le tabac est décrit comme le facteur de risque le plus fortement associé à la présence et à la sévérité des CIN (57) (58). Notre étude n'avait pas la puissance nécessaire pour mettre en évidence ce lien.

B. EPIDEMIOLOGIE DES HPV ET CIN

Détection des HPV

Dans notre population de lésions dysplasiques, l'ADN viral était détecté dans 85% des cas, avec une détection augmentant significativement avec la gravité des lésions CIN. Ce résultat met bien en évidence le lien nécessaire entre les HR-HPV et les lésions dysplasiques. Le taux de détection des HPV dans notre étude est un peu plus faible que ceux rapportés dans la littérature qui sont plutôt supérieurs à 90% (47) (59). Les 15% de non détection ne traduisent pas forcément une absence de virus HPV et peuvent s'expliquer de plusieurs façons :

- **Les limites techniques des tests de génotypage viral** : la trousse Linear Array Genotyping Test (Roche®) a été la plus utilisée dans notre étude (82 patientes). Elle détecte moins de génotypes de HR-HPV que la trousse INNO-LIPA. Il ya donc un risque de sous estimation de la prévalence des HR-HPV dans notre étude.
- **La charge virale sur le prélèvement** : dans notre échantillon, le génotypage a été fait dans la plupart des cas sur un FCU pré biopsie utilisé uniquement dans ce but. La détection a tout de même été négative pour 8 CIN1 sur 35, et sur 1 CIN2 sur 45. Il n'y avait pas de détection négative

chez les CIN3. La charge virale dépend aussi de l'activité productive des HR-HPV présents dans l'échantillon.

- **Les infections multiples** : dans notre étude, on observe 25,5% d'infections multiples. Il existe une compétition entre les HPV présents lors du test par hybridation, ce qui entraîne des risques de sous estimation. En cas de présence de HPV 33, 35 et ou 58, la détection d'ADN par la trousse Linear Array ne peut pas déterminer l'absence ou la présence des virus HPV 52 et 54. Dans notre étude nous avons choisi de considérer que ces sous types étaient absents, car cela n'a pas d'incidence sur la gravité potentielle de la lésion et ne change pas fondamentalement la prise en charge.
- **Mauvaise qualité du prélèvement** : mais de faible importance dans notre échantillon qui compte seulement 2 cas de CIN1 avec génotypage non interprétable sur 35, 3 cas sur 45 pour les CIN2 et 5 cas sur 25 pour les CIN 3. Il s'agit le plus souvent d'absence de révélation de témoin positif, ou de suspicion de contamination du prélèvement.

Quatre vingt neuf pour cent des HPV+ étaient des HR-HPV, 8% étaient de grade intermédiaire et 3% étaient de grade bas (Cf. **figure 1**). Il existe un lien significatif entre HPV à haut risque et la présence de CIN ($p=0,001$). Ce résultat confirme donc le rôle des HR-HPV dans la genèse des CIN. La **figure 1** met aussi en évidence la faible implication de HPV à risque intermédiaire et bas risque dans les CIN, étant ainsi en accord avec la classification des HPV muqueux de l'IARC.

Les HR-HPV sont statistiquement plus fréquents dans les CIN2 par rapport aux CIN1. Mais il n'y a pas de différence de prévalence significative entre CIN2 et CIN3. Dans la littérature, Zuna et Al (48), met en évidence une différence significative non seulement entre CIN1 et CIN2, mais aussi entre CIN2 et CIN3 dans la détection des HR-HPV. En fait, elle prend le problème à l'inverse et répartit les HPV en 3 groupes, en fonction de leur prévalence dans chaque groupe de CIN de son échantillon de 282 patientes. Elle obtient ainsi 3 groupes de HPV qu'elle classe en haut risque, risque intermédiaire et bas risque. Mais la répartition des HPV au sein de ces 3 groupes ne correspond pas à la répartition de l'IARC qui est la référence dans la plupart des études. Nos résultats sont donc difficilement comparables.

Le fait qu'il n'y ait pas de différence de prévalence significative entre CIN2 et CIN3 pourrait justifier que dans la plupart des études sur l'épidémiologie des HPV, CIN2 et 3 soient associées comme des lésions de haut grade (44) (45) (60).

Notre échantillon compte 25,5% d'infections multiples. La proportion des infections multiples dans les études sur les CIN et les cancers invasifs est très variable, allant de 7,2% en moyenne (0 à 14,4%) dans la méta analyse de Insinga (54), jusqu'à plus de 60% en moyenne dans l'étude de Coutlée et al (47). L'élément le plus probable pouvant expliquer cette différence est que Coutlée a effectué le génotypage sur des FCU et Insinga n'a retenu pour sa méta analyse que des études avec génotypage sur biopsie ou sur conisation cervicales. Son argument est que la détection sur FCU met en évidence également des génotypes liés à une simple infection du tractus vaginal, sans forcément d'implication dans les lésions de CIN. De plus, la charge virale est plus élevée et plus sélective sur les pièces tissulaires.

Mais le génotypage sur pièce tissulaire est plus long et plus fastidieux, puisqu'il implique préalablement une étape de déstructuration (digestion des protéines par lyse à l'aide de protéinase K) tissulaire avant l'extraction de l'ADN au sein du noyau cellulaire. De plus, Le fait qu'il y ait plus d'infection multiple n'entraîne pas de surestimation de la gravité des lésions puisque qu'il n'y a pas de différence significative de leur prévalence en fonction de la gravité des CIN dans notre échantillon, ainsi que dans l'étude de Coutlée ou encore la méta analyse d'Insinga. A noter cependant que dans notre étude, un peu plus du tiers de nos patientes a bénéficié d'un génotypage sur biopsie ou conisation, ce qui constitue un biais. Ribeiro (61) trouve cependant que les infections multiples sont prédictives d'une lésion cervicale de haut grade lorsque HPV 16 est associé, comme si la présence d'autres HPV potentialisait l'action carcinogène de HPV16.

Génotypes HPV les plus fréquents

L'HPV le plus fréquemment détecté dans notre échantillon est l'HPV 16, en accord avec la littérature qui montre que HPV 16 est l'HPV à haut risque le plus répandu dans le monde (54) (44) (47) (62) (63) (64) (65). HPV 16 était aussi le plus fréquent dans chaque sous groupe de CIN de notre étude, d'où l'intérêt en santé publique de ce génotype, qui est intégré dans les 2 vaccins anti HPV qui existent actuellement sur le marché (Gardasil® et Cervarix®). En terme de prévalence, dans notre échantillon, HPV 16 est suivi de HPV 31, qui représente 12% des HR-HPV, puis HPV 52. Ces données sont à peu près en accord avec la littérature. Les études EDITH en France en 2007 et 2008 ont permis d'étudier la distribution des HPV dans les lésions de bas grade, de haut grade et les cancers invasifs du col (44) (45) (43). Ainsi, HPV 16 est de loin le plus fréquent dans les lésions invasives, avec une prévalence globale de 73%, suivi des HPV 18 (19%) et 31 (7%) notamment. Dans l'étude EDITH II portant sur les lésions de haut grade (CIN2/3 associées), l'HPV 16 est encore de loin le type le plus représenté avec une prévalence globale de 63%, suivi de l'HPV 18 (15%) et 31(12%). Pour les lésions de bas grade, EDITH 3, l'HPV 66 est le plus fréquent, contrairement à notre groupe de CIN1 dans lequel HPV 16 qui est

le plus fréquent. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un peu plus de la moitié de notre effectif de CIN1 était des patientes considérées pour des LSIL persistants depuis 12 à 18 mois.

Dans notre étude HPV 31 est le deuxième génotype en terme de prévalence, quelque soit la gravité de la lésion CIN. Il n'est pas rare de retrouver ce génotype associé surtout aux CIN2 ou CIN2/3 (54) (64) (62). Cependant, il est peu associé aux lésions invasives, constituant souvent le troisième voire le quatrième génotype le plus fréquent dans les lésions invasives (43) (60).

Le sous-type HPV 18 est très peu représenté dans notre échantillon, correspondant à 3 patientes dans notre échantillon. Notre échantillon ne contient pas non plus de virus HPV 45. Ceci peut être lié au caractère restreint de notre effectif, mais il est en accord avec la plupart des études comparant la prévalence des HPV dans les lésions de haut grade et les lésions invasives. En effet, HPV18 et 45 sont significativement plus fréquents dans les lésions invasives par rapport aux lésions de haut grade (45) (63). Il est également possible que la prévalence de ces génotypes soit sous estimée dans notre étude comme dans les autres, car ils seraient responsables de lésions précancéreuses occultes, difficiles à mettre en évidence au FCU et à la biopsie. Ils causeraient d'emblée des lésions de haut grade, évoluant plus vite en lésion invasive que les lésions précancéreuses liées à d'autres génotypes (66).

Le génotypage permet donc de détecter les HPV les plus fréquents dans les lésions précancéreuses et les plus agressifs, information précieuse pour l'élaboration de vaccins et d'une campagne vaccinale ciblés sur les HPV prédominants.

C. GENOTYPAGE HPV ET PERSPECTIVES DIAGNOSTIQUES DES CIN

Notre étude met en évidence une prévalence significativement plus importante des virus HPV 16, 18 et 31, chez CIN2 par rapport à CIN1. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre CIN2 et CIN3. Notre résultat est donc plutôt en accord avec le statut de lésion de haut grade souvent accordé aux lésions CIN2 dans la littérature, ainsi que leur association fréquente aux lésions CIN3 (54) (44) (61). Ces résultats montrent que le génotypage peut avoir un intérêt pour le diagnostic différentiel entre lésion de bas grade et lésion de haut grade. Mais son intérêt semble limité pour faire la part des choses entre CIN2 et CIN3. Notre faible effectif entre les sous groupes ainsi qu'un biais d'échantillonnage nuance un peu ce constat, même si il est retrouvé par d'autres équipes qui dissocient CIN2 et CIN3. En effet, l'équipe canadienne de Coutlée met en évidence une fréquence de HPV 16 notamment, significativement plus importante chez CIN3 par rapport à CIN1, mais il n'existe pas de différence significative entre CIN2 et CIN3 (47). Il y a également significativement plus de HR-HPV associé à CIN2 et 3 qu'à CIN1, comme dans notre étude.

Comme l'indique notre étude, l'utilisation du génotypage viral comme outil diagnostique permettrait donc de délimiter 2 classes : les lésions de haut grade et les lésions de bas grade. Cette classification est en accord avec les connaissances biologiques actuelles sur la carcinogenèse des HPV, à savoir qu'il existe 2 phases essentiellement (13):

- La phase d'infection latente et ou d'infection productive, avec la réplication virale, pouvant se traduire par des lésions dysplasiques souvent mineures pouvant correspondre aux CIN 1
- La phase d'infection transformante, avec intégration du virus dans le génome, prolifération de cellules anormales, immatures, et donc présence de lésions dysplasiques avec potentiel de progression, pouvant correspondre aux CIN2 et 3.

Cette classification est également en accord avec celle proposée par le groupe LAST en 2012, qui préconise une classification en lésion de bas grade d'une part, et en lésion de haut grade d'autre part (49). Ce groupe nuance tout de même sa classification en soulignant qu'il est possible de préciser sur les compte-rendus la classification CIN à 3 entrées, qui peut être importante surtout chez les patientes jeunes, porteuses de CIN2. Sa prise en compte a pour but d'éviter les sur-traitements.

La plupart des études histologiques récentes associent CIN2 et 3, ne permettant pas d'évaluer le profil viral de CIN2. Mais elles se basent uniquement sur les résultats en coloration HE pour faire le diagnostic de CIN2. Les CIN2 sont pourtant une classe très controversée comme décrit dans notre introduction générale, considérée actuellement dans la plupart des recommandations comme des lésions de haut grade mais de façon plutôt arbitraire (21) (60).

Les études actuelles sur le génotypage s'intéressent surtout au risque de progression de ces lésions vers des lésions invasives Il n'y a quasiment pas d'étude sur l'intérêt diagnostique du génotypage détaillé viral, et notamment son intérêt dans le dépistage. L'analyse de l'étude ATHENA (67), étude américaine sur les performances diagnostiques du test HPV utilisant le génotypage de HPV 16 et 18, montre qu'il y aurait une meilleure sensibilité de ces tests par rapport à un FCU seul, associé à une forte spécificité et une bonne valeur prédictive négative (VPN), qui diminueraient le recours à la coloscopie. Cette étude porte sur 47208 femmes d'au moins 25 ans. Mais elle associe les lésions CIN2 et 3, ce qui ne permet pas d'évaluer l'apport de ces tests pour affiner le diagnostic de CIN2.

Pour affiner le diagnostic de CIN2, et donc des lésions considérées de haut grade par le génotypage, on a associé à l'analyse morphologique classique par coloration HE, l'immunomarquage de la P16.

Soixante neuf pour cent de notre effectif de CIN2 avait un immunomarquage positif pour la P16. La P16 étant un marqueur de l'infection transformante (Cf. introduction générale), témoignant du démarrage du processus néoplasique, ce résultat met en avant le caractère souvent à haut risque des CIN2, avec un risque de micro invasion voire d'invasion qui nécessite une prise en charge diagnostique et thérapeutique adéquates. Mais il met aussi en évidence un probable sur-traitement pour 31% de l'effectif, dont l'immunomarquage P16 est négatif. La valeur prédictive négative de P16 est très élevée, jusqu'à 96% (49) (68). Le marquage négatif signe donc l'absence de processus oncogénique, et reflète plutôt soit une absence d'infection, soit une infection latente ou productive transitoire.

Dans notre échantillon, la positivité de l'immunomarquage à P16 n'était pas statistiquement associée à la détection des virus HPV, même si empiriquement on constate que 28 des 41 patientes ayant un HR-HPV expriment la P16. Ce résultat est influencé par les limites du génotypage dans notre étude et par sa faible puissance. Klaes, en 2001, met en évidence un lien entre l'expression diffuse de P16 et les HR-HPV pour les CIN3 uniquement, témoignant ainsi de l'agressivité de ces lésions (51).

Nous avons mis en évidence une tendance à une association entre la gravité des CIN à la biopsie et l'expression de la P16. Donc la P16 peut être un marqueur de gravité des lésions CIN, pouvant être utilisé en cas de doute diagnostique notamment entre CIN1 et CIN2. Notre effectif limité est probablement l'une des causes de l'absence de différence significative entre CIN2 et CIN3. Omori a étudié en 2008 l'expression de la P16 chez 52 patientes CIN2 et 25 patientes CIN1. Il conclue lui aussi que l'expression de la P16 et le signal HPV obtenu par FISH (fluorescent in situ hybridation) sont associés à la gravité des CIN (68). Il s'agit également d'un marqueur pronostique parce qu'Omori constate également dans le suivi des CIN2, que l'expression de P16 devient diffuse et intense chez celles qui vont évoluer en CIN3. Le pronostic de CIN2 dépend donc significativement de l'expression de la P16. De même, Tsoumpou, dans sa méta analyse de 2009 portant sur 61 études, montre que la proportion de surexpression de P16 augmente avec la sévérité des lésions cytologiques et histologiques (50).

Dans notre effectif de CIN2, nous avons plusieurs situations de discordance entre la cytologie et la biopsie. Le résultat de l'immunomarquage P16 représente dans ces cas là un argument de plus en faveur de l'un ou de l'autre diagnostic. Ce marquage peut être effectué sur les biopsies, permettant ainsi d'éviter aux patientes avec

CIN2 mais sans surexpression de P16, une conisation non nécessaire. Ce constat est en accord avec une des propositions émises par le groupe d'étude américain LAST en 2012 (49). En effet, il préconise l'utilisation de P16 pour les CIN2, pour diminuer la subjectivité du diagnostic morphologique seul, et déterminer s'il s'agit de lésions à haut risque ou au contraire des lésions de bas risque, à surveiller. Il préconise également la P16 comme outil d'arbitrage en cas de désaccord dans l'interprétation histologique par coloration HE.

Dans la même veine, Bergeron et al ont utilisé la détection de la protéine p16 pour tester la reproductibilité du diagnostic histologique sur des prélèvements du col utérin avec un diagnostic de CIN 1, 2 ou 3 (38). L'étude était multicentrique avec l'implication de 12 pathologistes européens, et portaient sur 250 biopsies et 250 conisations. Elle a montré une amélioration statistiquement significative de la pertinence et de la reproductibilité du diagnostic de CIN2 et CIN 3 en utilisant la détection immunohistochimique de la protéine p16 en plus de la coloration par HE. Elle montre également une amélioration du diagnostic différentiel entre CIN2 et CIN3. Omori met en évidence une concordance inter observateur excellente pour le diagnostic de CIN2, contrairement à celle de l'analyse morphologique classique (68).

Interprétations de l'expression de P16

Nous avons choisi une interprétation binaire de l'expression de la P16, utilisée actuellement dans le service d'anatomopathologie du CHU de Bordeaux. C'est aussi celle préconisée par Bergeron et Al en 2010 (38) (36) et 2014 (69), et par le groupe américain LAST (49). L'un des buts de notre étude était de discuter l'intérêt de la P16 pour le diagnostic des CIN2. La recherche binaire d'un immunomarquage semble suffisante pour effectuer une différence entre les CIN2 témoignant d'un processus carcinologique vraiment en cours (P16 positif) et les CIN2 liées à une infection productive, ayant des anomalies morphologiques débordant sur la moitié voire les 2/3 de l'épithélium (P16 négatif). Il existe aussi des lésions bénignes qui peuvent mimer les CIN2 morphologiquement, mais qui auront un immunomarquage P16 négatif (atrophie, métaplasie immature,...). La positivité du marquage par P16 telle que nous l'avons utilisé exclut les immunomarquages artéfactuels qu'on peut rencontrer dans les lésions bénignes ou les infections productives.

Il est décrit que certains CIN1 peuvent avoir un immunomarquage positif à P16, avec un marquage ne dépassant pas le 1/3 de l'épithélium. Tsoumpou a mis en évidence dans sa méta analyse de 2009 que ces CIN1 avec immunomarquage positif à P16 sont plus à risque de progression vers des lésions de haut grade et vers des lésions invasives que les CIN1 sans immunomarquage de P16 (respectivement 37,8% et 71,4% ont regressé pendant le suivi, contre respectivement 62,2% et 28,6% qui ont progressé en CIN3 durant un suivi de 5 ans).

L'interprétation de la P16 selon son niveau d'expression sur l'épithélium ne présente pas d'intérêt diagnostique ni pronostique. En effet, l'analyse morphologique prime toujours sur le marqueur en cas de discordance sur la hauteur des anomalies entre l'expression de la P16 et la coloration HE. Donc, si une lésion CIN2 n'est positive qu'au 1/3 de l'épithélium pour la P16, elle est quand même considérée comme une CIN2 correspondant à une lésion de haut grade donc, méritant potentiellement un traitement invasif.

Dans la littérature, il n'y a pas de consensus sur l'interprétation de l'immunomarquage par P16. Les premières interprétations étaient basées sur le pourcentage de cellules marquées et le profil de marquage (diffus, sporadique, focal). D'autres sont basées sur l'intensité du marquage et le profil de marquage (annexe 6) (70). L'interprétation proposée par Klaes et Al semble la plus répandue. Il s'agit d'une classification semi quantitative (51):

- immunomarquage négatif si moins de 1% des cellules de l'épithélium sont marquées,
- sporadique si moins de 5% des cellules marquées,
- focale entre 5 et 25% des cellules marquées,
- diffuse supérieur à 25% pas très clair

Cette classification est assez détaillée mais d'intérêt clinique difficile à évaluer. Même dans son étude, Klaes finit par regrouper les expressions négative, focale et sporadique sous la même entité pour pouvoir faire les analyses, ce qui équivaut au classement binaire que nous avons utilisé. Le principal désavantage de ces classifications est donc la reproductibilité difficile. Van Bogaert, qui fait le point en 2012 sur les différentes interprétations du marquage par P16, conclut que l'interprétation de P16 reste non consensuelle, et gêne la généralisation de son utilisation en routine. Il semble plutôt en faveur de l'interprétation binaire utilisée par Bergeron (70).

Limites de la P16 et solutions

Les limites de l'utilisation de la P16 en histologie sont les suivantes :

- le diagnostic différentiel entre CIN1 et CIN2 peut parfois être difficile car CIN1 peut aussi exprimer la P16. Donc, si morphologiquement il y a un doute entre CIN1 et CIN2, la P16 seule ne permettra pas toujours de trancher
- le diagnostic différentiel entre CIN3 et remaniement métaplasique immature. L'expression positive de la P16 orienterait plutôt vers une CIN3, mais il existe aussi des lésions de bas grade se développant sur des métaplasies immatures et pouvant exprimer la P16. Il y a donc un risque de surestimation des lésions avec l'utilisation de P16 seule.

- L'étude de l'expression de la P16 seule ne peut pas être dissociée de l'étude morphologique

Pour pallier aux limites de la P16, certains pathologistes ont pensé à l'associer à l'expression d'un autre marqueur, le KI67 (36) (71). Il s'agit d'un marquage nucléaire d'intensité variable. C'est un marqueur de mitose, donc de renouvellement cellulaire. Dans les cellules normales, le marquage est strictement limité aux cellules des assises basales. Dans les dysplasies, la prolifération cellulaire étant anormale, on peut retrouver des cellules en cycle dans les couches parabasales, intermédiaires et/ou superficielles de l'épithélium. Ainsi, l'association d'une expression de P16 et de mitoses au-delà de l'assise basale est un argument de plus pour trancher en faveur d'une lésion de haut grade. Pour des raisons administratives et techniques, nous n'avons pas pu évaluer l'intérêt du KI67 dans notre étude.

Récemment a été mis en place un test conjoint étudiant l'expression de P16 et KI67 au sein de la même cellule (71). Cela permet ainsi une analyse plus rapide et automatisée, surtout utile en cytologie.

III- CONCLUSION

Les lésions précancéreuses du col utérin sont très fréquentes, et leur prise en charge est un problème de santé publique. L'amélioration de la connaissance de leur histoire naturelle ainsi que de l'action biologique des virus HPV lors du processus de carcinogenèse, entraîne une réflexion actuelle de la communauté scientifique pour l'affinement diagnostique et l'amélioration de leur prise en charge. Notre réflexion s'est axée surtout sur la prise en charge diagnostique des CIN2, entité dont le diagnostic cytologique et histologique est très controversé, entraînant des décisions thérapeutiques remises en question surtout chez les patientes en âge de procréer.

Nous avons étudié les profils viraux de notre population globale qui est en accord avec certains profils retrouvés dans la littérature, confirmant le caractère à haut risque des virus HPV 16 et 31 notamment. Les profils viraux de CIN2 et CIN3 concernant les HPV 16, 18 et 31 semblent similaires, et sont significativement différents de ceux de CIN1. Le génotypage est donc plutôt en faveur d'une classification à 2 entrées des CIN mais n'est pas suffisant pour affiner le diagnostic des CIN2.

Nous avons également réalisé l'immunomarquage par P16 sur tous nos cas de CIN2. La plupart des patientes ont eu une conisation justifiée, car le marquage P16 était positif dans 69% des cas. Il demeure 31% de patientes qui ont eu probablement un sur-traitement. Nous avons mis en évidence une tendance à une association entre l'expression de la P16 et la gravité des CIN sur la biopsie pré opératoire, qui n'est toutefois pas significative, probablement à cause de la faible puissance de notre échantillon. L'expression de la P16 représente donc un marqueur diagnostique et pronostique, permettant de repérer les CIN2 en phase d'infection transformante, et nécessitant une prise en charge thérapeutique invasive. Les CIN2 sans expression de P16 peuvent en revanche être surveillés, optique très importante car la plupart des patientes ayant ces lésions précancéreuses sont en âge de procréer. Cela pourrait éviter une augmentation inutile des risques obstétricaux et néonataux. La P16 est en faveur d'une classification à deux entrées comme le génotypage viral, mais avec la possibilité d'affiner le diagnostic des CIN2.

la P16 ne peut pas s'utiliser seule comme tous les marqueurs d'anatomopathologie. Elle doit s'intégrer dans une stratégie diagnostique associant en premier lieu l'analyse morphologique qui primera toujours sur les marqueurs. On peut y associer d'autres marqueurs comme le KI67 lorsque l'interprétation de l'expression de la P16 est limite et ne permet pas toujours de faire le diagnostic différentiel.

Toutefois, les biais de notre étude, notamment sa faible puissance et le biais d'échantillonnage, rendent nécessaire une étude sur une plus grande série, si possible prospective, avec un suivi à long terme pour pouvoir évaluer la régression, la persistance et la progression des lésions diagnostiquées. Elle pourrait associer à l'immunomarquage de la P16 celui du KI67 qui pourrait, selon la littérature, améliorer les performances

diagnostiques de la P16, et permettre son utilisation en routine dans l'analyse histologique des biopsies cervicales. Ceci dans le but final d'intégrer la P16 dans le dépistage du cancer du col utérin.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Hausen, H Zur.** Human papillomavirus: a major cause of cancer. *biochim biophy acta*. 1996, pp. 55-78.
2. **Bosch FX1, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV.** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87: 11.
3. **IARC.** Human papillomaviruses. *IARC monographs*. Vol. 90.
4. **de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *virology*. 2004; 324(11), 17-27.
5. **Monsenego, J.** Infection à HPV: état des connaissances, pratiques et prévention vaccinale. springer, 2006.
6. **Agius, G.** Infection à papillomavirus du cancer du col de l'utérus. personal communication, 2006.
7. **INCA.** épidémiologie du cancer du col de l'utérus- données en france métropolitaine. *e-cancer*. [Online] INCA, 2013. [Cited: mai 2, 2014.] <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-indicateurs/1-types-cancer/13-cancer-col-uterus/12-epidemiologie-cancer-col-uterus-france-metropolitaine-essentiel/32-epidemiologie-cancer-col-uterus-donnees-essentielles-france-metropolitaine.html>.
8. **HAS.** Recommandations pour le dépistage du cancer du col de l'utérus en france. *Has-santé*. [Online] 2010. [Cited: mai 2, 2014.] http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-11/fiche_de_synthese_recommandations_depistage_cancer_du_col_de_luterus.pdf.
9. **Munoz N, Bosch FX, de SS, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 518-27.
10. **duport, N.** *données épidémiologiques sur le cancer du col de l'utérus: état des connaissances*. Alfortville : France repro Maison-Alfort, 2007. ISBN : 978-2-11-096474-8.
11. **IARC.** *Cervix cancer screening*. lyon : IARC handbooks of cancer, 2005.
12. **HAS.** *Conditions pré-analytiques de réalisation de la recherche du génome (ADN) des Papillomavirus Humains (HPV) oncogènes à partir de frottis cervico-utérins*. Saint-Denis La Plaine Cedex : Service documentation – Information des publics , oct 2013. N° ISBN : 978-2-11-138061-5 .
13. **Bergeron, C.** HPV et cancer: classifications des lésions. *revue francophone des labo*. 2008; 405: 43-50.
14. **Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, et al.** Type dependant integration frequency of human papillomavirus genome in cervical lesions. *Cancer Res*. 2008; 68: 307-13.
15. **Muszinski C, Pannier C, Gondry J.** Le génotypage, à quoi cela sert vraiment? CNGOF. *Extrait des mises à jour en gynécologie médicale*. Paris : s.n., 2010.
16. **institut, Pasteur.** *techniques pour la détection et le génotypage des HPV*. s.l. : CNR HPV, 2012.
17. **ANAES.** Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal:actualisation 2002, recommandations. *has-santé*. [Online] 2002. [Cited: decembre 10, 2013.] http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/frottis_final_-_recommandations.pdf.

18. **Richart, RM.** clinical history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol.* 1967; 10: 748-84.
19. **Buckley CH, Butler EB, Fox H.** cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol.* 1982; 35: 1-13.
20. **Richart, RM.** A modified terminology for Cervical intraepithelial neoplasia. *clin obstet gynecol.* 1990; 75: 131-3.
21. **Wright Jr TC, Stewart Massad L, Dunton CJ, Spitzer M et al. for the 2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology–sponsored Consensus Conference.** 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *AJOG.* 2007; 340-345.
22. **Carcopino X, muszynski C, Mergui JL, gondry J, Boubli L.** La CIN2 mérite t-elle la même prise en charge que la CIN3? *Gynecol Obstet Fertil.* 2011; 39: 94-99.
23. **Milicić-Juhas V, Pajtler M.** Is the HSIL subclassification cytologically real and clinically justified? *Coll Antropol.* 2010; 34(2): 395-400.
24. **Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R.** Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta analysis. *Obstet gynecol.* 1998; 91(4): 626-31.
25. **Kyrgiou M, Tsoumpou I, Vrekoussis T.** The up-to-date evidence on colposcopy practice and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: the Cochrane colposcopy and Cervical cytopathology collaborative group (C5 group) approach. *Cancer Treat Rev.* 2006; 32(7): 516-23.
26. **Robertson AJ1, Anderson JM, Beck JS, Burnett RA, Howatson SR,.** Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J Clin Pathol .* 1989; 42(3): 231-8.
27. **Carreon JD, Sherman ME, Guillen D, Solomon D, Herrero R et Al.** CIN2 is a much less reproducible and less valid diagnosis than CIN3: results from a histologicalreview of population-based cervical samples. *Int J gynecol pathol.* 2007; 26(4): 441-6.
28. **Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL.** Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* suppl 3, 2006; S3: 42-51.
29. **Ostör, AG.** natural history of CIN: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* Raven Press Ltd., 1993;12: 186-192.
30. **Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maed H, Yasugi T,.** Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2011; 128: 2898-2910.
31. **Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D and Al. and Workshop, Bethesda 2001.** The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287(16): 2114-9.
32. **Fuchs K, Weitzen S, Wu L, Phipps MG, Boardman LA.** management of Cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescent and young women. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007; 20: 269-274.
33. **Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A et al.** Rate of and risk for regression of CIN2 in adolescent and young women. *Obstet Gynecol.* 2010; 116(6): 1373-1380.
34. **Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D.** Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2009; 113(1): 18-25.
35. **Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE.** P16INK4a induces an age dependent decline in islet regenerative potential . *Nature.* 2006; 443(7110): 453-7.

36. **bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T et al.** Conjunctive P16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2010 mar; 133(3): 395-406.
37. **Dalla palma P, Giorgi Rossi P, Collina G, Buccoliero AM, Ghiringhello B et al. and Group, NTCC Pathology.** The reproducibility of CIN diagnoses among different pathologists: data from histology reviews from a multicenter randomized study. *Am J Clin Pathol.* 2009, Vol. 132(1), 125-32.
38. **Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Ridder R.** Improving diagnosis accuracy and interobserver agreement for CIN2+ through the conjunctive use of p16 immuno- histochemistry on cervical biopsies. *Mod Pathol.* 2008, Vol. 21(suppl 1), 198A.
39. *De la néoplasie à la micro invasion.* **Henno, S.** Lyon : Multi's - Lyon/ La-Tour-de-Salvagny, 2012. ISSN 0989-8921.
40. **Mergui JL, Carcopino X, Marchetta J, Gondry J, Boubli L.** Repenser la prise en charge des néoplasies cervicales intra épithéliales: proposition d'une méthode d'évaluation du risque et d'aide à la décision thérapeutique. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2010; 39: 520-528.
41. **Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hisch, Prendiville W, Paraskevaidis E.** Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta analysis. *Lancet.* 2006; 367(9509): 489-98.
42. **Baldauf JJ, Baulon E, Thomas V, Woronoff AS, Akladios CY,.** Obstetric outcomes following loop excision. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2013 oct; 42(6): 534-40.
43. **Prézet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, et al.** Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer.* 2008; 122: 428-32.
44. **Prézet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B et al.** Human Papillomavirus genotype distribution in high grade squamous intraepithelial lesions (CIN2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer.* 2008; 122: 424-7.
45. **Prézet JL, Jacquard AC, Saunier M, Clavel C, Dachez R, Gondry J et al.** Human papillomavirus genotype distribution in low grade squamous intraepithelial lesion in France and comparison with CIN2/3 and invasive cervical cancer: the EDITH III study. *Gynecol Oncol.* 2008;110: 179-84.
46. **Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S.** Comparison of HPV type distribution in high grade squamous intraepithelial lesions and cervical cancer: a meta analysis. *Br J Cancer.* 2003; 89: 101-5.
47. **Coutlée F, Ratnam S, Ramanakuman AV, Insinga RR, Bentley J et al.** Distribution of human papillomavirus genotype in CIN and invasive cancer in Canada. *J Med Virol.* 2011; 83: 1034-1041.
48. **Zuna RE, Richard AA, Moore WE, LU Y, Mattu R, Dunn T.** distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intra epithelial lesions based on morphology and HPV type. *Modern Pathol.* 2007; 20: 167-174.
49. **Darragh T, Colgar TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR et al for members of the LAST Project Work Groups.** The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch pathol lab Med.* 2012 oct; 136: 1266-1297.

50. **Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P.** P16 immunostaining in cytological and histological specimens from uterine cervix: a systematic review and meta analysis. *Cancer treat Rev.* 2009; 35(3): 210-20.
51. **klaes R, Friedrich T, Spitkowski D, Ridder R, Rudy W et al.** Overexpression of P16 as a marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int j cancer.* 2001; 92: 276-284.
52. **bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T et al.** P16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol .* 2010 Mar; 133(3): 395-406.
53. **Moore K, Cofer A, Elliot L, Lanneau G, Walker J et al.** adolescent cervical dysplasia: histologic evaluation, treatment and outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197: 141.e1-141.e6.
54. **Insiga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM.** A Systematic Review of the Prevalence and Attribution of Human Papillomavirus Types Among Cervical, Vaginal and Vulvar Precancers and Cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(7): 1611-1622.
55. **Nam KH, Kwon JY, Kim YH, Park W.** Pregnancy outcomes after cervical conization: risk factor for preterm delivery and the efficacy of prophylactic cerclage. *J Gynecol Oncol.* 2010 dec; 21(4): 225-9.
56. **Bevis KS, Biggio JR.** Cervical conization and the risk of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205(1): 19-27.
57. **Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F et al.** Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection . *Br J Cancer.* 2000 apr; 82(7): 1332-8.
58. **Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P et al.** Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case--control study. *Cancer Causes Control.* 2003 nov; 14(9): 805-14.
59. **Alain S, Hantz S, denis F.** Papillomavirus: les virus et la physiopathologie de l'infection. *Mt Ped.* 2010; 13(1): 5-19.
60. **Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM.** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007 aug; 121(3): 621-32.
61. **Ribeiro AA, Figueiredo Alves RR, Costa MC, Villa LL, Mauricette Derchain SF et al.** Association between human papillomavirus types and species groups and cervical neoplasia from a high risk area for cervical cancer, Goiânia, Brazil. *Int J Gynecol Pathol.* 2011 may; 30(3): 288-94.
62. **Sanchez-Lander J, Cortinas P, Loureiro CL, Pujol FH, Capote-Negrin L.** Human papillomavirus in invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 in Venezuela: a cross sectional study. *Cancer Epidemiol.* 2012 oct; 36(5): 284-7.
63. **Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM and al.** Differences in Human papillomavirus type distribution in high grade cervical intraepithelial neoplasia and in invasive cervical cancer in Europe. *Int j Cancer.* 2013 feb; 132(4): 854-67.
64. **Pista A, De oliveira CF, Lopes C, Cunha MJ, CLEOPATRE Portugal Study Group.** Human papillomavirus type distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and cervical cancer in portugal: a CLEOPATRE II study . *Int J Gynecol Cancer.* 2013 mars; 23(3): 500-6.

65. **Mc Donald AC, Tergas AL, Kuhn L, Denny L, Wright Jr TC.** Distribution of Human papillomavirus genotypes among HIV positive and HIV negative women in Cape Town, South Africa. *Front Oncol*. 2014 mars; Vol. 48.
66. **Safaeian M, Schiffman M, Gage J, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE.** Detection of precancerous cervical lesions is differential by human papillomavirus type. *Cancer Res*. . 2009 Apr; 69(8): 3262-6.
67. **Cox JT, Castle PE, Behrens CM, Sharma A, Wright TC Jr.** Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study. *Am J Obstet Gynecol*. 2013 Mar; 208(3): 184.e1-184.e11.
68. **Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, Yamane T et al.** Estimation of prognose of cervical intraepithelial neoplasia 2 by P16INK4a immunoexpression and high risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol* . 2007; 128: 208-217.
69. **Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Stoler M, Von Knebel Doeberitz M.** The clinical impact of using P16INK4a immunochemistry in cervical hitopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J cancer*. 2014 apr, doi: 10.1002/ijc.28900.
70. **Bogaert, LJ Van.** P16INK4a immunocytochemistry and immunohitochemistry: need for scoring uniformization to be clinically useful in gynecological pathology. *Ann Diagn Pathol*. 2012 oct;16(5): 422-6.
71. **Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R and Group, European CINtec Cytology Study.** P16/KI67 dual stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology:results from the european equivocal or midly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol*. 2011 jun; 119(3): 158-66.
72. **bergeron.** Pourquoi et quand demander la détection de la protéine P16? *Extraits des mises à jour en gynécologie médicale*. [Online] décembre 9, 2009. [Cited: décembre 10, 2013.] cngof.asso.fr.
73. **Monsenego, J.** *Traité des infections et pahologies génitales à papillomavirus (HPV)*. Paris : Springer, 2007. EAN13 : 9782287720642.
74. **RM, Richart.** *cervical intraepithelial neoplasia: a review*. New York Appleton century crofts : Pahology Annual, 1973. 301-328.
75. **Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST.** Comparison of Human papillomavirus genotypes in high grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence for differences in biologic potential of precursor lesions. *Mod Pathol*. 2004;17: 1314-1322.
76. **QIAGEN.** *QIAGEN A*. [Online] juin 2009. [Cited: Août 31, 2014.] <http://www.hpv-test.fr/>. 1057665.

Annexe 1

Pathologies associées aux papillomavirus humains, lien avec le génotype, d'après Alain S et Al

Lésions	HPV
Verrues palmoplantaires	1
Verrues vulgaires	2 (26, 27, 65, 78)
Verrues planes	3, 10 (27, 28, 49)
Verrues des bouchers	7
Condylomes accuminés	6, 11 (70, 83)
Papulomatose bowénoïde	16
CIN, Cancers du col, cancers anogénitaux	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 52, 58, 66, 69 (30, 34, 40, 42, 43, 44, 53-57, 59, 61, 62, 64, 67, 68, 71-74, 82)
Papillomatose orale	6, 11
Hyperplasie épithéliale focale orale	13, 32
Papillomatose laryngée récurrente	6, 11
carcinome cutanée à cellules squameuses	41, 48 (29)
carcinome laryngée	16, 18
carcinome verruqueux	16, 6, 11
Epidermoplasie verruciforme (EV)	3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21-25, 36, 46, 47, 50 (37, 38)
Cancers associés à EV	5, 8
Verrues vulgaires chez les immunodéprimés, Kystes épidermiques	types de l'EV et 75, 76, 77, 60
Verrues de myrmécia	63

Annexe 2

Classification de Papanicolaou

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

- I : pas de cellules anormales
- II : cytologie atypique sans signe évident de malignité

- III : cytologie suggestive mais non conclusive
- IV : cytologie très suggestive
- V : cytologie conclusive

Annexe 3

Classification OMS des dysplasies cervicales

Première classification histologique, en 5 entrées :

- B- Condylome sans dysplasie
- C- Dysplasie légère
- D- Dysplasie modérée
- E- Dysplasie sévère
- F- Carcinome in situ

Annexe 4

Système Bethesda modifié en 2001(d'après l'IARC)

Commentaire :

Par rapport à la classification Bethesda 1991, sont introduits :

- o Le type de prélèvement,
- o la notion d'examen automatisé
- o et la réalisation des techniques complémentaires (test HPV).

La catégorie "diagnostic descriptif" devient "interprétation/résultats".

TYPE DE PRELEVEMENT

Préciser :

- frottis conventionnel (FC) ou
- préparation en milieu liquide (FML?) ou
- autre méthode

Commentaire :

La diffusion des techniques de préparation (ou frottis) en milieu liquide (en suspension) justifie que cette information soit présente dans le compte-rendu.

QUALITE DU PRELEVEMENT

Satisfaisant

- (décrire la présence ou l'absence d'éléments de la zone de transformation ou glandulaires endocervicaux et de tout autre indicateur de qualité, tels que la présence de sang ou d'inflammation masquant partiellement les cellules, etc.)

Non satisfaisant (préciser la raison)

- Echantillon rejeté, non technique (préciser la raison)
- Echantillon technique et interprété, mais insuffisant pour une évaluation des anomalies épithéliales, à cause de (préciser la raison)

Commentaire :

Par rapport à la classification Bethesda 1991, la catégorie «Satisfaisant mais limité par...» disparaît. De plus, et par définition, tout prélèvement comportant des cellules anormales (de type ASC-US ou AGC ou plus grave), est considéré comme satisfaisant. Les critères de cellularité ont été précisés. Si plus de 75% des cellules sont masquées par le sang ou l'inflammation, le prélèvement est non satisfaisant.

CLASSIFICATION GENERALE (optionnel)

Absence de lésion intraépithéliale ou de malignité
Autres :

- voir Interprétation/Résultats (par exemple: présence de cellules endométriales chez une femme de 40 ans ou plus)

Présence d'anomalies des cellules épithéliales :

- voir Interprétation/Résultats
- préciser malpighien ou glandulaire

Commentaire :

L'expression «diagnostic général» de 1991, devient «classification générale». Elle est optionnelle pour le compte-rendu.

INTERPRETATION/RESULTATS

Absence de lésion intraépithéliale ou de malignité

- o la présence de micro-organismes :
- o la présence d'autres modifications non néoplasiques :

Autres (liste non limitative)

- o Cellules endométriales chez une femme âgée de 40 ans ou plus

Anomalies des cellules épithéliales

- o cellules malpigiennes
- o cellules glandulaires

Autres lésions malignes : (préciser)

Commentaire :

La catégorie «modifications cellulaires bénignes» de 1991 qui était individualisée rejoint la catégorie «Absence de lésion intraépithéliale ou de malignité».

INTERPRETATION/RESULTATS (2)

Absence de lésion intraépithéliale ou de malignité

En l'absence de lésion intraépithéliale ou de malignité il convient de le rapporter dans la section "classification générale" ci-dessous et/ou dans la présente section "Interprétation/Résultats".

S'il y a lieu, préciser:

- o la présence de micro-organismes :
 1. *Trichomonas vaginalis*;
 2. éléments mycéliens, par exemple évoquant le *Candida*;
 3. anomalies de la flore vaginale évoquant une vaginose bactérienne;
 4. bactéries de type Actinomyces;
 5. modifications cellulaires évoquant un *Herpès simplex*;
- o la présence d'autres modifications non néoplasiques :
 1. modifications réactionnelles :
 1. inflammation,
 2. irradiation,
 3. ou présence d'un dispositif intra-utérin;
 2. présence de cellules glandulaires bénignes post hystérectomie;
 3. atrophie.

Autres (liste non limitative)

- o Cellules endométriales chez une femme âgée de 40 ans ou plus (préciser l'absence de lésion intraépithéliale ou de malignité)

Commentaire :

Les «modifications cellulaires bénignes» de TBS 1991 entrent dans la catégorie «absence de lésion intraépithéliale ou de malignité». En présence de cellules endométriales chez une femme après 40 ans il convient de préciser l'absence de lésions intraépithéliales ou de malignité.

INTERPRETATION/RESULTATS (3)

Anomalies des cellules malpighiennes

- **Atypies des cellules malpighiennes (ASC)**
 1. De signification indéterminée (ASC-US)
 2. Ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intraépithéliale de haut grade (ASC-H)
- **Lésions malpighiennes intraépithéliales de bas grade (LSIL – LMIEBG)**
 1. (regroupant les lésions autrefois dénommées : lésions à HPV/condylome, dysplasie légère, CIN1)
- **Lésions malpighiennes intraépithéliales de haut grade (HSIL – LMIEHG)**
 1. (regroupant les lésions autrefois dénommées : dysplasies modérées et sévères, CIN2, CIN3 et CIS)
 2. le cas échéant, présence d'éléments faisant suspecter un processus invasif (sans autre précision)
- **Le carcinome malpighien**

Commentaire :

La modification la plus importante est dans la catégorie des ASC avec une définition plus précise des critères, la disparition des «ASCUS probablement réactionnels» et l'individualisation des ASC-H. Ne pas oublier que cette catégorie des ASC-H correspond à l'interprétation d'un prélèvement et non d'une seule cellule.

INTERPRETATION/RESULTATS (4)

Anomalies des cellules glandulaires

- **Atypies des cellules glandulaires(AGC) :**
 1. endocervicales (sans autre indication (SAI) ou commenter),
 2. endométriales (SAI ou commenter) ou
 3. sans autre indication
- **Atypies des cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie :**
 1. endocervicales ou
 2. sans autre indication
- **Adénocarcinome endocervical in situ (AIS).**
- **Adénocarcinome**
 1. endocervical
 2. endométrial
 3. extra-utérin
 4. SAI

Commentaire :

L'individualisation de l'adénocarcinome in situ endocervical du fait de critères cytologiques bien définis et la disparition des AGC de signification indéterminée (AGUS) sont les principales modifications.

INTERPRETATION/RESULTATS (5)

Autres lésions malignes : (préciser)

Commentaire :

Outre les formes communes de carcinome malpighien et d'adénocarcinome endocervical il existe des tumeurs primitives du col rares ainsi que des tumeurs secondaires et métastatiques.

TECHNIQUES COMPLEMENTAIRES

Préciser si la recherche des HPV a été réalisée.

Commentaire :

Il convient de préciser la méthode utilisée pour le test HPV (PCR ou capture d'hybrides). Dans la mesure du possible il est préférable d'intégrer ces résultats au compte-rendu.

EXAMEN AUTOMATISE

Préciser si l'examen est automatisé, avec quel système et donner les résultats.

Commentaire :

Préciser le système utilisé, si l'analyse s'est déroulée correctement et si cette analyse s'est accompagnée d'une relecture des lames.

NOTES ET RECOMMANDATIONS (optionnel)

Concises, formulées en terme de suggestions et si possible accompagnées de références.

Commentaire :

Ces références proviendront des conférences de consensus et/ou de recommandations émanant des sociétés savantes ou d'organismes officiels (par exemple ANAES en France). Ces notes pourront par exemple: préciser les modalités de répétition ou prélèvement si celui-ci n'était pas satisfaisant, individualiser les patientes nécessitant un suivi particulier ainsi que les investigations souhaitées.

Index colposcopique de Reid(ICR)

Tente de prédire la sévérité des lésions observées en colposcopie

Signes colposcopiques	0 point	1 point	2 points
Couleur	Blanchiment acidophile de faible intensité (pas complètement opaque) ; blanchiment acidophile indistinct ; blanchiment acidophile transparent ou translucide Blanchiment acidophile au-delà des limites de la zone de remaniementCouleur d'un blanc neigeux avec une surface très brillante (rare)	Couleur intermédiaire blanc/gris et surface brillante (la plupart des lésions entrent dans cette catégorie)	Terne, opaque, blanc d'huître ; gris
Marge de la lésion et configuration de surface	Contour microcondylomateux ou micropapillaire ¹ Lésions planes aux marges indistinctes Marges duveteuses ou délicatement festonnées Lésions anguleuses, déchiquetées ³ Lésions satellites au-delà des limites de la zone de remaniement	Lésions symétriques de forme régulière, aux contours lisses et francs	Bords enroulés desquamants ² Démarcations internes entre des régions d'aspect colposcopique différent— une région centrale de modification de haut grade et une région périphérique de modification de bas grade
Vaisseaux	Vaisseaux de calibre fin et uniforme ⁴ - proches les uns des autres et uniformément distribués Ponctuation et/ou mosaïque fines peu définies Vaisseaux au-delà des limites de la zone de remaniement Vaisseaux fins à l'intérieur des lésions microcondylomateuses ou micropapillaires ⁶	Absence de vaisseaux	Ponctuation ou mosaïque large et bien définies, très précisément délimitées ⁵ – et largement dispersées de façon aléatoire
Imprégnation à l'iode	Imprégnation positive à l'iode donnant une couleur brun acajou Imprégnation négative d'une lésion insignifiante, c'est à dire, coloration jaune d'une lésion totalisant ³ points ou moins dans les trois critères ci-dessus Régions au-delà de la zone de remaniement, qui attirent l'attention à la colposcopie, manifestement iodo-négatives (de telles régions sont souvent le résultat d'une parakératose) ⁷	Imprégnation partielle à l'iode – Aspect tacheté, versicolore (couleur changeante)	Imprégnation négative à l'iode des lésions importantes, c'est à dire, coloration jaune d'une lésion totalisant déjà 4 points ou plus dans les trois critères ci-dessus

* Classification colposcopique réalisée avec une solution d'acide acétique à 5% et le soluté de Lugol. (Voir Annexe 3 pour la préparation de ces solutions)

¹ Une surface microexophytique évocatrice d'un cancer colposcopiquement déclaré n'est pas pris en compte dans ce tableau.

² Les bords épithéliaux ont tendance à se détacher du stroma sous-jacent et à se retourner sur eux-mêmes.

Noter : Les lésions bas grade frappantes sont souvent surinterprétées, alors que de discrètes LIEHG non vascularisées peuvent facilement passer inaperçues.

³ Score 0 même si une partie de la limite périphérique n'est pas déchiquetée (ligne franche).

⁴ De temps en temps, des motifs en mosaïque contenant des vaisseaux centraux sont caractéristiques d'anomalies histologiques de bas grade. Ces motifs capillaires associés aux lésions de bas grade sont parfois assez marqués. A moins que le praticien ne soit capable de faire la différence entre les motifs vasculaires fins et les motifs vasculaires larges, il est de règle de surestimer la gravité du diagnostique.

⁵ Les vaisseaux arborescents atypiques, évocateurs d'un cancer colposcopiquement déclaré, ne sont pas pris en compte dans ce tableau.

⁶ En général, plus la lésion est condylomateuse (papillaire), plus le score est bas. Cependant, bien que ce soit rare, un cancer peut également se présenter sous l'aspect d'un condylome micropapillaire.

⁷ Parakératose : Zone superficielle de cellules cornées ayant conservé leur noyau.

Prédiction colposcopique du diagnostic histologique en utilisant l'Index Colposcopique de Reid (ICR)

ICR (score total)	Histologie
0 - 2	Probablement une CIN 1
3 - 4	Lésion intermédiaire : Probablement une CIN 1 ou CIN 2
5 - 8	Probablement une CIN 2-3

Différentes méthodes d'interprétation de l'immunomarquage P16

Two-, 3, and 4-tier p16 scoring systems

2-tier scoring systems:

- Keating et al and Mulvany et al : strong and focal or diffuse = positive
- Riethdorf et al and Kong et al
 1. Focal and strong = equivocal
 2. Diffuse and strong = positive
- Dray et al, Yildiz et al, and Ozgul et al
 1. Strong and full thickness = positive
 2. Weak and basal = negative
- Bergeron et al: continuous staining of lower one or two-thirds or full thickness = positive

3-tier scoring systems:

- Redman et al
 1. Negative (0%-5% of stained cells)
 2. Focal or scattered staining of >5% to ≤80%
 3. Diffuse staining of >80%
- Murphy et al and Qiao et al score
 1. 1%-9% staining
 2. 10%-49%
 3. >50%
- Zielinski et al score
 1. Strong/diffuse
 2. Heterogeneous
 3. Occasional (negative)

4-tier scoring systems:

- Klaes et al
 1. <1%
 2. Sporadic <5%
 3. Focal: small clusters involving <25% of an area
 4. Diffuse >25%

« Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me le demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque. »