

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

DEFFAR Khalissa

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : BIOLOGIE

Spécialité : BIOCHIMIE

THÈME

**Marqueurs moléculaires et immunologiques du cancer du col de
l'utérus**

Soutenue publiquement le 30/04/2019

DEVANT LE JURY

Président

Hamdi Cherif Mokhtar

Pr. UFA Sétif 1

Directeur

Mahnane Abbes

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs

Belaaloui Ghania

Pr. Univ Batna 2

Houali Karim

Pr. Univ Tizi Ouzou

Alloui Ahmed Souhayel

MCA. Univ Constantine 3

Khenchouche Abdelhalim

MCA. UFA Sétif 1

DÉDICACE

À la mémoire de mon Père lhaj Ramdane

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour éternel, mon estime et mon respect que j'ai toujours eu pour vous.

Ce travail est le fruit de plusieurs sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

’رحمك الله يا والدي و أسكنك الفردوس الأعلى من الجنة، ستبقى في الوجدان’

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, Tout-puissant de m'avoir donné la force et la patience pour dépasser toutes les difficultés.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse, Pr. Mahnane Abbes pour son encadrement, pour les conseils qu'il m'a prodigués, pour son suivi et pour sa patience. Merci pour m'avoir appris à réfléchir, à persévérer et aussi à me mettre en question. Merci de m'avoir accordé votre confiance pendant ces années.

J'exprime ma reconnaissance à tous les membres de mon jury de thèse d'avoir bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail. Je remercie Mr. Hamdi Cherif Mokhtar, Professeur à l'université de Sétif 1, d'avoir accepté de présider le jury. Merci pour toutes les documentations sur le cancer que vous m'aviez permis de consulter.

Je remercie également les examinateurs M^{me} Belaaloui Ghania, Professeur à l'université de Batna 2 ; Mr Houali Karim, Professeur à l'université de Tizi Ouzou ; Mr Alloui Ahmed Souhayel, Maître de conférences classe A à l'université de Constantine 3 ; et Mr Khenchouche Abdelhalim, Maître de conférences classe A à l'université de Sétif 1, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr. Abdelouche Djamel de m'avoir accueilli au sein du service d'anatomo-pathologie CHU de Sétif et tous les membres de son laboratoire.

Mes vifs remerciements au Dr. Ouhida Soraya qui était le point de départ de mes expériences ; le support de mon travail ; merci pour votre disponibilité et pour votre coup de main à chaque besoin. Je n'oublie pas Dr. Taibi Sihem pour la collection des blocs du service d'anatomo-pathologie de l'hôpital de Bordj Bou Arreridj.

Je remercie Pr. Xie Xing de m'avoir accueilli au sein du laboratoire Women's Reproductive Health Laboratory of Zhejiang province, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, China, pour la réalisation de quelques expériences au niveau de son laboratoire et au niveau du service de Pathologie, sans oublier tous les membres de ce service, Dr. Lu Bingjian, Dr. Zhou Chaiyun, Mr. Chen Jianhua et Dr Li Ying.

Mes remerciements sont destinés à mes collègues et surtout amies pour leur aide et support.

Je souhaite remercier tout particulièrement ma chère mère, mes sœurs et mes frères qui m'ont toujours soutenu tout au long de mon parcours d'études. Grâce à vous j'ai pu obtenir ce fruit.

Mes remerciements à mon mari Said pour son support, son aide, sa grande patience avec moi pour finaliser ce travail.

Je remercie mon université pour le stage et la compagnie d'Air Algérie pour le billet de faveur et ses services durant tous mes voyages pour faire des stages en Chine. Je remercie également la bibliothèque de l'Etudiant pour ses services.

Enfin, merci à mes enfants : Mohamed Elamine et Abderrahmane. Leurs sourires sont gratuits mais n'ont pas de prix.

Merci à tous

RÉSUMÉS

ملخص

ينتقل داء سرطان عنق الرحم عن طريق العلاقات الجنسية، يسببه أساسا الفيروس الحليمي البشري (HPV) بالإضافة إلى عوامل أخرى ضرورية لظهور هذا النوع من السرطان. يعتمد الكشف المبكر عن المراحل ما قبل سرطانية بشكل أساسي على اختبار مسحة عنق الرحم والذي يبقى الخيار الأفضل لمكافحة هذا المرض، لكنه يفتقد للنوعية. لهذا الغرض، بُذلت العديد من الجهود لتطوير مؤشرات حيوية جديدة في مجال كشف وتشخيص سرطان عنق الرحم. تم في هذه الدراسة إحصاء 16461 مسحة عنق رحم أُجريت خلال الفترة الممتدة من 2013 إلى غاية 2017، على مستوى ولاية سطيف. أكثر من 90٪ من المسحات كانت ذات نوعية جيدة. شكلت فئة النساء اللاتي تتراوح أعمارهن بين 40 و45 سنة الفئة الأكثر فحصا. لتحديد مؤشرات هذا السرطان مخبريا، استخدمنا اختبارات تعتمد على التقنية المناعية-النسجية-الكيميائية، من خلالها قيما معدل التعبير عن البروتينات Bcl-2 و p53 في سرطان الخلايا الظهارية وسرطان الغدد لعنق الرحم. تبين من خلال النتائج أن حوالي 61,04٪ من الحالات لديها تعبير إيجابي عن البروتين Bcl-2، بينما 24,68٪ فقط من هذه الحالات المدروسة لديها تعبير إيجابي عن البروتين p53 في سرطان الخلايا الظهارية. أما فيما يخص سرطان الغدد فكان التعبير الإيجابي عن كل من Bcl-2 و p53 ضعيفا. التعبير عن هذين البروتينين في سرطان الخلايا الظهارية ليس لديه أي ارتباط معنوي ($p < 0.05$). كما قيما أيضا معدل التعبير عن البروتينات p16 ؛ Ki-67 ؛ MCM2 و TOP2A في مراحل مختلفة من سرطان عنق الرحم. كما تم تحديد أنواع الفيروس الحليمي البشري المنتشرة في منطقتنا. أظهرت النتائج أن المعدل الإيجابي للتعبير عن البروتينات p16 ؛ Ki-67 و MCM2 كان عاليا في المراحل المتقدمة من سرطان عنق الرحم. كما أن هذا التعبير لديه ارتباط معنوي بعدوى الفيروس الحليمي البشري عالي الخطورة ($p > 0.05$). كخلاصة، النتائج المُتحصل عليها من خلال هذه الدراسة تُبين أن البروتين Bcl-2 يُمكن أن يشكل مؤشرا حيويا للكشف عن سرطان الخلايا الظهارية و أن البروتينات p16 ؛ Ki-67 ؛ MCM2 يُمكن أن تشكل مؤشرات حيوية للكشف عن المراحل المتقدمة من سرطان عنق الرحم.

الكلمات المفتاحية: سرطان عنق الرحم، كشف المبكر، مسحة عنق الرحم، مؤشر حيوي، التقنية المناعية-النسجية-الكيميائية، الفيروس الحليمي البشري.

Résumé

Le cancer du col de l'utérus est causé principalement par une infection sexuellement transmissible dont l'origine est le papillomavirus humain (HPV) mais d'autres facteurs sont nécessaires à l'apparition de ce type de cancer. Le dépistage précoce des lésions précancéreuses repose principalement sur le frottis cervico-utérin (FCU) qui reste la meilleure option pour lutter contre cette maladie, mais ce test manque de sensibilité. À cet effet, beaucoup d'efforts ont été déployés pour déterminer de nouveaux biomarqueurs dans le domaine de détection et du diagnostic du cancer du col de l'utérus. Dans la présente étude, et durant la période 2013-2017, un nombre de 16461 FCU a été réalisé au niveau de la wilaya de Sétif. Plus de 90% des frottis étaient de bonne qualité. Les femmes âgées entre 40-45 ans étaient les plus dépistées. Des tests d'immunohistochimie ont été utilisés au laboratoire afin de détecter des marqueurs de ce cancer. Les taux d'expression des protéines Bcl-2 et p53 dans le carcinome épidermoïde (CÉ) et l'adénocarcinome (ADC) du col de l'utérus ont été évalués. Les résultats montrent que environ 61,04% des cas ont montré une expression positive de Bcl-2, alors que seulement 24,68% des cas ont montré une expression positive de p53 dans le CÉ. L'expression positive de Bcl-2 et p53 était faible dans les ADC. L'expression de ces deux protéines n'a pas été significative dans les cas du CÉ ($p > 0.05$). De même, le taux d'expression des protéines p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A dans des différents stades du cancer du col de l'utérus a aussi été évalué. D'autre part, le test HPV a été utilisé pour identifier les types d'HPV circulants dans notre région. Les résultats montrent que le taux positif de l'expression des protéines p16 ; Ki-67 et MCM2 est élevé dans les stades avancés. Cette expression a une corrélation avec l'infection par les virus HPV à haut risque ($p < 0.05$). En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la protéine Bcl-2 pourrait être considérée comme un biomarqueur de détection pour les CÉ et que les protéines p16 ; Ki-67 et MCM2 pourraient être considérées comme des biomarqueurs de détection des stades avancés du cancer du col de l'utérus.

Mots clés : Cancer du col de l'utérus, Dépistage précoce, Frottis Cervico-Utérin, Biomarqueur, Immunohistochimie, Papillomavirus humain.

Abstract

Cervical cancer is caused mainly by a sexual transmitted infection whose origin is human papillomavirus (HPV) but other factors are necessary for the appearance of this kind of cancer. Early screening of precancerous lesions remains the best option for fighting against this disease. This screening relies primarily on Pap smear test, but it has a weak sensitivity. For this purpose, much efforts have been expended to develop new biomarkers in the field of detection and diagnosis of cervical cancer. In this present study, during the 2013-2017 period, 16461 cervical smears were performed in the wilaya of Sétif. More than 90% of smears are of a good quality. Women aged between 40-45 years are the most screened. In the laboratory, we have used tests based on immunohistochemistry to detect biomarkers of this cancer. We have evaluated Bcl-2 and p53 expression levels in squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (ADC) of the cervix. The results show that about 61,04% of cases were Bcl-2 positive expressed, while only 24,68% of these cases had p53 positive expression in SCC. The Bcl-2 and p53 expression was weak in ADC. The expression of these two proteins was not significant ($p > 0.05$) in SCC. The expression level of p16 ; Ki-67 ; MCM2 and TOP2A proteins was also evaluated at different stages of cervical cancer. We also looked for types of HPV circulating in our region. The results show that the positive expression of p16 ; Ki-67 and MCM2 is high in the advanced stages of cervical cancer. This expression is correlated with HPV-HR infection ($p < 0.05$). As conclusion, the results obtained in this study show that the Bcl-2 protein may be considered as a detection biomarker for the SCC and that p16 ; Ki-67 and MCM2 proteins may be considered as biomarkers for the detection of advanced stages of cervical cancer.

Keywords: Cancer of the uterine cervix, Screening, Pap smear test, Biomarker, Immunohistochemistry, Human papillomavirus.

Adresse de l'auteur : Département de Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif-1.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.

ADC : Adénocarcinome

AGC: Atypical Glandular Cells

AIF : Apoptosis Inducing Factor

AIS : Adenocarcinoma *In Situ*

APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand

ASC-H : Atypical Squamous Cells can not exclude high grade squamous intraepithelial lesion

ASC-US : Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance

B.

Bad : Bcl-2 Antagonist of cell Death

BAFF : B cell-Activating Factor of the TNF Family

Bak : Bcl-2 Antagonist Killer

Bax : Bcl-2 Associated X protein

Bcl-2 : B Cell Lymphoma 2

Bcl-w : Bcl-2-like 2 protein

Bcl-XL : Bcl-2-related protein long form of Bcl-x

BH : Bcl-2 Homology

Bid : BH3-Interacting Death domain agonist

Bim : BH3-Interacting protein

BSA : Bovine Serum Albumin

C.

CAK : CDK Activating Kinase

CD44 : Cluster of Differentiation 44

CDI : Cyclin-Dependent kinase Inhibitor

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CEA : Carcinoma Embryonic Antigen

CÉ : Carcinome Épidermoïde

CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CIS : Carcinome *In Situ*

CYFRA : Cytokeratin Fragment

D.

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

DD : Death Domain

E.

E : Early

E6AP : E6 associated protein

EBV : Epstein-Barr Virus

EPSP : Établissement Public de Santé de Proximité

ER : Estrogen Receptor

F.

FasL : Fatty Acid Synthas Ligand

FCU : Frottis Cervico-Utérin

FIGO : Fédération internationale de la gynécologie et l'obstétrique

FNUAP : Fonds des Nations Unies pour la Population

G.

G : Gap

H.

HAS : Haute Autorité de Santé

HE : Hématoxyline Éosine

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HPV : Human Papillomavirus

HPV-BR : HPV à Bas Risque

HPV-HR : HPV à Haut Risque

HRP : Horseradish Peroxidase

HSIL : High grad Squamous Intraepithelial Lesion

HSV-2 : *Herpes simplex* virus-2

I.

IC : Intervalle de Confiance

IHC : Immunohistochimie

INSP : Institut National de Santé Publique

IP3R : Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor

K.

kDa : kilo Dalton

L.

L : Late

LCR : Long Control Region

LIGHT : Lymphotoxin-like Inducible protein that competes with Glycoprotein D for Herpes virus entry mediator on T cell

LSIL : Low grad Squamous Intraepithelial Lesion

M.

MBR : Membrane-Bound Region

Mcl-1 : Myeloid Cell Leukemia-1

MCM : MiniChromosome Maintenance protein complex

mdm2 : Mouse Double Minute 2 homolog

N.

Noxa : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

O.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P.

p16^{INK4a} : Protéine p16

p53 : Protéine p53

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PR : Progesterone Receptor

pRb : Retinoblastoma protein

R.

RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand

S.

Se : Sensibilité

SCC : Squamous Cell Carcinoma

SCC-Ag : Squamous Cell Carcinoma Antigen

sCD44 : Soluble CD44

SD : Standard Deviation

SIL : Squamous Intraepithelial Lesion

Sp : Spécificité

SV40 : Virus Simien 40

T.

TBS : Tris Buffered Saline

Ter : Terminal

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TNF-like-1 : Tumor Necrosis Factor like weak inducer of apoptosis

TNM : Tumor Node Metastasis

TOP2A : Topoisomerase 2 alpha

TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

U.

URR : Upstream Regulatory Region

V.

VLP : Virus Like Particles

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

LISTE DES TRAVEAUX

- **DEFFAR KHALISSA**, KHENCHOUCHE ABDELHALIM, XING XIE, YING LI, OUHIDA SORAYA and MAHNANE ABBES. Immunohistochemical Expression of p53 and Bcl-2 in Algerian Cervical Carcinoma. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 11 (1) : 67-75, 2018.
- **K Deffar**, AH Khenchouche, Xie Xing, Bingjian Lu, Chaipun Zhou, Jianhua Chen, S Ouhida, D Abdelouche, S Taibi, M Hamdi Cherif, A Mahnane. La protéine p16 : un biomarqueur de pronostic du cancer du col de l'utérus. 1^{er} congrès international sur la prévention et le dépistage du cancer, Sétif 23 Juin 2018 (Communication affichée).

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Estimation de l'incidence et de la mortalité du cancer chez la femme dans le monde, en 2018.....	3
Figure 2 : Les cancers les plus fréquents chez la femme en Algérie de l'année 2012.....	4
Figure 3 : Estimation des taux de l'incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde, en 2018.....	6
Figure 4 : Estimation des taux de la mortalité par cancer du col de l'utérus dans le monde, en 2018.....	6
Figure 5 : Représentation de l'appareil génitale féminin interne et de la zone de transformation cervicale en vue frontale et endovaginale.....	9
Figure 6 : Structure de l'exocol normal, l'endocol normal et la zone de jonction.....	11
Figure 7 : Évolution des cancers invasifs du col de l'utérus dans le temps.....	13
Figure 8 : Stadification du cancer du col de l'utérus selon FIGO, tumeur primaire et métastase.....	17
Figure 9 : Représentation schématique du génome d'HPV 16.....	21
Figure 10 : Cycle infectieux de l'HPV.....	23
Figure 11 : Les effets des protéines virales E6 et E7 sur la prolifération cellulaire.....	26
Figure 12 : Les protéines CDK, cycline et CDI impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.....	30
Figure 13 : Les membres de la famille Bcl-2.....	34
Figure 14 : Fonctions de p53 et ses homologues p63 et p73et leurs gènes cibles.....	37
Figure 15 : Schématisation de l'organisation de p53.....	38
Figure 16 : La classification des biomarqueurs.....	39
Figure 17 : Un diagramme schématique des protéines cellulaires impliquées dans la transition G1-S et l'interférence des HPV oncogènes.....	43
Figure 18 : Résumé du travail réalisé.....	47
Figure 19 : Le principe de l'immunohistochimie indirect.....	53
Figure 20 : La membrane HybriMem utilisée dans l'hybridation.....	56
Figure 21 : Nombre des FCU réalisés en 2013-2017 à Sétif.....	60
Figure 22 : Répartition des frottis réalisés en 2013-2017 à Sétif selon la qualité.....	60
Figure 23 : Répartition des frottis FCU 1 et FCU 2+3.....	61

Figure 24 : Répartition des frottis FCU 1 selon les tranches d'âge.....	62
Figure 25 : Répartition des frottis FCU 2 et 3 selon les tranches d'âge.....	63
Figure 26 : Résultats des frottis.....	63
Figure 27 : Répartition des résultats des FCU en fonction des anomalies cellulaires.....	64
Figure 28 : Recommandation de laboratoires pour les années 2013-2017.....	65
Figure 29 : L'immunohistochimie de l'expression de la protéine Bcl-2.....	67-69
Figure 30 : L'immunohistochimie de l'expression de la protéine p53.....	71-72
Figure 31 : La relation entre le taux de l'expression de la protéine Bcl-2 et la protéine p53.....	73
Figure 32 : Coloration HE.....	73-75
Figure 33 : Le résultat de l'hybridation HPV.....	76
Figure 34 : La prévalence des types HPV dans les wilayas de Sétif et Bordj Bou Arreridj (2015-2017).....	76
Figure 35 : Expression de la protéine p16 dans les différents types de lésions du col de l'utérus.....	78
Figure 36 : Détection de l'expression de la protéine p16 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus.....	78-80
Figure 37 : Expression de la protéine Ki-67 dans les différents types de lésions du col de l'utérus.....	82
Figure 38 : Détection de la protéine Ki-67 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus.....	83-84
Figure 39 : Expression de la protéine MCM2 dans les différents types de lésions du col de l'utérus.....	87
Figure 40 : Détection de de la protéine MCM2 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus.....	88-89
Figure 41 : Expression de la protéine TOP2A dans les différents types de lésions du col de l'utérus.....	92
Figure 42 : Détection de de la protéine TOP2A2 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus.....	93-95
Figure 43 : Résultats de l'estimation par l'ImmunoRatio du marquage des protéines Ki-67 ; MCM2 et TOP2A dans le carcinome épidermoïde du col de l'utérus.....	96-97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différentes lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus.....	13
Tableau II : La classification de FIGO.....	18
Tableau III : Classification des HPV alpha basée sur le potentiel oncogène.....	22
Tableau IV : Marqueurs sériques utiles pour le cancer du col de l'utérus.....	41
Tableau V : Répartition des frottis cervico-utérins réalisés par année, à Sétif en 2013-2017.....	59
Tableau VI : Répartition des frottis FCU 1 selon les tranches d'âge.....	61
Tableau VII : Répartition des frottis FCU 2+3 selon les tranches d'âge.....	62
Tableau VIII : Résultats de l'expression de la protéine Bcl-2.....	66
Tableau IX : Taux d'expression de la protéine p53 dans les cas du carcinome épidermoïde et dans l'adénocarcinome.....	70
Tableau X : Résultats de l'expression de la protéine p16.....	77
Tableau XI : Résultats de l'expression de la protéine Ki-67.....	81
Tableau XII : Résultats de l'expression de la protéine MCM2.....	86
Tableau XIII : Résultats de l'expression de la protéine TOP2A.....	91
Tableau XIV : Valeurs de la Se ; la Sp ; la VPP et la VPN des marqueurs p16 ; Ki-67 ; MCM et TOP2A.....	98
Tableau XV : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine p16.....	98
Tableau XVI : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine Ki-67.....	99
Tableau XVII : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine MCM2.....	99
Tableau XVIII : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine TOP2A.....	99
Tableau XIX : Expression de la protéine p16 dans le cancer du col de l'utérus dans différentes études.....	111
Tableau XX : Expression de la protéine Ki-67 dans le cancer du col de l'utérus dans différentes études.....	115

Tableau XXI : Valeurs de la Se, la Sp, la VPP et la VPN de l'expression de p16 et Ki-67 dans les différentes études.....	116
Tableau XXII : Expression de la protéine MCM2 dans le cancer du col de l'utérus dans différentes études.....	118

SOMMAIRE

RÉSUMÉS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1. ÉPIDÉMIOLOGIE DU CANCER DU COL DE L'UTÉRUS

1.1. Incidence et mortalité du cancer du col de l'utérus	3
1.2. Tendances, survie et prévalence du cancer du col de l'utérus	5
1.3. Comparaison avec d'autres pays.....	5
1.4. Dépistage du cancer du col de l'utérus en Algérie	7

CHAPITRE 2. HISTOIRE NATURELLE DU CANCER DU COL DE L'UTÉRUS

2.1. Anatomie et physiologie du col de l'utérus	9
2.2. Histologie du col normal	10
2.3. États précancéreux du col de l'utérus	11
2.3.1. Différentes lésions précancéreuses	11
2.3.2. Types d'états précancéreux	12
2.3.2.1. Cellules malpighiennes anormales	12
2.3.2.2. Cellules glandulaires anormales.....	14
2.4. Tumeurs et lésions non cancéreuses du col de l'utérus	14
2.4.1. Polype cervical	14
2.4.2. Kyste de Naboth	14
2.4.3. Fibrome cervical	14
2.4.4. Cervicite	15
2.5. Tumeurs cancéreuses du col de l'utérus.....	15
2.5.1. Carcinome épidermoïde	15
2.5.2. Adénocarcinome	16
2.6. Tumeurs rares du col de l'utérus	16
2.7. Stadification de cancer du col de l'utérus.....	17

CHAPITRE 3. FACTEURS DE RISQUE, ONCOGENÈSE VIRALE ET IMUNITÉ DU CANCER DU COL DE L'UTÉRUS

3.1. Facteurs de risque d'une infection par l'HPV	19
3.2. Infection par le papillomavirus	20
3.2.1. Structure de la particule virale HPV	20
3.2.2. Tropisme des HPV et géotypes viraux.....	21
3.2.3. Cycle viral	22
3.2.3.1. Cycle viral lytique	22
3.2.3.2. Cycle viral intégratif.....	24
3.2.4. Oncogenèse virale.....	24
3.2.4.1. Intégration du génome	24
3.2.4.2. Rôle des oncoprotéines E6 et E7.....	25
3.2.4.2.1. Protéine E6	25
3.2.4.2.2. Protéine E7	25
3.2.5. Réponse immunitaire à l'infection par l'HPV.....	26
3.2.5.1. Réponse humorale	27
3.2.5.2. Réponse cellulaire	28

CHAPITRE 4. MARQUEURS MOLÉCULAIRES DE CANCER DU COL DE L'UTÉRUS

4.1. Régulation du cycle cellulaire et apoptose	29
4.1.1. Régulation du cycle cellulaire et perturbation tumorale	29
4.1.2. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	31
4.1.3. L'apoptose.....	31
4.1.3.1. Acteurs moléculaires de l'apoptose.....	32
4.1.3.1.1. Récepteurs membranaires de la famille du TNF- α	32
4.1.3.1.2. Les caspases.....	32
4.1.3.1.3. Membres de la famille Bcl-2	33
4.1.3.2. Protéine Bcl-2	34
4.1.3.3. Protéine p53	36
4.2. Biomarqueurs et leurs applications	38
4.2.1. Généralités sur les biomarqueurs.....	38
4.2.2. Applications des biomarqueurs	39
4.2.3. Biomarqueurs du cancer du col de l'utérus.....	40
4.2.3.1. Marqueurs viraux	40
4.2.3.2. Marqueurs cellulaires	41
4.2.3.2.1. Protéine p16 ^{INK4a}	42
4.2.3.2.2. Protéine Ki-67.....	42
4.2.3.2.3. Protéine MCM2	44
4.2.3.2.4. Topoisomérase 2 alpha.....	44

CHAPITRE 5. MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1. Matériel	46
5.2. Méthodes	48
5.2.1. Étude rétrospective de l'évaluation des activités de dépistage des pathologies du col de l'utérus à Sétif.....	48
5.2.1.1. Préparation des frottis conventionnels.....	48
5.2.1.2. Étude statistique	48
5.2.2. Étude de l'expression des biomarqueurs dans le cancer du col de l'utérus	49
5.2.2.1. Préparation des blocs	49
5.2.2.2. Confection des blocs et préparation des coupes histologiques	49
5.2.2.3. Coloration à l'Hématoxyline-Éosine	50
5.2.2.4. Immunohistochimie	51
5.2.2.5. Acquisition des images	53
5.2.2.6. Détermination des pourcentages de l'expression des biomarqueurs.....	53
5.2.2.6.1. Technique manuelle	53
5.2.2.6.2. Technique automatique	54
5.2.2.7. Génotypage d'HPV	54
5.2.2.7.1. Extraction de l'ADN	54
5.2.2.7.2. Amplification par PCR.....	55
5.2.2.7.3. Hybridation.....	56
5.2.2.8. Analyse statistique.....	57
5.2.2.9. Calcul de la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives	58

CHAPITRE 6. RÉSULTATS

6.1. Évaluation des activités de dépistage des pathologies du col de l'utérus à Sétif	59
6.1.1. Évolution du nombre de frottis réalisés durant la période 2013-2017.....	59
6.1.2. Qualité des frottis effectués.....	60
6.1.3. Âge des femmes au premier frottis	61
6.1.4. Âge des femmes au deuxième et troisième FCU.....	62
6.1.5. Résultats des frottis	63
6.1.6. Suivi des frottis anormaux	64
6.2. Expression de la protéine Bcl-2 dans le cancer du col de l'utérus.....	66
6.3. Expression de la protéine p53 dans le cancer du col de l'utérus	70
6.4. Relation entre le taux de l'expression de la protéine Bcl-2 et la protéine p53	72
6.5. Coloration à l'Hematoxiline-Éosine	73
6.6. Prévalence des types HPV dans les wilayas de Sétif et Bordj Bou Arreridj (2015-2017)	75
6.7. Expression de la protéine p16 dans le cancer du col de l'utérus	76
6.8. Expression de la protéine Ki-67 dans le cancer du col de l'utérus	81

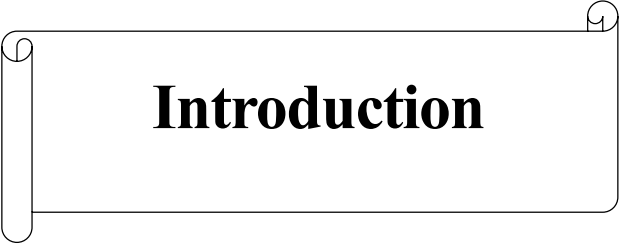
6.9. Expression de la protéine MCM2 dans le cancer du col de l'utérus.....	85
6.10. Expression de la protéine TOP2A dans le cancer du col de l'utérus	90
6.11. Analyse des images par l'ImmunoRatio	95
6.12. Calcul de la sensibilité (Se), la spécificité (Sp) et les valeurs prédictives (VPP ; VPN)	97
6.13. Relation entre l'infection par les HPV à haut risque et l'expression des protéines p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A	98

CHAPITRE 7. DISCUSSION

7.1. Situation du dépistage à Sétif	101
7.1.1. Nombre et qualité de frottis réalisés à Sétif (2013-2017)	102
7.1.2. Âge des patientes au premier frottis	103
7.1.3. Résultats des frottis	103
7.1.4. Recommandations de laboratoire	104
7.2. Détection des protéines p53 et Bcl-2 dans les biopsies cervicales	104
7.2.1. Expression de Bcl-2	105
7.2.2. Expression de p53.....	106
7.2.3. Expression simultanée de p53 et de Bcl-2	108
7.3. Détection des protéines p16 et Ki-67 dans les biopsies cervicales.....	109
7.3.1. Expression de la protéine p16	109
7.3.2. Expression de la protéine Ki-67	112
7.3.3. Évaluation des performances des marqueurs p16 et Ki-67	115
7.3.4. Le double marquage des protéines p16/ Ki-67.....	116
7.4. Détection des protéines MCM2 et TOP2A dans les biopsies cervicales et évaluation des valeurs de performances de ces marqueurs	117
7.4.1. Expression de la protéine MCM2	118
7.4.2. Expression de la protéine TOP2A	119
7.5. Relation entre l'expression des protéines p16, Ki-67, MCM2, TOP2A et l'infection par HPV-HR.....	121
7.6. Avantages de l'utilisation de l'application ImmunoRatio.....	122
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	124

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES



Introduction

Introduction

Le cancer du col de l'utérus est une maladie causée principalement par le papillomavirus humain (HPV 16 et HPV 18) mais d'autres facteurs sont nécessaires à l'apparition de ce type du cancer (HAS, 2013 ; OMS, 2017). Le mécanisme de la carcinogenèse des papillomavirus est lié à une perturbation de la multiplication cellulaire. Les protéines virales E6 et E7 sont responsables de la dégradation respective des protéines cellulaires p53 et pRb qui sont des gènes suppresseurs de tumeur (Mougin *et al.*, 2008).

Ce cancer occupe le 4^{ème} rang dans le monde avec 569 847 nouveaux cas et 311 365 décès enregistrés chez la femme en 2018 (GLOBOCAN, 2018). Il demeure la deuxième cause de mortalité des femmes dans les pays en voie de développement. Étant le 2^{ème} cancer gynécologique après le cancer du sein en Algérie, son incidence est de 6,7% enregistrée en 2015 pour 100 000 femmes (Ouahioune *et al.*, 2016 ; Hamdi Cherif *et al.*, 2017a). Dans la wilaya de Sétif, durant la période 2011-2016, ce cancer a occupé la 5^{ème} place des cancers chez la femme et il représente 3.9% des cancers féminins (Hamdi Cherif *et al.*, 2017b).

La durée du développement du cancer du col utérin est très longue (10 à 20 ans) et il est toujours précédé par des lésions précancéreuses. De ce fait, il peut être prévenu dans la quasi-totalité des cas s'il est dépisté aux premiers stades asymptomatiques. Le dépistage précoce de ces lésions reste le moyen le plus sûr pour lutter contre ce type du cancer. L'application à large échelle de dépistage par frottis cervico-utérin (FCU) dans les pays industrialisés a permis une diminution très nette de l'incidence de ce cancer (Catarino *et al.*, 2015). En Algérie, un programme national du dépistage a été lancé depuis 2001. Au vue des dernières évaluations, le cancer du col semble se stabiliser presque dans toutes les wilayas dont la wilaya de Sétif. Mais ces résultats ne sont pas à la hauteur des objectifs fixés par l'état (Zitouni, 2014). Le taux de réalisation du frottis de dépistage est de 15,5% chez la population cible, qui concerne les femmes âgées de 30 à 49 ans (Nadir *et al.*, 2018). Beaucoup d'efforts restent à déployer pour atteindre une couverture acceptable par ce test.

Avec la disponibilité de nouvelles techniques, les chercheurs ont doublé d'efforts pour rechercher de nouveaux biomarqueurs utilisables pour le dépistage précoce, le diagnostic et l'évaluation des traitements thérapeutiques du cancer. Un biomarqueur est une molécule biologique trouvée dans les tissus, dans le sang, ou dans d'autres fluides corporels. Il peut être exprimé par une tumeur ou bien il peut être une réponse spécifique de l'organisme à la présence

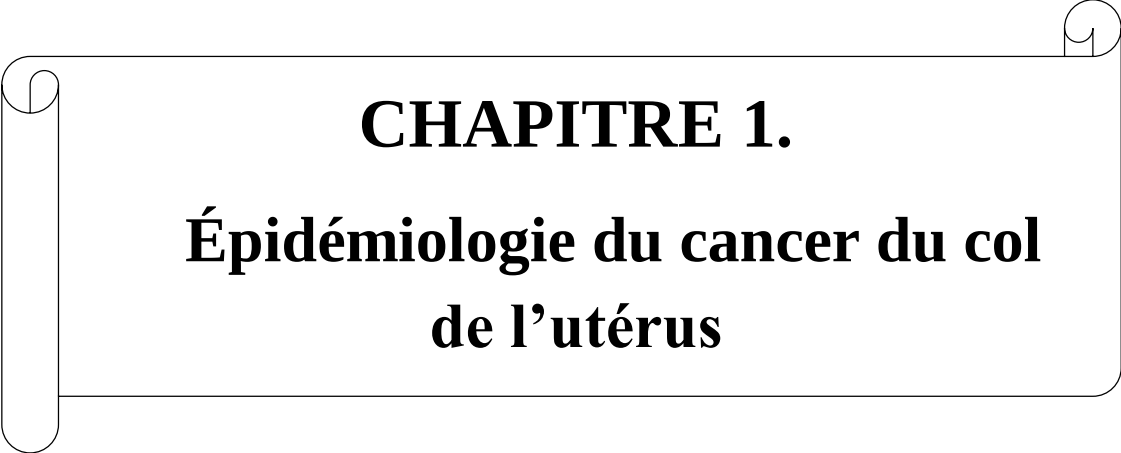
de cette tumeur. Un biomarqueur doit être fiable et reproductible (Mishra et Verma, 2010 ; Dasari *et al.*, 2015).

Au cours des 30 dernières années, des efforts considérables ont été entrepris pour identifier de nouveaux biomarqueurs pour un programme de dépistage du cancer du col utérin efficace et rentable. Ces protéines pourraient être des biomarqueurs utilisés en histochimie et cytochimie pour dépister les métaplasies immatures des lésions de haut grade.

Dans cette étude nous avons évalué les activités de dépistage des pathologies du col de l'utérus réalisées à Sétif durant la période 2013-2017. Nous avons essayé de déterminer la valeur de l'expression de quelques protéines, comme biomarqueurs de pronostic ou de diagnostic du cancer du col de l'utérus, pour faciliter l'interprétation du diagnostic de ce cancer. Les protéines que nous avons étudiées sont : Bcl-2 ; p53 ; p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A. Les spécimens utilisés sont des tissus cervicaux enrobés dans des blocs de paraffines. Ils correspondent aux différents stades précancéreux et cancéreux du col de l'utérus. Ces biomarqueurs sont détectés par immunohistochimie. Des taux d'expression de ces molécules ont été proposés pour les protéines Bcl-2 et p53 dans les carcinomes épidermoïdes et les adénocarcinomes. D'autres protéines (p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A) ont été également recherchées dans les cols normaux et les lésions cervicales à des stades différents du cancer du col de l'utérus. Nous avons évalué également leurs performances, la sensibilité ; la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative. En outre pour une meilleure interprétation des résultats, nous avons utilisé l'application web gratuite "ImmunoRatio" pour déterminer le pourcentage du marquage nucléaire de protéines Ki-67 ; MCM2 et TOP2A. Par ailleurs, nous avons détecté les types de papillomavirus humain pour estimer la prévalence de ces virus dans notre région. Enfin nous avons étudié la relation entre l'expression de chaque protéine-marqueur et l'infection par les HPV à haut risque.

La présente étude s'articule autour deux objectifs qui sont :

- Faire un état des lieux concernant le dépistage par frottis cervico-utérins réalisés à Sétif durant la période 2013-2017. Le but principal est l'évaluation du système de santé en terme de détection et de prise en charge des lésions cervicales, d'évaluer des indicateurs déterminants les activités de dépistage dont la qualité des frottis ; l'interprétation des frottis et les recommandations des laboratoires.
- L'évaluation des protéines Bcl-2 ; p53 ; p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A comme biomarqueurs du cancer du col de l'utérus par l'utilisation de la technique de l'immunohistochimie.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both featuring a rolled-up end. The chapter title is centered within the horizontal strip.

CHAPITRE 1.

Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

CHAPITRE 1. Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

1.1. Incidence et mortalité du cancer du col de l'utérus

Le cancer est un problème majeur de santé publique dans le monde. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2008, il a été estimé que 70% des décès par cancer dans le monde survenaient dans les pays en développement. Le nombre de nouveaux cas de cancer en 2012 est estimé à 14,1 millions et le nombre de décès est de 8,2 millions. La fréquence des cancers pourrait augmenter dans le monde de 50% en 2020, avec 15 millions de nouveaux cas par an. À l'horizon 2030, il est prévu que le nombre de décès par cancer s'élève à 13,1 millions (GLOBOCAN, 2012 ; Ouahioune *et al.*, 2016). Chez l'homme, les formes de cancer les plus fréquentes sont celles du poumon, de la prostate, du colo-rectum, de l'estomac, du foie, de la vessie et de l'œsophage. Ils constituent 61,1% de tous les cancers masculins. Le cancer du poumon à lui seul représente environ 14,5% des cancers masculins. Les formes de cancer les plus fréquentes chez la femme sont celles du sein, du colo-rectum, du poumon, du col de l'utérus, de la thyroïde, du corps de l'utérus et de l'estomac. Ils constituent 62,3% de tous les cancers féminins. Les cancers du sein (24,2%) et du col de l'utérus (6,6%) totalisent, à eux seuls, 30,8% de tous les cancers féminins. Le cancer du col utérin occupe la 4^{ème} place dans le monde avec 528 000 nouveaux cas et 266 000 décès chez la femme enregistrés en 2012. En 2018, le cancer du col de l'utérus occupe toujours le 4^{ème} rang parmi les cancers féminins avec 569 847 nouveaux cas et 311 365 décès (GLOBOCAN, 2012, 2018) [figure 1].

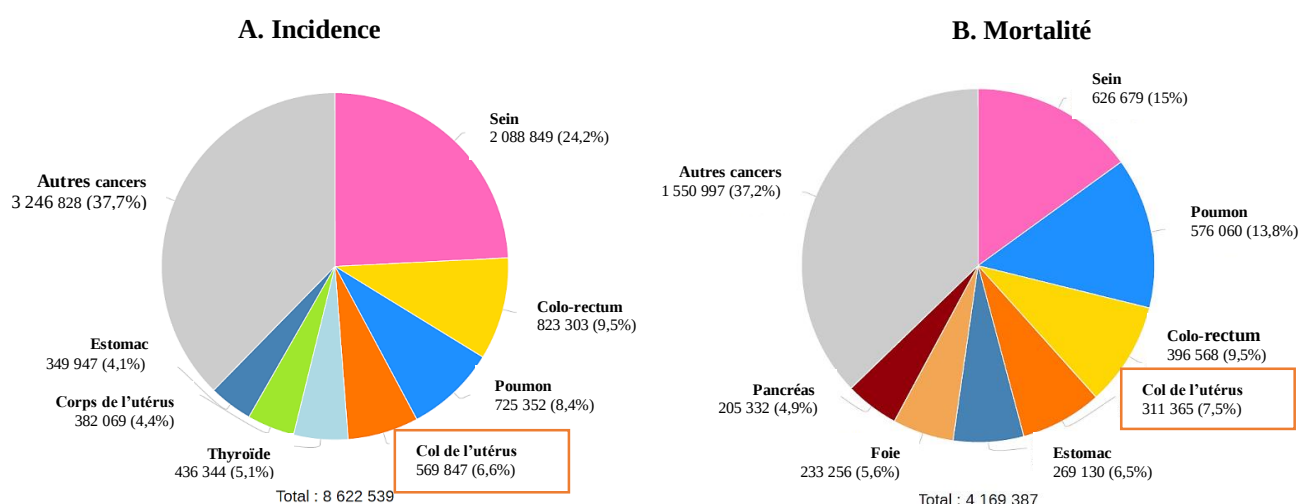


Figure 1 : Estimation de l'incidence (A) et de la mortalité (B) du cancer chez la femme dans le monde, en 2018 (adaptée du : GLOBOCAN, 2018).

CHAPITRE 1. Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

En Algérie le cancer du col de l'utérus est le 2^{ème} cancer gynécologique après le cancer du sein, avec une incidence de 8,7% pour 100 000 femmes enregistrée en 2010, 7,1% enregistrée en 2012 [figure 2] et 6,7% enregistrée en 2015 (GLOBOCAN, 2012 ; Ouahioune *et al.*, 2016 ; Hamdi Cherif *et al.*, 2017a).

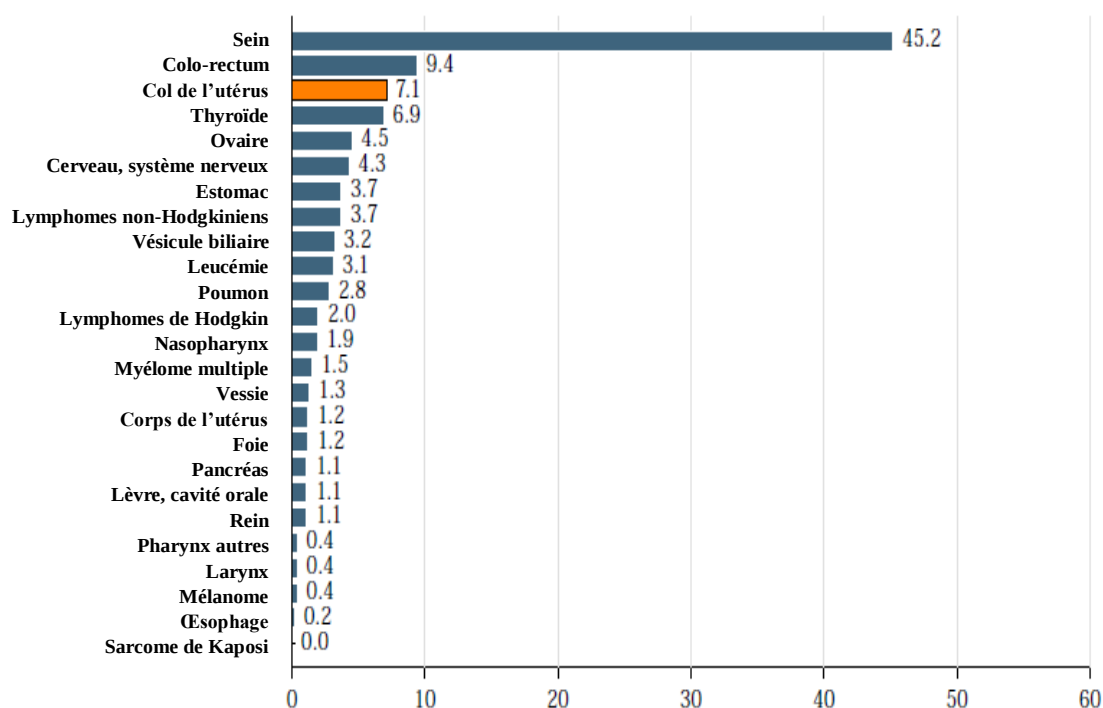


Figure 2 : Les cancers les plus fréquents chez la femme en Algérie de l'année 2012 (adaptée de : Ferlay *et al.*, 2013).

À Sétif, durant la période 2011-2016 le cancer du col utérin a occupé la 5^{ème} place des cancers chez la femme après le cancer du sein ; du colo-rectum ; de la thyroïde et des lymphomes non Hodgkiniens. Ils représentent 3,9% des cancers féminins avec une moyenne annuelle de 34 nouveaux cas ce qui correspond à une incidence annuelle brute pour 100 000 femmes de 4,2. L'âge d'apparition du cancer du col chez la jeune femme est à partir de 30 ans et l'âge médian lors du diagnostic est de 55,8 ans. La répartition des tumeurs selon la base de diagnostic a montré que 100% des tumeurs sont des tumeurs primitives. La répartition selon la morphologie a montré que 63,2% sont des carcinomes épidermoïdes et 13,2% sont des adénocarcinomes (Hamdi Cherif *et al.*, 2017b).

CHAPITRE 1. Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

1.2. Tendances, survie et prévalence du cancer du col de l'utérus

Dans le monde, selon les estimations de l'OMS, la prévalence de 5 ans de cancer du col de l'utérus est 1 216 504 cas qui représente 7,1% des cancers féminins (GLOBOCAN, 2012). En Algérie, la survie standardisée pour le cancer du col de l'utérus est de 55,1 [49,8-60,4] (Hamdi Cherif *et al.*, 2015). Dans la wilaya de Sétif, en 1998, l'incidence du cancer du col a augmenté au cours de la première décennie puisque le taux d'incidence standardisé a pratiquement doublé en 12 ans en passant de 8,4 en 1986 à 15,9 pour 100 000 habitants puis a diminué statistiquement jusqu'à 5,8 pour 100 000 habitants en 2016. Le taux de survie observé à 5 ans est de 63.06% avec un intervalle de confiance de IC 95% s'étant entre 58,12 et 67,60 (Hamdi Cherif *et al.*, 2017b).

La prévalence relativement élevée des cas en Algérie serait due à plusieurs facteurs. Les lacunes en termes de prévention par le dépistage seraient la cause principale. Plus de la moitié des femmes algériennes découvrent leur cancer trop tardivement, à un stade avancé de la maladie, lorsque le cancer a déjà gagné tout l'appareil génital ou plus. Dans ce cas le taux de survie diminue de 80%. Lorsque le cancer du col, affecte les femmes dans leur jeunesse, il peut avoir des conséquences catastrophiques avec un coût humain, social et économique très élevé (Khenchouche, 2014).

1.3. Comparaison avec d'autres pays

À l'échelle mondiale, le cancer du col utérin est le cancer le plus fréquent chez la femme dans plusieurs pays. Il s'agit de nombreux pays d'Afrique subsaharienne, de nombreux pays d'Asie (comme la Mongolie) et certains pays d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale. Les figures 3 et 4 montrent les différences dans l'incidence et le taux de mortalité, enregistrées en 2018, entre les différentes régions du monde. Ces cartes de distribution des cas permettent de voir les fortes disparités en termes d'incidence et de mortalité qui existent entre différentes zones au sein de certains pays. Une grande majorité de ces cas (environ 85%) ont été dans les régions les moins développées. Au cours de la même année, 311 365 femmes sont décédées d'un cancer du col dans le monde ; la grande majorité des femmes vivant dans des pays à revenu faible ou moyen. Un nombre réduit de ces femmes décédées vivaient dans des pays à revenu élevé. Les principales raisons de ces disparités sont les variations géographiques et socio-économiques, les variations en matière d'équité hommes-femmes et les facteurs déterminés par la culture. Tous ces facteurs pouvant grandement limiter l'accès aux services de prévention chez certains groupes de femmes.

CHAPITRE 1. Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

En l'absence d'une prévention efficace, le cancer du col n'est généralement détecté qu'à un stade avancé, lorsqu'il est trop tard pour les patientes de bénéficier d'un traitement efficace, avec en conséquence une mortalité élevée (OMS, 2017 ; GLOBOCAN, 2018). En somme, il est constaté une inégale répartition de la mortalité par le cancer du col de l'utérus dans le monde et que la mortalité est plus importante dans les pays en développement que dans les pays industrialisés.

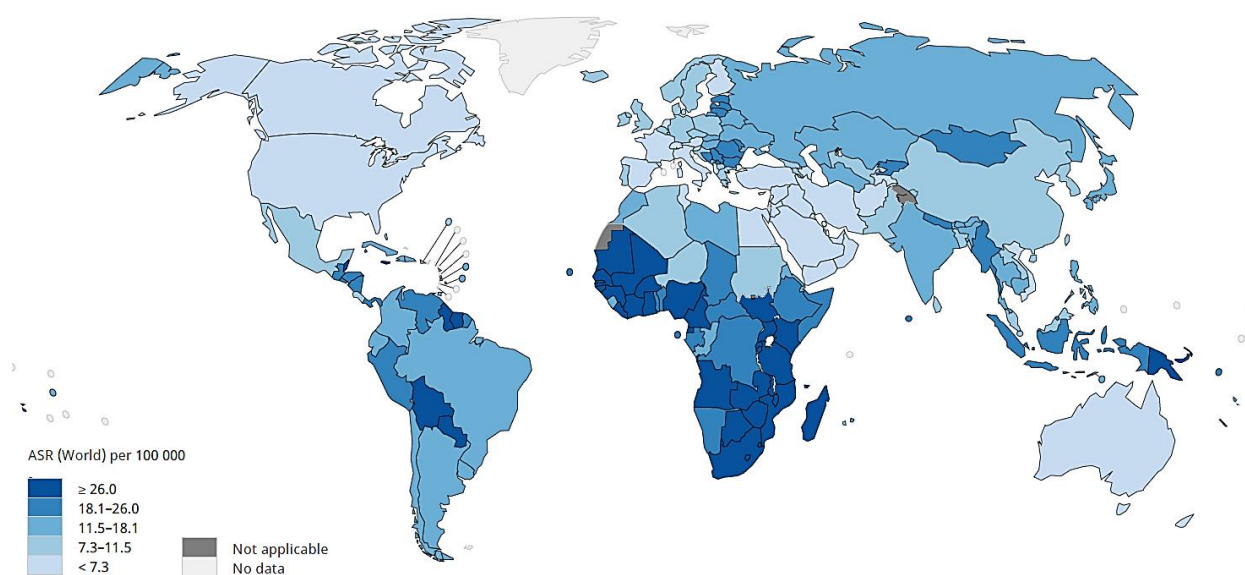


Figure 3 : Estimation des taux de l'incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde, en 2018 (GLOBOCAN, 2018).

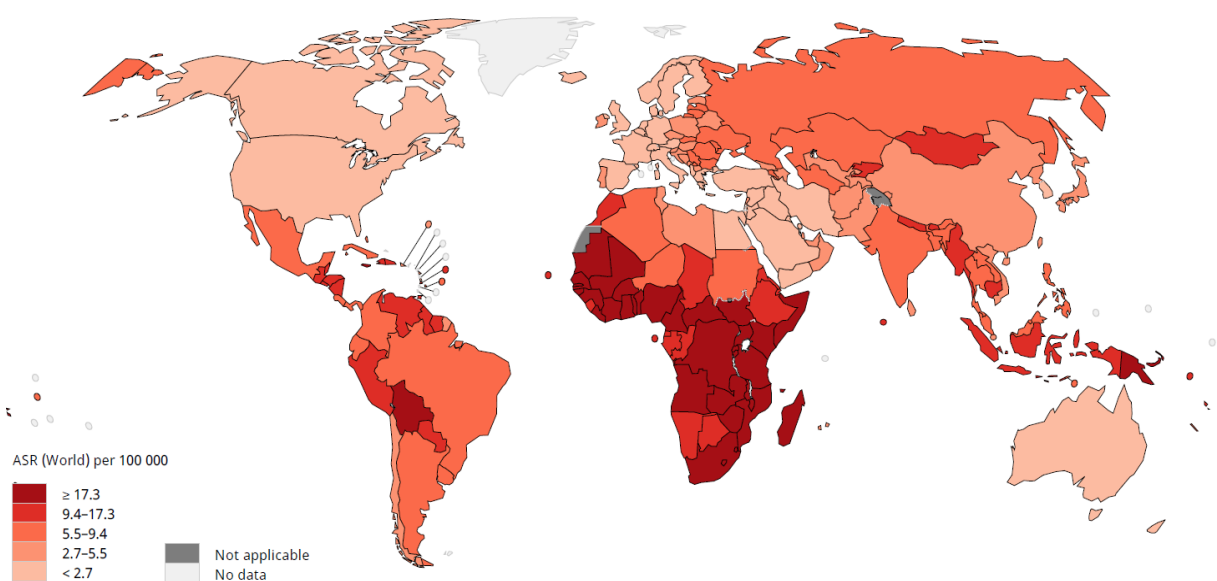


Figure 4 : Estimation des taux de la mortalité par cancer du col de l'utérus dans le monde, en 2018 (GLOBOCAN, 2018).

CHAPITRE 1. Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

1.4. Dépistage du cancer du col de l'utérus en Algérie

Une approche multiple de la prévention du cancer du col de l'utérus incluant le dépistage, le traitement précancéreux, et la vaccination contre l'HPV pourrait réduire le nombre de décès dus au cancer du col de l'utérus dans les pays en développement jusqu'à atteindre des taux aussi bas que ceux observés dans de nombreux pays industrialisés (Garnett *et al.*, 2006).

Un dépistage précoce se base sur les frottis qui consistent à recueillir un échantillon de cellules du col de l'utérus. Ces cellules sont spécifiquement colorées, puis l'échantillon est lu, interprété et confirmé par un pathologiste. C'est le test décrit en 1943 par Papanicolaou qui consiste à prélever des cellules du col de l'utérus, endocol et exocol. Une autre alternative est l'inspection visuelle (IVA) du col de l'utérus badigeonné à l'aide de l'acide acétique dilué (vinaigre) qui met en évidence les lésions précancéreuses de telle sorte qu'elles puissent être observées « à l'œil nu » (Megevand, 1996). Une troisième approche est l'utilisation des tests HPV de dépistage qui détectent la présence des types d'HPV à haut risque, dans les cellules cervicales, associés au cancer. L'infection par ces virus permet de suivre les femmes qui sont plus susceptibles d'avoir des lésions précancéreuses, donc plus à risque de développer un cancer du col de l'utérus (Lessard *et al.*, 2017).

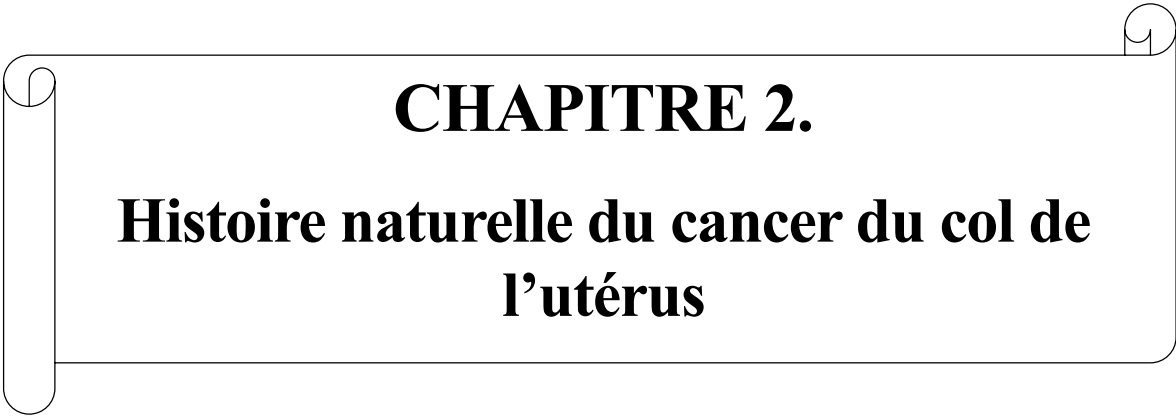
À l'heure actuelle, l'interprétation des frottis par les anatomo-pathologistes est basée sur le système de Bethesda de référence. Dans le cas du frottis conventionnel, les cellules sont prélevées par la spatule d'Ayre et ensuite étalées et fixées sur une lame. Dans le frottis en milieu liquide, les cellules sont placées en suspension dans un flacon contenant un liquide après grattage par une brosse en plastique au niveau de la jonction squamo-cylindrique et l'endocol. Le frottis en milieu liquide permet d'éviter la plupart des artéfacts de superposition du frottis conventionnel. Les recommandations officielles de programmes de dépistage par FCU sont la réalisation chez toutes les femmes d'un frottis tous les 3 ans, après deux examens successifs normaux espacés d'un an de 25 ans à 65 ans. Un résultat positif (présence de cellules atypiques) nécessite la réalisation d'une colposcopie avec biopsies du col (Abbara, 2013 ; Benlahrech *et al.*, 2018).

L'Algérie a opté en 1997 pour la mise en œuvre d'un plan national de dépistage du cancer du col utérin par cytodiagnostics, en coopération avec l'OMS et le FNUAP (Fonds des Nations Unies pour la Population) en assurant notamment une formation annuelle de screeners et de colposcopistes au niveau du laboratoire de référence de cytodiagnostics de l'INSP (Institut National

CHAPITRE 1. Épidémiologie du cancer du col de l'utérus

de Santé Publique). La stratégie nationale, adoptée en 2001, a impliqué notamment l'intégration du dépistage dans les structures sanitaires de base, permettant ainsi l'ouverture d'unités de dépistage réparties sur les 48 wilayas dont la wilaya de Sétif. L'action entamée en 2001 a été évaluée de manière objective en 2014 et a permis de constater que les résultats ne sont pas à la hauteur des objectifs fixés (Sancho-Garnier *et al.*, 2013 ; Zitouni, 2014). Au cours de la période 2001-2007, 200 000 frottis seulement ont été effectués parmi les 5 millions de femmes algériennes visées par le dépistage cytologique (1,6 à 1,7 million/ an), ce qui a conduit à un taux de couverture estimé à 2% (Ould-Kada, 2008). D'autres dépistages individuels, effectué chez les privés, sans avoir de données. Le résultat de l'enquête « Stepwise » montre que la fréquence de la réalisation du test de dépistage est estimée à 12,7% chez la femme algérienne âgée entre 18 et 69 ans. La répartition par tranche d'âge montre un taux élevé dans la tranche d'âge 45-59 ans, soit 21,0% et un taux très bas de la tranche d'âge 18-29 ans (4,5%). Donc Ce taux de la réalisation du test de dépistage est de 15,5% chez la population cible de l'OMS (les femmes âgées de 30 à 49 ans) (Nadir *et al.*, 2018). En Algérie, le manque d'accès au dépistage et au traitement des lésions précancéreuses et du cancer invasif conduit à un pourcentage élevé de stades avancés (stades III et IV) et, par conséquent, un taux élevé de mortalité. Cependant, cela n'est pas largement connu en raison de l'absence de registre qui valide la mortalité basée sur la population (Sancho-Garnier *et al.*, 2013).

Les insuffisances et dysfonctionnements devraient être corrigés par à une couverture plus adéquate du dépistage par cytologie conventionnelle traditionnelle, et aussi en partie grâce à l'introduction de nouvelles techniques de dépistage plus modernes mondialement reconnues. Par ailleurs le recours à des établissements centralisés experts serait d'un grand intérêt par le volume important d'examens effectués, l'encadrement hautement qualité bien sélectionné, le contrôle de qualité organisé et la gestion informatisée des dossiers pour renforcer le programme national de prévention du cancer du col de l'utérus (Zitouni, 2014 ; Bouhadeb *et al.*, 2016).

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both featuring rounded ends and a slight shadow effect.

CHAPITRE 2.

Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

2.1. Anatomie et physiologie du col de l'utérus

L'utérus est un organe centro-pelvien, situé en avant du rectum, et en arrière de la vessie, recouvert d'un péritoine et au-dessus du vagin. Il est constitué de 3 parties : corps, col, et isthme. Le col est une portion fibromusculaire constitue la partie inférieure de l'utérus située sous l'isthme de l'utérus. Il a une forme cylindrique. Chez une femme en âge de procréer qui n'est pas enceinte, il mesure environ 3-4 cm de long pour 2,5 cm de diamètre. Il est percé dans sa partie vaginale par l'orifice externe du col. Cet orifice se prolonge pour former le canal cervical qui aboutit à un second orifice au niveau de l'isthme utérin, l'orifice interne du col, met en relation la cavité utérine et le vagin [figure 5]. Le col de l'utérus sécrète la glaire cervicale en fonction du cycle menstruel, cette glaire est une substance qui régule le passage des spermatozoïdes. Hors période d'ovulation, la glaire cervicale est très épaisse et empêche des germes éventuellement dangereux de pénétrer plus loin dans le corps (OMS, 2007, 2017).

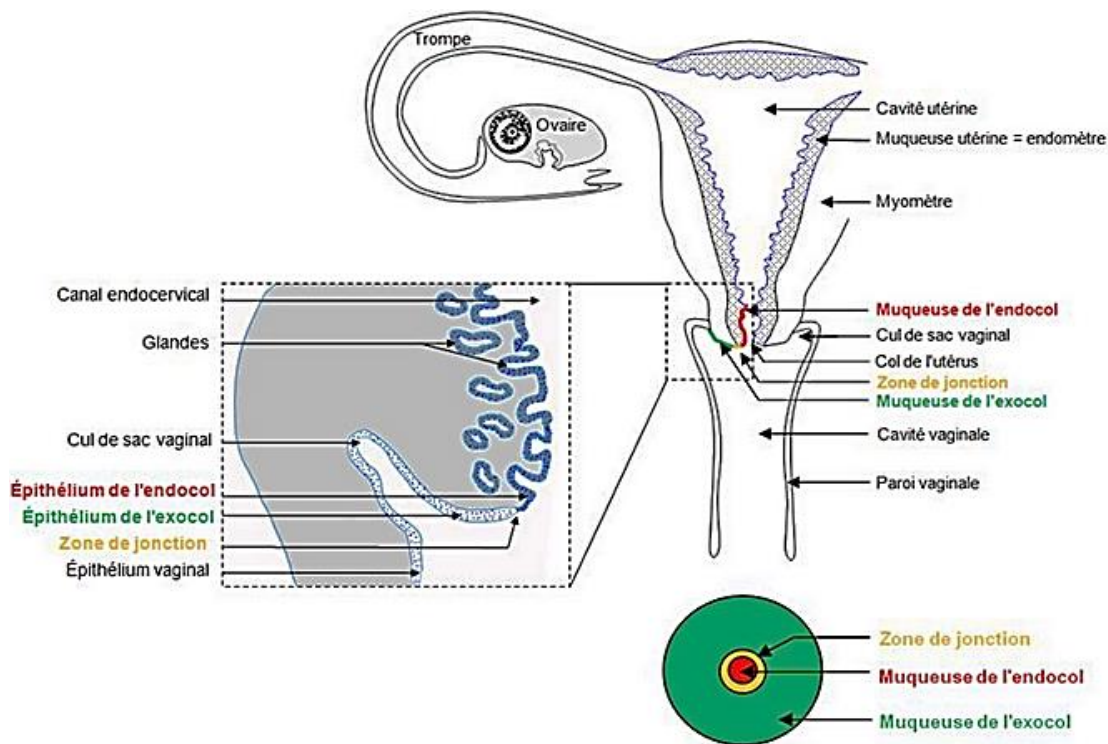


Figure 5 : Représentation de l'appareil génital féminin interne et de la zone de transformation cervicale en vue frontale et endovaginale (<http://www.chups.jussieu.fr> ; <http://www.umvf.univ-nantes.fr/gynecologie-et-obstetrique>).

Le col utérin est divisé en deux régions anatomiques distinctes : l'exocol et l'endocol. L'exocol est la portion externe du col, visible (en colposcopie) à la partie haute du vagin. L'exocol est recouvert d'un épithélium malpighien (pavimenteux stratifié) non kératinisé. L'endocol relie

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

l'orifice externe à l'isthme utérin et il est recouvert d'un épithélium glandulaire simple mucosécrétant. La zone de jonction pavimento-cylindrique est l'endroit de transition entre l'épithélium malpighien exocervical et l'épithélium glandulaire endocervical. Cette transition est abrupte, elle se présente sous la forme d'une ligne étroite marquée par une dénivellation à cause de la différence d'épaisseur entre les épithéliums pavimenteux et cylindrique. Cette zone serait la partie fragile pour développer le cancer du col de l'utérus (OMS, 2007).

2.2. Histologie du col normal

L'exocol est normalement recouvert par un épithélium pluristratifié de type pavimenteux ou malpighien, à peu près identique à celui qui tapisse la paroi vaginale. Il est chargé en glycogène et réparti en 5 couches [figure 6A] qui sont de la profondeur vers la superficie.

➤ **Couche basale** est formée par une seule assise de cellules de petite taille, de forme cylindrique, tassées les unes contre les autres en palissade le long de la membrane basale.

➤ **Couche parabasale** est formée par 1 ou 2 assises de cellules analogues mais un peu plus volumineuses. Ces cellules ont un cytoplasme abondant et clair qui contient beaucoup de glycogène.

➤ **Couche intermédiaire** comprend 8 assises de cellules.

➤ **Couche superficielle** ou zone de kératinisation intra-épithéliale. Elle est formée par 5 à 6 couches de cellules qui s'aplatissent progressivement vers la surface. Leur membrane est épaisse, leur noyau est petit et homogène, leur cytoplasme occupé par du glycogène.

➤ **Zone de desquamation** est constituée de cellules qui se détachent facilement de la surface de la muqueuse. Elles desquament isolément et gardent leurs noyaux. Elles constituent l'essentiel du frottis cervico-utérin (http://screening.iarc.fr/atlashisto_list.php?cat=B2&lang=2).

L'endocol est tapissé par un épithélium unistratifié mucosécrétant. Les cellules sont cylindriques à noyau basal et un cytoplasme clair mucosécrétant. L'épithélium de l'endocol est plissé en cryptes ressemblant faussement à des glandes. Son renouvellement s'effectue à partir de cellules de réserve encore indifférenciées, disposée en couche discontinue [figure 6B] (CIRC, 2004a ; OMS, 2007).

La jonction exocol-endocol ou jonction pavimento-cylindrique correspond exactement à l'orifice cervical externe c'est-à-dire la réunion de deux épithéliums de hauteur différente : l'un

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

malpighien pluristratifié, l'autre cylindrique unistratifié [figure 6C]. Mais sa structure et sa topographie varient avec l'âge (CIRC, 2004a ; OMS, 2007).

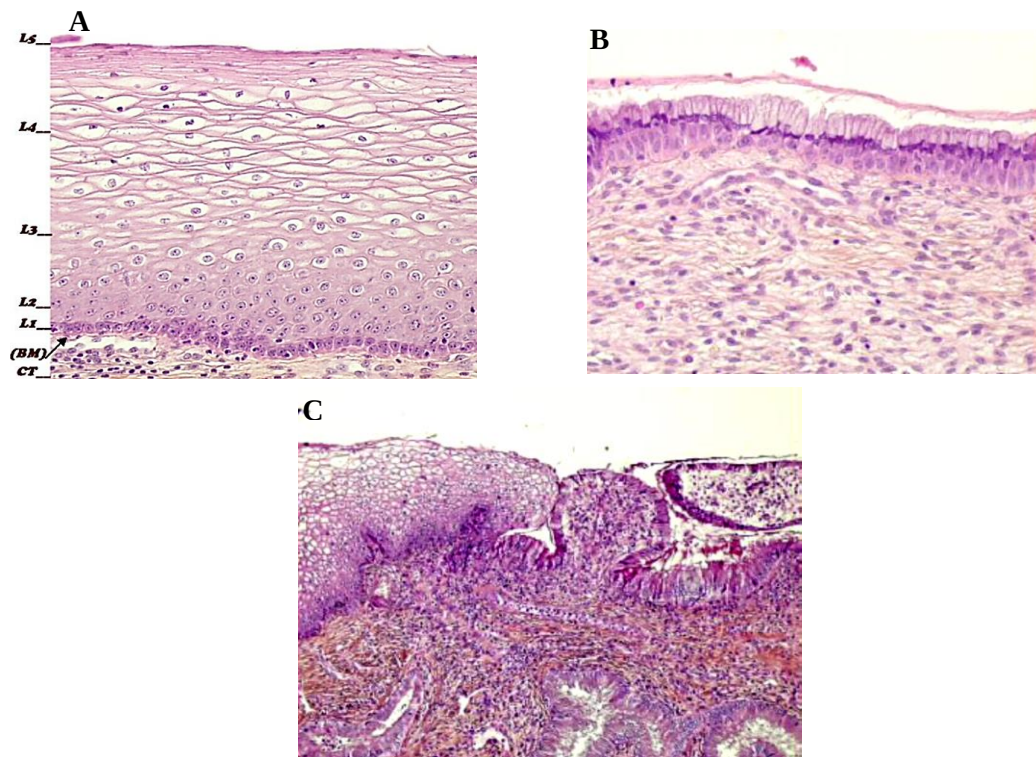


Figure 6 : Structure de l'exocol normal, l'endocol normal et la zone de jonction. **A.** Structure de l'exocol normal, CT : tissu conjonctif, BM : membrane basale, L1 : cellules basales (1 couche), L2 : cellules parabasales (1 ou 2 couches), L3 : cellules intermédiaires (environ 8 couches), L4 cellules superficielles (5 ou 6 couches), L5 cellules desquamantes. **B.** Structure de l'endocol normal, épithélium constitué d'une couche de cellules mucipares avec de nombreuses cellules de réserve. Discrète hyperplasie des cellules de réserve. **C.** Structure de la zone de transformation discrètement inflammatoire (CIRC, 2004b).

2.3. États précancéreux du col de l'utérus

Un état précancéreux du col de l'utérus est caractérisé par des changements que subissent les cellules du col qui les transforment et seront plus susceptibles d'évoluer en cancer. Si ces lésions ne sont pas traitées dans 10 ans ou plus, elles peuvent se transformer en cancer du col de l'utérus, mais cela prend parfois moins de temps.

2.3.1. Différentes lésions précancéreuses

Les états précancéreux du col de l'utérus prennent naissance dans la zone de transformation. Les cellules cylindriques glandulaires de cette région se transforment constamment en d'autres cellules malpighiennes. Cette transformation est un processus normal, mais il rend les cellules plus sensibles aux effets du virus HPV. Les changements précancéreux du col de l'utérus sont assez

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

fréquents. Ils peuvent apparaître à tout âge mais le font le plus souvent chez les femmes entre la vingtaine et la trentaine d'âge (HAS, 2013).

2.3.2. Types d'états précancéreux

Les états précancéreux du col de l'utérus sont décrits en fonction du degré d'anomalie de l'apparence des cellules observées au microscope et de la gravité des changements cellulaires. On les regroupe selon le type de cellule qui est anormal.

2.3.2.1. Cellules malpighiennes anormales

Le système de Bethesda 2001-2014 est le système le plus utilisé pour décrire les changements anormaux subis par les cellules malpighiennes dans lequel ils sont appelés lésions malpighiennes intraépithéliales (SIL : *Squamous Intraepithelial Lesion*) [annexe I]. Des fois les termes de néoplasie intra-épithéliale cervicale (CIN : *Cervical Intraepithelial Neoplasia*) ou de dysplasie cervicale sont utilisés. Ce sont d'anciennes expressions employées pour classer les changements du col de l'utérus. Les lésions malpighiennes intraépithéliales sont de bas grade (LSIL : *Low grade Squamous Intraepithelial Lesion*) ou de haut grade (HSIL : *High grade Squamous Intraepithelial Lesion*) [figure 7, tableau I] (Tranbaloc, 2008).

Les infections à HPV sont souvent inapparentes et transitoires. Elles évoluent le plus souvent dans le sens d'une clairance virale aboutissant à la guérison spontanée de l'infection. En moyenne 70% des infections disparaissent en 12 mois et 90% en 24 mois (Baseman et Koutsky, 2005 ; Gravitt et Winer, 2017). Ainsi, on estime que la clairance virale est réalisée en 8 à 16 mois. Suite à une infection à HPV on peut rencontrer différents types de lésions (Orth, 2005, Schiffman *et al.*, 2011). Les lésions épithéliales malpighiennes ou néoplasies intraépithéliales cervicales sont définies par l'analyse histologique des biopsies. Elles sont classées en 3 grades (CIN1, CIN2 et CIN3) selon la hauteur des anomalies morphologiques de l'épithélium. La figure 7 permet d'observer l'évolution des différentes lésions induites par les HPV. Il existe une probabilité de régression pour chaque lésion cervicale (de 32 à 57 % en fonction de la gravité de la lésion) vers un épithélium normal. Dans les cas plus graves, il n'y a pas de clairance virale complète, et par conséquent une probabilité de persistance ou de progression vers un stade plus avancé (Melnikow *et al.*, 1998, Schiffman *et al.*, 2016 ; Gravitt et Winer, 2017).

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

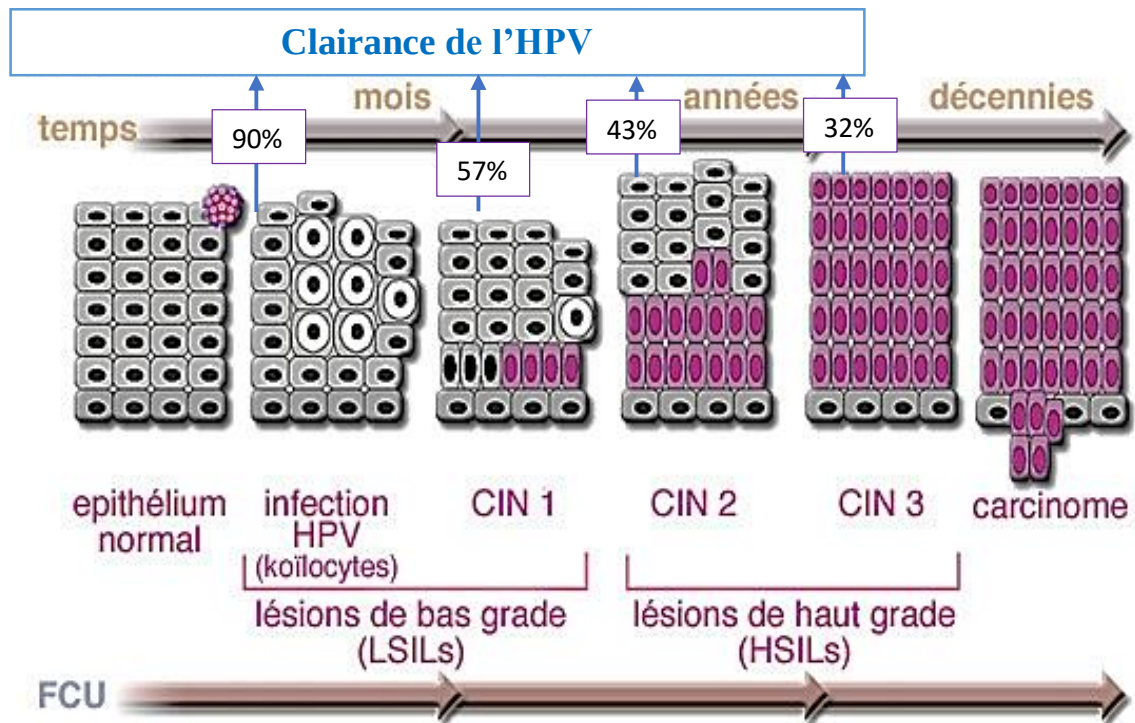


Figure 7 : Évolution des cancers invasifs du col de l'utérus dans le temps. FCU : frottis cervico-utérin (adaptée de : www.arcagy.org).

Tableau I : Les différentes lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus (HAS, 2013).

	Cytologie	Histologie	
Lésions précancéreuses	ASC-US : cellules épidermoïdes atypiques de signification indéterminée	Atypie	
	ASC-H : cellules épidermoïdes atypiques ne permettant pas d'exclure une lésion intra-épithéliale épidermoïde de haut grade		
	LSIL : lésion intra-épithéliale épidermoïde de bas grade	Koilocytose Dysplasie légère	CIN1
Lésions cancéreuses	HSIL : lésion intra-épithéliale épidermoïde de haut grade	Dysplasie modérée	CIN2
		Dysplasie sévère Carcinome <i>in situ</i>	CIN3
	Cancer invasif	Cancer invasif	

En ce qui concerne les lésions précancéreuses malpighiennes, les classifications histologique (employée pour le diagnostic) et cytologique (employée pour le dépistage).

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

2.3.2.2. Cellules glandulaires anormales

Ces états ne sont pas classés comme cela a été observé pour les cellules malpighiennes. Les cellules glandulaires atypiques (AGC : *Atypical Glandular Cells*) sont les précurseurs d'environ 20% des cancers du col utérin (Tranbaloc, 2008).

2.4. Tumeurs et lésions non cancéreuses du col de l'utérus

La tumeur non cancéreuse, ou bénigne, du col de l'utérus est une masse qui ne se propage pas à d'autres parties du corps (pas de métastases). Ce type de tumeur ne met habituellement pas la vie en danger. Les tumeurs non cancéreuses suivantes peuvent apparaître dans le col de l'utérus :

2.4.1. Polype cervical

Le polype cervical est la tumeur non cancéreuse la plus fréquente du col utérin. Il apparaît le plus souvent chez la femme âgée de plus de 20 ans. Il est rare chez les jeunes femmes qui ne sont pas encore menstruées. C'est une masse rouge semblable à un doigt. Il prend naissance dans le canal endocervical et peut avancer dans le vagin. On n'a habituellement pas besoin de traiter le polype cervical, sauf s'il est gros ou s'il semble anormal, dans ce cas on peut l'enlever. La plupart des polypes sont bénins, mais certains peuvent devenir malins (CIRC, 2004a).

2.4.2. Kyste de Naboth

Le kyste de Naboth apparaît souvent à la surface du col de l'utérus. Il arrive parfois que les cellules malpighiennes qu'on observe normalement dans l'exocol commencent à se développer sur les cellules qui produisent le mucus dans l'endocol. Elles emprisonnent donc le mucus dans le col. Puisque le mucus continue d'être produit et emprisonné, il finit par s'accumuler et former une masse ronde et lisse. Il ne requiert généralement pas de traitement. Dans certains cas, il peut devenir suffisamment gros pour modifier la forme du canal cervical et rendre les examens pelviens difficiles. À ce moment-là, on peut ouvrir le kyste pour évacuer le mucus (Société canadienne du cancer, 2017a).

2.4.3. Fibrome cervical

Le fibrome cervical, aussi appelé léiomyome, prend naissance dans le tissu musculaire du col de l'utérus. Il ressemble au fibrome utérin, mais il est moins courant. Le fibrome cervical est habituellement petit, mesurant de 0,5 à 1 cm de large. Il peut apparaître chez les femmes de tout

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

âge. Certaines femmes prennent des médicaments pour contrôler leurs symptômes. D'autres peuvent avoir besoin d'une chirurgie pour enlever le fibrome (Okogbo *et al.*, 2011 ; Société canadienne du cancer, 2017a).

2.4.4. Cervicite

La cervicite est une inflammation affectant l'épithélium cylindrique du col utérin. Elle peut se traduire par une simple allergie (notamment à des spermicides). Elle peut aussi être due à une maladie sexuellement transmissible (gonorrhée, infection à *Trichomonas*, ou à *Chlamydia* etc.), à des streptocoques ayant proliféré à la suite d'un accouchement ou d'une interruption volontaire de grossesse, à un herpès génital viral ou encore à des bactéries ayant remonté du vagin à l'utérus. Les autres causes de l'inflammation peuvent inclure le déséquilibre bactérien et le déséquilibre hormonal. Dans de rares cas, la radiothérapie ou le cancer peuvent entraîner des modifications du col de l'utérus compatibles avec la cervicite (CIRC, 2004c).

2.5. Tumeurs cancéreuses du col de l'utérus

La tumeur cancéreuse, ou maligne du col de l'utérus peut croître et se disséminer à d'autres parties du corps. Il s'agit du carcinome épidermoïde et de l'adénocarcinome qui sont les deux formes les plus fréquentes. Ces deux formes de cancer du col de l'utérus se développent habituellement à partir de changements précancéreux dans le col. Heureusement, ce ne sont pas tous les changements précancéreux du col de l'utérus qui évoluent en cancer. D'autres types de tumeurs cancéreuses du col de l'utérus peuvent se manifester. Ils ne sont pas très fréquents et peuvent être traités différemment du carcinome épidermoïde et de l'adénocarcinome du col de l'utérus (HAS, 2013 ; Ouahioun *et al.*, 2016).

2.5.1. Carcinome épidermoïde

Presque 80-90% des cancers du col de l'utérus sont des carcinomes épidermoïdes. Ces derniers prennent naissance dans les cellules plates et écailleuses qui recouvrent l'exocol. Le carcinome épidermoïde apparaît le plus souvent dans la jonction squamo-cylindrique puisque les cellules cylindriques cubiques se transforment constamment en cellules malpighiennes de surface. Les types de carcinome épidermoïde sont le carcinome *in situ* dont lequel l'épithélium est désorganisé sur toute sa hauteur dans la zone de jonction. Les cellules malignes occupent l'épithélium sur une certaine surface mais ne franchissent pas la membrane basale inférieure (Marth

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

et al., 2017). Le carcinome micro-invasif où l'épithélium néoplasique de surface infiltre le chorion en un ou plusieurs endroits, sur une profondeur inférieure ou égale à 3 mm, mesurée à partir de la membrane basale ; aucune invasion vasculaire sanguine ou lymphatique n'est détectée (Baldauf et Baulon, 2007). Et le carcinome invasif dont les lésions débutantes peuvent se présenter sous forme d'une induration focale, d'une lésion ulcérée ou en relief. Les lésions se développent dans la quasi-totalité des cas sur la zone de transformation et s'étendent de façon variable sur le reste de la surface exocervicale. Ce carcinome tend à reproduire un épithélium malpighien et montre parfois une kératinisation. Classiquement, on distingue des formes : à grandes cellules kératinisantes ; à grandes cellules non kératinisantes ; et à petites cellules (CIRC, 2004d ; Baldauf et Baulon, 2007). Il existe d'autres types rares de carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus dont le carcinome verruqueux, le carcinome papillaire, le carcinome transitionnel papillaire, le carcinome condylomateux, le carcinome basaloïde et le carcinome lymphoépithélial (Société canadienne du cancer, 2017b).

2.5.2. Adénocarcinome

L'adénocarcinome représente de 10 à 20% de tous les cas de cancer du col de l'utérus. Il peut se manifester plus souvent chez les jeunes femmes. L'adénocarcinome prend naissance à partir des glandes endocervicales qui sont contiguës à la zone de jonction. Parmi les types d'adénocarcinome on trouve l'adénocarcinome *in situ* : il s'agit d'une lésion cancéreuse débutante développée à partir des glandes endocervicales. Cette lésion est souvent associée à une néoplasie malpighienne intraépithéliale du col utérin. L'adénocarcinome micro-invasif qui est défini par une infiltration du stroma de moins de 5 mm. La distinction entre adénocarcinome *in situ* et adénocarcinome micro-invasif est très difficile. Et l'adénocarcinome invasif qui est précédé d'atypies glandulaires qui constituent les lésions pré-invasives (Marth *et al.*, 2017 ; Pirog, 2017). Il existe d'autres types rares d'adénocarcinomes dont l'adénocarcinome mucineux, l'adénocarcinome endométrioïde, l'adénocarcinome papillaire villoglandulaire, l'adénocarcinome papillaire séreux, l'adénome malin, l'adénocarcinome mésonéphroïde et l'adénocarcinome endocervical microkystique (Pirog, 2017).

2.6. Tumeurs rares du col de l'utérus

Les tumeurs cancéreuses rares du col de l'utérus représentent moins de 5% de tous les cancers du col de l'utérus. On trouve dans ce groupe : le carcinome adénosquameux ; le carcinome à petites cellules ; le carcinome non à petites cellules ; le carcinome à cellules vitreuses ; le carcinome

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

mucoépidermoïde ; le carcinome adénoïde kystique ; le carcinome adénoïde basal ; la tumeur carcinoïde ; le sarcome et le lymphome du col de l'utérus (Société canadienne du cancer, 2017b).

2.7. Stadification de cancer du col de l'utérus

Le système de stadification le plus fréquemment employé pour le cancer du col de l'utérus est la classification de la fédération internationale de la gynécologie et l'obstétrique (FIGO). Dans le cas du cancer du col de l'utérus, il y a 4 stades. Pour les stades 1 à 4, on utilise souvent les chiffres romains I, II, III et IV. En général, plus le numéro du stade est élevé, plus le cancer s'est propagé. Le stade 0 ne fait pas partie de la classification FIGO. Au stade 0, on parle d'état précancéreux du col de l'utérus ou de carcinome *in situ* [figure 8, tableau II, annexes II-IV] (Wiebe *et al.*, 2012).

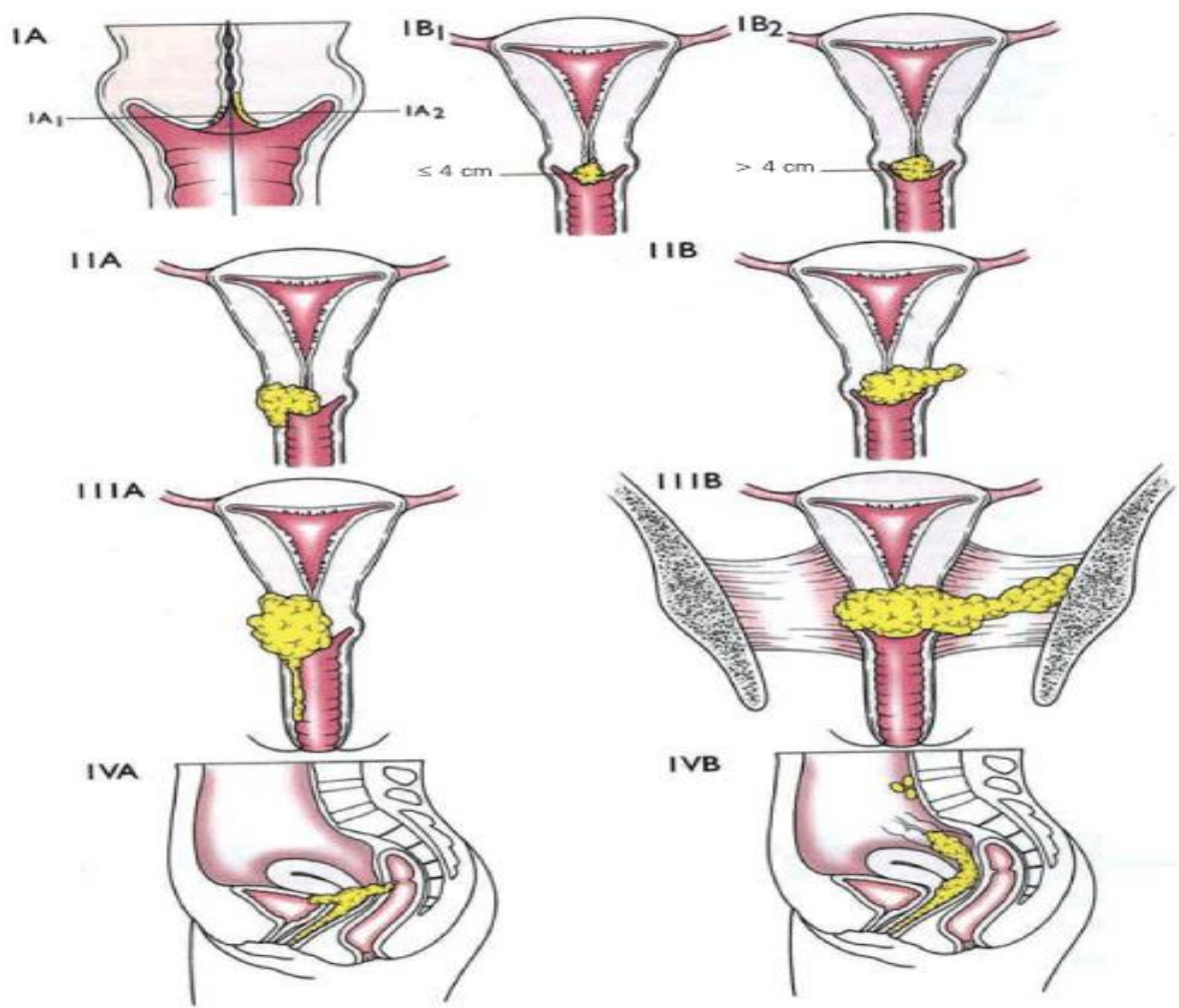


Figure 8 : Stadification du cancer du col de l'utérus selon FIGO, tumeur primaire et métastase (Quinn *et al.*, 2006)

CHAPITRE 2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

Tableau II : La classification de FIGO (ESMO et FAC, 2012).

Stade I		
Stade IA	Cancer invasif identifié par examen microscopique uniquement. L'invasion est limitée à l'invasion stromale mesurée ne dépassant pas 5 mm en profondeur et 7 mm en largeur.	
	Stade IA1	L'invasion mesurée dans le stroma ne dépasse pas 3 mm en profondeur et 7 mm en largeur.
	Stade IA2	L'invasion mesurée dans le stroma est comprise entre 3 et 5 mm en profondeur et ne dépasse pas 7 mm en largeur.
Stade IB	Soit les lésions cliniques sont limitées au col, soit les lésions infracliniques sont plus importantes que dans le stade IA. Toute lésion macroscopiquement visible même avec une invasion superficielle est classée cancer de stade IB.	
	Stade IB1	Lésions cliniques de taille ne dépassant pas 4 cm.
	Stade IB2	Lésions cliniques de taille supérieure à 4 cm.
Stade II		
Tumeur s'étendant au-delà de l'utérus mais ne touchant pas la paroi pelvienne ni le tiers inférieur du vagin.		
	Stade IIA	Pas d'atteinte paramétrique évidente. L'invasion touche les deux tiers supérieurs du vagin.
	Stade IIB	Atteinte paramétriale évidente, mais la paroi pelvienne n'est pas touchée.
Stade III		
Tumeur s'étendant jusqu'à la paroi pelvienne, et/ ou atteignant le tiers inférieur du vagin et/ ou avec hydronéphrose ou rein non fonctionnel.		
	Stade IIIA	Tumeur atteignant le tiers inférieur du vagin sans extension à la paroi pelvienne.
	Stade IIIB	Tumeur s'étendant jusqu'à la paroi pelvienne et/ ou avec hydronéphrose ou rein non fonctionnel.
Stade IV		
Extension aux organes pelviens ou à distance.		
	Stade IVA	Atteinte de la muqueuse rectale ou vésicale.
	Stade IVB	Extension au-delà du pelvis.

CHAPITRE 3.

**Facteurs de risque, oncogenèse virale et
immunité du cancer du col de l'utérus**

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogenèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

Il est prouvé aujourd'hui que pratiquement tous les cancers du col utérin sont causés par certains types d'HPV, un groupe de virus apparentés au virus responsable des verrues génitales ou de la peau. L'infection par l'HPV est causée après un contact direct ; dans le cas du col utérin, elle se fait généralement par contact sexuel, ou même par contact peau-à-peau. Le développement de la tumeur cervicale maligne dure plusieurs années (voire des décennies). Cependant, cette infection n'est pas un facteur suffisant pour le développement des lésions précancéreuses et du cancer du col utérin. Autrement dit, d'autres facteurs sont nécessaires à l'apparition du cancer du col utérin. Ces facteurs seront discutés dans ce qui suit :

3.1. Facteurs de risque d'une infection par l'HPV

Parmi les facteurs de risque pour la survenue de la tumeur cervicale, on cite surtout :

- Les rapports sexuels non protégés avec des partenaires multiples ou des rapports sexuels avec un homme qui a plusieurs partenaires sexuels.
- Le début de la vie sexuelle à un âge précoce.
- L'utilisation à long terme de contraceptifs hormonaux.
- La multiparité ou grossesses multiples.
- Une mauvaise hygiène.
- D'autres infections sexuellement transmissibles par exemple, par herpès simplex virus-2 (HSV-2), l'Epstein-Barr virus (EBV), ou par *Chlamydia trachomatis* ou par *Neisseria gonorrhoeae* (HAS, 2013 ; Murtaza *et al.*, 2016).

Une aggravation est observée lors de la diminution des défenses immunitaires causée par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ou par un traitement médicamenteux qui affectent le système immunitaire. Ce dernier combat normalement les infections par l'HPV et réduit le risque de développement du cancer.

D'autres facteurs qui affaiblissent le système immunitaire et l'état de santé général, comme une mauvaise alimentation (par exemple, une faible consommation de fruits et de légumes), le tabagisme, des habitudes de sommeil irrégulières et un manque d'exercice physique. La pauvreté et le fait de vivre dans un pays émergent constituent des facteurs de risque spécifiques, puisque dans ces régions manquent de suivi gynécologique et des pratiques de dépistages réguliers, en raison d'un accès plus difficile aux services de santé (ESMO et FAC, 2012 ; HAS, 2013).

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogénèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

3.2. Infection par le papillomavirus

Les HPV se contractent classiquement au contact de la muqueuse cervicale à l'occasion d'une relation sexuelle avec un partenaire infecté. Cependant tout acte sexuel sans pénétration est associé à un risque d'infection par les HPV et ça dépend de l'âge au moment des premiers rapports sexuels, du nombre de partenaires sexuels au cours de la vie, et du changement récent de partenaire (Goffard, 2012).

La détection de ce virus chez une personne ne signifie pas qu'elle développera un cancer. C'est sa persistance dans l'appareil génital qui est le facteur de risque majeur pour le cancer du col de l'utérus. Lors d'une infection par l'HPV, le virus pénètre au niveau des cellules basales de l'épithélium de la muqueuse cervicale, à la suite d'un microtraumatisme ou d'une lésion tissulaire. L'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte qu'il infecte est l'événement précoce de la cancérogenèse cervicale (Kadaja *et al.*, 2009 ; Schiffman *et al.*, 2011). Sa persistance sous forme de provirus va permettre l'expression d'oncogènes viraux qui joueront le rôle transformant de la cellule cervicale.

3.2.1. Structure de la particule virale HPV

Les papillomavirus humains sont de petits virus mesurant 45 à 55 nanomètres de diamètre, faisant partie de la famille des *Papillomaviridae*. Ce sont des virus non enveloppés comportant une capside icosaédrique à symétrie cubique de 72 capsomères et d'un ADN bicaténaire dont un seul brin est codant. Cet ADN double brin, d'environ 8000 paires de bases, comporte 3 régions différentes [figure 9] (Seedorf *et al.*, 1985 ; Schiffman *et al.*, 2016). Une région précoce E (Early), une région tardive L (Late) et une région non codante de régulation LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*) (Lambert, 1991).

La région E, traduite précocement, est subdivisée en 6 régions (E1 à E7) qui codent des protéines non structurales impliquées dans la réplication, la transcription et la formation cellulaire. Les protéines E6 et E7 sont impliquées dans la transformation tumorale, alors que la protéine E2 inhibe l'expression de ces protéines. La région L, traduite tardivement, code pour les deux protéines structurales formant la capside (L1 et L2). La région non codante LCR ou URR située entre L1 et

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogénèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

E6 contient les promoteurs ainsi que les séquences de régulation de la réplication et la transcription (Mougin *et al.*, 1999 ; Schiffman *et al.*, 2016).

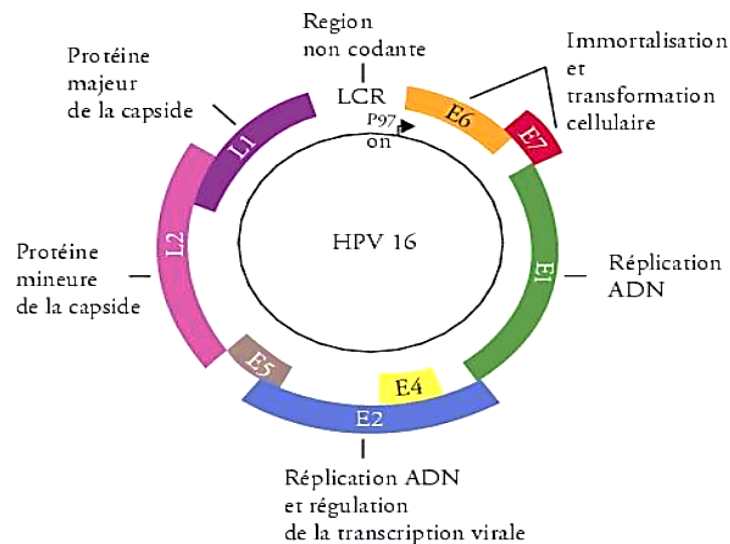


Figure 9 : Représentation schématique du génome d'HPV 16 (NeufCoeur *et al.*, 2009).

3.2.2. Tropisme des HPV et génotypes viraux

Les HPV sont des virus extrêmement répandus qui infectent la peau et les muqueuses, plus précisément les épithéliums malpighiens. Les HPV sont classés en 2 types (alpha et bêta) et plusieurs sous-types (génotypes) selon le degré d'homologie des séquences nucléotidiques. Cent quatre-vingt-neuf génotypes d'HPV ont été caractérisés. Chez l'homme, plus de 120 génotypes de papillomavirus ont été décrits, dont une quarantaine infecte préférentiellement les muqueuses anogénitales (Segondy, 2008).

Les études épidémiologiques sur la relation entre l'HPV et les cancers du col utérin permettent de distinguer les papillomavirus humains en fonction de leur oncogénicité potentielle : HPV à bas risque (à l'origine des condylomes acuminés) et HPV à haut risque oncogènes [Tableau III].

Les HPV ont un tropisme exclusif pour les cellules métaplasiques des jonctions des épithéliums malpighiens et glandulaires. Ils ont un effet cytopathogène caractéristique avec transformation des kératinocytes en koilocytes. Ils sont responsables de lésions généralement

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogénèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

bénignes mais peuvent être à l'origine de cancers. Les infections par HPV sont communes tout au long de la vie adulte chez les femmes sexuellement actives, et guérissent le plus souvent spontanément, sans signe clinique. Une infection persistante est cependant retrouvée chez 3 à 10% des femmes infectées (Schiffman *et al.*, 2016).

Tableau III : Classification des HPV alpha basée sur le potentiel oncogène (HAS, 2013).

Type d'HPV	Génotype	Pathogénécité
Groupe 1	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Oncogène
Groupe 2A	68	Probablement oncogènes
Groupe 2B	5, 8, 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 30, 34, 69, 85, 97	Possiblement oncogènes
Groupe 3	6, 11, autres	Non classables comme oncogènes

Les papillomavirus humains à haut risque identifiés dans les cancers invasifs du col de l'utérus sont par ordre de fréquence décroissante les génotypes 16, 18, 31, 33, 68, 45, 52 et 58. Le génotype 16 et le génotype 18 sont responsables de la plupart des cancers invasifs du col de l'utérus (HAS, 2013).

3.2.3. Cycle viral

3.2.3.1. Cycle viral lytique

Caractérisé par une spécificité d'hôte étroite, les papillomavirus présentent un tropisme pour les épithéliums cutanéomuqueux. Les cellules cibles des HPV sont les kératinocytes présents dans les couches basales des épithéliums et la progression du cycle de réplication virale va s'effectuer en parallèle de la différenciation de ces cellules épidermiques. À la suite de microlésions, les HPV pénètrent les épithéliums et infectent ces cellules basales qui sont le siège du renouvellement permanent de l'épithélium. Après internalisation du virus au sein de la cellule, l'ADN viral est transporté jusqu'au noyau où il est maintenu sous forme d'épisome (ADN circulaire extra chromosomique). Le virus ne possédant pas les enzymes nécessaires, la réplication de son ADN est dépendante des enzymes de la cellule hôte. Au niveau des couches basales de l'épithélium, la

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogenèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

multiplication du génome viral dans sa forme épisomale va se faire de manière limitée à raison de 50 à 100 copies par cellules (Mougin et Dalstein, 2004 ; Kadaja *et al.*, 2009).

Lors de l'ascension des cellules vers la couche superficielle de l'épiderme, la réplication virale s'intensifie. Cette phase d'amplification conduit à la réplication du génome viral de 1000 à 10 000 copies par cellule ainsi qu'à une forte expression des protéines précoces [figure 10]. Les promoteurs des gènes tardifs sont activés dans les couches superficielles de l'épithélium et conduisent à l'expression des protéines L1 et L2 de la capsid permettant l'encapsulation du génome du virus et la formation de nouveaux virions (Mougin et Dalstein, 2004).

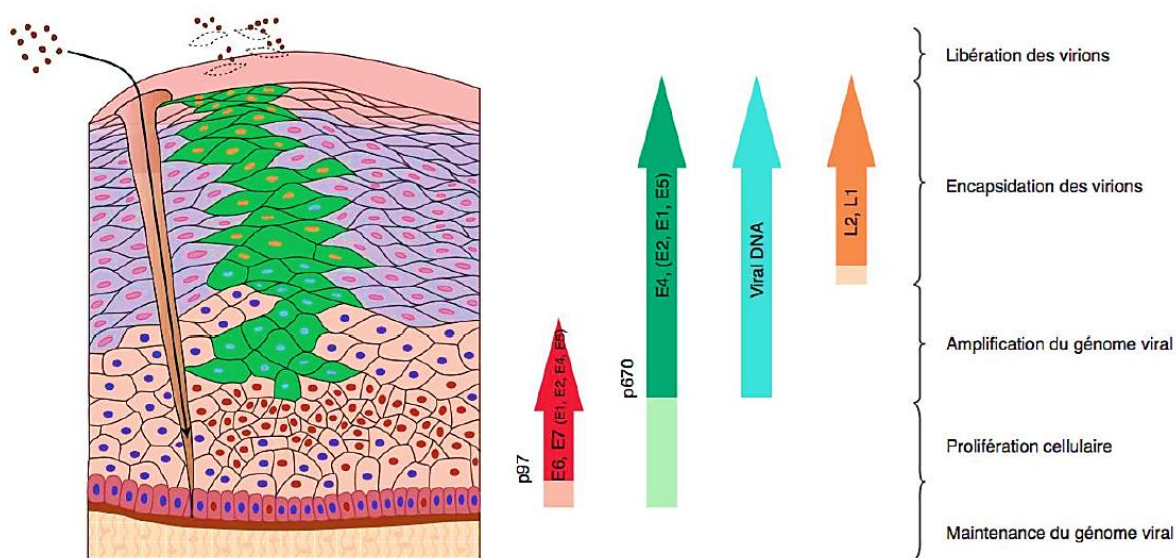


Figure 10 : Cycle infectieux de l'HPV. Les cellules présentant des noyaux rouges sont les cellules infectées au sein desquelles les protéines virales sont exprimées. La morphologie des cellules dépend de l'expression des protéines virales en particulier d'E6 et E7. Leur expression va être nécessaire à la réplication du génome. Les protéines de capsid L1 et L2 vont être exprimées au sein des cellules contenant l'ADN amplifié au niveau de couches supérieures (adaptée de : Doorbar, 2005).

Les virions matures sont donc libérés dans le milieu extérieur au cours de la desquamation des couches superficielles épithéliales. Les virions libérés vont pouvoir se propager au sein d'un même épithélium ou être transmis à un autre individu par contact direct. La libération de virions définit une infection productive. La production virale varie selon la nature de l'épithélium infecté. Elle est très importante dans les verrues plantaires et variables dans les lésions du col utérin, selon que l'infection est clinique, infra-clinique ou latente. L'infection virale productive se traduit par un

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogénèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

effet cytopathogène caractéristique, la koïlocytose. Les koïlocytes sont les cellules atypiques sur un frottis, présentant une vacuolisation cytoplasmique périnucléaire ou un halo, qui traduisent les changements cytopathologiques liés à l'infection HPV (Denis *et al.*, 2008).

3.2.3.2. Cycle viral intégratif

Les HPV peuvent emprunter un autre cycle, non lytique. Le virus reste, dans ce cas, à l'état latent dans les cellules basales de l'épithélium, son génome persistant soit sous forme épisomique, soit, le plus souvent, intégré au génome cellulaire. Le génome se retrouve sous forme épisomique dans les condylomes et les lésions de bas grade, mais majoritairement sous forme intégrée au génome cellulaire dans les lésions de haut grade et dans les cancers. Dans cet état de latence, les protéines tardives ne sont pas exprimées et il n'y a donc plus de production de virions (Denis *et al.*, 2008).

3.2.4. Oncogénèse virale

Le mécanisme de la carcinogénèse des papillomavirus est lié à une perturbation de la multiplication cellulaire qui n'apparaît que de manière tardive si l'infection par des HPV oncogènes persiste.

3.2.4.1. Intégration du génome

Dans la majorité des cancers invasifs, les séquences d'ADN de l'HPV sont intégrées au génome de la cellule hôte. Cette intégration est un événement terminal dans le cycle du virus car une fois le génome intégré, la réplication virale est bloquée. Dans ce type de réplication du virus, l'intégration de l'ADN est une étape importante dans la progression vers le cancer. Cette étape ne concerne que les HPV à haut risque. L'intégration se produit au niveau de la phase ouverte de lecture E1/ E2. Il s'ensuit une perte d'expression de la protéine E2 qui n'inhibe plus l'expression des protéines E6 et E7. La production exagérée de ces dernières entraîne une instabilité génomique et une prolifération cellulaire incontrôlée (Mougin *et al.*, 1999, 2008). Dans les lésions précancéreuses du col de l'utérus, le génome viral est essentiellement présent dans les cellules dysplasiques sous forme épisomale. Ainsi, l'intégration n'est jamais observée dans les néoplasies intraépithéliales de stade I, et n'est notée que dans moins de 5% des néoplasies plus sévères. En revanche, l'intégration est observée dans trois quarts des cancers HPV 16 positifs, avec parfois

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogenèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

présence mixte épisomale et intégrée, et dans 100% des cancers HPV 18 positifs (Park *et al.*, 1997 ; Burd, 2003).

3.2.4.2. Rôle des oncoprotéines E6 et E7

Les protéines virales E6 et E7 sont responsables de la dégradation respective des protéines cellulaires p53 et pRb qui sont des produits de gènes suppresseurs de tumeur et qui ont pour fonction d'empêcher la prolifération des cellules cancéreuses (zur Hausen, 2002 ; Münger *et al.*, 2004).

3.2.4.2.1. Protéine E6

La cible la plus importante de la protéine E6 est la protéine p53. E6 se lie à une protéine (E6AP) pour former un complexe ternaire avec p53, ce qui aboutit à la dégradation de la protéine p53 [figure 11]. Or, la p53 est la protéine « gardien du génome » : si l'ADN est lésé, la p53 arrête transitoirement le cycle cellulaire en phase G1 pour permettre la réparation de l'ADN. Si l'ADN est trop endommagé, elle engage la cellule dans un programme d'apoptose. Ainsi, E6 perturbe la réponse cellulaire à p53, empêchant alors l'arrêt de la croissance et l'apoptose induits par cette protéine et contribue donc à l'accumulation des mutations génomiques dans les cellules infectées. Dans le cas des papillomavirus à faible risque, l'interaction p53-E6 se révèle beaucoup plus faible que pour les HPV à haut risque. En effet, dans les cellules transformées par HPV 16 ou 18 on retrouve un taux de p53 très faible ce qui traduit une interaction forte entre E6 et p53 donc une forte dégradation de la p53 (Burd, 2003 ; Münger *et al.*, 2004).

3.2.4.2.2. Protéine E7

La protéine E7 se fixe spécifiquement à la forme hypophosphorylée de la protéine pRb et conduit à sa dégradation. Or, la forme hypophosphorylée de pRb est considérée comme la forme biologiquement active. Cette liaison perturbe le complexe entre la protéine pRb et le facteur de la transcription cellulaire E2F, entraînant la libération de ce dernier, ce qui permet la transcription de gènes dont leurs produits sont nécessaires pour entrer dans la phase S du cycle cellulaire. Le produit du gène E7 peut également s'associer à d'autres protéines cellulaires interactives sur le plan mitotique telles que la cycline E. Le résultat est la stimulation de la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire (Burd, 2003 ; Gariglio *et al.*, 2016).

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogénèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

L'inhibition de l'activité des protéines p53 et pRb par ces oncoprotéines ouvre la voie à de multiples dérégulations favorables au processus malin mais à cela s'ajoutent d'autres fonctions de E6 et E7 contribuant à diverses étapes de l'oncogénèse [figure 11]. La protéine E5 pourrait aussi avoir un pouvoir transformant. Cependant, l'intégration du génome d'HPV conduit fréquemment à la perte de son expression, ce qui suggère que cette protéine n'ait pas le plus grand rôle dans le processus de malignité des cellules (Münger *et al.*, 2004).

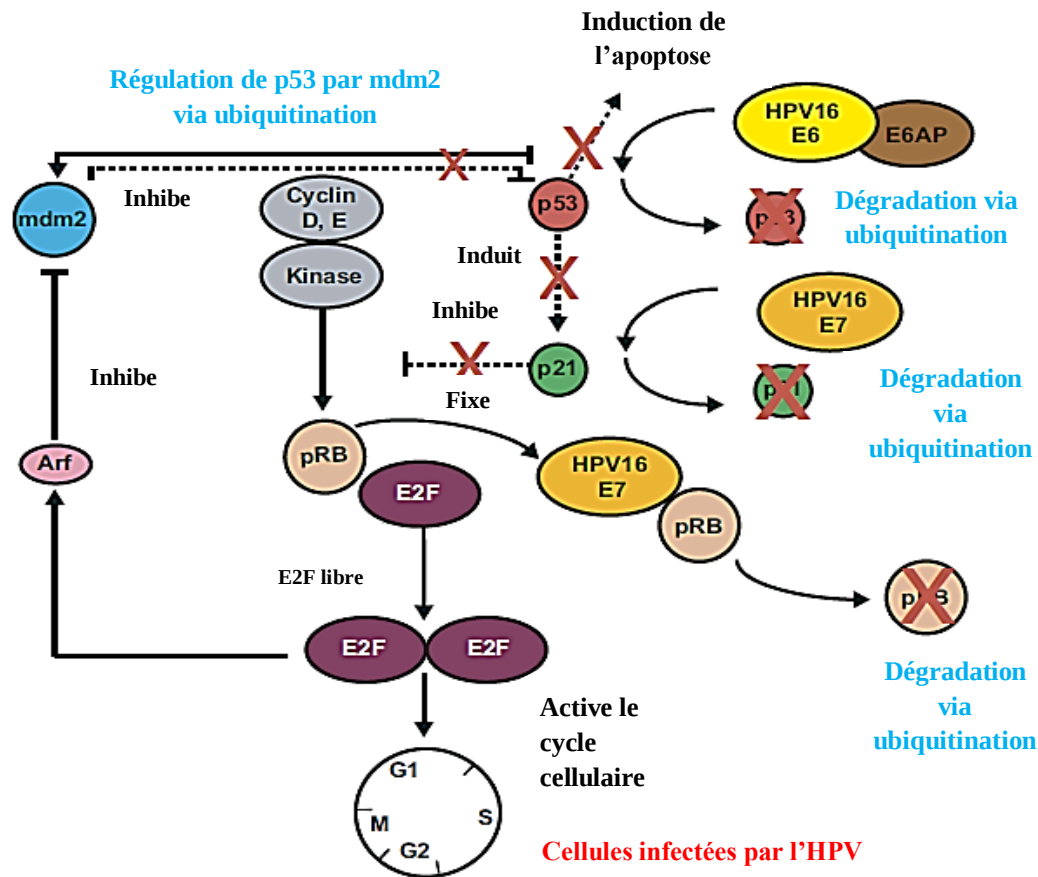


Figure 11 : Les effets des protéines virales E6 et E7 sur la prolifération cellulaire (adaptée de : Hiller et Iftner, 2004).

3.2.5. Réponse immunitaire à l'infection par l'HPV

Lors d'une infection naturelle par les HPV, il existe une immunité basée d'une part sur la production d'anticorps neutralisants qui s'opposent à la pénétration du virus dans les cellules cibles, et d'autre part sur une réponse immunitaire cellulaire s'opposant à l'extension des lésions existantes et à leur transformation. Après pénétration, le virus est pris en charge par les cellules de Langerhans qui migrent vers les follicules lymphoïdes et jouent leur rôle de cellules présentatrices

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogenèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

de l'antigène ce qui conduit à la production de lymphocytes B et lymphocytes T CD4 et CD8 (Onon, 2004).

3.2.5.1. Réponse humorale

La réponse humrale est la production d'anticorps qui sont dirigés contre les protéines de structure du virus, L1 et L2, et s'opposent à la pénétration des virus dans les kératinocytes cibles. Ce sont les lymphocytes B, aidés par les lymphocytes CD4, qui sont responsables de la production d'anticorps. Après une infection à HPV, des anticorps neutralisants sont détectés à la fois dans le sérum et dans les sécrétions vaginales. Ces anticorps agissent comme des gardiens à la surface du col pour neutraliser et éliminer les papillomavirus qui pourraient s'y présenter. Ces anticorps sont synthétisés tardivement, 6 à 12 mois après une infection persistante, et seulement 72% des femmes infectées de manière persistante par HPV 16 ou 18 vont synthétiser des anticorps. Ces anticorps transsudent du sérum vers les sécrétions cervicales à une concentration dix à vingt fois plus faible. Le virus ne circulant pas dans le sang (car il est pris directement en charge par les cellules de Langerhans), la stimulation des lymphocytes B est faible ce qui conduit à un faible taux d'anticorps et peu de cellules mémoire. Les anticorps responsables de l'immunité humorale naturelle ne jouent donc aucun rôle dans le contrôle des infections déjà établies ou l'évolution des lésions et ont peu d'impact sur une réinfection ultérieure par le même virus (Onon, 2004).

Pour prévenir le cancer du col de l'utérus et stimuler le système immunitaire, des vaccins anti-HPV ont été développés. Ces vaccins reposent sur le principe de la vaccination prophylactique, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un vaccin indiqué dans la prévention primaire des infections à HPV, à base de particules pseudo-virales L1 (VLP : *Virus Like Particles*). Les VLP possèdent une morphologie quasiment identique à celle du virus et trompent le système immunitaire qui induit alors la production d'un fort taux d'anticorps sériques, neutralisants et spécifiques. Ces derniers sont dirigés contre la protéine L1 du virus. Ils sont ensuite transsudés du sérum vers la muqueuse cervicale où ils pourront neutraliser les virions avant leur entrée dans les cellules basales de l'épithélium en se fixant à la protéine L1 de la capside virale. Ce processus prévient l'acquisition d'une infection à HPV (Riethmuller et Brun, 2010).

CHAPITRE 3. Facteurs de risque, oncogenèse virale et immunité du cancer du col de l'utérus

3.2.5.2. Réponse cellulaire

Comme pour toute infection virale, les lymphocytes T CD4 et CD8 jouent un rôle dans le contrôle de l'infection par HPV. Lors de l'infection, les cellules de Langerhans de l'épithélium malpighien internalisent le virus et le transportent au ganglion drainant où elles présentent les antigènes viraux aux lymphocytes T. La réponse cellulaire passe notamment par les lymphocytes CD8 qui ont la capacité de détruire les kératinocytes infectés. Cette réponse immunitaire cellulaire est essentielle dans le processus de défense contre les HPV. En effet, la régression des lésions génitales est associée à une forte réaction immunitaire à médiation cellulaire car les lésions qui sont spontanément régressives contiennent plus de lymphocytes T et de macrophages que les lésions qui ne régressent pas. C'est pour cela que les patients immunodéprimés HIV positifs réactivent souvent HPV et développent des cancers (Da Silva *et al.*, 2001).

Chez certains sujets, les HPV à haut risque échappent au système immunitaire comme en témoignent les infections persistantes et la progression des lésions vers des formes précancéreuses et cancéreuses. Ces mécanismes d'échappement semblent liés :

- à la faible ou l'absence de production de particules virale, l'infection étant productive surtout dans les lésions de type condylomes,
- à l'absence de lyse cellulaire qui s'accompagne alors d'une absence de réaction inflammatoire et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires locales, contribuant à un défaut d'activation lymphocytaire,
- au déficit de l'initiation de la réponse immunitaire par des mécanismes de défaut de présentation des antigènes viraux.

Ainsi, tous ces mécanismes concourent à limiter la réponse immunitaire ce qui va favoriser la persistance et la progression des infections génitales à HPV (Hantz *et al.*, 2005).

CHAPITRE 4.

Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

4.1. Régulation du cycle cellulaire et apoptose

4.1.1. Régulation du cycle cellulaire et perturbation tumorale

Le cycle cellulaire des eucaryotes supérieurs comprend quatre phases. Durant la phase S et la phase M, les cellules exécutent les deux événements fondamentaux du cycle cellulaire qui sont la réplication de l'ADN et le partage égal des chromosomes entre les deux cellules filles. Les deux autres phases du cycle, G1 et G2, représentent des intervalles de préparations. Au cours de la phase G1, la cellule, intègre les signaux mitogènes ou anti-mitogènes, effectue sa croissance et se prépare pour effectuer correctement la phase S ; au cours de la phase G2, la cellule se prépare pour la phase M.

La cellule dispose de systèmes de régulation hautement perfectionnés pour assurer, d'une part, l'ordre immuable de la succession des quatre phases du cycle (régulation du cycle), et d'autre part, l'obtention de deux cellules filles rigoureusement identiques (surveillance de l'ADN). Dans le premier cas, ce sont essentiellement des kinases cycline-dépendantes (CDK : *Cycline-Dependant Kinase*), qui interviennent tout au long du cycle dans un ordre déterminé (en phase G1 et pour la transition G1/ S, c'est à dire pour le déclenchement de la réplication de l'ADN, en phase S pour la poursuite de la réplication, en phase G2 et pour la transition G2/ M, c'est à dire pour le déclenchement et l'exécution de la mitose). Dans le second cas, d'autres molécules interviennent dans différents mécanismes de surveillance du cycle pour inhiber les CDK et arrêter le cycle, si l'étape précédente n'est pas terminée, ou si une "réparation" est nécessaire (Lebart *et al.*, 2004).

Les CDK sont des enzymes de type sérine-thréonine kinases, qui catalysent la phosphorylation de protéines cibles jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire (réplication de l'ADN, compaction des chromosomes, fragmentation de l'enveloppe nucléaire...), ou dans l'avancement du cycle. Leur fonction consiste à transférer le groupement γ -phosphate de l'ATP sur une thréonine ou une sérine, présentes dans les protéines cibles, à condition que ces acides aminés soient dans une séquence d'acides aminés caractéristique (séquence consensus) spécifiquement reconnue par la kinase (exemple : Ser/ Thr-Pro-X-Arg/ Lys). Cette phosphorylation provoque un changement de conformation des protéines cibles, ce qui entraîne l'apparition de nouvelles propriétés pour ces dernières tel que le changement de partenaire d'interaction, l'activation ou l'inhibition. Les CDK sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

sous-unité catalytique (CDK) et une sous-unité régulatrice (cycline). Donc selon que les CDK sont associées ou non à leur cycline, elles peuvent donc être sous forme activée ou désactivée (Lebart *et al.*, 2004 ; Weber, 2007).

Les cyclines apparaissent puis disparaissent brusquement à des moments précis du cycle, de façon périodique, donc elles ne sont pas présentes pendant tout le cycle. Elles ont été appelées cycline car leurs concentrations varient périodiquement au cours du cycle cellulaire. D'après le séquençage du génome humain il existerait 13 CDK et 25 cyclines, mais toutes les possibilités de formation de complexes CDK/ cycline ne sont pas connues (Lebart *et al.*, 2004). Le complexe CDK/ cycline est régulé positivement par la concentration en cyclines et par la phosphorylation induite par CAK (*CDK Activating Kinase*). Le principal rôle des cyclines est d'activer les protéines CDK en formant des complexes avec elles ; il y en a 8 : A, B, C, D, E, F, G, H dont chacune possède un mode unique d'expression au cours du cycle. Les cyclines D sont synthétisées au début de la phase G1 et se lient avec les CDK4 et CDK6 ; en formant des complexes intervenant dans la progression au cours de la phase G1. Le complexe : cycline E/ CDK2 joue un rôle dans la transition G1/ S et dans le déroulement de la phase S. Les cyclines A et B s'associent à CDK1 et participent à la transition G2/ M [figure 12, annexe V] (Weber, 2007).

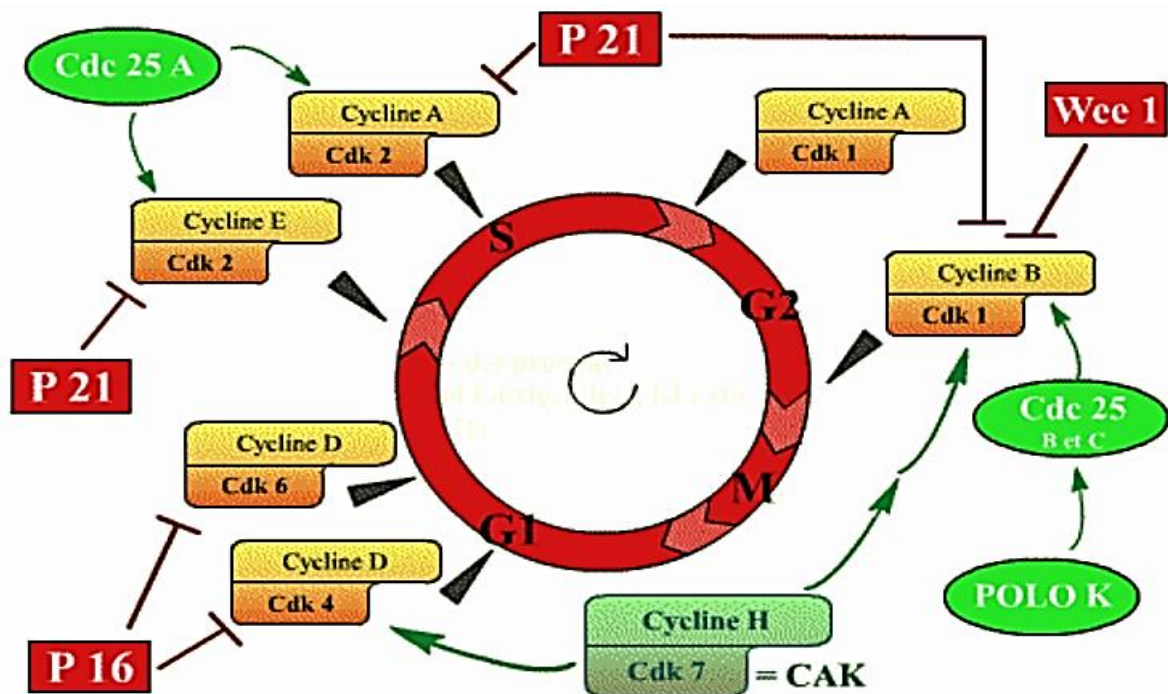


Figure 12 : Les protéines CDK, cyclines et CKI impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. CAK : *CDK Activating Kinase* ; CDC : *Cell Division Cycle* (Lebart *et al.*, 2004).

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

Il existe aussi des protéines inhibitrices du cycle cellulaire, selon leur action ; on trouve deux catégories : les membres de la famille (p21 ; p27 et p57) inhibent les complexes cyclines/ CDK en se liant à eux. Par contre ; les membres de la famille (p16 ; p15 ; p18 et p19) entrent en compétition avec les cyclines pour la liaison aux CDK [figure 12] (Lim et Kaldis, 2013).

4.1.2. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Les cellules tumorales sont le siège d'une suite d'accidents génétiques aléatoires soumis à la sélection naturelle, il y a une rupture des contraintes normale de la prolifération cellulaire. Un nombre de gènes restreint est impliqué ; les gènes de régulation de la prolifération cellulaire peuvent être regroupés en deux classes non disjointes : des gènes de stimulation (les oncogènes) et des gènes d'inhibition (les gènes suppresseurs de tumeur). Donc le cancer est le résultat d'une série importante d'accidents génétiques et/ ou épigénétiques aléatoires conduisant à la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale.

Un proto-oncogène est un gène normal, habituellement concerné par la régulation de la prolifération cellulaire, qui peut être converti par une mutation en un oncogène favorisant le cancer. Par exemple des mutations au niveau de quelques promoteurs se traduisaient par la surexpression de certains gènes, tel que la protéine Bcl-2 (Monier, 2000).

Un anti-oncogènes ou gène suppresseur de tumeur inhibe la division cellulaire et dont la perte de fonction est impliquée dans la progression tumorale. L'altération du gène suppresseur de tumeur aboutit à une perte de fonction de la protéine correspondante. L'inactivation de ces gènes peut être due à des mutations inactivatrices, des méthylations sur le promoteur des gènes ou par l'effet direct des oncogènes viraux. Les remaniements chromosomiques (délétions, inversions, translocations ou duplications) soit sont caractérisés par des déplacements de fragments chromosomiques, soit conduisent au gain ou à la perte de matériel génétique. Les chromosomes ainsi remaniés peuvent provoquer des modifications d'activité au niveau des gènes déplacés (Monier, 2000).

4.1.3. L'apoptose

Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 pour définir une forme de mort cellulaire différente de la nécrose. L'apoptose est un processus physiologique actif de mort cellulaire, utilisée pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées,

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort « suicide cellulaire ». Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire (Kerr *et al.*, 1972 ; Hongmei, 2012 ; Siddiqui *et al.*, 2015).

4.1.3.1. Acteurs moléculaires de l'apoptose

4.1.3.1.1. Récepteurs membranaires de la famille du TNF- α

Les membres de la famille du TNF- α ainsi que leurs récepteurs jouent un rôle important dans l'apoptose (MacEwan, 2002). Les différents membres de cette famille qui ont été identifiés sont TNF- α , RANKL, FasL, les ligands similaires au TNF- α induisant l'apoptose (TRAIL), lymphotoxine α , lymphotoxine β , CD27L, CD30L, CD40L, CD137L, OX40L, LIGHT, TWEAK, APRIL, TL1 et BAFF. La majorité de ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires avant que leurs domaines extracellulaires soient clivés par des métalloprotéases. Les ligands sont produits sous une forme trimérique et ont chacun un ou plusieurs récepteurs spécifiques. Ces récepteurs appartiennent à la famille du récepteur au TNF α . Ce sont des protéines transmembranaires caractérisées par un motif extracellulaire riche en résidus cystéines et un domaine intracellulaire contenant un motif peptidique caractéristique dit "domaine de mort" (DD : *Death Domain*). Pour certaines cellules de l'immunité, tous ces ligands n'induisent pas la mort cellulaire. Au contraire, ils peuvent induire notamment des signaux de survie. D'autres ligands auront un rôle différent sur l'apoptose en fonction du type cellulaire. La mort initiée par ces ligands requiert la trimérisation des récepteurs et conduit à l'activation des caspases cytoplasmiques (MacEwan, 2002 ; Ashe et Berry, 2003 ; Hongmei, 2012).

4.1.3.1.2. Les caspases

Les caspases sont des cystéines protéases pouvant intervenir dans le processus de mort cellulaire après stimulation des cellules par différents facteurs. Elles ont un rôle primordial dans l'initiation et dans l'exécution de l'apoptose. Le terme caspase a été proposé par Alnemri *et al.* en 1996, le « C » représente la cystéine du site actif et « aspase » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. Une autre protéase connue pour avoir la même spécificité est le Granzyme B, une sérine protéase contenue dans les granules des cellules cytotoxiques qui initie la mort par apoptose des cellules cibles. Toutes les caspases

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et elles ont une structure conservée. Les caspases sont constituées d'un pro-domaine de taille et de séquence variables localisé dans la partie amino-terminale de la protéine, d'une grande sous-unité (20 kDa) située au milieu de la molécule et d'une plus petite sous unité (10 kDa) localisée dans la partie carboxy-terminale (MacEwan, 2002 ; Ashe et Berry, 2003). L'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus, permettant de couper le pro-domaine et de séparer les deux sous-unités. Les caspases peuvent s'autocliver et activer d'autres caspases ou substrats formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques. Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité nécessite la liaison à la petite sous-unité. Les caspases actives sont sous forme de tétramères formés par l'association de deux hétérodimères, contenant deux sites catalytiques indépendants. Il existe deux principales voies caspases-dépendantes de signalisation de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). Une autre voie apoptotique caspase-indépendante est initiée par la mitochondrie grâce à la libération de l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) (MacEwan, 2002 ; Hongmei, 2012).

4.1.3.1.3. Membres de la famille Bcl-2

La protéine Bcl-2 (*B Cell Lymphoma 2*) a d'abord été identifiée comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires, où une translocation chromosomique conduit à une expression constitutive de son gène (Tsujimoto et Groce, 1986). Puis, il a été montré que cet oncogène était responsable d'une inhibition de l'apoptose plutôt que d'une activation de la prolifération cellulaire. Les membres de la famille Bcl-2 sont des régulateurs de l'apoptose. Cette famille contient près de 30 protéines peut être divisée en deux groupes en fonction de leur activité : les protéines possédant une activité anti-apoptotique et les protéines possédant une activité pro-apoptotique. Ces deux groupes diffèrent par leur structure mais quatre régions sont communes, il s'agit des domaines BH (*Bcl-2 Homology*). Les régions BH1, 2 et 3 forment la poche hydrophobe capable de lier un domaine BH3 appartenant à une autre protéine (Siddiqui *et al.*, 2015).

- Les membres de la famille Bcl-2 qui sont anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL et Bcl-w contiennent les domaines BH1, 2, 3 et 4 (Tsujimoto, 1998 ; Ashe et Berry 2003 ; Shamas-Din *et al.*, 2013).
- Les membres pro-apoptotiques se divisent en deux sous-groupes, ceux qui possèdent les 3 domaines (BH1, 2 et 3) comme Bax, Bak, et ceux qui possèdent uniquement le domaine BH3

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

comme Bid, Bad, Bik encore appelés BH3-Only proteins [figure 13] ; la région BH3 semble être fortement impliquée dans l'activité pro-apoptotique. La région BH4 et les séquences proches, présentes dans les protéines anti-apoptotiques uniquement, peuvent être phosphorylées. Par complexation avec d'autres protéines, comme la calcineurine, ce domaine permet de faire un lien avec d'autres voies que l'apoptose (Ashe et Berry 2003 ; Shamas-Din *et al.*, 2013 ; Siddiqui *et al.*, 2015).

Toutes les protéines de la famille Bcl-2 contiennent un domaine carboxy-terminal hydrophobe de 20 acides aminés (*Membrane-Bound Region* « MBR ») permettant leur ancrage dans la membrane intracellulaire en majorité au niveau de la mitochondrie mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (Tsujimoto, 1998 ; Shamas-Din *et al.*, 2013).

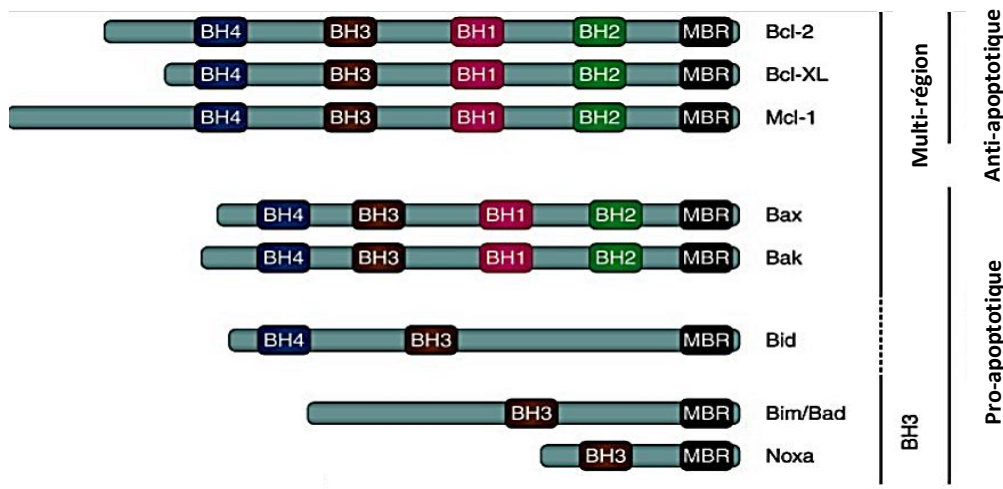


Figure 13 : Les membres de la famille Bcl-2 (Adaptée de : Shamas-Din *et al.*, 2013).

4.1.3.2. Protéine Bcl-2

Il s'agit d'une protéine anti-apoptotique qui permet la survie cellulaire. La protéine Bcl-2 est associée aux membranes et se localise de façon prédominante au niveau des mitochondries. L'hyperexpression de la protéine Bcl-2 prévient dans de nombreux systèmes tels que les manifestations nucléaires de l'apoptose et les anomalies mitochondriales précoces, la production de radicaux libres et la libération mitochondriale du cytochrome C et de la protéine AIF (Decaudin *et al.*, 1998 ; Siddiqui *et al.*, 2015).

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

Le spectre d'action de la protéine Bcl-2 est important. En effet, Bcl-2 s'oppose à l'apoptose induite par de nombreux agents cytotoxiques, radiations ionisantes, glucocorticoïdes, privation en facteurs de croissance et hypoxie (Shimizu *et al.*, 1995 ; Decaudin *et al.*, 1997). En particulier, Bcl-2 contrôle la voie apoptotique de p53, qui est initiée en amont de l'effecteur central mitochondrial (Chiou *et al.*, 1994). Inversement, Bcl-2 ne semble pas prévenir de façon complète la mort cellulaire induite par le récepteur Fas impliqué dans la cytotoxicité des lymphocytes T (Susin *et al.*, 1997). De même, l'apoptose induite par le calcium ou certaines substances qui se fixent aux thiols de la chaîne respiratoire mitochondriale (diamide) n'est pas bloquée par l'hyperexpression de la protéine Bcl-2 (Kroemer *et al.*, 1997). L'ensemble de ces observations souligne donc la complexité de la régulation de la phase effectrice de l'apoptose, et en particulier du pore de transition de perméabilité. Bcl-2 régule ainsi la mort cellulaire programmée en maintenant le potentiel membranaire de la mitochondrie et en contrôlant la libération de différents facteurs apoptogènes dans le cytoplasme de la cellule. Elle empêche l'oligomérisation Bax/ Bak et l'insertion de ces dimères dans la membrane mitochondriale externe. Une étude a démontré toutefois que Bcl-2 a une plus forte affinité pour Bax que Bak. L'inhibition de Bak implique plutôt Bcl-xL et Mcl-1 (Ku *et al.*, 2011). Bcl-2 inhibe Bax par la formation d'hétéro-dimères via le domaine BH4. Les structures de ces hétéro-dimères sont similaires aux homo-dimères de Bax (Ding *et al.*, 2010).

Bcl-2 n'est pas seulement localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Elle est également présente au niveau de l'enveloppe nucléaire ainsi qu'au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Schinzel *et al.*, 2004). En effet, le domaine BH4 de Bcl-2 interagit avec le récepteur à l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3R). L'IP3R fait partie d'une famille de canaux Ca^{2+} permettant la libération du calcium et principalement localisé au niveau du réticulum endoplasmique. Ainsi cette interaction Bcl-2/ IP3R aboutit à la diminution des échanges de calcium du réticulum vers la mitochondrie et donc à une inhibition de l'apoptose (Monaco *et al.*, 2012). Donc la direction ou non vers l'apoptose dans une cellule, est définie par le ratio entre les protéines pro-apoptotiques (comme Bax) et anti-apoptotiques (comme Bcl-2). Un excès de Bcl-2 détermine la survie cellulaire et un excès de Bax détermine la mort cellulaire ou apoptose (Shamas-Din *et al.*, 2013).

Dans de nombreuses tumeurs, l'expression de Bcl-2 est augmentée et protège les cellules contre la mort cellulaire. La surexpression de Bcl-2 a tout d'abord été découverte dans les

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

lymphomes folliculaires en 1984. Les lymphomes correspondent à la prolifération maligne d'un type cellulaire dans le tissu lymphoïde. Les lymphomes se développent initialement au niveau des organes lymphoïdes ganglionnaires ou extra-ganglionnaires. Tous les organes du tissu lymphoïde peuvent ensuite être atteints d'emblée ou secondairement. Cette surexpression est due à la translocation t (14 ; 18) (q32 ; q21). La conséquence de cette translocation est la surexpression, dans les lymphocytes B portant la modification, d'une protéine Bcl-2 qui ne diffère pas de la protéine sauvage. L'excès de Bcl-2 empêche la sortie du cytochrome C de la mitochondrie, cela pousse l'équilibre vers la survie cellulaire et donc vers un échappement de l'apoptose. La présence d'un réarrangement Bcl-2-immunoglobuline n'est pas synonyme de transformation cellulaire et donc d'un développement tumoral. En effet, ce réarrangement a été identifié dans des tissus lymphoïdes normaux. Le développement tumoral est dû au fait que la surexpression de Bcl-2 n'est que l'un des événements associés à la prolifération lymphoïde, des altérations génétiques additionnelles étant nécessaires à la transformation maligne (Pezzella *et al.*, 1990 ; Vaandrager *et al.*, 2000).

Au cours du développement tumoral, le taux de Bcl-2 augmente et l'apoptose diminue. Pour résumer, Bcl-2 est une protéine qui joue un rôle important dans la voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose. Cette molécule anti-apoptotique intervient dans la survie cellulaire en empêchant l'apoptose (Basu et Haldar, 1998).

4.1.3.3. Protéine p53

La protéine p53, a été découverte en 1979 par Linzer et Levine. En 1989, Baker a mis en évidence son rôle anti-oncogène. C'est un facteur qui intervient à l'état normal dans le contrôle négatif du cycle cellulaire, la réparation et la division cellulaire, le contrôle de la stabilité génétique et l'apoptose. Cette protéine est inactivée dans de nombreux cancers et la perte de sa fonction normale n'est pas seulement la perte d'un frein à la prolifération cellulaire mais aussi la perte des capacités de réparation de l'ADN, constituant un facteur d'instabilité du matériel génétique, et de l'échappement à l'apoptose [figure 14] (Muller et Vousden, 2013 ; Saha *et al.*, 2015).

Le gène *TP53* qui code la protéine p53 est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13). Ce gène est particulièrement conservé au cours de l'évolution. Il s'agit d'une phosphoprotéine nucléaire de 53 kDa et de 393 acides aminés répartis en 5 domaines [figure 15].

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

Les principaux domaines sont : le N ter, domaine transactivateur, le domaine de fixation à l'ADN au centre, le C ter et la région de la régulation de l'activité de la protéine (Saha *et al.*, 2015).

En oncologie, la perte de p53 nécessite l'inactivation des deux allèles du gène *p53*. Cette constatation permet de définir la protéine p53 comme un gène suppresseur de tumeur, de la même façon que le gène *pRb*. La protéine p53 peut être inactivé par différents mécanismes comme les mutations germinales et somatiques du gène *p53*, la méthylation du promoteur du gène *p53*, les effets directs des oncoprotéines virales [la protéine E6 d'HPV 16 et l'antigène T du Virus Simien 40 (SV40)]. La protéine p53 peut aussi interagir avec des oncoprotéines cellulaires endogènes, par exemple avec la protéine mdm2. Dans une cellule normale, la protéine mdm2 interagit avec la partie N-terminale de p53, qui est ainsi ciblée pour sa dégradation protéolytique ubiquitine-dépendante. C'est la protéine p53 qui active la transcription de mdm2, établissant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. L'oncogène mdm2 peut être surexprimé dans certaines tumeurs comme les sarcomes des tissus mous. Dans ce cas, p53 est excessivement dégradée et ne peut plus assurer sa fonction (Appella et Anderson, 2001 ; Olivier *et al.*, 2010 ; Muller et Vousden, 2013).

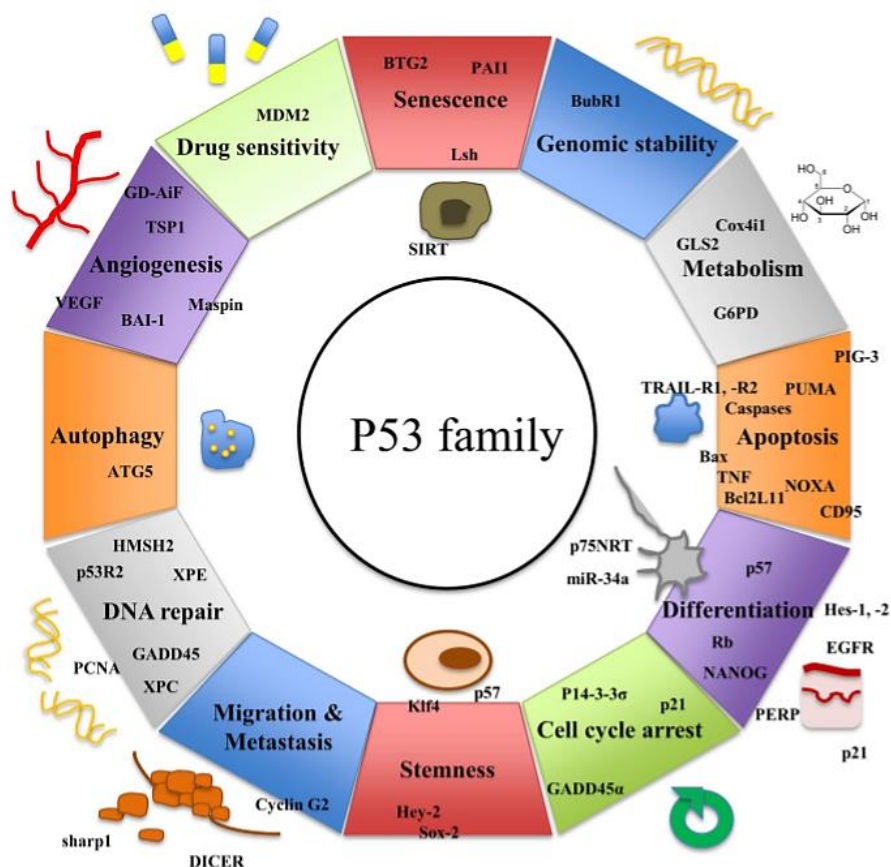


Figure 14 : Fonctions de p53 et ses homologues p63 et p73 et leurs gènes cibles (Pflaum *et al.*, 2014).

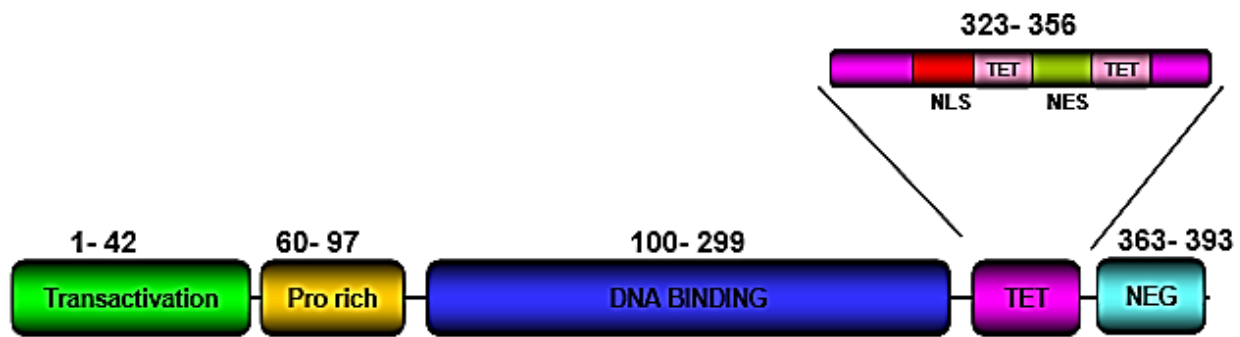


Figure 15 : Schématisation de l'organisation de p53. **Transactivation**, domaine d'interaction avec l'appareil de la transcription. **Pro rich**, domaine riche en proline intervenant dans la voie apoptose et interaction protéine/ protéine. **DNA binding**, domaine de fixation à l'ADN. **TET**, domaine de tétramérisation de p53 contenant aussi les domaines de translocation nucléaire NLS nuclear localisation signal et NES nuclear exportation signal. **NEG**, domaine principal de régulation de p53 (Cortèse et Zemmar, 2007).

4.2. Biomarqueurs et leurs applications

4.2.1. Généralités sur les biomarqueurs

Un biomarqueur est une caractéristique ou un indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. Un biomarqueur est un signe d'un processus normal ou anormal, ou d'un état de santé ou d'une maladie. C'est une molécule biologique trouvée dans les tissus, dans le sang, ou dans d'autres fluides corporels. Un biomarqueur peut être exprimé par une tumeur ou bien elle peut être une réponse spécifique de l'organisme à la présence d'un cancer qui est utilisé pour voir comment le corps réagit à un traitement. Les biomarqueurs sont également appelés marqueurs moléculaires et des molécules de signature. Des biomarqueurs génétiques, épigénétique, protéomique, glycomique, et des biomarqueurs d'imagerie peuvent être utilisés pour le diagnostic, le pronostic et la thérapie du cancer [figure 16] (Mishra et Verma, 2010).

Au cours des 30 dernières années, des efforts considérables ont été entrepris pour identifier de nouveaux biomarqueurs pour un programme de dépistage du cancer du col utérin efficace et rentable. La plupart des travaux ont été effectués sur le rôle du test HPV. En dehors de cela, de nombreux autres marqueurs ont été évalués dans les lésions précancéreuses de cancer du col utérin. En raison de l'accessibilité du col de l'utérus, la plupart des approches se sont concentrées sur l'identification de marqueurs directement dans les échantillons de tissus prélevés sur le col de l'utérus.

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

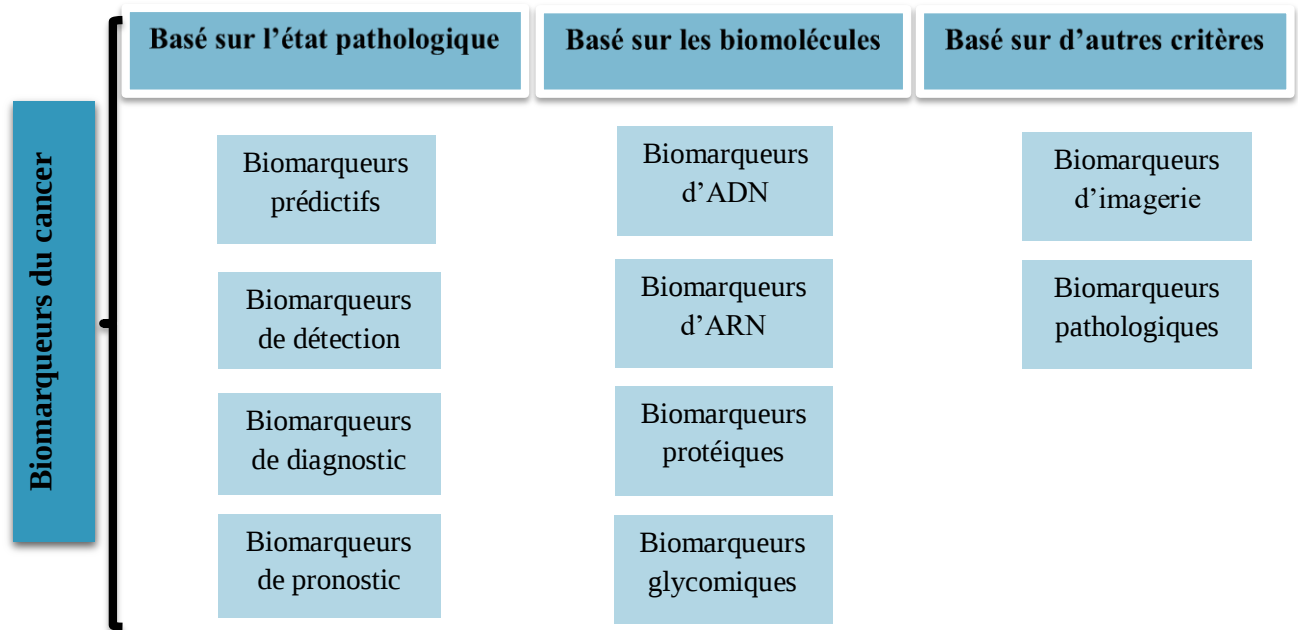


Figure 16 : La classification des biomarqueurs (Adaptée de : Mishra et Verma, 2010).

4.2.2. Applications des biomarqueurs

Il existe plusieurs filières d'applications de biomarqueurs du cancer y compris la détection précoce des cancers, l'amélioration de la productivité de diagnostic histopathologique, et la surveillance des personnes à risque et qui sont sous un suivi post-thérapeutique. Dans le dépistage du cancer du col de l'utérus, les biomarqueurs sont nécessaires et permettent d'identifier les personnes à risque pour développer un cancer au moment encore permet une intervention curative réussie avant le développement d'un cancer invasif (Wentzensen et von Knebel Doeberitz, 2007).

L'utilisation des biomarqueurs devrait être spécifiquement avec la progression de la maladie. Les biomarqueurs pourraient être utilisés pour l'évaluation des risques de lésions détectées, de prévoir la progression et de contrôler les récurrences après traitement. Une filière d'application importante des biomarqueurs de cancer du col utérin pourrait être la discrimination entre CIN1+2 et le traitement sera donc limité aux groupe de CIN1+2 à haut risque comme indiqué par le biomarqueur (Wentzensen et von Knebel Doeberitz, 2007). Le test HPV est recommandé comme option pour trier la cytologie ASC-US (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*). Les biomarqueurs comme l'ARNm d'HPV et la protéine p16 ont été évalués dans les études initiales et ont montré des résultats promoteurs mais n'ont pas la validation dans des grands essais (Cuzick *et al.*, 2006). Les nouveaux biomarqueurs tel que les profils de la méthylation virale et

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

cellulaire pourraient représenter les plus une progression de cancer du col de l'utérus (Tornesello *et al.*, 2013).

La performance du test biomarqueur est caractérisée par des mesures de sensibilité, de spécificité, de valeur prédictive positive (VPP) et de valeur prédictive négative (VPN). Naturellement, il est souhaitable d'avoir des tests, à la fois, de sensibilité et de spécificité élevées. Un manque de sensibilité va entraîner un manque des cas nécessitant un traitement. Un manque de spécificité entraînera une identification de faux positifs cas qui doivent être traités bien qu'ils ne soient pas touchés par la maladie. La VPP et la VPN sont tous deux liés à la performance du test et la prévalence de la maladie. La plus faible prévalence de la maladie est, la plus bas sera la VPP d'un dosage avec une sensibilité et une spécificité données. La VPP indique la proportion des individus testés positifs et vraiment ayant la maladie. La VPN donne une indication de la sécurité d'un dosage, c'est-à-dire combien il est sûr qu'un résultat négatif indique que la maladie n'est pas présente. Il a été estimé que l'introduction des vaccins prophylactiques d'HPV va réduire l'incidence des cancers du col de l'utérus et les précurseurs et réduira donc la VPP des frottis anormaux jusqu'à 10%-20% au lieu de 50-70% dans les régions à forte couverture vaccinale (Franco *et al.*, 2006).

4.2.3. Biomarqueurs du cancer du col de l'utérus

Les biomarqueurs de cancer du col de l'utérus sont divisés en deux groupes : les marqueurs viraux et les marqueurs cellulaires.

4.2.3.1. Marqueurs viraux

Les méthodes de détection de l'ADN et de l'ARN de l'HPV sont attendues pour améliorer les protocoles de dépistage du cancer du col de l'utérus. Plusieurs méthodes sont disponibles pour détecter les HPV tel que l'hybridation de l'ADN mais elle a une sensibilité limitée et elle est très complexe. La meilleure méthode utilisée pour tester l'infection par l'HPV est la PCR ; la capture hybride II et la PCR en temps réel pour tester l'ARNm. Les applications réelles de la détection de l'ADN ou de l'ARN de l'HPV est dans le triage pour limiter le test Pap et le suivre après le traitement des lésions précancéreuses du cancer du col de l'utérus. Mais l'utilisation de ces marqueurs viraux a un vrai rôle dans le diagnostic du cancer du col utérin (Grigore *et al.*, 2013).

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

Le développement du cancer du col de l'utérus est précédé par la surexpression des protéines virales E6 et E7 dans les lésions de haut-grade. Ceci est accompagné par l'intégration de l'ADN d'HPV dans les cellules hôtes. Cette intégration a été considérée comme un marqueur très spécifique pour suivre le traitement et la surveillance de cette tumeur (Pett et Coleman, 2007).

4.2.3.2. Marqueurs cellulaires

Plusieurs types de marqueurs tumoraux sont utilisés dans les cancers gynécologiques, en fonction du type histologique de la tumeur. Les dosages de CA-125, SCC et Cyfra 21-1 sont les marqueurs tumoraux des formes histologiques les plus fréquentes de cancer du col utérin [Tableau IV]. Néanmoins, leur utilisation dans le cadre de la surveillance et de l'évaluation des réponses aux traitements doit obéir à des critères stricts fondés essentiellement sur la connaissance de leurs cinétiques (Borras *et al.*, 1995 ; Molina *et al.*, 2005).

Tableau IV : Marqueurs sériques utiles pour le cancer du col de l'utérus (Dasari *et al.*, 2015).

Marqueur du cancer	Utilisation proposée	Références
SCC-Ag	– Identification des groups à haut risque présentant des métastases ganglionnaires dans les cellules squameuses du col de l'utérus. – Prétraitement, prévision du pronostic du cancer du col utérin dans les cellules squameuses. – Prédiction de la réponse au traitement dans les cellules squameuses du col utérin.	Bolli <i>et al.</i> , 1994 ; Takeda <i>et al.</i> , 2002.
CA-125	– Prédiction pré-thérapeutique du pronostic, en particulier dans l'ADC. – Préopératoire de la présence de métastases ganglionnaires, en particulier dans l'ADC.	Takeda <i>et al.</i> , 2002.
CEA	– Suivi de la maladie, en particulier dans l'ADC. – Prédiction pré-thérapeutique du pronostic. – Prédiction préopératoire de la présence de métastases ganglionnaires, en particulier dans l'ADC. – Prétraitement prédictif de la réponse clinique à la chimiothérapie néoadjuvante.	Disaia <i>et al.</i> , 1977 ; Takeda <i>et al.</i> , 2002.
Cytokératines (TPA, TPS, Cyfra 21-1)	– Prédiction pré-thérapeutique du pronostic. – Suivi de la maladie après un traitement primaire.	Takeda <i>et al.</i> , 2002 ; Kjaer <i>et al.</i> , 2002.
sCD44	– Distinguer les cas des cancers prémalignes des carcinomes malignes.	Dasari <i>et al.</i> , 2014

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

Abréviations du tableau IV : **SCC-Ag** : *Squamous Cell Carcinoma Antigen*, **CA-125** : *Cancer Antigen 125*, **CEA** : *Carcinoma Embryonic Antigen*, **TPA** : *Tissue Polypeptide Antigen*, **TPS** : *Tissue Polypeptide Specific antigen*, **Cyfra 21-1** : *Cytokeratine 21 Fragment*, **sCD44** : *Soluble Cluster of Differentiation 44*, **ADC** : adénocarcinome.

Plusieurs études ont un objectif de déterminer d'autres biomarqueurs et leurs applications dans le diagnostic, le pronostic et le traitement du cancer du col de l'utérus. Ces marqueurs seront des promoteurs potentiels et pourraient être catégorisés en différentes classes tels que les anomalies chromosomiques, les points de contrôle du cycle cellulaire, l'expression des gènes suppresseur de tumeurs, les marqueurs pronostic, les paramètres angiogéniques, les régulations épigénétiques comme la méthylation, les marqueurs métaboliques et d'imagerie. Les avantages des marqueurs sont leurs implications cliniques dans le dépistage, le diagnostic ET le traitement du cancer du col de l'utérus (Grigore *et al.*, 2013).

4.2.3.2.1. Protéine p16^{INK4a}

La protéine p16^{INK4a} est une protéine régulatrice du cycle cellulaire, par l'inhibition des CDK 4 et 6 et la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, son expression est alors strictement contrôlée dans les cellules normales. Dans ces dernières la p16 est exprimée à des taux faibles et généralement non détectables par les méthodes immuno-chimiques, elle peut également être transitoirement exprimée et détectée dans les cellules normales métaplasiques (Wentzensen et Doeberitz, 2007).

La surexpression de la protéine p16 est induite dans les cellules basales de l'épithélium malpighien du col de l'utérus par l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 au cours d'une infection par les HPV à haut risque [figure 17]. La p16 est présente dans presque tous les cancers du col utérin, dans les CIN2, dans les CIN 3, dans les adénocarcinomes avec une expression diffuse sur toute la hauteur de l'épithélium malpighien (Keating *et al.*, 2001).

4.2.3.2.2. Protéine Ki-67

La protéine Ki-67 est un antigène nucléaire avec une demi-vie d'environ 1-1,5 heure. Elle est présente dans toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M), mais elle est absente

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

dans la phase G0. Pendant l'anaphase et la télophase, une forte diminution des taux de Ki-67 se produit (Brown DC et Gatter KC, 2002).

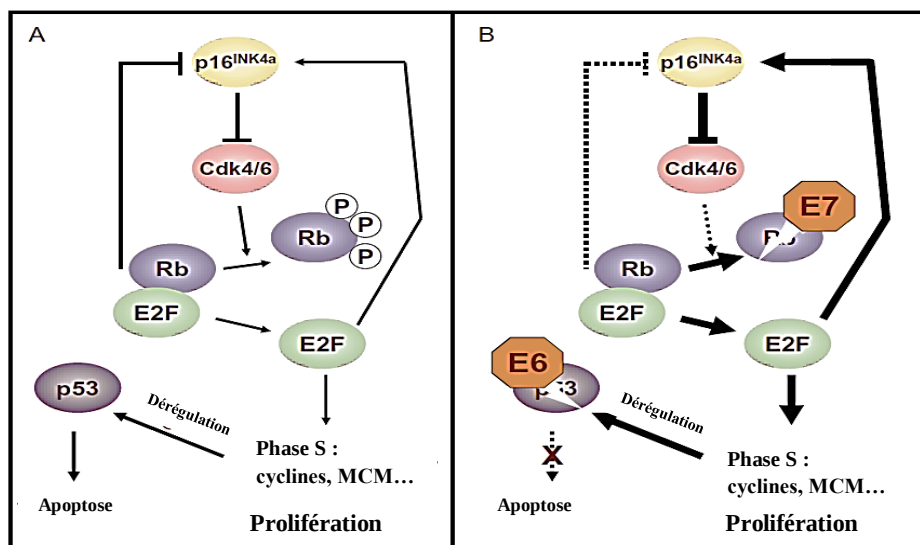


Figure 17 : Un diagramme schématisant des protéines cellulaires impliquées dans la transition G1-S et l'interférence des HPV oncogènes. **A**, une régulation stricte d'E2F dans les cellules normales. La phosphorylation de pRb par CDK 4/ 6 libère E2F de sa fixation avec pRb et conduit à l'expression des gènes de la phase S. L'activité de CDK 4/ 6 est bloquée par p16 qui a été activée par E2F et bloquée par le complexe Rb/ E2F. La dérégulation de l'activation de la phase S dans les cellules normales conduirait à l'apoptose. **B**, l'interférence des oncoprotéines de l'HPV avec la régulation de la phase G1-S. E7 conduit à la perturbation de la fixation E2F-pRb. p16 est surexprimée à cause de la perte de la répression pRb/ E2F et l'activation forte par E2F libre. Cependant, les gènes de la phase S sont activés de façon continue depuis la répression de CDK 4/ 6 médiée par p16 a aucun effet en aval sur pRb. L'apoptose est abrogé par E6 qui a médié la dégradation de p53 (adaptée de : Khleif *et al.*, 1996).

La protéine Ki-67 est exprimée à la périphérie des chromosomes et il agit comme un tensioactif qui permet de maintenir les chromosomes mitotiques séparés. Une participation au maintien du pouvoir prolifératif ou au contrôle du cycle cellulaire est suggérée. L'expression de la protéine Ki-67 est associée à l'activité proliférative des populations cellulaires intrinsèques dans les tumeurs malignes, ce qui lui permet d'être utilisé comme un marqueur de l'agressivité tumorale (Brown et Gatter, 2002).

La valeur pronostique de la protéine Ki-67 a été montrée dans certaines études avec son potentiel en tant que marqueur fiable ayant été montré dans les cancers du sein, du poumon et de la prostate (Ciancio *et al.*, 2012 ; Josefsson *et al.*, 2012 ; Ishihara *et al.*, 2013). Il a été montré que la coloration immunohistochimique de la protéine Ki-67 est une méthode efficace pour évaluer le pronostic dans plusieurs types de tumeurs. En pratique l'index de marquage par le Ki-67 représente

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

le pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps Ki-67 (Dowsett *et al.*, 2011). Dans le cancer du col de l'utérus, la protéine Ki-67 est un marqueur de prolifération cellulaire et elle est surexprimée dans les lésions néoplasiques intraépithéliales, mais elle peut être exprimée dans les cellules basales normales qui ont une capacité proliférative (Grigore *et al.*, 2013).

4.2.3.2.3. Protéine MCM2

MCM2 (*Minichromosome Maintenance Complex Component 2*) est l'une des protéines de maintenance des mini-chromosomes hautement conservées qui participent à l'initiation de la réplication du génome eucaryotique. Le complexe protéique hexamérique formé par les protéines MCM est un élément clé du complexe de pré-réplication (pré-RC) et peut être impliqué dans la formation de fourches de réplication et dans le recrutement d'autres protéines liées à la réplication de l'ADN. Cette protéine forme un complexe avec MCM 4, 6 et 7, et elle régule l'activité hélicase du complexe. Cette protéine est phosphorylée et donc réglementée par les protéines kinases CDC2 et CDC7 (Labib et Diffley, 2001).

L'altération de l'expression de MCM2 peut être une caractéristique de la dérégulation du cycle cellulaire, qui pourrait être un mécanisme essentiel dans le développement et la progression des cancers humains (Shi *et al.*, 2007). Cette protéine est surexprimée dans les dysplasies du col de l'utérus comme un résultat de l'infection par HPV et une activation incontrôlée subséquente de la transcription des gènes et l'induction de la phase aberrante S, qui est médiée par la voie du facteur de transcription E2F. La surexpression de la protéine MCM2 fournit le lien entre l'infection par les HPV oncogéniques et les événements moléculaires des dysplasies du col de l'utérus. Il a été démontré que la surexpression de cette protéine dans les dysplasies de haut-grade pourrait être détectée par l'immunohistochimie (Ishimi, 2003 ; Shi *et al.*, 2007). MCM2 est un marqueur utile pour l'entrée du cycle cellulaire, qui est très abondant dans le noyau dans l'ensemble du cycle cellulaire et la perdu de la terminaison du cycle cellulaire, avec un perdu rapide de différenciation (Rusiniak *et al.*, 2012).

4.2.3.2.4. Topoisomérase 2 alpha

Les topoisomérases sont des enzymes essentielles qui gèrent l'état structurel de l'ADN. En clivant, réarrangeant et ligaturant sélectivement les brins d'ADN. Les topoisomérases peuvent altérer l'état de la superhélice de l'ADN et aider à démêler les chromosomes liés (Schoeffler et

CHAPITRE 4. Marqueurs moléculaires de cancer du col de l'utérus

Berger, 2008). Les topoisomérases appartiennent à deux catégories générales, appelées type I ou II (Deweese et Osheroff, 2009). L'être humain exprime deux isoformes de topoisomérase de type II appelés topoisomérase II α (TOP2A) et topoisomérase II β (TOP2B). Le gène TOP2A code pour une enzyme nucléaire de 170 kDa qui contrôle la structure topologique de l'ADN, la ségrégation des chromosomes et la progression du cycle cellulaire (Watt et Hickson, 1994). En raison de son rôle dans la prolifération cellulaire, l'expression de TOP2A a été utilisée comme marqueur de cellules cancéreuses (Wendorff *et al.*, 2012).

Dans le cancer du col de l'utérus, il a été démontré que cette protéine est surexprimée soit au niveau de l'ARNm soit au niveau protéique. L'évaluation de l'expression de TOP2A a montré que la surexpression de TOP2A est associée à la progression de CIN2 à la néoplasie cervicale avancée (Branca *et al.*, 2006).

A decorative horizontal scroll border with a vertical scroll on the left and a small scroll on the right.

CHAPITRE 5.

Matériel et méthodes

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

5.1. Matériel

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur les activités de dépistage du cancer du col de l'utérus par le frottis cervico-utérin au niveau de la wilaya de Sétif.

La population cible est définie par les femmes ayant effectuées un FCU, entre janvier 2013 et décembre 2017, au niveau des unités de dépistage du cancer du col de l'utérus implantées au niveau des EPSP (Établissement Public de Santé de Proximité) de la wilaya de Sétif, et dont la lecture s'est faite au niveau du service du laboratoire de cytologie de ces EPSP. La source d'information repose sur des rapports trimestriels d'évaluation des activités de dépistage du cancer du col de l'utérus fournis par ces EPSP de la wilaya de Sétif.

Au laboratoire, nous avons utilisé deux groupes d'échantillons du col de l'utérus sous forme de blocs de tissus cervicaux enrobés dans la paraffine. Le premier groupe contient 200 blocs de carcinome épidermoïde (CÉ) et d'adénocarcinome (ADC). Nous avons réalisé l'immunohistochimie (IHC) pour évaluer le taux de l'expression de la protéine Bcl-2 et la protéine p53. Une série de 90 prélèvements a été prise en considération dans notre étude (77 cas du CÉ et 13 cas d'ADC). Les tissus en question semblent bien entretenus car ils ont montré des résultats clairs au microscope.

Le deuxième groupe d'échantillons du col de l'utérus a servi au génotypage d'HPV pour déterminer la prévalence de ce virus enregistrée dans notre région (Sétif et Bordj Bou Arreridj). Sur les mêmes blocs, l'IHC a été réalisée pour évaluer le taux de l'expression des protéines p16, Ki-67, MCM2 et TOP2A. Ce 2^{ème} groupe contient 54 blocs : 8 col normaux ; 7 cas de cervicites ; 9 prélèvements contenant des koilocytes ; 4 condylomes ; 10 CIN1 ; 1 CIN3 ; 12 CÉ ; 2 cas d'ADC ; 1 carcinome adénosquameux [figure 18].

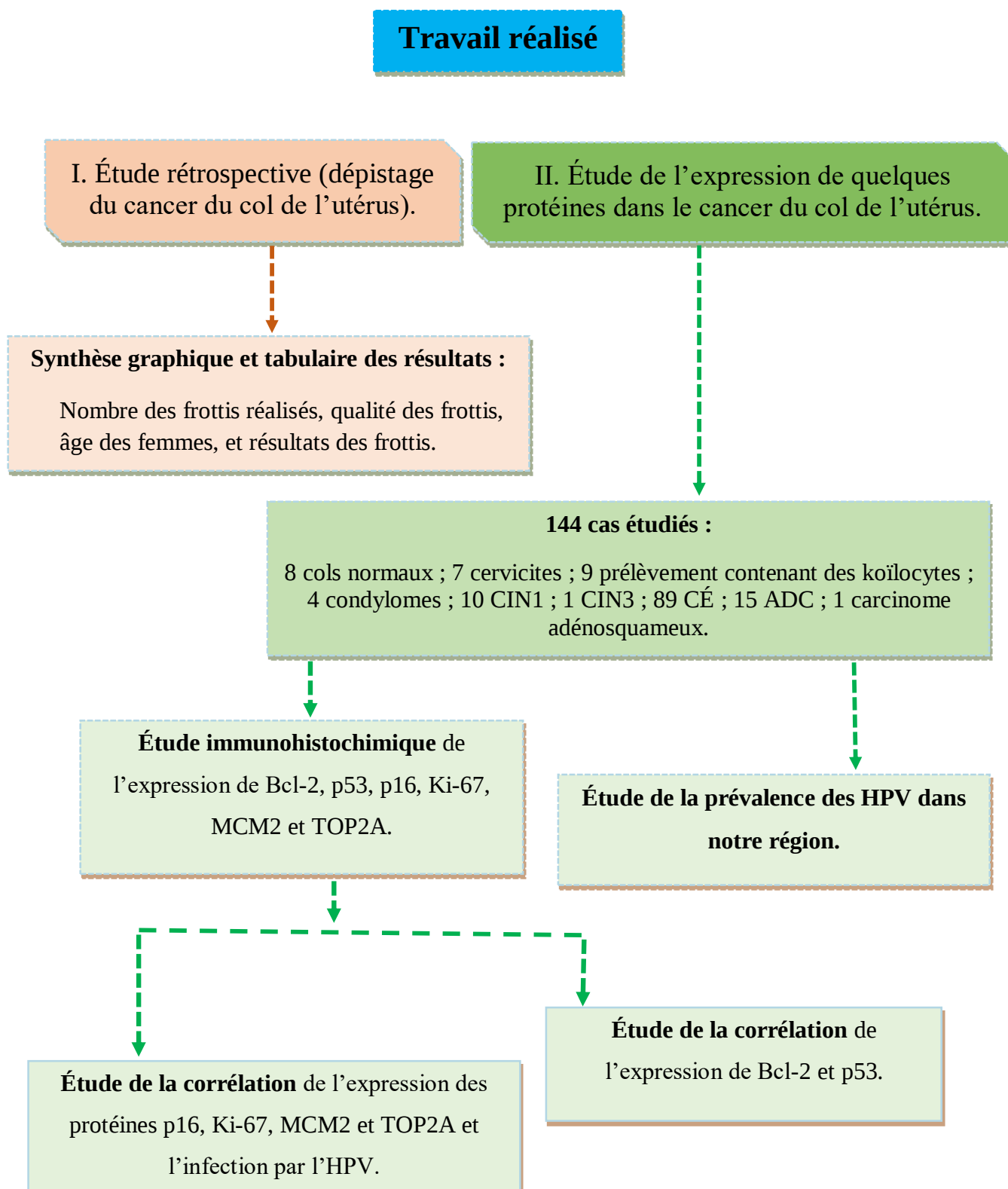


Figure 18 : Résumé du travail réalisé de l'étude rétrospective et l'étude de l'expression de quelques biomarqueurs dans 144 cas (dont les cols normaux) : les effectifs et les tests sont indiqués.

5.2. Méthodes

5.2.1. Étude rétrospective de l'évaluation des activités de dépistage des pathologies du col de l'utérus à Sétif (2013-2017)

5.2.1.1. Préparation des frottis conventionnels

La procédure du FCU décrite en 1943 par Papanicolaou consiste à prélever des cellules du col de l'utérus, endocol et exocol. À l'heure actuelle, le système de référence pour les anatomo-pathologistes, pour l'interprétation des frottis, est le système de Bethesda. Dans le cas du frottis dit conventionnel, c'est-à-dire sur lames (une lame pour le frottis de l'exocol et la jonction endo-exocervicale, puis une deuxième lame pour le frottis de l'endocol). Le prélèvement se fait par frottement à l'aide :

- d'une petite spatule en bois (à extrémité simple et extrémité bifide) afin de réaliser les prélèvements au niveau de la muqueuse tapissant la portion vaginale du col utérin ; ce prélèvement doit être obligatoirement réalisé au niveau de la jonction entre la muqueuse de l'exocol et la muqueuse de l'endocol.
- d'un écouvillon (une tige en bois portant à son extrémité un petit bourgeon en coton) ou d'une petite brosse pour faire le prélèvement de la muqueuse tapissant l'endocol (le canal cervical).

Le prélèvement effectué par le gynécologue ou la sage-femme doit être fixé au cyto-spray ou autres (Éther-Alcool, Laque de cheveux...). La fixation doit être rapide dans les 3 secondes qui suivent alors que le matériel prélevé est encore humide pour éviter la dessiccation cellulaire. Les cellules prélevées sont colorées au niveau des laboratoires des EPSP avec des colorations spéciales (par la technique de Papanicolaou dont laquelle les cytotechniciens utilisent l'hématoxyline, l'Orange G6 et l'éosine-Azur). La lecture de ces frottis va analyser le noyau des cellules et leur cytoplasme (Abbara, 2013).

5.2.1.2. Étude statistique

Des méthodes statistiques sont utilisées pour l'analyse des données collectées. Les présentations tabulaires et graphiques permettent de mieux présenter la synthèse des résultats. L'Excel 2013 a servi pour la base de données.

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

5.2.2. Étude de l'expression des biomarqueurs dans le cancer du col de l'utérus

5.2.2.1. Préparation des blocs

Les blocs utilisés dans ce travail ont été préparés au niveau du service d'anatomopathologie du CHU de Sétif et de l'EPH (établissement public hospitalier) de Bordj Bou Arreridj. Les prélèvements reçus correspondent à des :

- biopsies du col réalisées à l'aide d'une pince à biopsie ;
- curetages de l'endocol lors de la colposcopie lorsque les lésions sont de localisation endocervicale ou la lésion n'est pas visible ;
- prélèvements réalisés sur des pièces d'hystérectomie réalisées pour autres motifs.

La fixation des tissus doit être immédiate dans une quantité suffisante de formol. Le choix du fixateur est important. Il n'existe pas de fixateur universel pour l'IHC. Le formol à 10% est un bon fixateur (pH 7.4). La durée de fixation varie de 6 à 24 heures.

Une fois les prélèvements reçus, s'il s'agit d'un prélèvement biopsique, on doit mentionner le nombre et la mensuration du plus grand fragment au plus petit. Pour les pièces d'hystérectomie, plusieurs prélèvements de 3 mm d'épaisseur sont réalisés au niveau du col. Ils doivent intéresser l'exocol, l'endocol et la jonction endo-exocol. Les prélèvements sont placés dans des cassettes portant la référence du prélèvement.

Ensuite, les prélèvements subissent une déshydratation. Pour cela il suffit d'un passage dans des bains successifs d'alcool. Le but est la substitution de l'eau présente dans les tissus par l'alcool. Ce dernier est ensuite substitué par un solvant organique (xylène) miscible à la paraffine fondue (à 56°C) (Marck, 2010 ; Canene-Adams, 2013).

5.2.2.2. Confection des blocs et préparation des coupes histologiques

La confection des blocs de paraffine consiste en un enrobage de l'échantillon par de la paraffine liquide qui sera rigidifiée. Elle permet de fournir un support externe à la fois pendant et après la coupe.

Une fois les tissus sont bien solidifiés dans la paraffine, les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome à rotation (Leica, RM2125RT ; Thermo, HM340ES17071538), l'épaisseur des coupes

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

tissulaires varie de 3 à 5 μm . Les rubans sont recueillis à l'aide d'une pince dans un bain-marie préchauffé à 47°C (Leica, HI1210 ; Meiko, 00400044) contenant de l'eau distillée. Cette dernière ne doit contenir aucun additif. Elles sont étalées sur les lames.

Des lames standards et d'autres silanisées à surface chargée (Prodiag ; Shitai, Jiangshu ; China, 810600-4) ont été utilisées de façon à garantir une meilleure adhésion des préparations sur le support de verre pendant toute la durée du processus technique. Les préparations ont ensuite été séchées en les chauffant sur une plaque chauffante à 70°C (Labo Nord HP-3 ; Meiko, 00400060) pendant 5 minutes. Afin d'égoutter l'eau se trouvant sous les tissus, les lames sont séchées dans une étuve à température de 75°C (Sakura, PM100 ; Kodia, DHG-9030A) pendant une nuit. Les lames sont ensuite conservées à 37°C jusqu'à la réalisation de l'étape suivante (Marck, 2010).

Les tissus sont déparaffinés pour permettre la réhydratation des coupes afin de les colorer ou les étudier par immunohistochimie.

5.2.2.3. Coloration à l'Hématoxyline-Éosine

Les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Pour le déparaffinage des coupes, les lames sont mises dans une étuve à 75°C pendant toute la nuit, puis elles sont plongées dans des bains de xylène (ETS Begriche Rubeh) (x8 bains de 2 min, successivement). Puis les lames sont plongées dans des bains d'éthanol (ETS Begriche Rubeh) de degré décroissant de 100% (2 min), 100% (2 min), 95% (2 min), 95% (2 min), 75% (2 min) successivement pour la réhydratation des coupes. Après cette étape, les lames sont rincées dans l'eau courante (2 min).

L'étape suivante est la coloration à l'hématoxyline filtré (hématoxyline de MAYER, ETS Begriche Rubeh), dans 2 bains (2 min pour chaque bain). Un rinçage à l'eau courante est essentiel pendant 2 minutes.

La coloration à l'éosine (ETS Begriche Rubeh) fait suite et dure 2 min suivie d'un rinçage à l'eau courante pendant 2 minutes. Une déshydratation des lames est ensuite nécessaire dans des bains d'éthanol de degré croissant 75% (2 min), 95% (2 min), 95% (2 min), 100% (2 min), 100% (2 min). Puis l'immersion dans trois ou quatre bains de xylène pendant 2 min chacun (Fischer *et al.*, 2008 ; Marck, 2010). Finalement les lames sont couvertes de lamelles montées à l'aide d'une

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

résine pour l'observation au microscope optique et l'acquisition des images (Leica, Allemagne, DM2500 11888139).

5.2.2.4. Immunohistochimie

Les lames conservées à 37°C et qui ont été déjà préparées (voir section 5.2.2.2) sont utilisées dans les réactions immunohistochimiques pour la détection de six protéines différentes situées dans différents compartiments cellulaires. Les préparations sont déparaffinées en les immergeant successivement dans les solvants suivants : toluène (Huadong Med. Corp., Hangzhou, China), 3 bains de 10 min ; 20 min et 20 min respectivement. Puis dans l'éthanol absolu (Longshan Chem. Ltd., Hangzhou, China), 3 bains de 5 min ; puis éthanol 95%, 2 bains de 5 min ; éthanol 75%, 1 bain de 5 min ; puis l'eau distillée un bain de 5 min ou plus.

Nous avons utilisé un démasquage par la chaleur en immergeant les préparations dans un tampon de citrate à pH 6.1 (MXB Biotechnologie), pendant 3 min dans une cocotte-minute. Après refroidissement à température ambiante, les préparations sont plongées dans l'eau distillée.

Les préparations ont été ensuite immergées dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% (Maxim Biotech, Fuzhou, China) pendant 15 minutes. Le rinçage est effectué par l'utilisation du PBS/TBS (ETS Begriche Rubeh ; Shanghai Specimen & Model Factory, Shanghai, China) 3 fois, chacune pendant 5 min.

Les anticorps utilisés pour le premier groupe de prélèvements (50-100 µl pendant 1h à température ambiante) sont les suivants :

- l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine humaine p53 (clone DO-7 ; code M7001 Dako),
- l'anticorps monoclonal de la souris qui reconnaît l'oncoprotéine humaine Bcl-2 (clone 124 ; code M0887, Dako).

Les anticorps utilisés pour le deuxième groupe de prélèvements (50-100 µl pendant 1h à température ambiante) sont les suivants :

- l'anticorps monoclonal de souris anti-protéine humaine p16 (clone 16P04/JC2 ; code GT2013, Gene Tech),

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

- l'anticorps monoclonal de souris anti-protéine humaine Ki-67 (clone GM001 ; code GT2094 ; Gene Tech),
- l'anticorps polyclonal de lapin anti-protéine humaine MCM2 (code ab31159, abcam),
- l'anticorps monoclonal de la souris anti-protéine humaine TOP2A (clone Ki-S1 ; code GM7186, Gene Tech).

Chaque solution d'anticorps a été diluée dans le PBS 1x/BSA (Maxim Biotech, Fuzhou, China) additionné de sérum de cheval normal à 1:50 ; 1:50 ; 1:100 ; 1:200 ; 1:500 et 1:50 respectivement. Des essais préalables réalisés à l'aide de tissus témoins ont permis de définir la concentration optimale pour chaque antigène. Puis les lames sont rincées par l'utilisation de PBS/TBS 3 fois pendant 5 min chacun.

On fait ensuite réagir les conjugués à raison de 50-100 µl des anticorps secondaires marqués à la peroxidase (HRP) pendant 30 min à température de la chambre (code K5007, Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/ DAB⁺, Lapin/ Souris). L'incubation du conjugué avec un chromogène-substrat approprié (DAB : 3,3'-Diaminobenzidine) se fait à l'obscurité. Pour cela, nous avons utilisé le kit Dako EnVision+System HRP Labelled Polymer (Code K4002, Dako).

Les préparations sont ensuite contre-colorées par l'ajout de 500 µl d'une solution d'hématoxyline de Harris (Boao Biotech, Shanghai, China). Après rinçage à l'eau distillée et déshydratation par 3 bains d'éthanol (70%, 95%, 100% de 3 min chacun) suivi de 3 bains de xylène de 5 min chacun, les préparations sont recouvertes de lamelles qui est montée à l'aide d'une résine (Shanghai Specimen & Model Factory, Shanghai, China) pour l'observation au microscope optique (Leica, Allemagne, DM2500 11888139). La figure 19 résume les étapes de l'IHC (Marck, 2010).

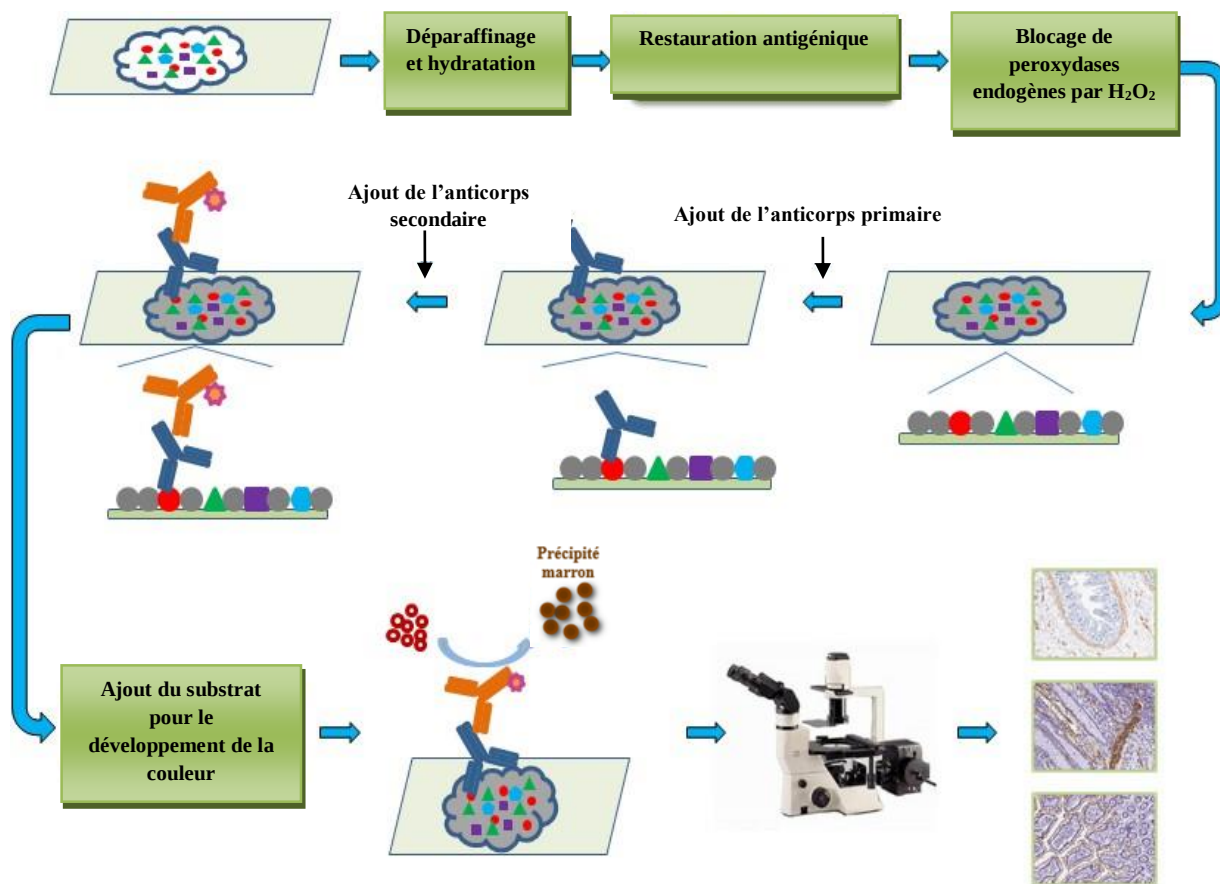


Figure 19 : Le principe de l'immunohistochimie indirect (adaptée de : <http://www.sinobiological.com>).

5.2.2.5. Acquisition des images

Les images numériques ont été capturées à l'aide d'un microscope optique (Leica, Allemagne, CTRMIC 258427) connecté à un ordinateur fonctionnant avec un logiciel spécial, EZ-MET. Le microscope utilisé est équipé d'objectifs 5×, 10×, 20× et 40× et d'un phototube 10×. Il inclut en plus une caméra numérique (Leica, Allemagne, Oplenic digital camera). Les images ont été stockées en utilisant un format de fichier image non compressé (TIF). La luminosité et le contraste optimaux de l'image ont été déterminés à l'aide de l'assistant de réglage de la caméra.

5.2.2.6. Détermination des pourcentages de l'expression des biomarqueurs

5.2.2.6.1. Technique manuelle

Pour les protéines p53 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A, les cellules avec une coloration nucléaire ont été considérées comme positives. Pour les protéines Bcl-2 et p16 le marquage était cytoplasmique avec une exception du marquage de la protéine p16 qui était des fois nucléaire et

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

cytoplasmique à la fois. Quatre microphotographies des 4 meilleurs champs d'agrandissement ($\times 50$; $\times 100$; $\times 200$; $\times 400$) ont été prises et le compte des cellules a été effectué par un pathologiste pour obtenir le pourcentage de l'expression de ces protéines. Les données ont été analysées et traitées par l'utilisation du SPSS 20.

5.2.2.6.2. Technique automatique

Nous avons utilisé l'application « ImmunoRatio » qui est gratuite sur le Web (<http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>) pour déterminer le pourcentage du marquage nucléaire des protéines Ki-67, MCM2 et TOP2A. Après la soumission de l'image, l'application segmente les zones marquées à la DAB et les zones de noyaux colorés à l'hématoxyline de cette image. Puis cette application calcul le pourcentage de la zone nucléaire colorée à la DAB sur la zone nucléaire totale (c-à-d l'indice d'étiquetage). Finalement, l'application génère une image de résultat pseudo-colorée correspondant à la segmentation de la zone et donne le pourcentage des cellules marquées. Cette application fournit l'analyse des images des résultats de l'immunohistochimie et aide le diagnostic pour marquer immunohistochimiquement des échantillons. Les résultats d'analyse doivent toujours être interprétés avec les images pseudo-colorées et les diapositives d'origine (Yeo *et al.*, 2017).

5.2.2.7. Génotypage d'HPV

Le typage viral a été réalisé en utilisant le kit de la biocompagnie chinoise (杭州诺嘉医疗设备有限公司) de diagnostic "21 HPV GenoArray". Ce kit est conçu pour la détection et le typage de 21 types d'HPV à haut risque (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68) et à bas risque (HPV 6, 11, 42, 43, 44, CP8304 (81)) dans des spécimens du col de l'utérus :

Après une réaction PCR qui permet d'amplifier l'ADN provenant des échantillons des cols de l'utérus, les amplicons sont ensuite hybridés avec des sondes immobilisées spécifiques aux différents HPV « technique d'hybridation fluide » (HybriBio, 2012).

5.2.2.7.1. Extraction de l'ADN

Environ 5 à 10 coupes des tissus de paraffine sont mises dans des microtubes de 1,5 ml. Après l'ajout de 1 ml de xylène, les tubes sont incubés pendant 10 min à température ambiante, puis centrifugés à 1300 g pendant 5 min. Le surnageant (xylène) est éliminé après centrifugation,

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

puis remplacé par un autre volume (1 ml) de xylène. Tous les tubes sont ensuite incubés pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, les tubes sont centrifugés à 1300 g pendant 5 min, et le surnagent (xylène) est rejeté.

Chaque tube subit les cinq étapes suivantes. Pour chaque étape 1 ml d'éthanol de degré décroissant est ajouté : éthanol à 100%, à 95% (deux fois), à 75% (deux fois). Chaque étape d'incubation dure 10 minutes et suivi d'une centrifugation à 1300 g pendant 5 min. L'alcool est rejeté et le reste est laissé pour être volatilisé.

Le culot est mis en suspension dans 200 µl de la solution I (Tris, NaCl, Na₂EDTA, NaOH, SDS, eau distillée) et 20 µl de protéinase K. Les tubes sont vortexés puis incubée à 56°C pendant une nuit. 200 µl de solution I est ajouté, puis tous les tubes sont mis à l'ébullition à 100°C pendant 15 à 20 minutes.

Les tubes sont centrifugés et le surnageant est transféré dans de nouveau microtube de 1,5 ml. 400 µl de solution II (Isopropanol) est ajoutée, les solutions sont mélangées par inversion pendant 2 min, puis centrifugées à 1400 g pendant 5 min. Le surnageant de chaque tube est versé. Le reste est épuisé par une pipette. Le culot d'ADN est ensuite ressuspendu dans 60 µl d'eau distillée stérile et bien mélangé pour avoir une solution d'ADN qui va être dosée. La pureté est estimée par le rapport d'absorbance (260/ 280 nm). Enfin, l'ADN est conservé à -20°C.

5.2.2.7.2. Amplification par PCR

Le mélange réactionnel de la PCR (PCR master mix) et l'extrait d'ADN de la patiente sont décongelés à température ambiante. Un mélange de 23.25 µl de mix PCR et 0.75 µl de la Taq DNA polymérase sont répartis dans chaque tube de réaction. Puis l'ajout de 1 µl de l'ADN matrice (prélèvements) dans chaque tube de réaction. L'étiquetage de tous les tubes de réaction de PCR est nécessaire puis tous les tubes sont centrifugés pendant quelques secondes.

Les tubes sont placés dans le thermocycleur pour l'amplification de PCR en suivant le programme (du fabricant, HybriBio, 2012) suivant :

- Une première dénaturation à 95°C pendant 9 minutes.
- 40 cycles, chacun comprenant :

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

- la dénaturation à 95°C pendant 20 secondes,
- l'hybridation à 55°C pendant 30 secondes,
- la polymérisation à 72°C pendant 30 secondes.

- Une extension finale à 72°C pendant 5 min et finalement à 4°C jusqu'à la manipulation suivante.

5.2.2.7.3. Hybridation

Des membranes (HybriMem) de nylon sont utilisées pour réaliser l'hybridation. Chaque membrane contient 23 puits. Deux contrôles sont incorporés dans chaque membrane : la tâche de Biotine qui sera toujours positive, c'est un contrôle pour la détection de la réaction du conjugué enzymatique. Une tâche du contrôle interne qui est un contrôle pour surveiller la réussite de la PCR sans inhibiteur. Les 21 puits qui restent contiennent des sondes spécifiques pour 21 types d'HPV [figure 20]. Premièrement, la température est réglée et les membranes de nylon sont mises dans la chambre de réaction de l'appareil HybriMax qui est une sorte de thermo-modulateur.

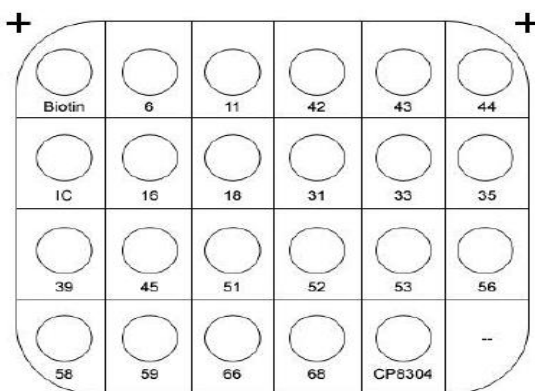


Figure 20 : La membrane HybriMem utilisée dans l'hybridation. IC : *Internal control* (HybriBio, 2012).

Puis les produits biotinylés de la PCR sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes et sont immédiatement refroidis dans la glace. Dans chaque puit désigné sur les membranes, 0.5 ml d'eau déminéralisée est ajoutée. Tous les solvants sont pompés, puis le pompage est arrêté. Quand la température de l'HybriMax atteint 45°C, 0.8 ml de la solution d'hybridation (NaCl, SDS) préchauffée à 45°C est ajoutée dans chaque puit et les membranes sont incubées pendant 3 min. Tous les solvants sont pompés, puis le pompage est arrêté. La solution d'hybridation préchauffée à 45°C de 0.5 ml est rajoutée dans chaque puit. Tous les échantillons de l'ADN amplifiés et

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

dénaturés sont ajoutés dans les puits, toutes les préparations sont mélangées à l'aide d'une pipette, et les préparations sont incubées à 45°C pendant 10 min (couvercle fermé).

Durant cette partie, il faut garder le pompage en marche, on lave 3 fois la membrane par 0.8 ml de la solution d'hybridation. Puis, la membrane est refroidie à 25°C par le dispositif HybriMax. Ce refroidissement est nécessaire avant de faire les autres lavages, puis le pompage est arrêté. Après ce lavage ; la température est augmentée à 30°C, pour ajouter 0.5 ml de la solution du blocage des sites non occupés (caséine - Tris-HCl), tout en pompant les solvants, puis le pompage est arrêté. Un applique d'une deuxième fois de 0.5 ml de la solution du blocage dans chaque puit, puis les préparations sont incubées pendant 5 min (couvercle fermé), pendant que le pompage des solvants est en marche, puis on l'arrête.

Quand la température de l'appareil HybriMax atteint 25°C, 0.5 ml du conjugué enzymatique (streptavidine phosphatase alcaline) sont ajoutés dans tous les puits. On incube pendant 3 minutes, puis on pompe tous les solvants. Pendant que le pompage est en marche, on lave les membranes 4 fois à l'aide de 0.8 ml d'une solution A (Tris, azide de sodium à 0,05%). À partir du deuxième lavage, il faut régler la température de l'HybriMax à 36°C. Puis on arrête le pompage.

Tout en gardant la température de l'HybriMax à 36°C, on ajoute le substrat et le chromogène (NBT/ BCIP) à raison de 0.5 ml. Les préparations sont incubées pendant 5 min (couvercle fermé). Tous les solvants sont ensuite pompés. Trois lavages sont effectués en utilisant 0.8 ml la solution B (NaCl, SDS) tout poursuivant le pompage. Les membranes sont rincées en utilisant 1 ml de l'eau distillée et tous les liquides sont pompés à une vitesse moyenne. Les membranes sont séchées puis les résultats sont interprétés selon les spots (taches) observés.

5.2.2.8. Analyse statistique

L'analyse statistique des données est effectuée à l'aide du programme SPSS 20 et Excel 2013. Pour le premier groupe de prélèvements, les données sont collectées : l'âge ; le type histologique ; la région du col touchée et le taux de l'expression de Bcl-2 et p53. L'analyse est effectuée en utilisant les statistiques descriptives. La corrélation entre les variables (le pourcentage de l'expression de Bcl-2 et de l'expression de p53) a été déterminée au moyen du coefficient de Pearson, la valeur de p de 0.05 ou moins de 0.05 a été considérée statistiquement significative. L'analyse de régression bivariée est réalisée sur le pourcentage de l'expression de Bcl-2 et de

CHAPITRE 5. Matériel et Méthodes

l'expression de p53. L'âge des patientes est exprimé comme moyen $\pm$ Déviation Standard (SD). Pour le deuxième groupe de prélèvements, les Data collectés sont : l'âge ; le type histologique ; l'infection par HPV et le taux de l'expression de p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A. Les Data sont analysé en utilisant la statistique descriptive. L'âge des patientes a été exprimé comme moyen $\pm$ Déviation Standard. Le coefficient de corrélation de Pearson est utilisé pour investiguer les corrélations possibles entre le statu de l'HPV et l'expression de p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A.

5.2.2.9. Calcul de la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives

La sensibilité ; la spécificité ; la VPP (valeur prédictive positive) et la VPN (valeur prédictive négative) sont calculé pour détecter la signification de l'importance de biomarqueurs p16, Ki-67, MCM2 et TOP2A, entre les stades précoces et les stades avancés du cancer du col de l'utérus.

La sensibilité est définie par la fréquence des tests positifs (ici c'est le taux de l'expression d'un biomarqueur $\geq 5\%$) chez les malades (ici sont les stades de cancer du col utérin) :

$$\text{Sensibilité (Se)} = \text{vrais positif (VP)} / [\text{vrais positif (VP)} + \text{faux négatif (FN)}] \times 100$$

La spécificité est définie par la fréquence des tests négatifs (ici c'est le taux de l'expression d'un biomarqueur $< 5\%$) chez les non malades (ici sont les cols normaux) :

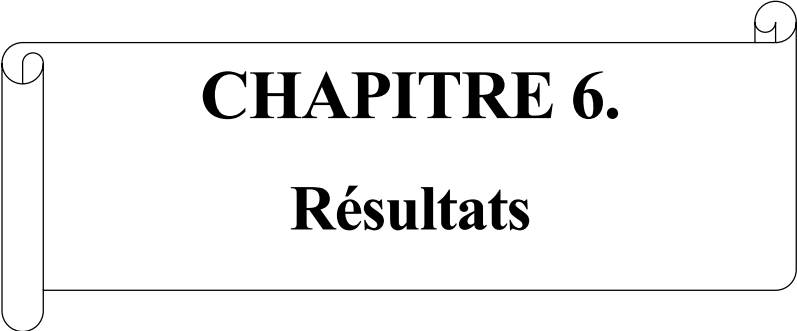
$$\text{Spécificité (Sp)} = \text{vrais négatif (VN)} / [\text{vrais négatif (VN)} + \text{faux positif (FP)}] \times 100$$

La valeur prédictive positive correspond à la probabilité qu'un sujet soit réellement malade lorsque le test est positif :

$$\text{VPP} = \text{vrais positif (VP)} / \text{total positif (TP)} \times 100$$

La valeur prédictive négative correspond à la probabilité qu'un sujet soit vraiment non malade quand le test est négatif :

$$\text{VPN} = \text{vrais négatif (VN)} / \text{total négatif (TN)} \times 100 \text{ (Nendaz et Perrier, 2004).}$$

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both featuring a rolled-up edge effect.

CHAPITRE 6.

Résultats

6.1. Évaluation des activités de dépistage des pathologies du col de l'utérus à Sétif

6.1.1. Évolution du nombre de frottis réalisés durant la période 2013-2017

Dans cette partie du travail, durant la période 2013-2017, 16461 frottis ont été réalisés au niveau de la wilaya de Sétif. Ce nombre comprend les trois types de frottis FCU 1, FCU 2 et FCU 3 [tableau V].

Remarque :

✓ **FCU 1** : Concerne les femmes qui ont fait le frottis pour la première fois, c'est-à-dire n'ayant jamais eu de frottis antérieurs.

✓ **FCU 2 et FCU 3** : Concerne les femmes ayant déjà eu un frottis auparavant.

✓ Avant 2015, il n'y avait pas un formulaire où figurait le FCU 3. Ceci explique le chiffre 0 dans le tableau V pour les années 2013 et 2014.

Tableau V : Répartition des frottis cervico-utérins réalisés par année, à Sétif 2013-2017.

Année	FA / %	FCU 1	FCU 2	FCU 3	Total	%
2013	FA	1 483	676	0	2 159	13,1
	%	68,7	31,3	0,0	100	
2014	FA	2 417	1 059	0	3 476	21,1
	%	69,5	30,5	0,0	100	
2015	FA	3 191	1 006	161	4 358	26,5
	%	73,2	23,1	3,7	100	
2016	FA	2 499	913	214	3 626	22,0
	%	68,9	25,2	5,9	100	
2017	FA	1 863	679	300	2 842	17,3
	%	65,6	23,9	10,6	100	
Total	FA	11 453	4 333	675	16 461	100
	%	69,6	26,3	4,1	100	

✓ **FA** : fréquence absolue

Les nombres des frottis réalisés en 2013, 2014 et 2015 sont caractérisés par une augmentation progressive chaque année de 1317 frottis en plus en 2014 par rapport à l'année 2013, et 882 frottis en plus en 2015 par rapport à l'année 2014. Alors que le nombre de frottis réalisés a diminué en

CHAPITRE 6. Résultats

2016 avec une différence de 732 frottis par rapport à l'année 2015 et 784 frottis en 2017 par rapport à l'année 2016 [figure 21].

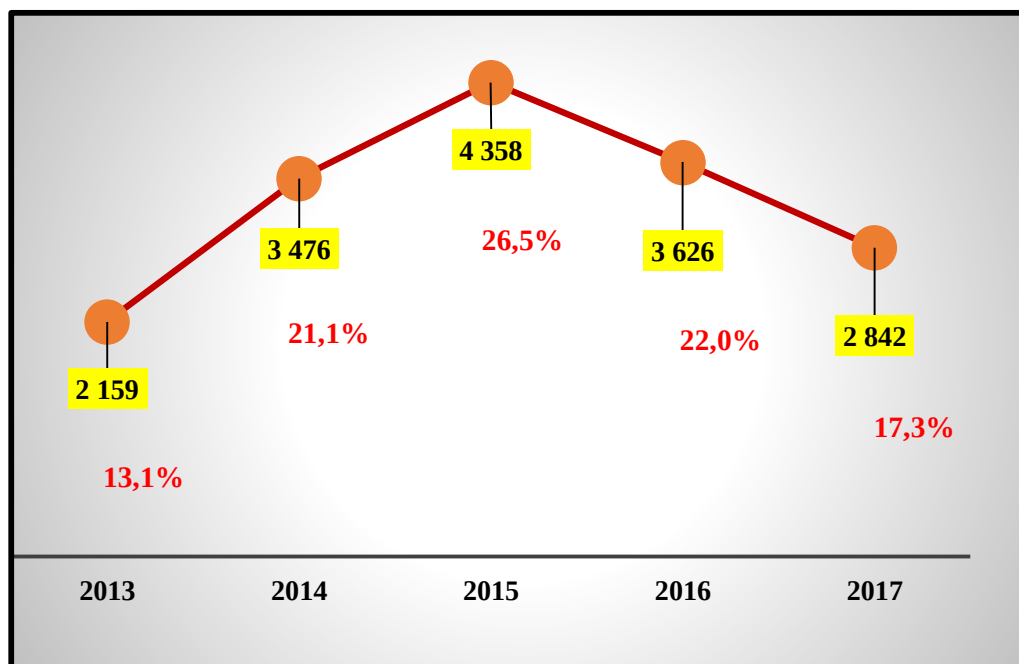


Figure 21 : Nombre des FCU réalisés en 2013-2017 à Sétif.

6.1.2. Qualité des frottis effectués

Pour chaque année la majorité des frottis réalisés ont été de bonne qualité (96,1%) et des faibles proportions (3,9%) ont été insatisfaisantes pour l'interprétation [figure 22, annexe VI].

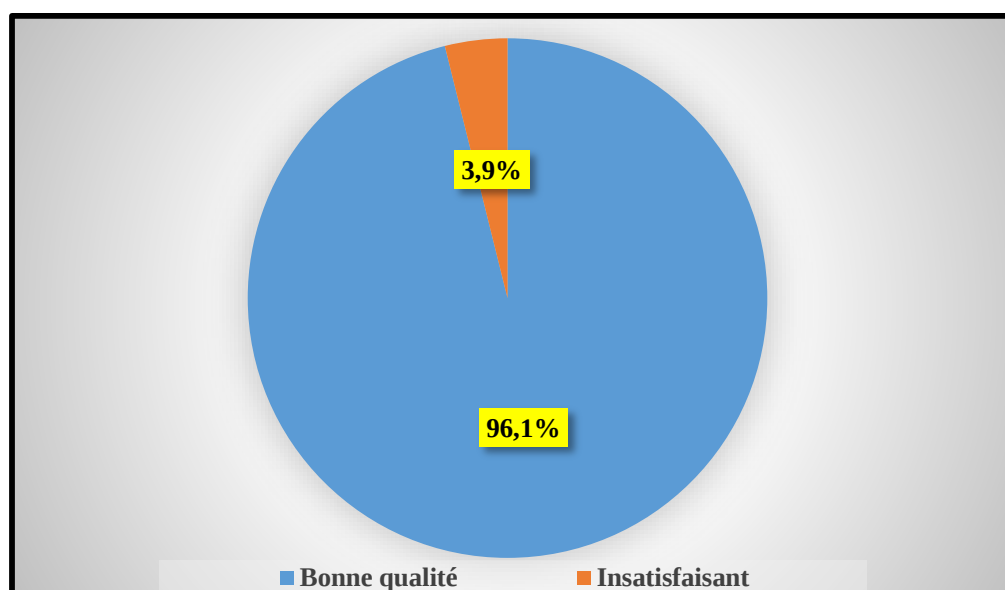


Figure 22 : Répartition des frottis réalisés en 2013-2017 à Sétif selon la qualité.

CHAPITRE 6. Résultats

6.1.3. Âge des femmes au premier frottis

Les femmes au premier FCU représentent 69,6% [figure 23, tableau VI]. Dans ce groupe, les femmes âgées entre 30 et 49 ans représentent 68,6% de la population cible, c'est-à-dire plus des deux tiers. 10,4% sont des femmes âgées de moins de 30 ans et 21,0% sont âgées de plus de 50 ans [figure 24].

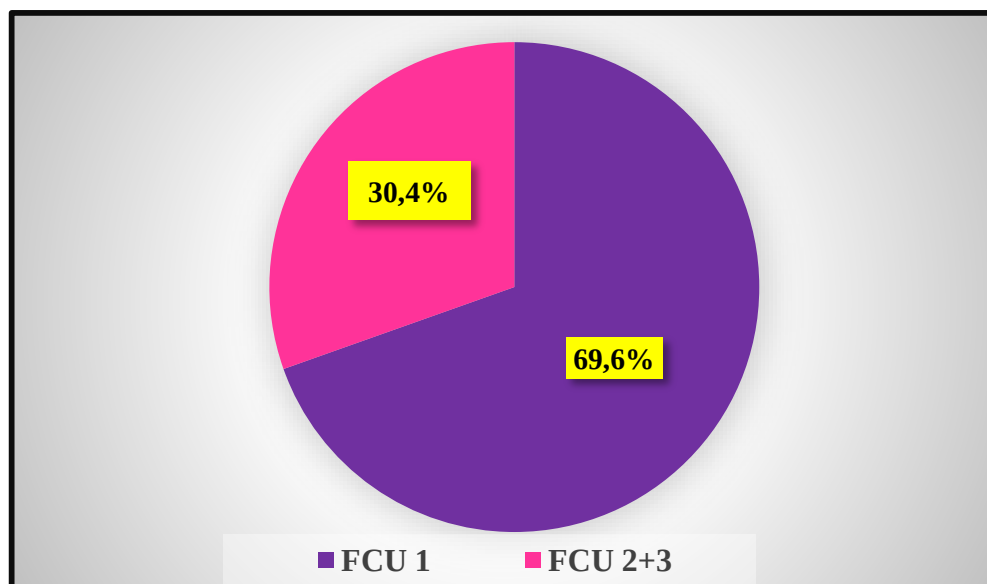


Figure 23 : Répartition des frottis FCU 1 et FCU 2+3.

Tableau VI : Répartition des frottis FCU 1 selon les tranches d'âge.

Année	FCU 1	< 30ans	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60 et +	Total
2013	FA	196	289	218	300	250	163	67	0	1483
	%	13,2	19,5	14,7	20,2	16,9	11,0	4,5	0,0	100
2014	FA	261	327	518	468	403	238	199	3	2417
	%	10,8	13,5	21,4	19,4	16,7	9,8	8,2	0,1	100
2015	FA	298	497	566	544	505	440	284	57	3191
	%	9,3	15,6	17,7	17,0	15,8	13,8	8,9	1,8	100
2016	FA	255	449	462	463	374	282	127	86	2498
	%	10,2	18,0	18,5	18,5	15,0	11,3	5,1	3,4	100
2017	FA	177	274	318	342	290	259	124	79	1863
	%	9,5	10,7	17	18,3	15,6	13,9	6,7	4,2	100
Total	FA	1187	1836	2082	2117	1822	1382	801	225	11452
	%	10,4	16,0	18,2	18,5	15,9	12,1	7,0	2,0	100
		10,4%				68,6%			21,0%	69,6%
									100%	

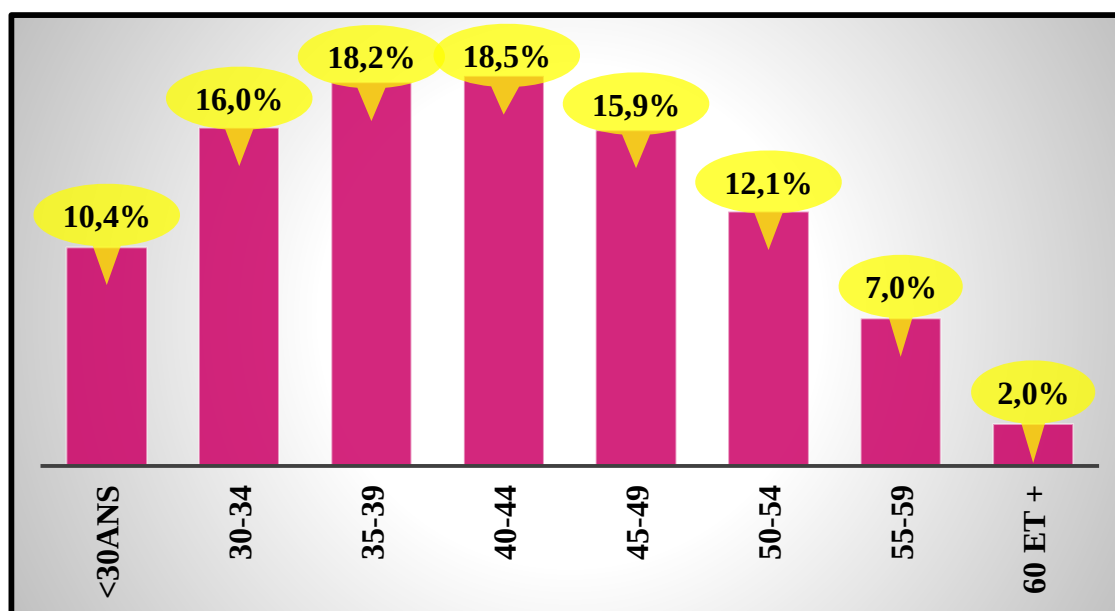


Figure 24 : Répartition des frottis FCU 1 selon les tranches d'âge.

6.1.4. Âge des femmes au deuxième et troisième FCU

Les femmes au deuxième et/ ou troisième FCU représentent 30,4% [figure 23]. Les femmes âgées entre 30 et 49 ans représentent 74,0% de la population cible, 4,6% sont des femmes ont moins de 30 ans et 21,3% sont les femmes ont plus de 50 ans [tableau VII, figure 25].

Tableau VII : Répartition des frottis FCU 2+3 selon les tranches d'âge.

Année	FCU 2+3	<30ans	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60 et +	Total
2013	FA	27	115	136	153	140	81	22	2	676
	%	4,0	17,0	20,1	22,6	20,7	12,0	3,3	0,3	100
2014	FA	81	144	177	189	176	253	35	4	1059
	%	7,6	13,6	16,7	17,8	16,6	23,9	3,3	0,4	100
2015	FA	33	193	235	275	224	138	50	19	1167
	%	2,8	16,5	20,1	23,6	19,2	11,8	4,3	1,6	100
2016	FA	56	134	200	207	233	176	77	45	1128
	%	5,0	11,9	17,7	18,4	20,7	15,6	6,8	4,0	100
2017	FA	38	121	233	226	192	74	69	26	979
	%	3,9	12,4	23,8	23,1	19,6	7,6	7,0	2,7	100
Total	FA	235	707	981	1050	965	722	253	96	5009
	%	4,7	14,1	19,6	21,0	19,3	14,4	5,0	1,9	100
		4,7%				74,0%			21,3%	30,4%
									100%	

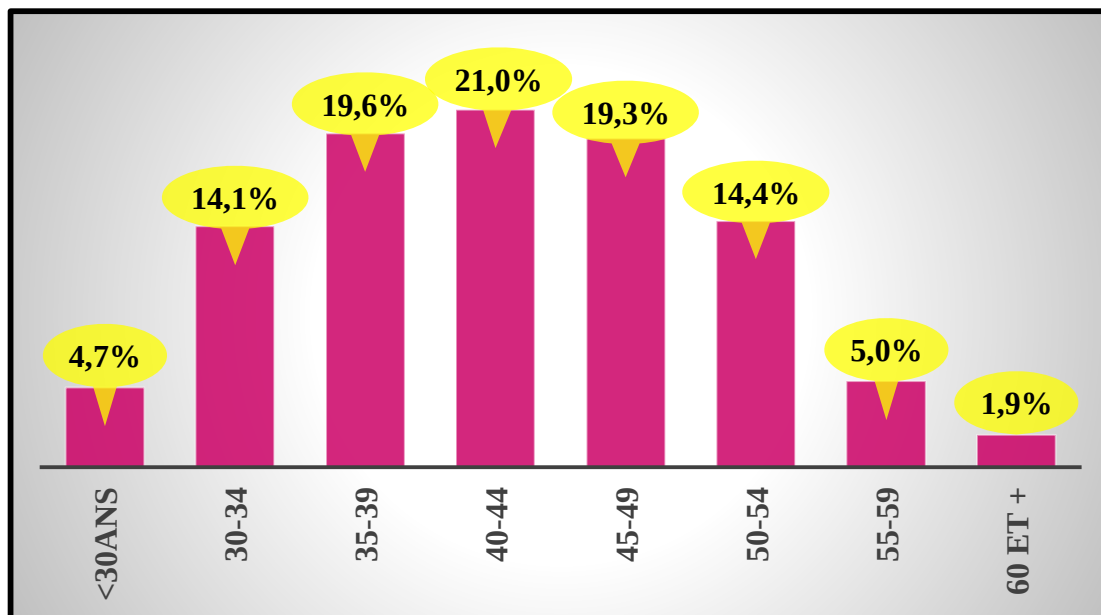


Figure 25 : Répartition des frottis FCU 2 et 3 selon les tranches d'âge.

6.1.5. Résultats des frottis

Les résultats cytologiques observés sont rapportés dans l'annexe VII. Sur l'ensemble des frottis, 42,1% des FCU effectués sont normaux, les changements réactionnels bénins représentent 47,8% et regroupent les inflammations non spécifiques et les infections, alors que les anomalies cellulaires représentent 3,5% [figure 26].

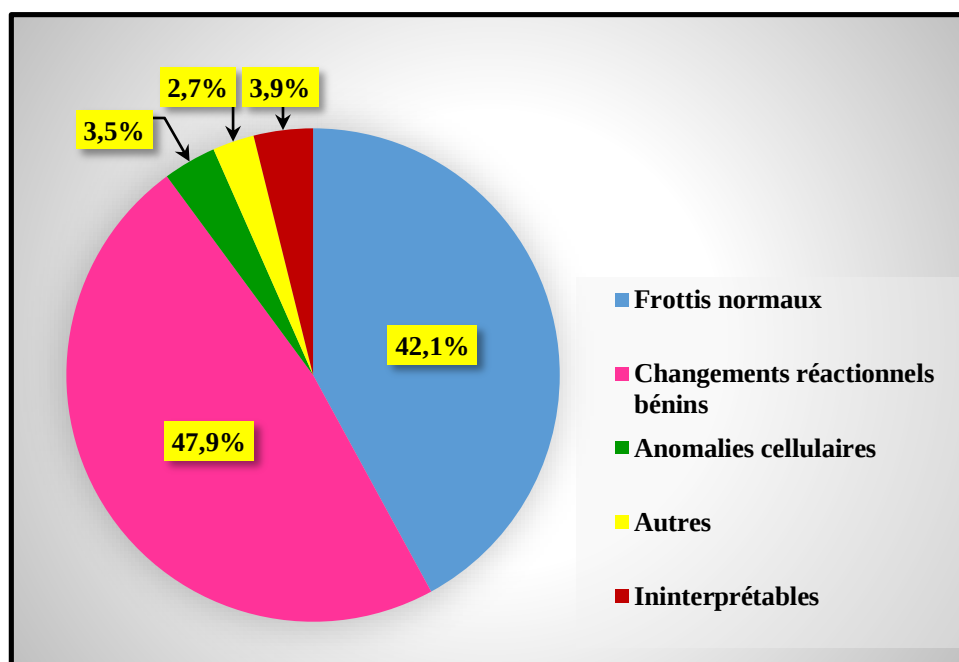


Figure 26 : Résultats des frottis.

CHAPITRE 6. Résultats

Les inflammations non spécifiques représentent 84,6% des changements réactionnels bénins et 15,4% de celles-ci incluent les infections par des bactéries, virus, parasite ou autres.

Les anomalies cellulaires incluent : les cellules malpighiennes atypiques de signification indéterminée (ASC-US) qui représentent 12,8%, les cellules malpighiennes sans pouvoir exclure une lésion de haut grade (ASC-H : *Atypical Squamous Cells can not exclude high grade squamous intraepithelial lesion*) représentent 2,5%, et les cellules glandulaires atypiques (AGC) qui représentent 15,8%. Les lésions intra-épithéliales de bas grade représentent 20,4% alors que les lésions intra-épithéliales de haut grade représentent 4,4%. L'adénocarcinome *in situ* (AIS) représente 0,1% alors que les taux du carcinome épidermoïde et ce de l'adénocarcinome sont nul. Autres anomalies cellulaires ont été détectées aussi et représentent 43,9% [figure 27, annexe VIII].

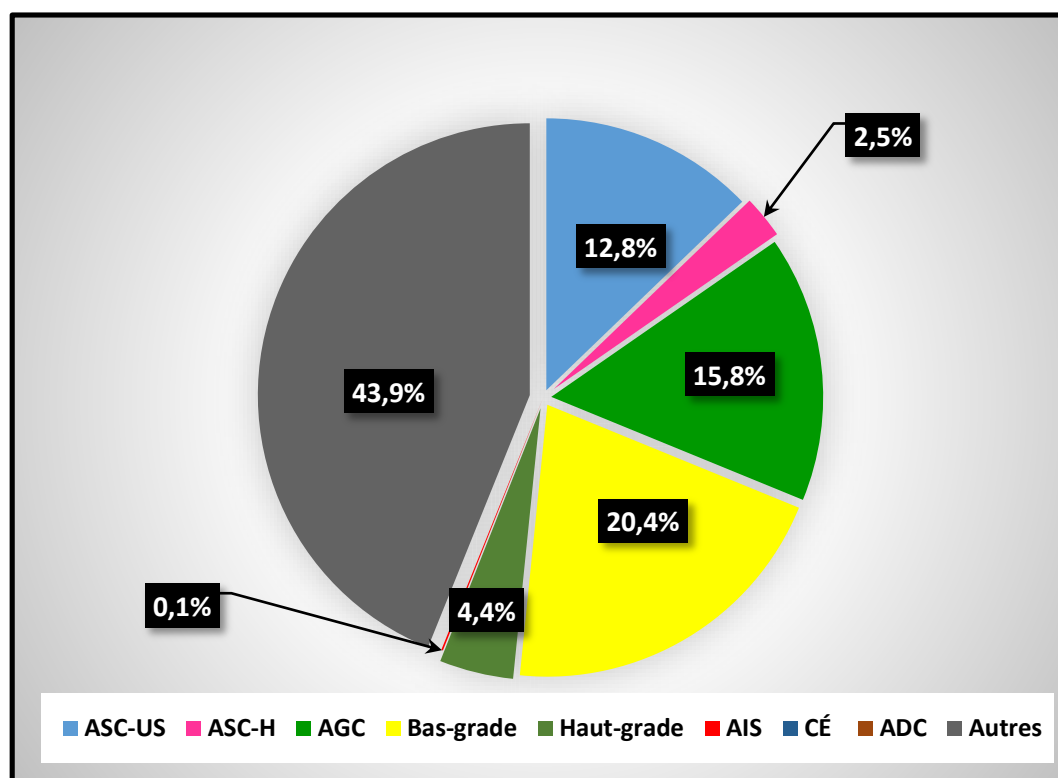


Figure 27 : Répartition des résultats des FCU en fonction des anomalies cellulaires.

6.1.6. Suivi des frottis anormaux

Pour chaque année la réalisation des frottis après 6 mois, après 1 an, après 3 ans, ou post-traitement étaient les plus recommandés par les laboratoires. La réalisation des frottis dans les

CHAPITRE 6. Résultats

meilleurs délais, le test HPV, la colposcopie, la biopsie étaient moins recommandés [figure 28, annexe IX].

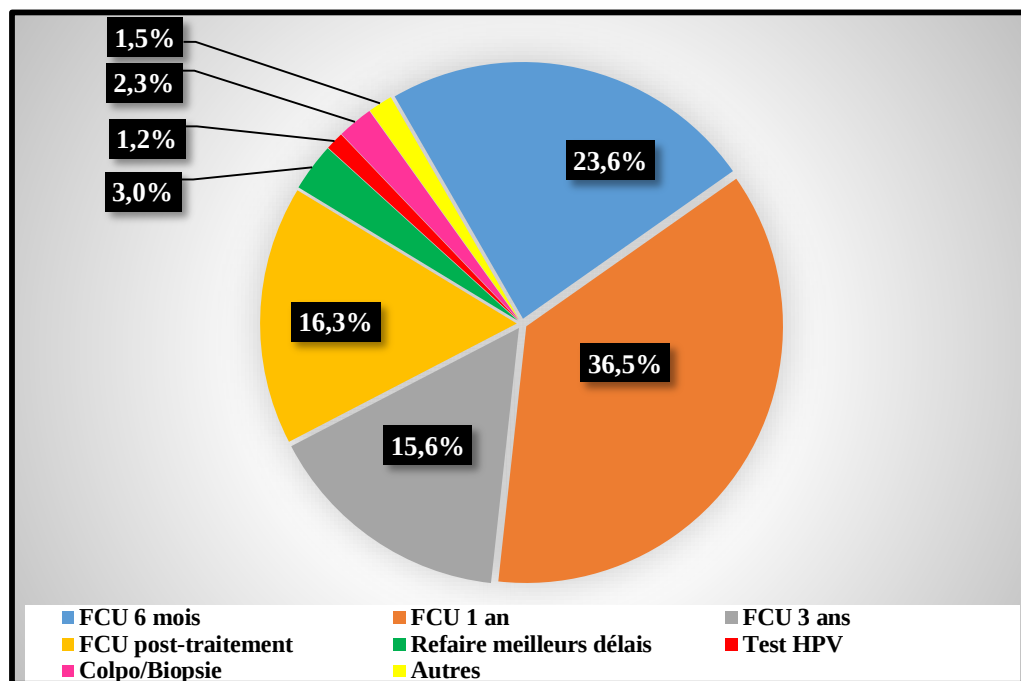


Figure 28 : Recommandation de laboratoires pour les années 2013-2017.

6.2. Expression de la protéine Bcl-2 dans le cancer du col de l'utérus

Dans cette partie, nous avons évalué le taux de l'expression de la protéine Bcl-2 dans 90 échantillons de cancer du col de l'utérus, l'âge médian des patientes est de 51 ans $\pm$ 10.18. Une meilleure lecture de l'expression de la protéine Bcl-2 a été faite par un pathologiste expérimenté qui a confirmé le diagnostic de tous les spécimens. Les résultats de cette expression ont été partagés en quatre groupes : expression négative < 5% (nombre des cellules marquées), expression faible 5-50% (nombre des cellules marquées), expression modérée 50-90% (nombre des cellules marquées) et expression forte > 90% (nombre des cellules marquées) (Tjalma *et al.*, 1998 ; Dako, 2002a). Le pourcentage des cellules tumorales a été déterminé par la relation suivante :

$$\text{Le nombre des cellules tumorales marquées} / \text{le nombre total des cellules tumorales} \times 100.$$

Si la taille de la coupe est petite on compte toute les cellules néoplasiques. Si la taille de la coupe est grande avec un marquage faible on prend en considération toutes les cellules néoplasiques. Si la taille de la coupe est grande avec un marquage fort et élevé on prend en considération juste 10 régions dans la coupe. Le même calcul est fait pour déterminer le pourcentage de l'expression de toutes les autres protéines étudiées dans ce travail avec une petite exception avec la protéine p16. Les résultats de l'expression de la protéine Bcl-2 obtenus dans ce travail sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats de l'expression de la protéine Bcl-2.

	- < 5%, n (%)	+ 5-50%, n (%)	+ > 50%, n (%)	Taux positif (%)	Total, N
Carcinome épidermoïde	30 (38,96)	39 (50,65)	8 (10,39)	61,04	77
Adénocarcinome	10 (76,92)	3 (23,08)	0 (0)	23,08	13
Total					90

Pour le CÉ on a compté 30/77 cas avec une expression négative (38,96%), 39/77 cas avec une expression faible (50,65%) et 8/77 cas avec une expression modérée à élevée (10,39%). Pour l'ADC on a compté 10/13 cas sans expression de Bcl-2 (76,92%), 3/13 cas avec une expression

CHAPITRE 6. Résultats

faible (23,08%) et aucun échantillon montre une surexpression de cette protéine. L'expression positive de la protéine Bcl-2 était de 61,04% et de 23,08% dans le CÉ et l'ADC respectivement.

Dans le carcinome épidermoïde l'expression de la protéine Bcl-2 était toujours diffuse dans le cytoplasme des cellules néoplasiques. Cependant l'expression de la protéine Bcl-2 était hétérogène et elle pourrait des fois varier entre positivement forte à négative dans la même tumeur. On a utilisé un microscope optique incluant une caméra digitale (Leica, Allemagne) connecté à un ordinateur avec un programme EZ-MET pour photographier les coupes, de cette partie et les autres parties, avec les différents grossissements ($\times 50$; $\times 100$; $\times 200$ et $\times 400$) [figure 29].

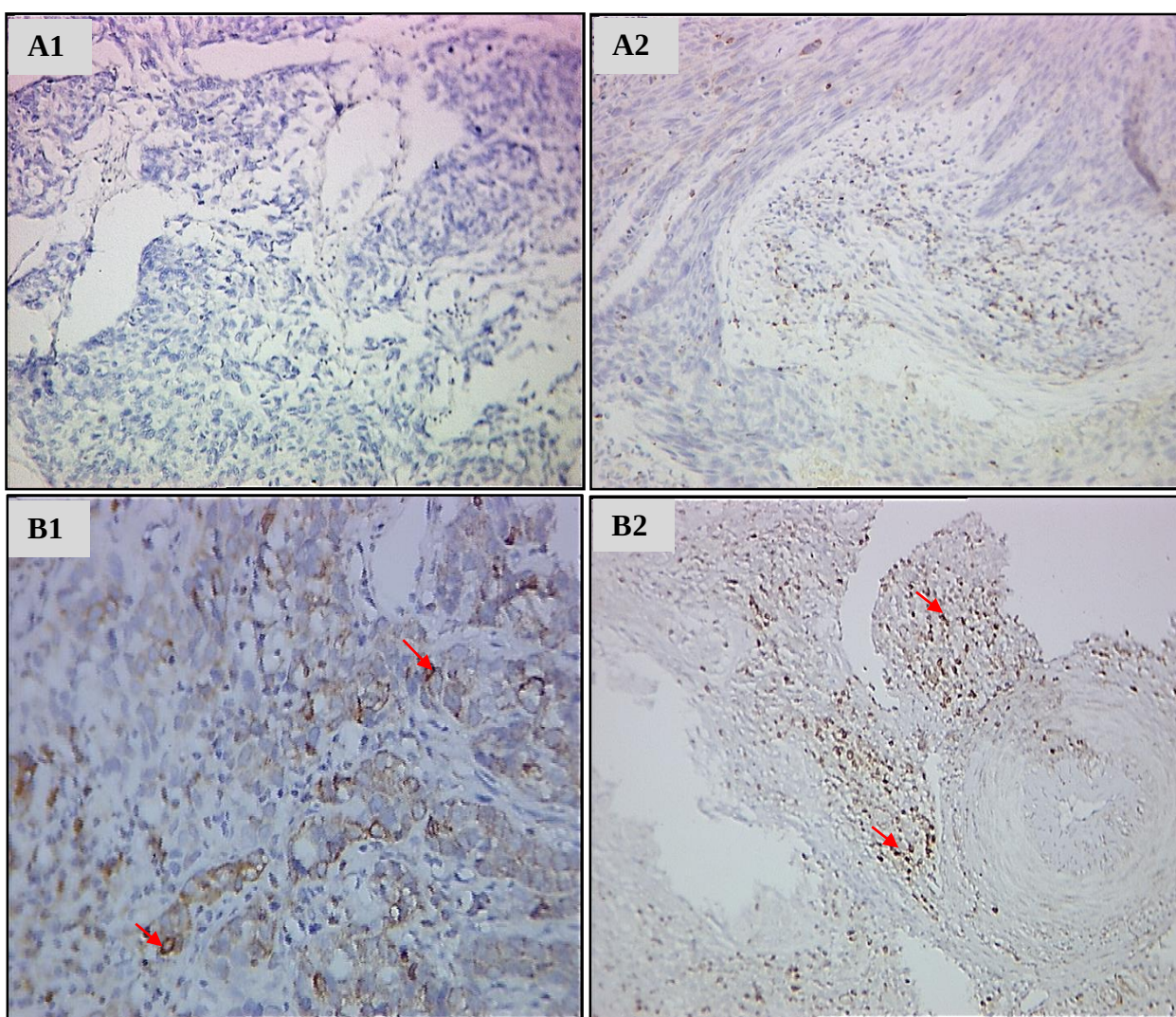


Figure 29 : L'immunohistochimie de l'expression de la protéine Bcl-2. **A 1-2.** Expression négative dans le CÉ ($\times 200$) ; **B 1-2.** Expression faible dans le CÉ (B1 $\times 400$, B2 $\times 200$).

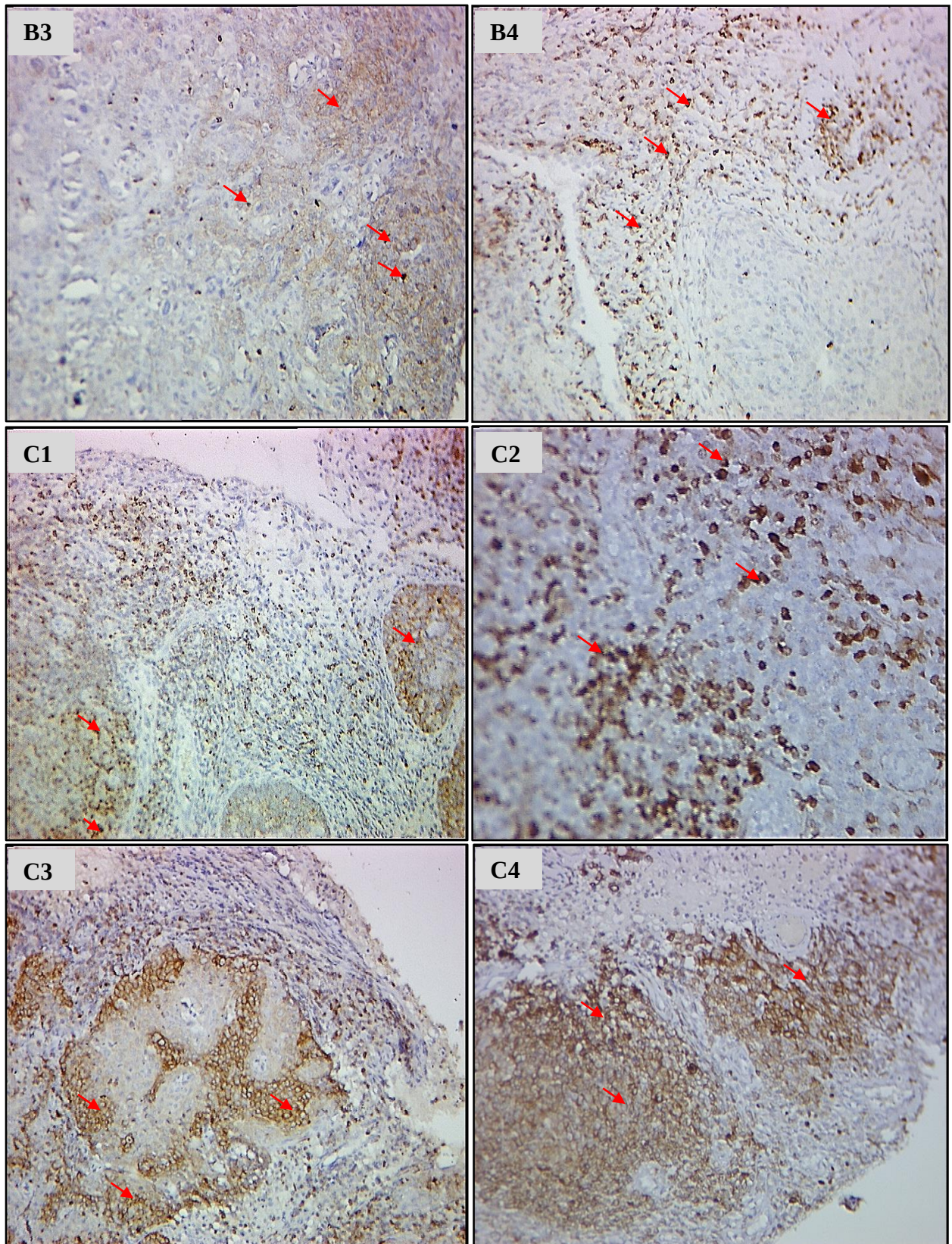


Figure 29 : L'immunohistochimie de l'expression de la protéine Bcl-2. **B 3-4.** Expression faible dans le CÉ (×200) ; **C 1-4.** Expression modérée à forte dans le CÉ (C1, C3, C4 ×200, C2 ×400).

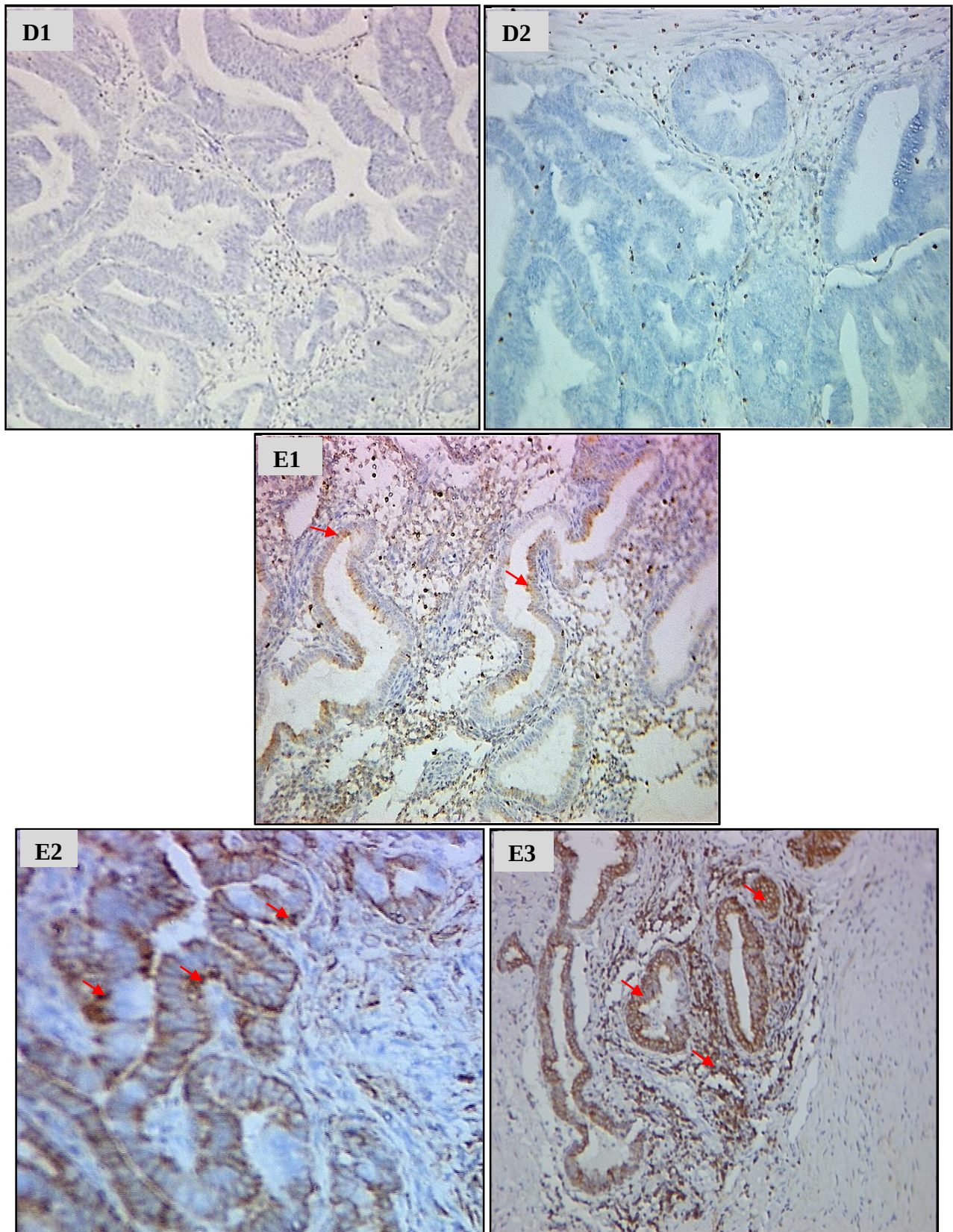


Figure 29 : L'immunohistochimie de l'expression de la protéine Bcl-2. **D 1-2.** Expression négative dans l'ADC (D1 $\times 200$, D2 $\times 400$) ; **E 1-3.** Expression faible à modérée dans l'ADC (E1 $\times 200$; E2 $\times 400$, E3 $\times 200$).

6.3. Expression de la protéine p53 dans le cancer du col de l'utérus

Dans cette partie de ce travail on a aussi testé l'expression de la protéine p53 dans les 90 échantillons de cancer du col de l'utérus utilisés dans la partie précédente. Nous avons estimé le taux de l'expression de la protéine p53 dans toutes les coupes. Les résultats de cette expression sont répartis en deux catégories : expression négative $< 5\%$ (nombre des cellules marquées) et expression positive $\geq 5\%$ (nombre des cellules marquées) (Tajlma *et al.*, 2001 ; Dako, 2002b). Les résultats trouvés dans ce travail sont résumés dans le tableau IX.

Tableau IX : Taux d'expression de la protéine p53 dans les cas du carcinome épidermoïde et dans l'adénocarcinome.

	- $< 5\%$, n (%)	+ $\geq 5\%$, n (%)	Taux positif (%)	Total, N
Carcinome épidermoïde	58 (75,32)	19 (24,68)	24,68	77
Adénocarcinome	12 (92,30)	1 (7,70)	7,70	13
Total				90

Un nombre élevé des prélèvements étudiés montre une expression faible ou nulle de la protéine p53. Pour le CÉ la majorité des cas (58/77) n'expriment pas la protéine p53 (75,32%). Le reste (24,68%) des cas montrent une expression positive de p53. Pour l'ADC également, 12/13 cas avec une expression négative (92,30%). Un seul cas a montré une expression positive (7,70%). En sommes, les cas de carcinome épidermoïde sont plus positifs en protéine p53 que les cas d'adénocarcinome (24,67% versus 7,70% respectivement).

La protéine p53 apparaît de couleur marron, nucléaire dans les cellules néoplasiques. Des fois l'expression de la protéine p53 semble dispersée [figure 30].

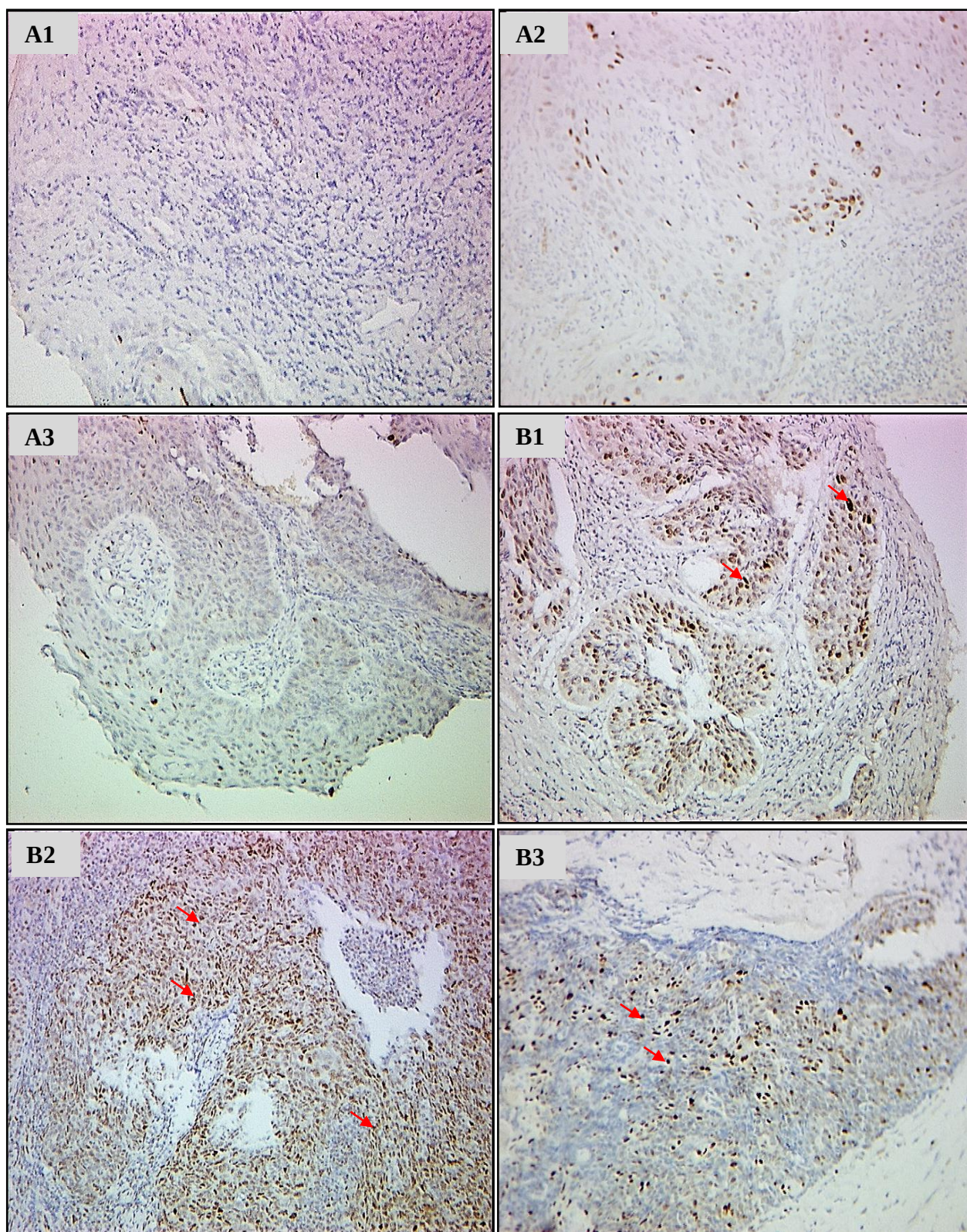


Figure 30 : L'immunohistochimie de l'expression de la protéine p53. **A 1-3.** Expression négative dans le CÉ ($\times 200$) ; **B 1-3.** Expression positive dans le CÉ ($\times 200$).

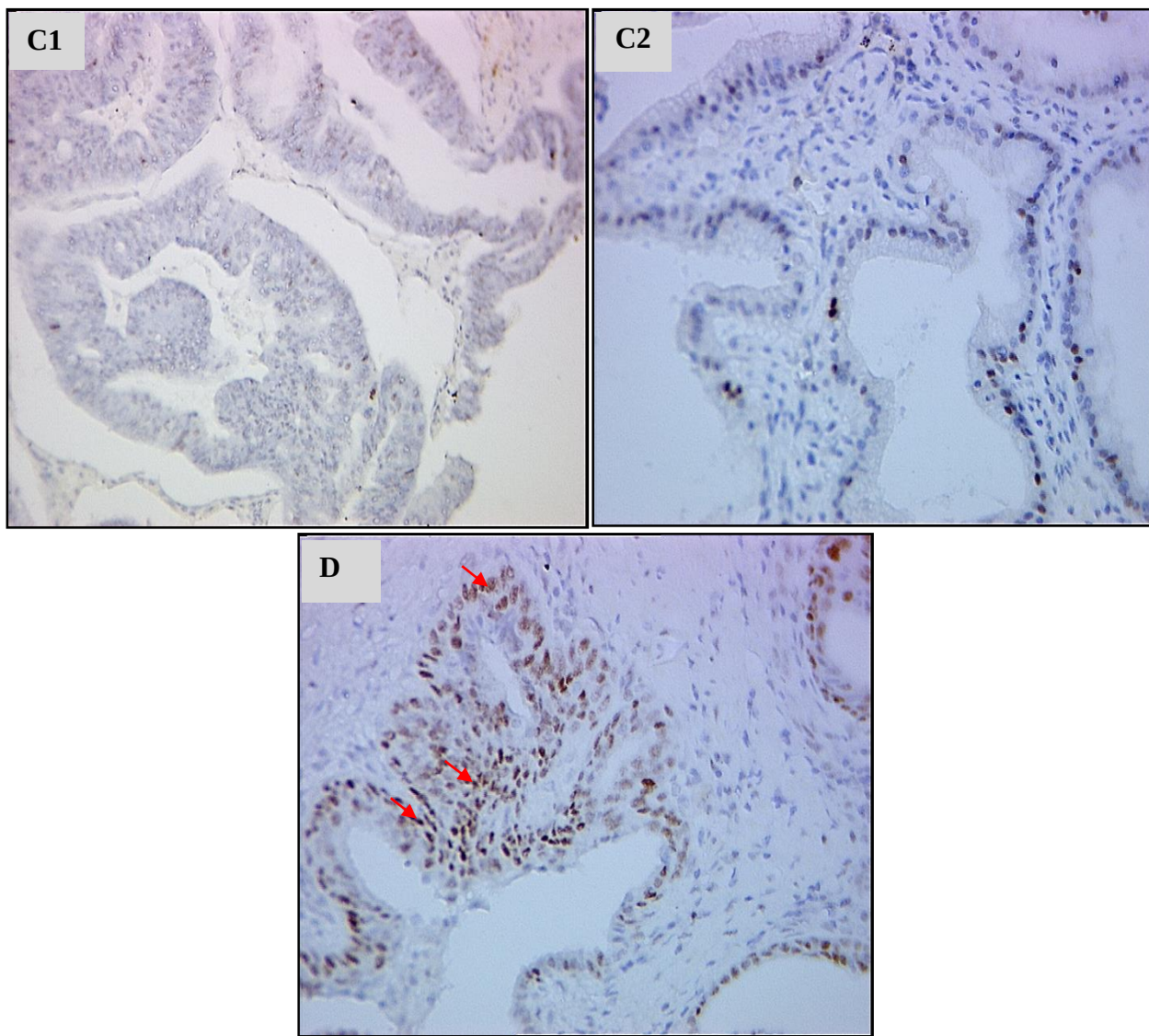


Figure 30 : L'immunohistochimie de l'expression de la protéine p53. **C 1-2.** Expression négative dans l'ADC ($\times 200$) ; **D.** Expression positive dans l'ADC ($\times 400$).

6.4. Relation entre le taux de l'expression de la protéine Bcl-2 et la protéine p53

Nous avons testé la corrélation entre l'expression de p53 et de Bcl-2 pour les 77 cas de carcinome épidermoïde [figure 31]. La valeur p était 0,352 signifie que la corrélation entre l'expression des protéines Bcl-2 et p53 n'est pas significative.

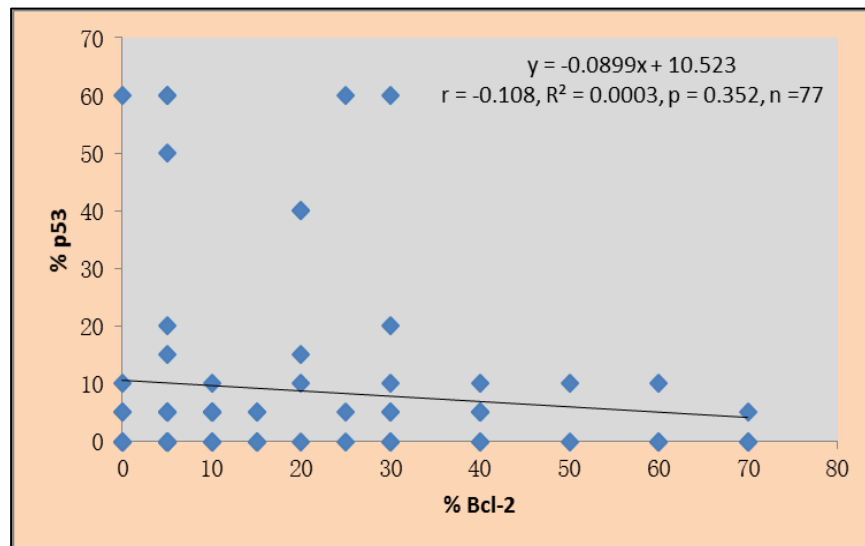


Figure 31 : La relation entre le taux de l'expression de la protéine Bcl-2 et la protéine p53.

6.5. Coloration à l'Hématoxiline-Éosine

Pour le deuxième groupe de patientes dont l'âge médian était de 54 ans ± 10.81 , nous avons réalisé sur des coupes de tissus la coloration HE afin de déterminer pour chacune des patientes le stade du cancer. Puis nous avons déterminé les types de virus HPV infectants avant de déterminer le taux de l'expression des protéines humaines suivantes : p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A. Nous avons analysé dans ce groupe 54 blocs de tissus différents. L'aspect de la coloration HE est présenté dans la figure 32. Nous avons photographié les coupes histologiques avec les différents grossissements ($\times 100$; $\times 200$ et $\times 400$).

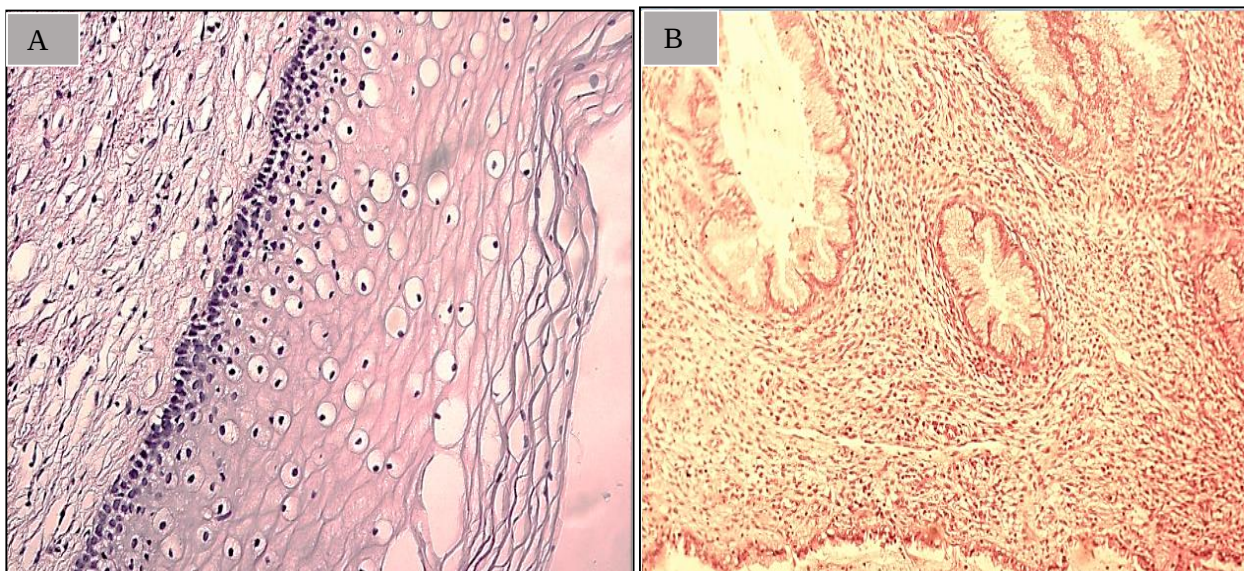


Figure 32 : Coloration HE. **A.** Exocol normal ($\times 200$) ; **B.** Endocol normal ($\times 100$).

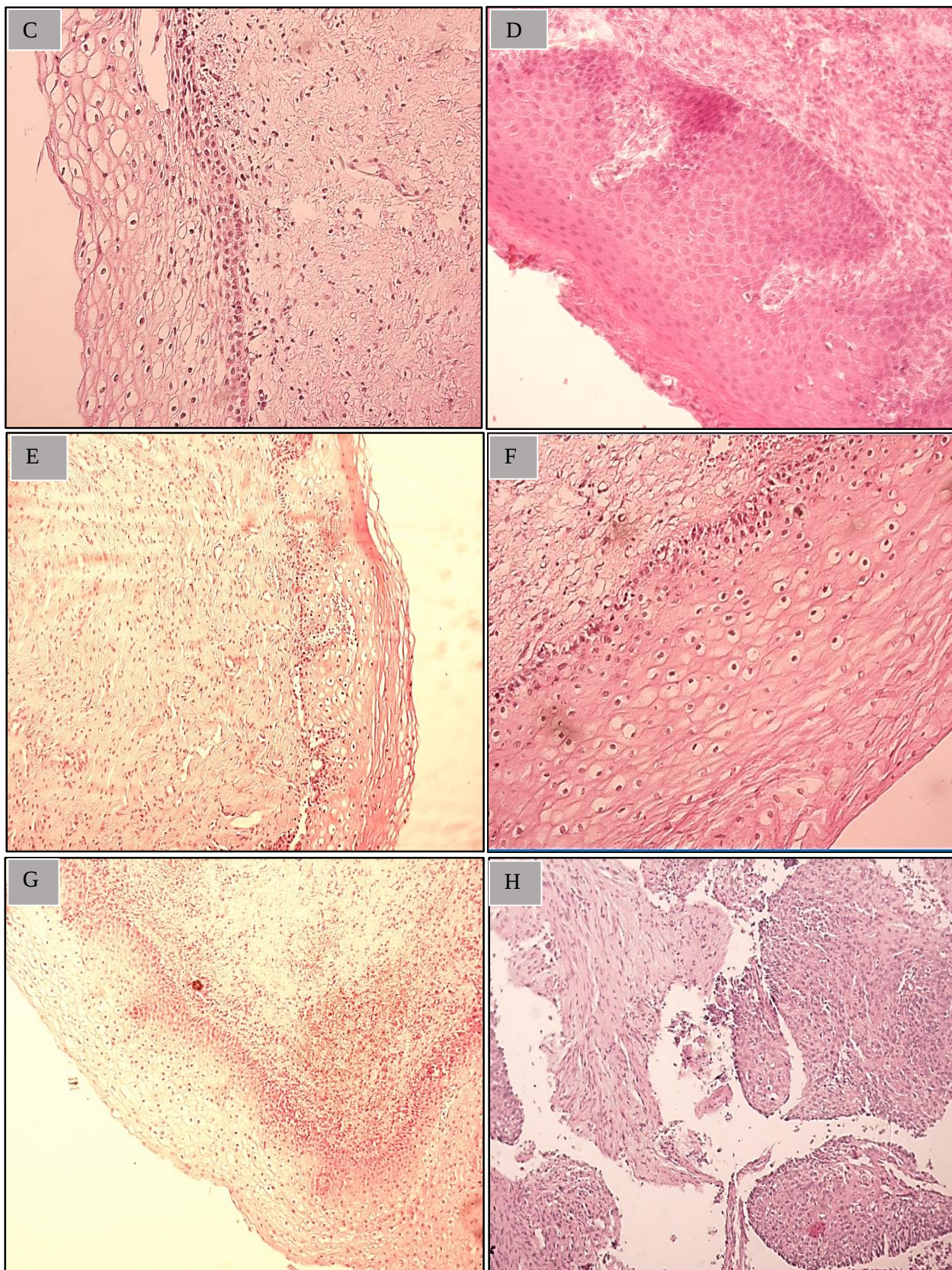


Figure 32 : Coloration HE. **C.** Cervixite (×200) ; **D.** Condylome (×100) ; **E.** Koilocytes (×200) ; **F.** CIN1(×200) ; **G.** CIN3 (×100) ; **H.** Carcinome épidermoïde (×100).

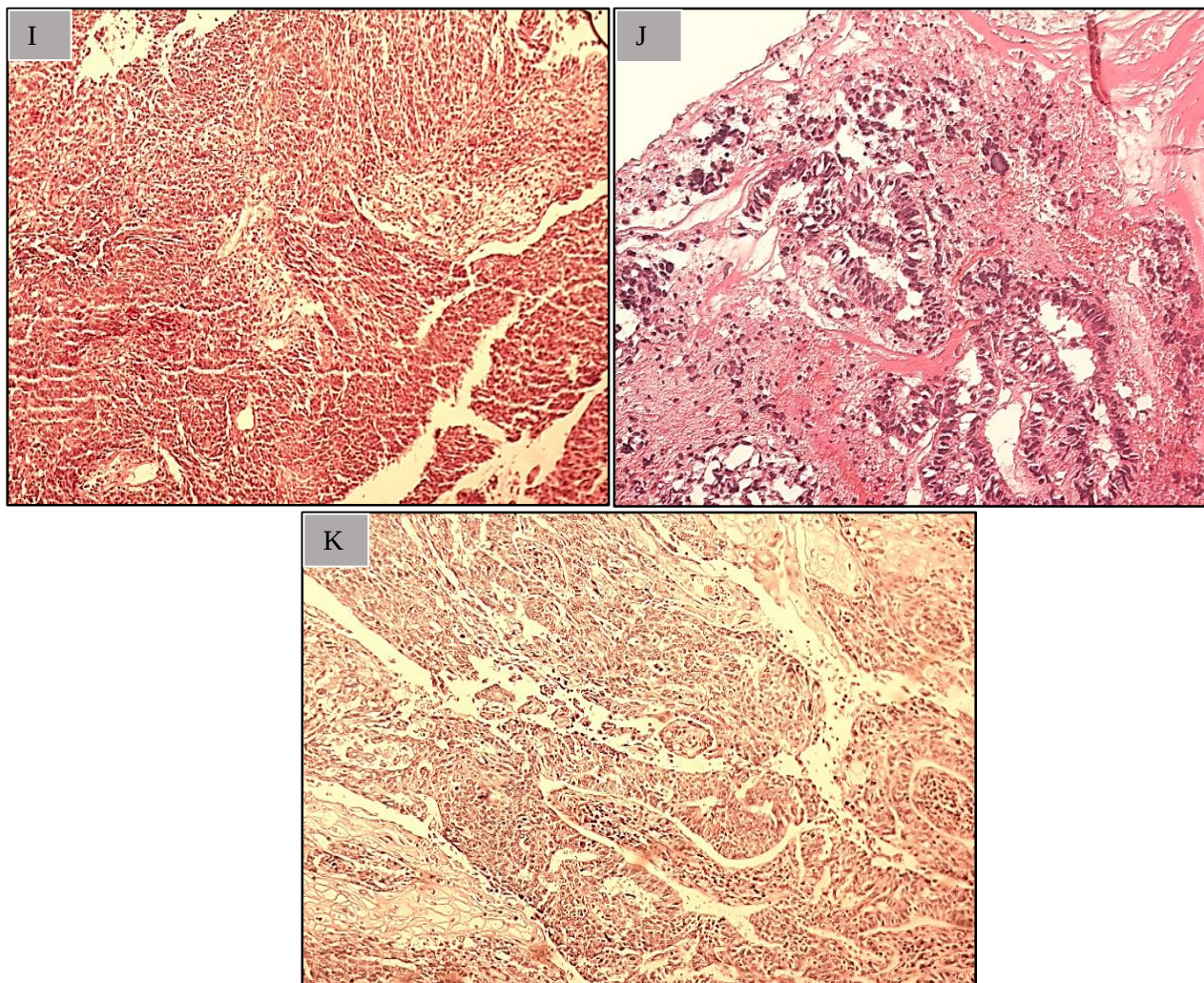


Figure 32 : Coloration HE. **I.** Carcinome épidermoïde ($\times 100$) ; **J.** ADC ($\times 200$) ; **K.** Carcinome adénoquameux ($\times 100$).

6.6. Prévalence des types HPV dans les wilayas de Sétif et Bordj Bou Arreridj (2015-2017)

La figure 33 montre le résultat négatif et un exemple de résultat positif du génotypage d'HPV par hybridation. Les deux tâches montrées sur la membrane du résultat négatif indiquent l'absence de l'infection par un type d'HPV, la présence du conjugué enzymatique (tâche de la biotine) et la réussite de la PCR. Alors que la membrane du résultat positif montre, en plus de ces deux taches du contrôle négatif, la présence d'une infection par le type HPV 16.

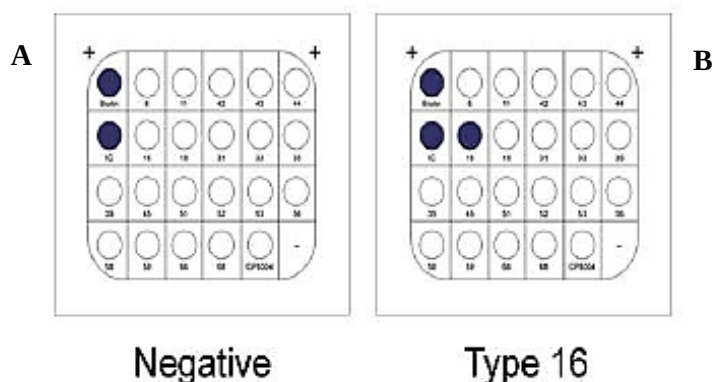


Figure 33 : Le résultat de l'hybridation HPV. **A.** résultat négatif ; **B.** résultat positif du typage HPV 16.

Selon le résultat de typage [figure 34], nous n'avons pas détecté d'HPV dans 45% des cas des spécimens. Les autres cas sont touchés par ces types d'HPV (HPV 16 ; 18 ; 39 ; 56 ; 58 et 68). Environ 3% des prélèvements n'étaient pas en bon état pour l'analyse, ils n'ont pas été étudiés.

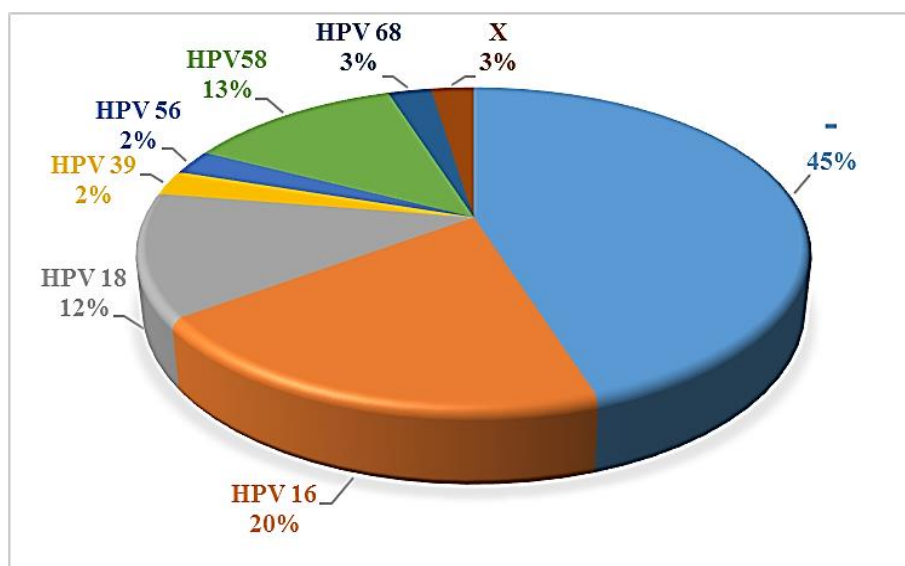


Figure 34 : La prévalence des types HPV dans les wilayas de Sétif et Bordj Bou Arreridj (2015-2017).

6.7. Expression de la protéine p16 dans le cancer du col de l'utérus

Le taux d'expression de la protéine p16 pour tous les 54 prélèvements a été estimé. Pour déterminer le score d'expression de cette protéine, quatre classes semi-quantitative ont été désignées selon le pourcentage des cellules tumorales positivement marquées : négative (moins de 5%), positive faible (1+, 5-25%), positive modérée (2+, 26-50%) et positive intense (3+, plus de 50%) (Zhong *et al.*, 2015). Si le marquage est diffus et pas limité on l'exprime par des descriptions

CHAPITRE 6. Résultats

qualitatives comme marquage faible, modéré ou fort sans détermination des pourcentages. Les résultats de l'expression de la protéine p16 sont résumés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats de l'expression de la protéine p16.

Diagnostic	- < 5%, n (%)	+ 5-25%, n (%)	+ 26-50%, n (%)	+ > 50%, n (%)	Taux positif (%)	Total, N
Normal: Exocol	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	3
Endocol	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	5
Cervicite	7 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	7
Condylome	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	4
Koilocytes	9 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	9
CIN1	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	10
CIN3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	100	1
CÉ	1 (8,33)	4 (33,33)	1 (8,33)	6 (50)	91,67	12
ADC	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	2
Carcinome adénosquameux	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	100	1
Total	41	5	1	7		54

La plupart des échantillons, 41/54 (75,93%), n'expriment pas la protéine p16, 6/54 des cas (11,11%) ont une expression faible à modérée de la protéine p16. Et seulement 7/54 échantillons l'expriment fortement ce qui représente 12,96% des cas. Le taux positif de l'expression de la protéine p16 était de 100%, 91,67% et 100% dans les CIN3, les CÉ et les carcinomes adénosquameux respectivement. Alors qu'il n'y a pas d'expression visible dans les autres stades de cancer, ni dans les cols normaux.

En plus, il y'a une expression plus intense dans les cas de carcinome épidermoïde et CIN3 par rapport aux autres stades où l'expression est soit négative ou faible [figure 35].

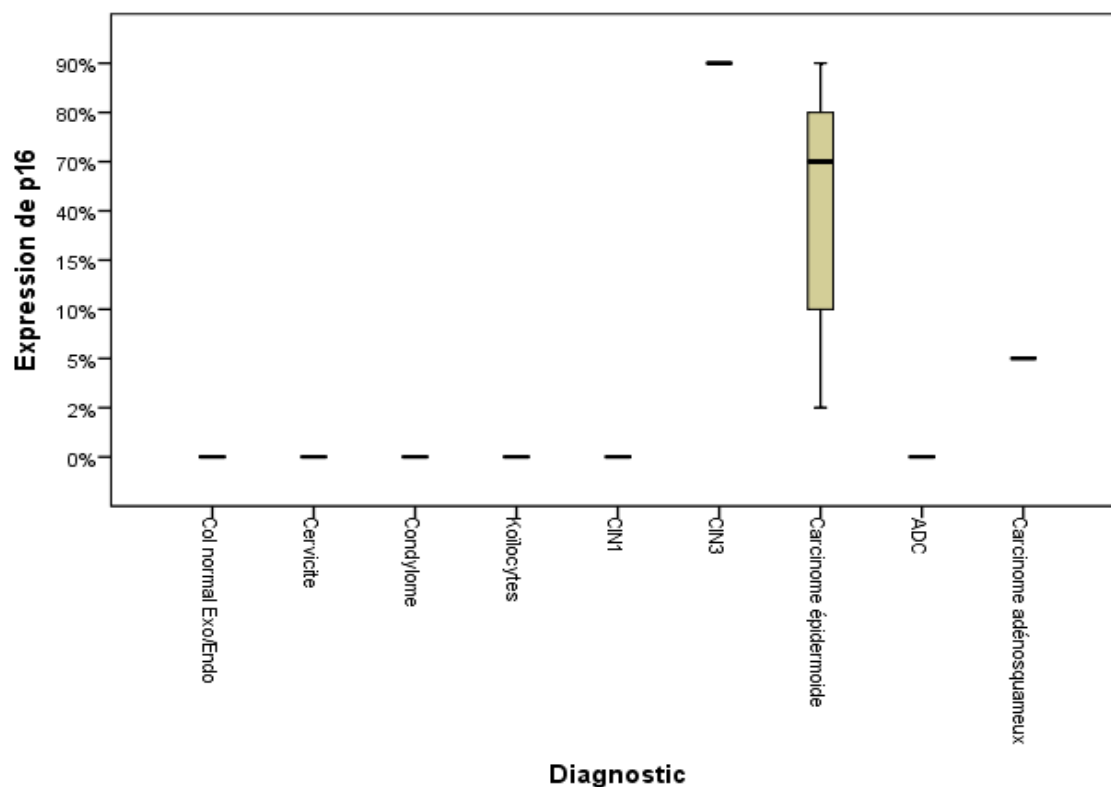


Figure 35 : Expression de la protéine p16 dans les différents types de lésions du col de l'utérus. Une expression négative dans la plupart des stades seulement les cas de CIN3 et de CE ont une expression forte de l'ordre de 90% et 70% respectivement.

Le marquage de la protéine p16 était cytoplasmique dans toutes les cellules et il était d'une couleur marron claire ou foncée. La coloration est diffuse dans la majorité des cas et son intensité était variable, des fois faible ou intense. Nous avons photographié les coupes histologiques avec les différents grossissements ($\times 100$; $\times 200$ et $\times 400$) [figure 36].

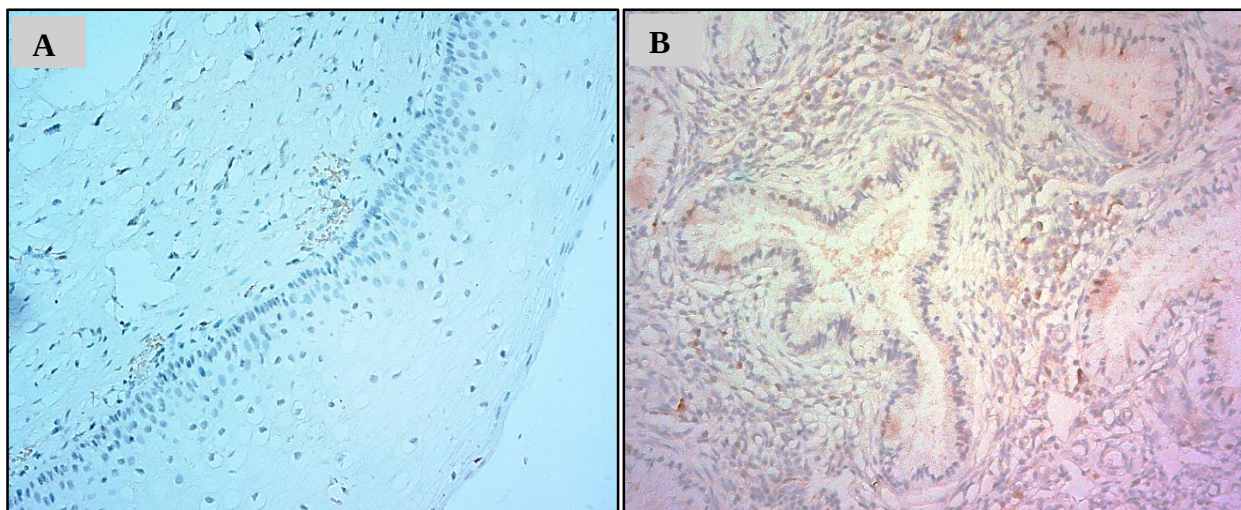


Figure 36 : Détection de l'expression de la protéine p16 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **A.** Exocol normal ($\times 200$) ; **B.** Endocol normal ($\times 200$).

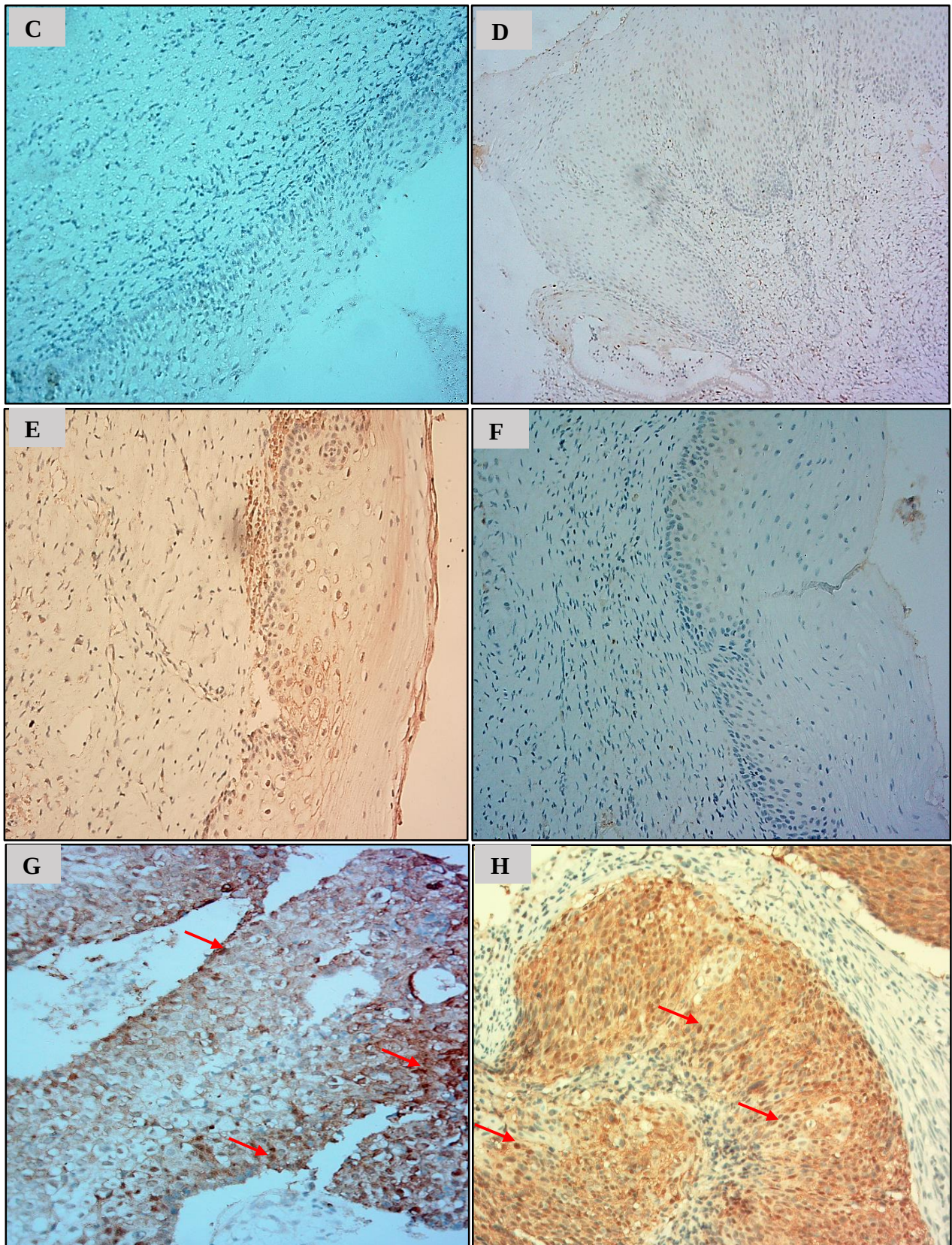


Figure 36 : Détection de l'expression de la protéine p16 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **C.** Cervicite (×200) ; **D.** Condylome (×100) ; **E.** Koilocytes (×400) ; **F.** CIN1 (×200) ; **G.** CIN3 (×200) ; **H.** CÉ (×200).

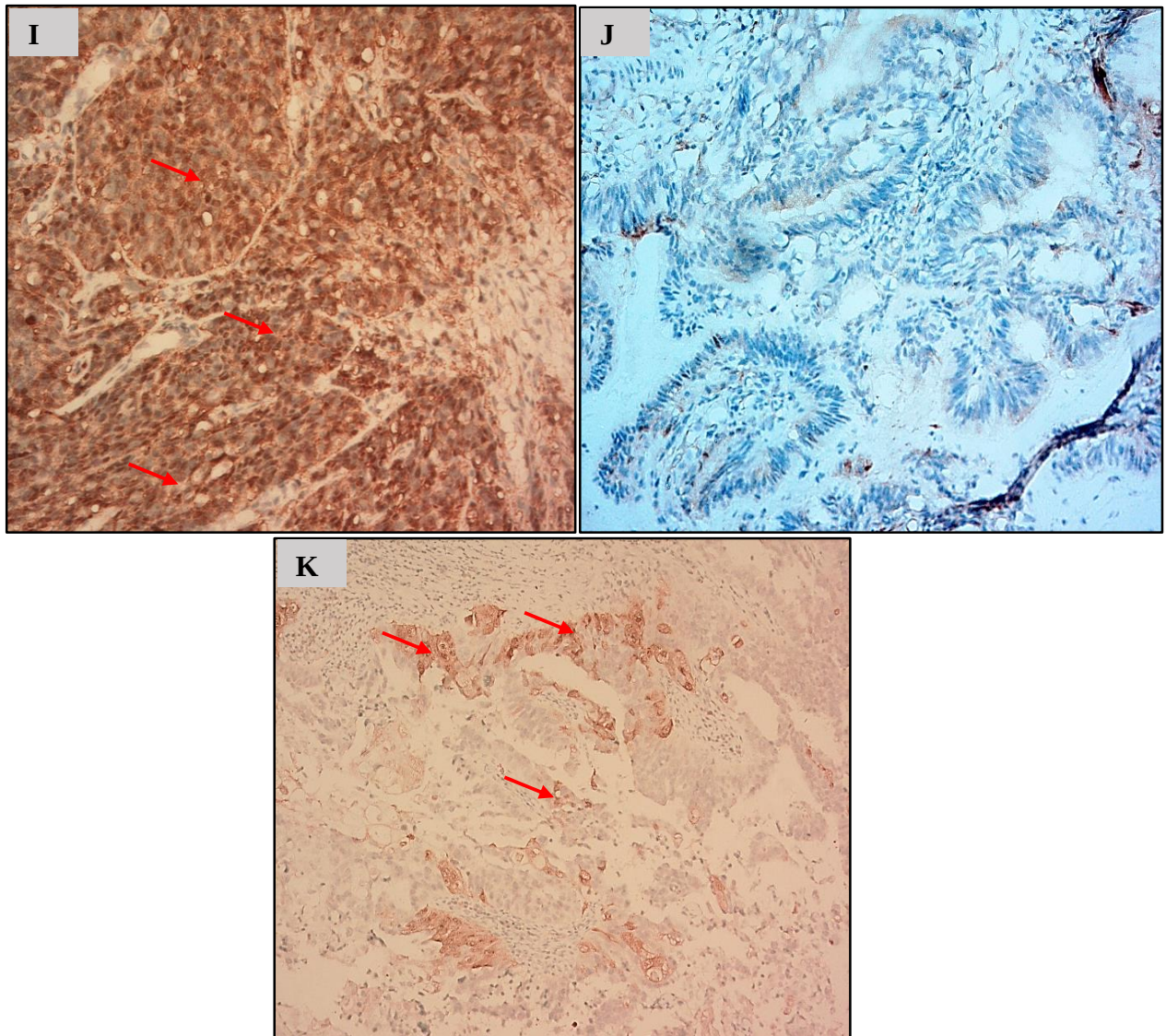


Figure 36 : Détection de l'expression de la protéine p16 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **I.** Carcinome ($\times 100$) ; **J.** ADC ($\times 400$) ; **K.** Carcinome adénoquameux ($\times 400$).

6.8. Expression de la protéine Ki-67 dans le cancer du col de l'utérus

La protéine Ki-67 a été détectée par immunohistochimie, puis le taux d'expression a été estimé en utilisant l'application Web-gratuite ImmunoRatio. Cette application permet de déterminer le score d'expression de la protéine Ki-67. En effet, 200 cellules épithéliales à travers l'ensemble des couches épithéliales ont été examinées dans le domaine de grossissement le plus grand (x400). L'index de Ki-67 a été défini comme le pourcentage des cellules positives en Ki-67 : négative, 1+, 2+ et 3+ a été donné quand l'index de Ki-67 était moins de 5%, 5%-25%, 26-50% et plus de 50% respectivement (Zhong *et al.*, 2015). Les résultats obtenus de l'expression de la protéine Ki-67 sont résumés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats de l'expression de la protéine Ki-67.

Diagnostic	- < 5%, n (%)	+ 5-25%, n (%)	+ 26-50%, n (%)	+ > 50%, n (%)	Taux positif (%)	Total, N
Normal: Exocol	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	3
Endocol	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	5
Cervicite	5 (71,43)	2 (28,57)	0 (0)	0 (0)	28,57	7
Condylome	3 (75)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	25	4
Koilocytes	9 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	9
CIN1	7 (70)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	30	10
CIN3	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	100	1
CÉ	2 (16,67)	3 (25)	3 (25)	4 (33,33)	83,33	12
ADC	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	2
Carcinome adénosquameux	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	100	1
Total	36	10	4	4		54

L'absence d'expression de la protéine Ki-67 a été enregistrée dans 36/54 des cas (66,66%), alors que dans 10/54 (18,52%) des cas l'expression était faible, 4/54 des cas (7,41%) ont une

CHAPITRE 6. Résultats

expression modérée et 4/54 des cas (7,41%) ont une forte expression de cette protéine. Aucune expression n'a été observée dans les cols normaux, les cas de koilocytes ou les adénocarcinomes. Cette protéine était présente dans 28,57% dans les cervicites, dans 25% dans les condylomes, dans 30% dans les CIN1, et dans 100% des cas de CIN3, dans 100% des cas de carcinomes adénosquameux et dans 83,33% des cas de CÉ. Les CÉ (10/54 cas) ont toujours une expression positive de la protéine Ki-67.

Le marquage de la protéine Ki-67 était nucléaire avec une couleur marron claire ou foncé. Son intensité était forte dans la plupart des cas. Le taux de l'expression est de l'ordre de 40 et 45% dans les cas du CÉ et le carcinome adénosquameux respectivement [figure 37 ; figure 38].

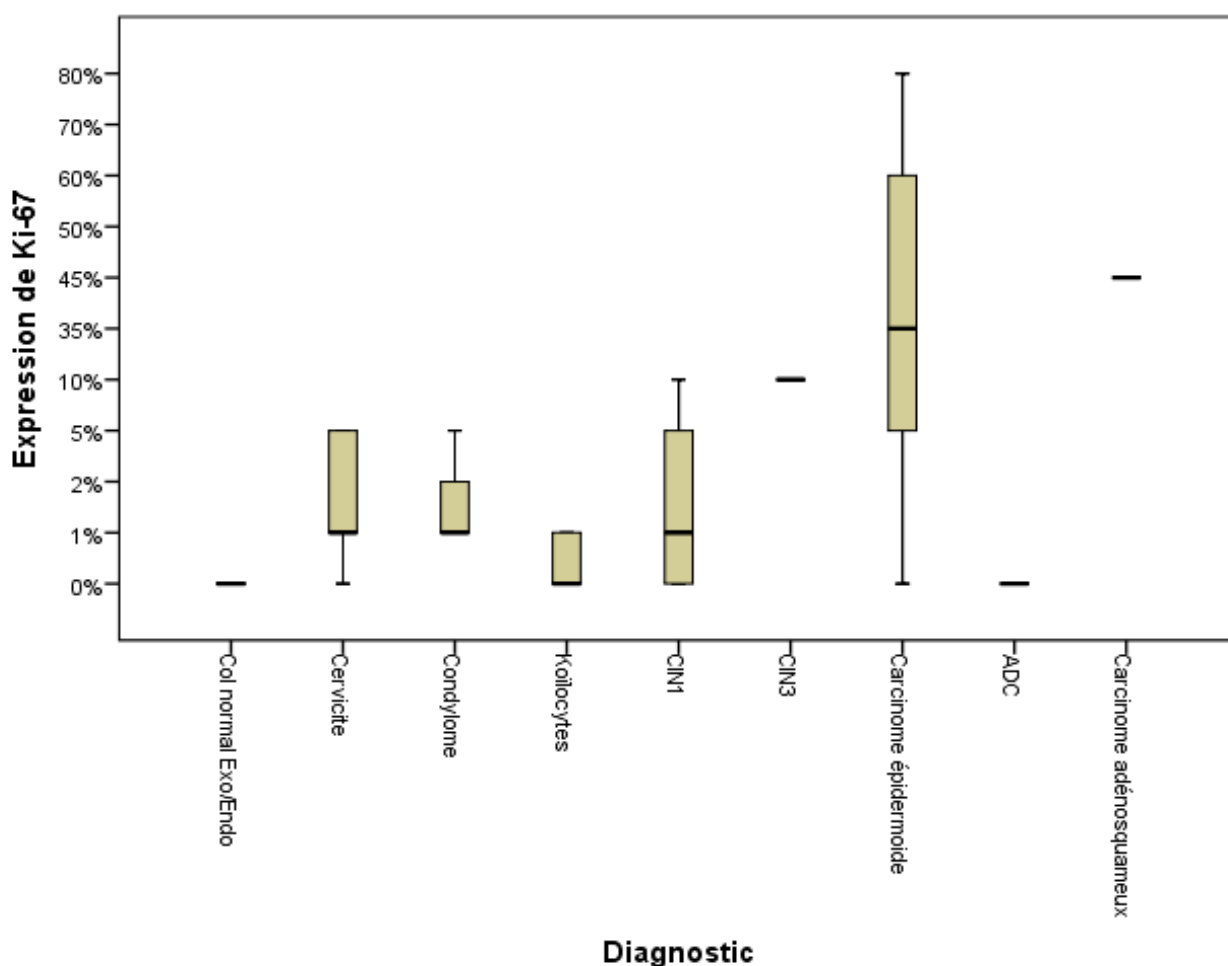


Figure 37 : Expression de la protéine Ki-67 dans les différents types de lésions du col de l'utérus. Une expression négative dans les cols normaux et l'ADC. L'expression dans les cas de cervicite et CIN1 est moins de 5%. L'expression est de l'ordre de 40 et 45% dans les cas du CÉ et le carcinome adénosquameux respectivement.

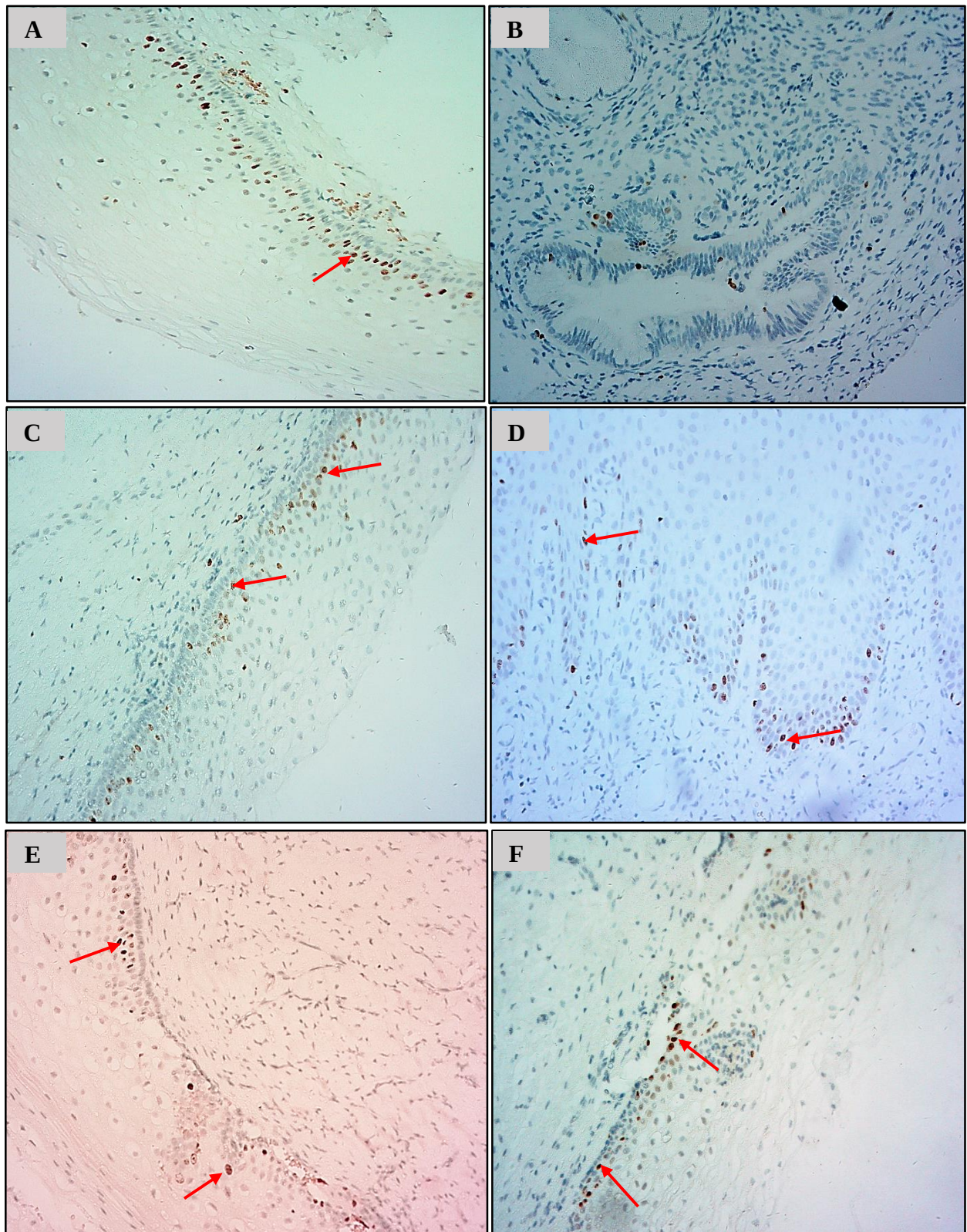


Figure 38 : Détection de la protéine Ki-67 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **A.** Exocol normal (×200) ; **B.** Endocol normal (×200) ; **C.** Cervicite (×200) ; **D.** Condylome (×200) ; **E.** Koilocytes (×200) ; **F.** CIN1 (×200).

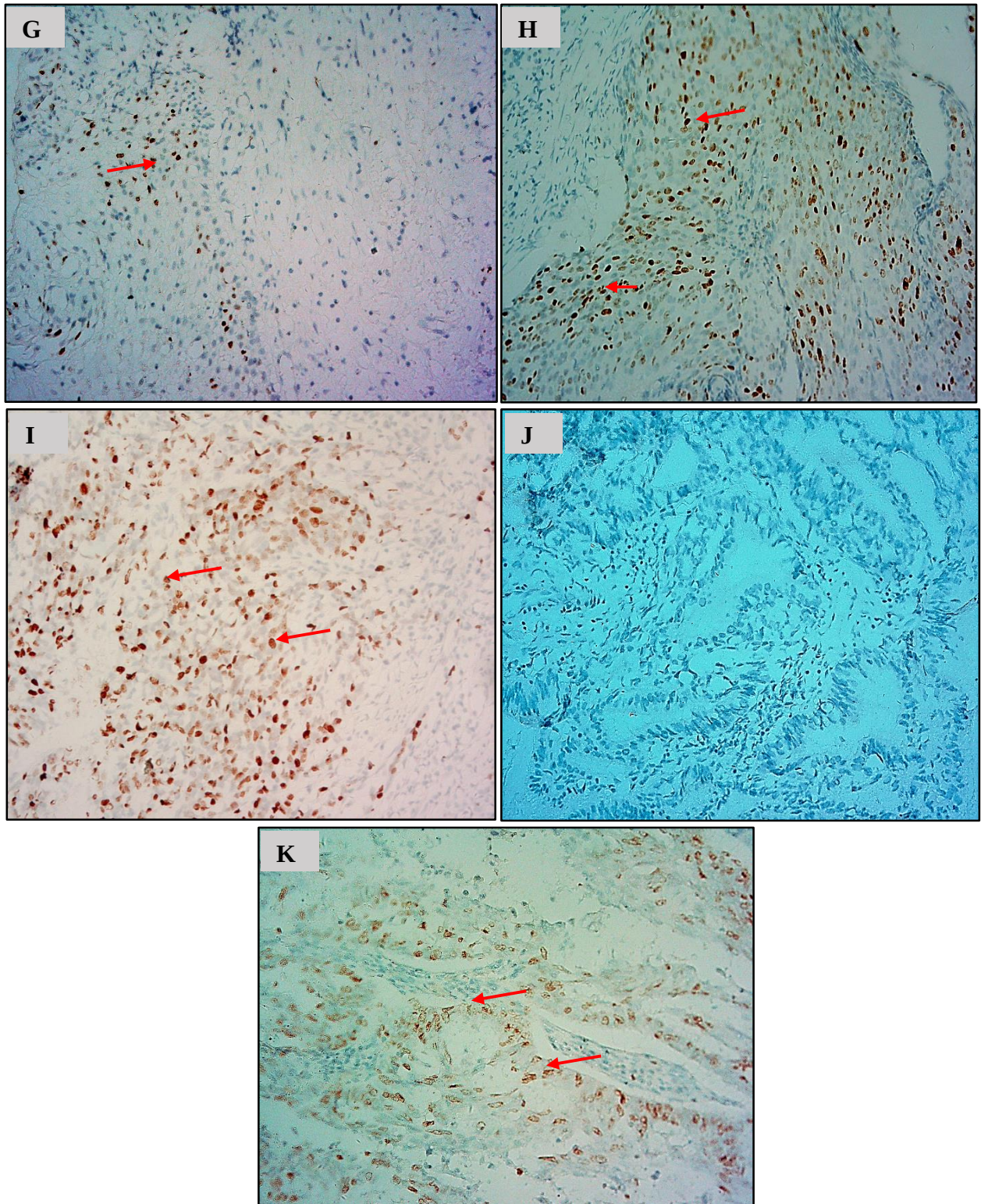


Figure 38 : Détection de la protéine Ki-67 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **G.** CIN3 ($\times 400$) ; **H.** CÉ ($\times 200$) ; **I.** Carcinome ($\times 200$) ; **J.** ADC ($\times 200$) ; **K.** Carcinome adénoquameux ($\times 200$).

6.9. Expression de la protéine MCM2 dans le cancer du col de l'utérus

La protéine MCM2 a été détectée en utilisant l'anticorps anti-MCM2 sur des coupes histologiques provenant des tissus normaux et des lésions du col de l'utérus. À l'état normal, ce sont les cellules épithéliales basales qui se sont avérées positives en cette protéine. Plus précisément, ce sont les noyaux qui étaient marqués. Plusieurs cas de figures ont été observés :

- soit que les cellules occupant moins de 25% de l'épithélium cervical (quart inférieur).
- la moitié inférieure (25% à 50%) de l'épithélium montrant un marquage positif.
- trois quarts inférieurs (51% à 75%) des cellules sont marquées.

Les niveaux de l'expression de la protéine MCM2 étaient définis comme score 1 ($\leq 25\%$) ; score 2 (25%-50%) ; score 3 (51%-75%) et score 4 ($> 75\%$) (Badr *et al.*, 2008 ; Zheng, 2015). Ou bien dans un mode semi-quantitatif la classification est basée sur deux critères principaux pour tous les antigènes : la distribution et l'intensité. L'intensité du marquage est graduée comme faible « marron clair » ou forte « marron foncé » (Pinto *et al.*, 2008). Pour cette partie, en plus de l'estimation du taux de l'expression de la protéine MCM2 par un pathologiste, nous avons utilisé l'application ImmunoRatio pour déterminer ce taux aussi.

Dans cette étude 28/54 cas (51,85%) ont un score 1+ d'expression de la protéine MCM2, 8/54 des cas (14,81%) ont un score 2+, 5/54 des cas (9,26%) ont un score 3+ et 3/54 des cas (5,56%) ont un score 4+. Le taux positif de l'expression de MCM2 est de 100% dans les cas de cervicites, CIN1, CIN3, CÉ et d'adénosquameux. Ce taux était 66,67% dans les cas d'exocol, de 20% des cas d'endocol, 77,78% des cas de koilocytes et de 50% pour les cas de condylomes et d'ADC [tableau XII].

CHAPITRE 6. Résultats

Tableau XII : Résultats de l'expression de la protéine MCM2.

Diagnostic	- < 5%	+ 5-25%,	+ 26-50%,	+ 51-75%,	+ > 75%,	Taux positif (%)	Total, N
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Normal: Exocol	1 (33.33)	2 (66.67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	66.67	3
Endocol	4 (80)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20	5
Cervicite	0 (0)	6 (85,71)	1 (14,29)	0 (0)	0 (0)	100	7
Condylome	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	50	4
Koilocytes	2 (22,22)	7 (77,78)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	77,78	9
CIN1	0 (0)	8 (80)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	100	10
CIN3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	100	1
CÉ	0 (0)	3 (25)	3 (25)	3 (25)	3 (25)	100	12
ADC	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	50	2
Carcinome adénosquameux	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	100	1
Total	10	28	8	5	3		54

Les cols normaux expriment la protéine MCM2, l'ordre de cette expression varie entre 0 et 15%. Pour les cas de cervicites, de condylomes, et les cas de koilocytes, l'ordre de l'expression de la protéine MCM2 est de 15%, 5%, et 10% respectivement. L'ordre de l'expression pour les cas de CIN1, les cas d'ADC est de 20% et 10% respectivement. L'expression élevée a été trouvée avec les cas de CIN3 et de carcinomes et elle est de l'ordre de 65-70% [figure 39].

Dans ce travail, l'expression de la protéine MCM2 était principalement limitée à la portion basale de l'épithélium de l'exocol. Un marquage nucléaire variable était observé aussi dans les cellules glandulaires. Bien que la plupart des glandes aient montré des cellules positives dispersées, dans des occasions rares le marquage de 25% à 50% des cellules étaient notées. Quelques cellules dispersées du stroma étaient aussi positives [figure 40]. Le marquage par l'anticorps anti-MCM2 utilisé dans ce travail est de couleur marron foncée et d'une intensité forte dans tous les

CHAPITRE 6. Résultats

échantillons. Nous avons photographié les coupes avec les différents grossissements ($\times 100$; $\times 200$ et $\times 400$)

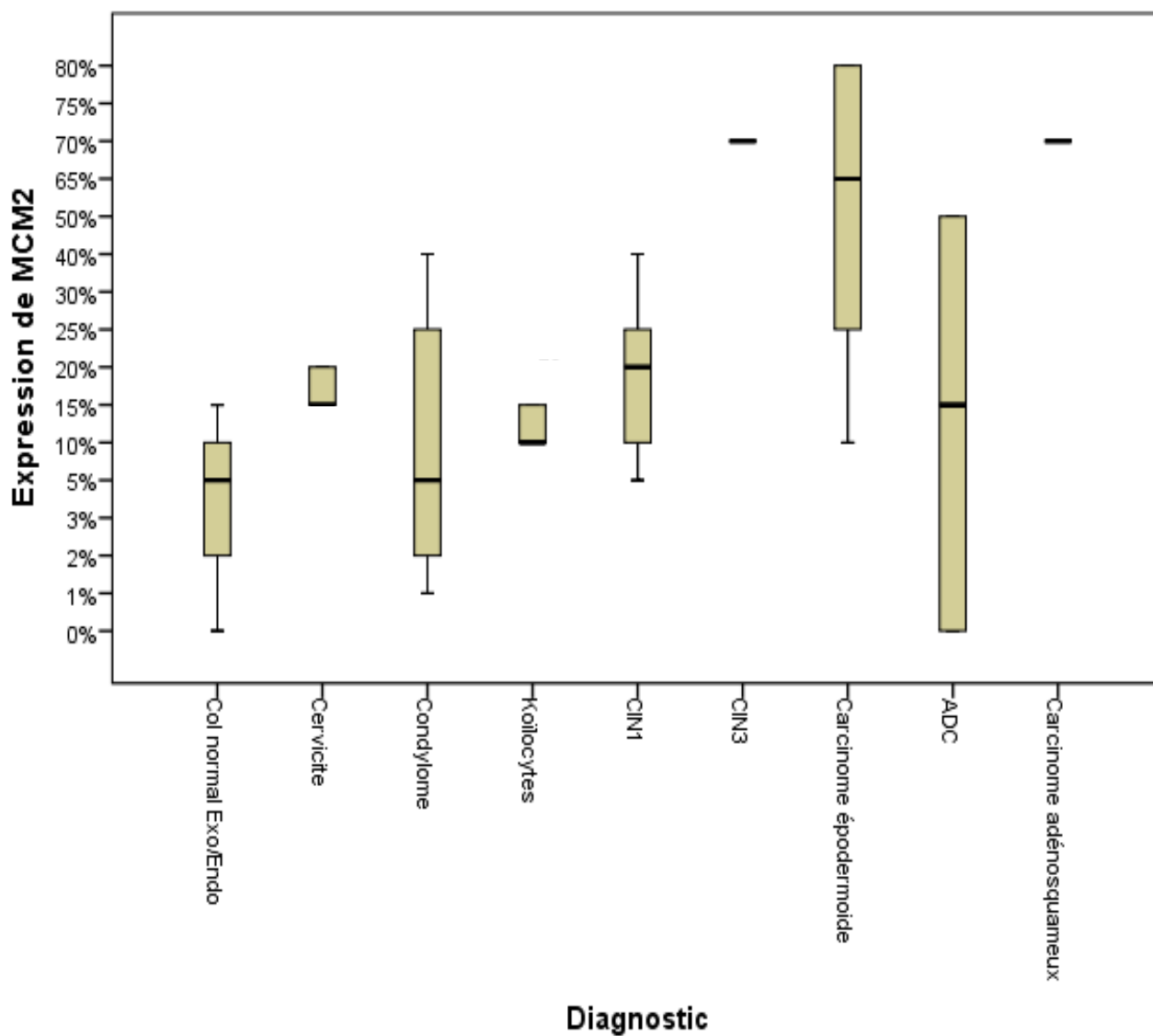


Figure 39 : Expression de la protéine MCM2 dans les différents types de lésions du col de l'utérus. Une expression entre 0 et 15% dans les cols normaux ; les cervicites ; les condylomes ; les koïlocytes et les ADC. L'ordre de l'expression est de 20% dans la CIN1 ; 70% dans la CIN3 et le carcinome adénosquameux ; 65% dans le CÉ.

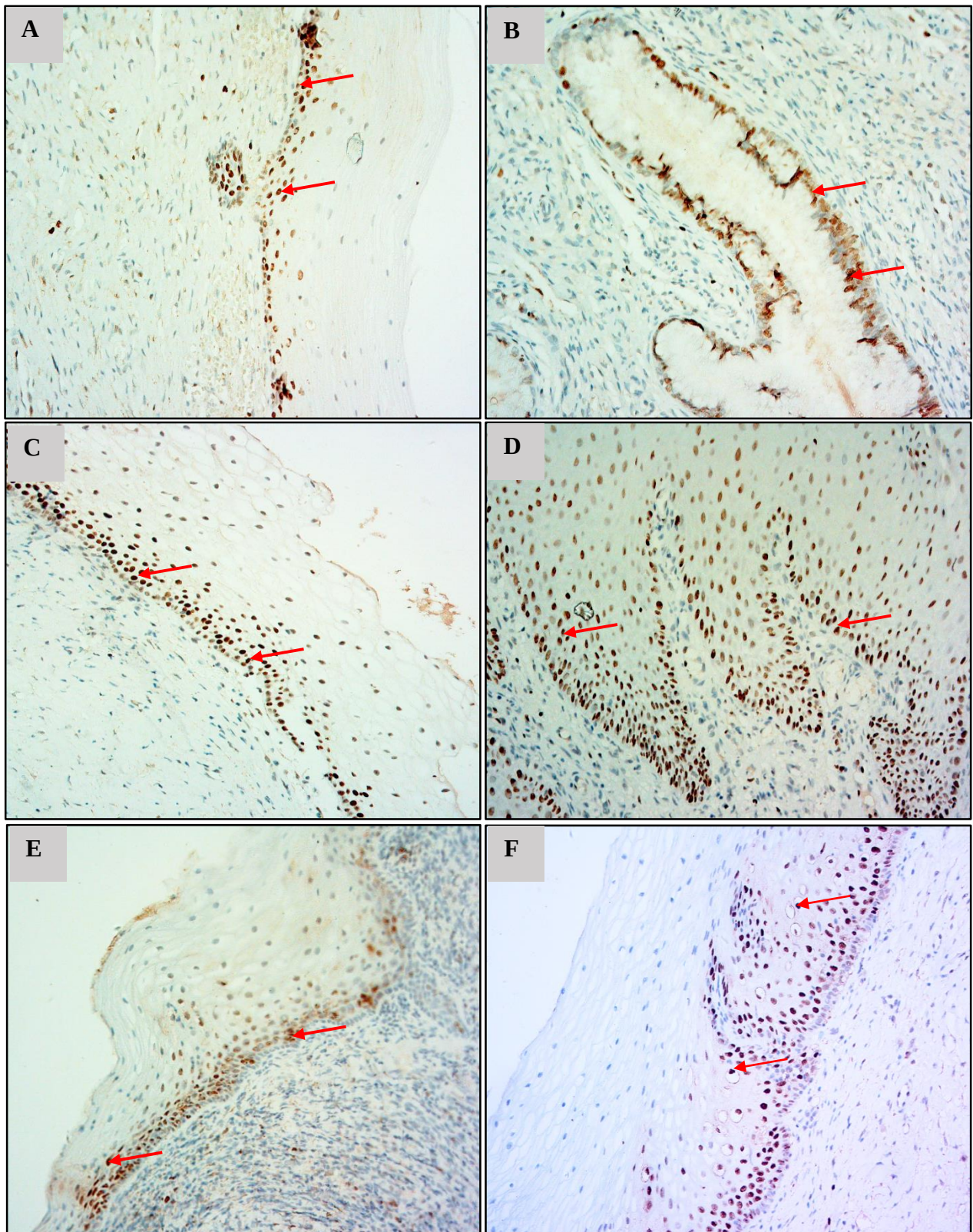


Figure 40 : Détection de de la protéine MCM2 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **A.** Exocol normal ($\times 200$) ; **B.** Endocol normal ($\times 200$) ; **C.** Cervicite ($\times 200$) ; **D.** Condylome ($\times 200$) ; **E.** Koilocytes ($\times 200$) ; **F.** CIN1 ($\times 200$).

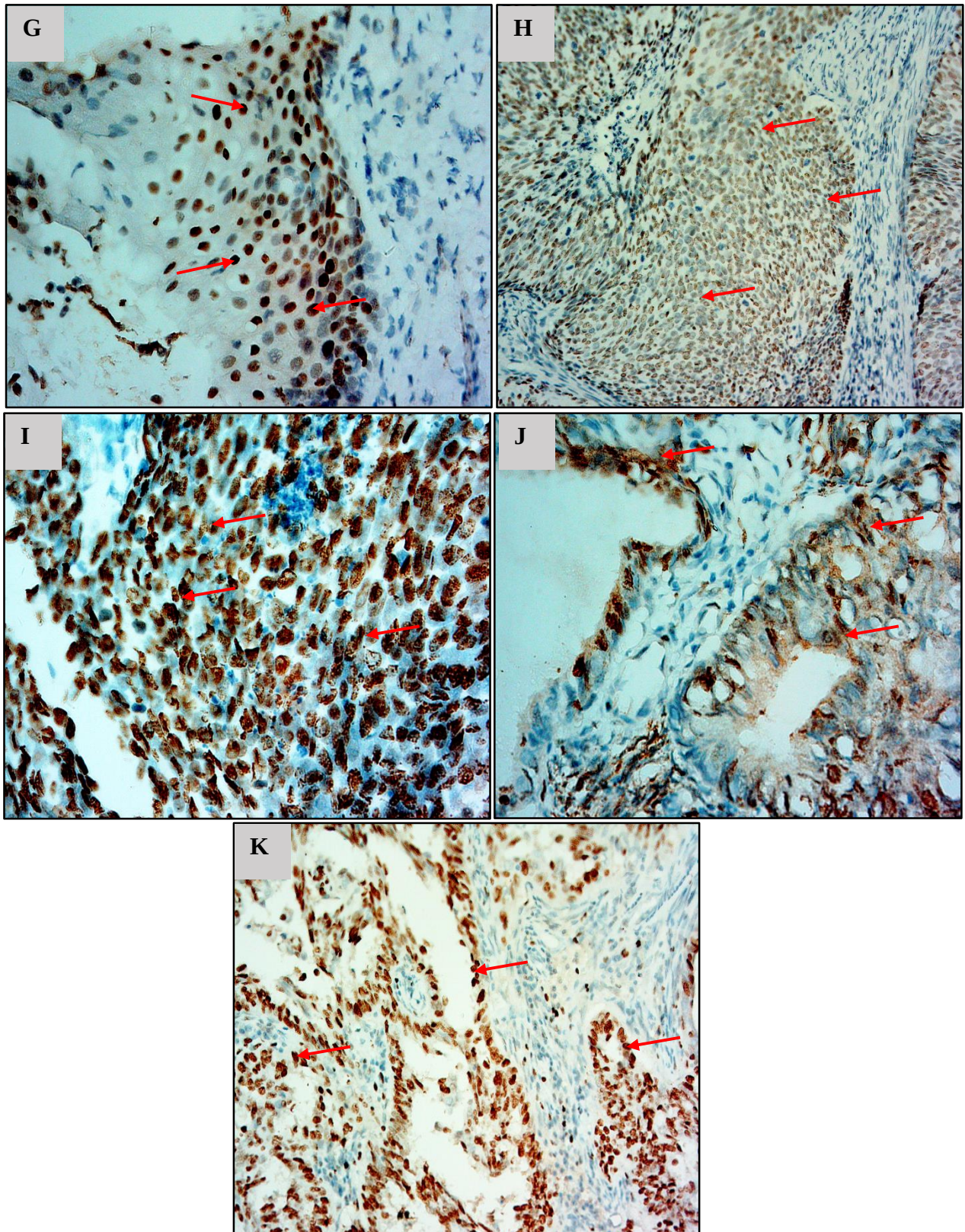


Figure 40 : Détection de de la protéine MCM2 par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **G.** CIN3 ($\times 400$) ; **H.** CE ($\times 200$) ; **I.** Carcinome ($\times 400$) ; **J.** ADC ($\times 400$) ; **K.** Carcinome adénoquameux ($\times 200$).

6.10. Expression de la protéine TOP2A dans le cancer du col de l'utérus

En utilisant l'anticorps anti-TOP2A sur les tissus normaux et les différentes lésions du col de l'utérus la protéine TOP2A était présente un peu partout dans ces tissus. La coloration a touché différentes régions de l'épithélium. Le pourcentage de TOP2A des cellules épithéliales positives était recordé comme :

- basale (les noyaux marqués étaient moins de 25% et ont occupé le quart inférieur de l'épithélium cervical) ;
- la moitié inférieure (25% à 50%) des noyaux ont montré un marquage positif et/ ou ont impliqué la moitié inférieure de l'épaisseur de l'épithélium du col de l'utérus.
- trois quarts inférieurs (50% à 75%) des noyaux marqués et/ ou le marquage a impliqué moins de trois quarts de l'épaisseur épithélial) et épaisseur entier (75% à 100% des noyaux marqués étaient positive) (Badr *et al.*, 2008).

Les résultats de l'immunohistochimie concernant cette protéine sont résumés dans le tableau XIII. L'application ImmunoRatio a été utilisée pour estimer le taux d'expression de cette protéine. Une proportion de 51.85% des cas ont une expression $\leq 25\%$ de la protéine TOP2A ; 15/54 cas (27.78%) ont un taux d'expression de 26-50% de cette protéine la majorité des cas sont des CÉ, 9/54 cas (16.67%) ont un taux d'expression de 51-75% avec une répartition entre les différents stades et 2/54 cas (3.70%) expriment fortement la protéine TOP2A. Le taux positif de l'expression de TOP2A était élevé presque dans tous les stades et même les cols normaux.

CHAPITRE 6. Résultats

Tableau XIII : Les résultats de l'expression de la protéine TOP2A.

Diagnostic	- < 5%	+ 5-25%,	+ 26-50%,	+ 51-75%,	+ > 75%,	Taux positif (%)	Total, N
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Normal: Exocol	1 (33,33)	2 (66,67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	66,67	3
Endocol	1 (20)	1 (20)	2 (40)	1 (20)	0 (0)	80	5
Cervicite	1 (14,28)	3 (42,86)	1 (14,28)	2 (28,57)	0 (0)	85,71	7
Condylome	0 (0)	1 (25)	2 (50)	1 (25)	0 (0)	100	4
Koilocytes	1 (11,11)	8 (88,89)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	88,89	9
CIN1	0 (0)	5 (50)	4 (40)	1 (10)	0 (0)	100	10
CIN3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	100	1
CÉ	0 (0)	3 (25)	6 (50)	2 (16,67)	1 (8,33)	100	12
ADC	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	50	2
Carcinome adénosquameux	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	100	1
Total	5	23	15	9	2		54

Selon la figure 41, le taux d'expression de la protéine TOP2A dans les cols normaux est de l'ordre de 15%. Dans les cervicites et les cas de koilocytes ce taux est de l'ordre de 20% alors que dans les cas des condylomes ce taux est de l'ordre de 50%. Les cas de CIN1 ont une expression varie entre 5-70%. Une expression très forte a été trouvée dans les cas de CIN3 et des carcinomes adénosquameux. Le taux d'expression dans les carcinomes épidermoïdes et les adénocarcinomes est 50% et 25% respectivement.

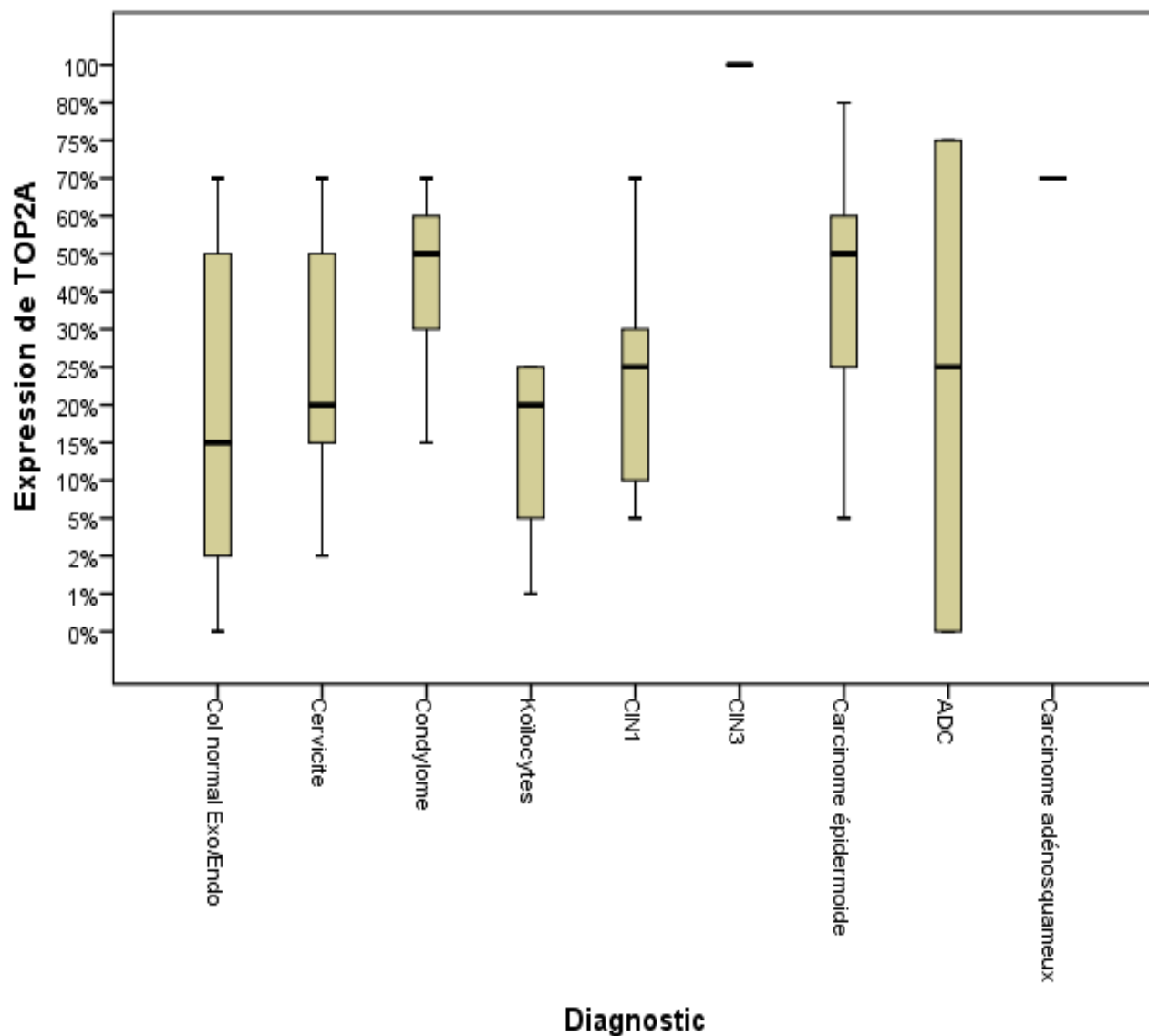


Figure 41 : Expression de la protéine TOP2A dans les différents types des lésions du col de l'utérus. Un ordre d'expression de 15% dans les cols normaux ; de 20% dans les cervicites ; de 50% dans les condylomes ; de 20% dans les koilocytes ; de 25% dans les CIN1 ; de 100% dans la CIN3 ; de 50% dans le CÉ ; de 25% dans les ADC et les ADC et de 70% dans le carcinome adénoquameux.

Le marquage par l'anticorps anti-TOP2A est nucléaire. Il a une couleur marron dont l'intensité varie du claire au foncée. Elle est diffuse dans les cas des ADC [figure 42]. Nous avons photographié les coupes histologiques avec les différents grossissements ($\times 100$; $\times 200$ et $\times 400$).

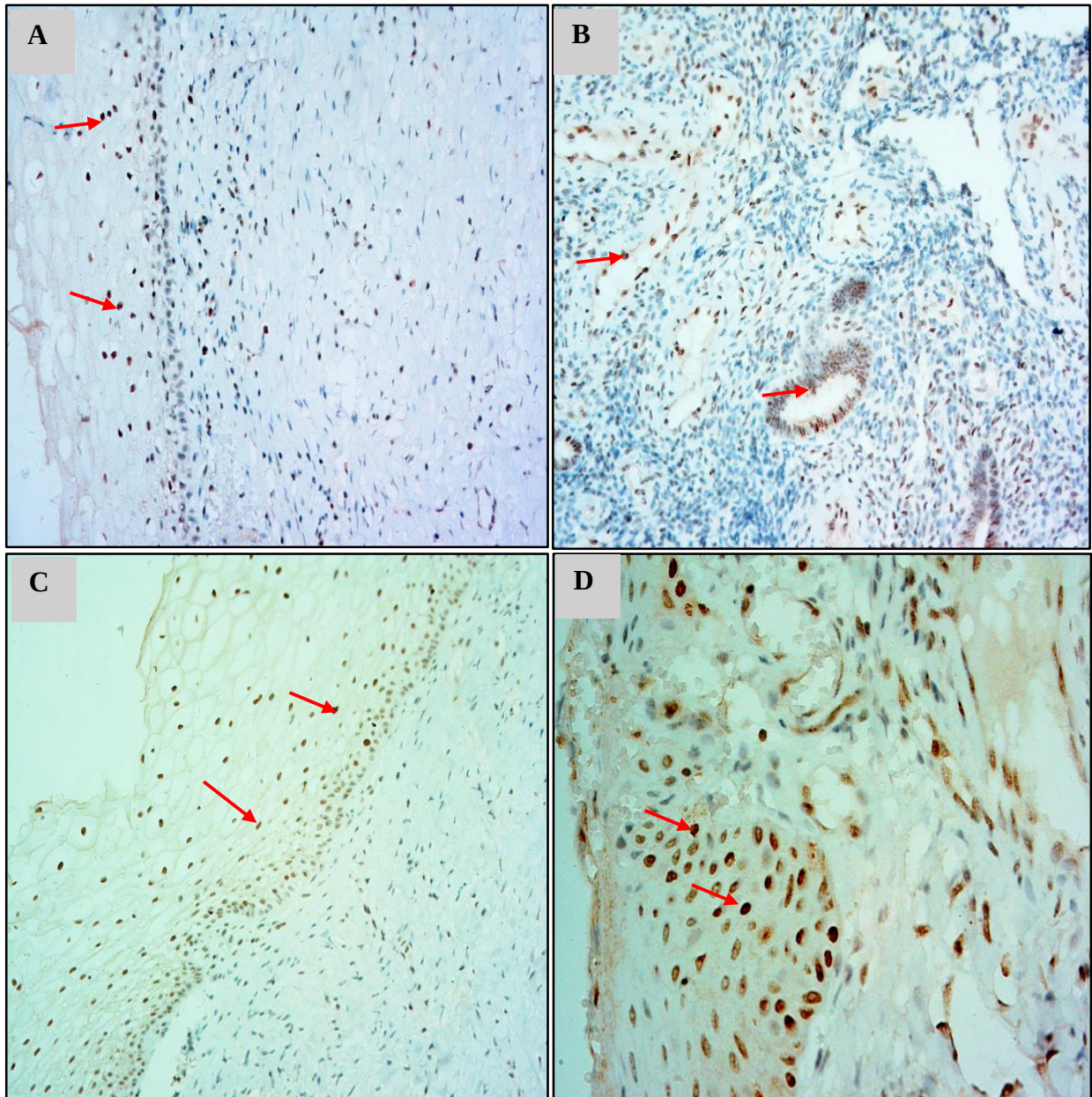


Figure 42 : Détection de de la protéine TOP2A par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **A.** Exocol normal (×200) ; **B.** Endocol normal (×200) ; **C.** Cervicite (×200) ; **D.** Condylome (×400).

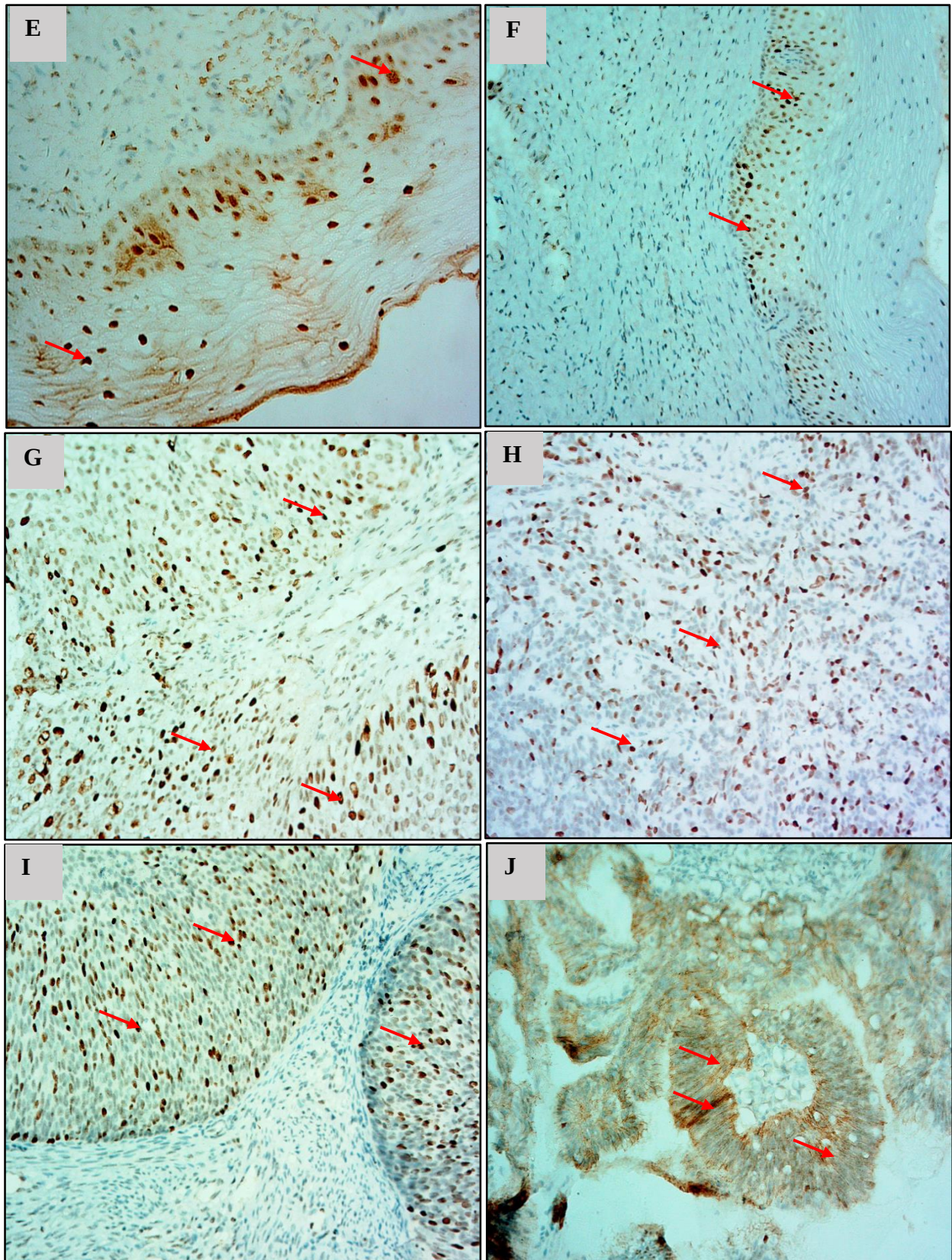


Figure 42 : Détection de de la protéine TOP2A par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **E.** Koilocytes (×400) ; **F.** CIN1 (×200) ; **G.** CIN3 (×200) ; **H.** CÉ (×200) ; **I.** Carcinome (×200) ; **J.** ADC (×400).

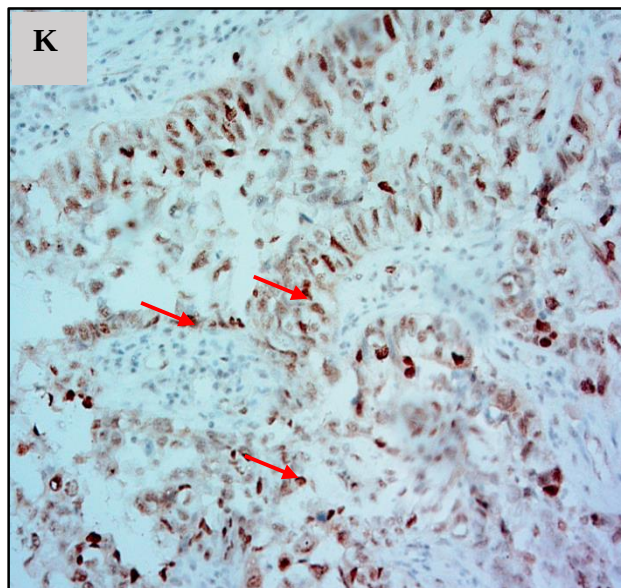


Figure 42 : Détection de de la protéine TOP2A par immunohistochimie dans le col utérin normal et les différents types des lésions du col de l'utérus. **K.** Carcinome adénosquameux ($\times 400$).

6.11. Analyse des images par l'ImmunoRatio

Les résultats de l'estimation par ImmunoRatio du marquage nucléaire des protéines Ki-67 ; MCM2 et TOP2A sont montrés dans la figure 43.

Les images résultantes de traitement par l'ImmunoRatio comprennent un identifiant d'échantillon, la date d'analyse, l'indice d'étiquetage (pourcentage d'aire nucléaire colorée positivement), l'image d'origine et une image pseudo-colorée montrant les composants du marquage.

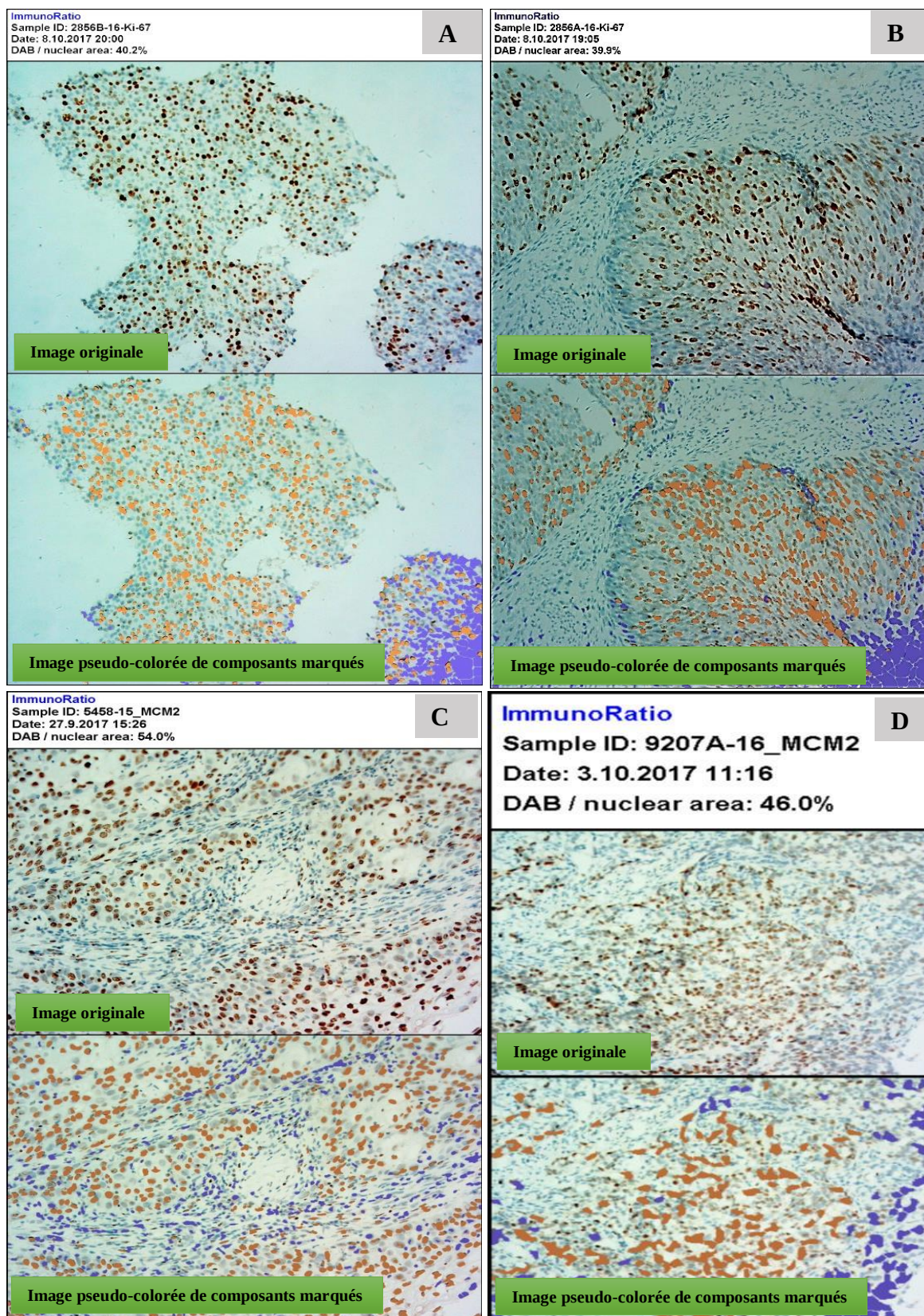


Figure 43 : Résultats de l'estimation par l'ImmunoRatio du marquage des protéines Ki-67 ; MCM2 et TOP2A dans le carcinome épidermoïde du col de l'utérus. **A.** Ki-67 dans le CÉ ; **B.** Ki-67 dans le carcinome ; **C.** MCM2 dans le CÉ ; **D.** MCM2 dans le carcinome.

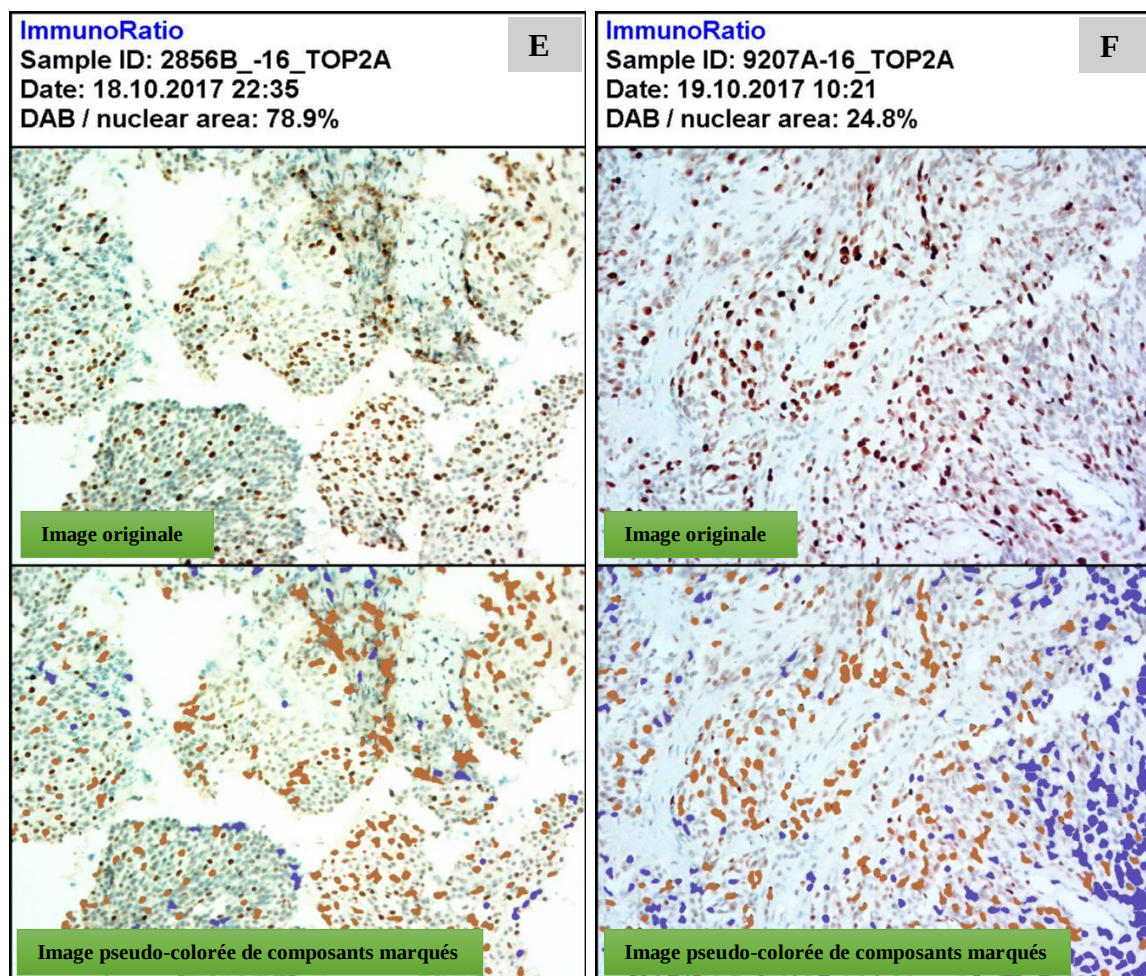


Figure 43 : Résultats de l'estimation par l'ImmunoRatio du marquage des protéines Ki-67 ; MCM2 et TOP2A dans le carcinome épidermoïde du col de l'utérus. E. TOP2A dans le CÉ ; F. TOP2A dans le carcinome.

6.12. Calcul de la sensibilité (Se), la spécificité (Sp) et les valeurs prédictives (VPP ; VPN)

Les valeurs de la Se ; la Sp ; la VPP et la VPN sont résumés dans le tableau XIV. Pour la protéine p16, les valeurs de la Se et la VPP pour les stades avancés (CIN3, carcinomes et ADC) sont plus élevées que celles des stades précoces du cancer du col de l'utérus (Se : 81,2%, Sp : 100%, VPP : 100%, VPN : 72,7%). Et c'est le cas aussi pour la protéine Ki-67 (Se : 75%, Sp : 100%, VPP : 100%, VPN : 66,66%).

Pour la protéine MCM2, sa valeur de sensibilité et de VPN sont élevées dans les stades avancés par rapport aux stades précoces (condylome, koilocytes ; CIN1) 93,7 contre 82,6. Alors que la valeur de sa spécificité est identique dans les différents stades.

CHAPITRE 6. Résultats

Pour la protéine TOP2A la valeur de sa sensibilité dans les stades avancés du cancer du col de l'utérus est inférieure à celle des stades précoces de cancer du col de l'utérus (93,7% contre 95,6%). Sa valeur de spécificité est similaire dans les deux stades.

Tableau XIV : Valeurs de la Se ; la Sp ; la VPP et la VPN des marqueurs p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A.

	Condylomes/Koïlocytes/CIN1				CIN3/Carcinomes/ADC			
	p16	Ki-67	MCM2	TOP2A	p16	Ki-67	MCM2	TOP2A
Sensibilité (%)	0	17,39	82,6	95,6	81,2	75	93,7	93,7
Spécificité (%)	100	100	62,5	25	100	100	62,5	25
VPP (%)	0	100	86,3	78,5	100	100	83,3	71,4
VPN (%)	25,8	29,6	55,5	66,6	72,7	66,66	83,3	66,6

6.13. Relation entre l'infection par les HPV à haut risque et l'expression des protéines p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A

Pour déterminer la relation entre l'infection par les HPV-HR et l'expression des protéines p16 ; Ki-67 ; MCM2 et TOP2A, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Pearson. Les tableaux ci-dessous résument les résultats des nombres des cas infectés ou non par les virus HPV-HR en relation avec le taux de l'expression de l'une des protéines citées. D'après la valeur p, on constate que l'expression des protéines p16 ($p = 0.005$) ; Ki-67 ($p = 0.004$) et MCM2 ($p = 0.04$) a une corrélation significative avec l'infection par un virus HPV-HR alors que l'expression de la protéine TOP2A ($p = 0.127$) n'a aucune corrélation avec cette infection [tableaux XV-XVIII].

Tableau XV : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine p16.

HPV-HR	Taux d'expression de p16				$p : 0.005^*$
	- < 5%	+ 5-25%	++ 26-50%	+++ > 50%	
-	18	0	1	0	
+	11	1	7	2	
Total	29	1	8	2	

CHAPITRE 6. Résultats

Tableau XVI : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine Ki-67.

HPV-HR	Taux d'expression de Ki-67				p : 0.004*
	- < 5%	+ 5-25%	++ 26-50%	+++ > 50%	
-	16	3	0	0	
+	8	6	3	4	
Total	24	9	3	4	

Tableau XVII : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine MCM2.

HPV-HR	Taux d'expression de MCM2				p : 0.04*
	- < 5%	+ 5-25%	++ 26-50%	+++ > 50%	
-	3	13	3	0	
+	2	8	4	7	
Total	5	21	7	7	

Tableau XVIII : La relation entre les HPV à haut risque et l'expression de la protéine TOP2A.

HPV-HR	Taux d'expression de TOP2A				p : 0.127
	- < 5%	+ 5-25%	++ 26-50%	+++ > 50%	
-	2	11	2	4	
+	1	7	8	5	
Total	3	18	10	9	

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both featuring a rolled-up edge effect.

CHAPITRE 7.

Discussion

CHAPITRE 7. Discussion

La durée de développement du cancer du col de l'utérus est très longue et il est précédé de lésions précancéreuses. Le dépistage précoce de ces lésions reste l'axe principal de la lutte contre ce type du cancer. Selon les experts, le succès des programmes de dépistage mis en œuvre dans un certain nombre de pays développés varie d'un pays à l'autre. Néanmoins, les programmes de dépistage de masse, dans le cadre desquels les femmes (de 25-65 ans) se font faire un frottis du col au moins une fois tous les trois à cinq ans, ont permis de réduire les taux de mortalité et de morbidité dus au cancer du col de l'utérus. En Canada et en Finlande, par exemple, un dépistage organisé a permis de réduire les taux de mortalité de 70%. Dans les pays où les programmes de dépistage ont moins bien réussi, il a été jugé essentiel d'améliorer la formation des médecins, d'instaurer des projets éducatifs à l'intention des femmes et de mettre en place des systèmes efficaces "d'appel et de rappel" pour inciter les femmes à se présenter pour des frottis (Catarino *et al.*, 2015 ; Bouhadeb *et al.*, 2016). Les recommandations essentielles du programme national de dépistage du cancer du col de l'utérus étant de faire bénéficier toutes les femmes d'un dépistage par frottis cervical tous les 5 ans après deux frottis négatifs, dès l'âge de 30 ans.

En Algérie, au vue des dernières évaluations, la phase initiale du programme national de dépistage du cancer du col de l'utérus semble encourageante. Dans la région d'Alger, ce cancer est le 5^{ème} cancer féminin après avoir occupé la 2^{ème}, la 3^{ème} puis la 4^{ème} place après le cancer du sein selon le registre des tumeurs 2011 de l'INSP. Dans les autres wilayas dont Sétif, le cancer du col semble se stabiliser (Bouhadeb *et al.*, 2016 ; Hamdi Cherif *et al.*, 2017a, 2017b).

Beaucoup d'efforts ont été fournis pour développer de nouveaux biomarqueurs utilisables dans le diagnostic précoce, l'évaluation et le suivi des traitements thérapeutiques du cancer du col de l'utérus. Le but de cette approche aidera à développer un diagnostic précoce et à augmenter l'efficacité du traitement avec diminution de la récurrence (Dasari *et al.*, 2015). Parmi les techniques utilisées pour déterminer les biomarqueurs du cancer on trouve la technique d'immunohistochimie. Cette dernière permet de localiser, dans les structures biologiques tissulaires, des motifs structuraux de nature protéique ou glycoprotéique ayant la valeur de motif antigénique (Nakane et Pierce, 1967). Le réactif principal est un anticorps spécifiquement dirigé contre ce motif. Les principaux avantages de cette technique sont sa sensibilité, sa spécificité, et la facilité de sa mise en œuvre. De plus, elle permet, par une approche morphologique, de préciser la répartition des motifs d'intérêt dans un tissu et de localiser le signal dans les différents

compartiments cellulaires. Le niveau de sensibilité de l'immunohistochimie dépend de multiples facteurs : la concentration de la protéine cible, la configuration de l'antigène, la spécificité de l'anticorps utilisé, et la préservation des antigènes en fonction du mode de préparation des spécimens. Une étape de démasquage est le plus souvent nécessaire en fonction de l'épitope d'intérêt et du fixateur utilisé. Deux types de traitements sont couramment utilisés : une protéolyse ménagée et/ ou une dénaturation thermique dans une solution tampon à pH contrôlé. Afin de diminuer le bruit de fond dû à l'action de peroxydases endogènes, l'évaluation de l'expression de toutes les protéines par immunohistochimie est effectuée en utilisant une méthode quantitative avec évaluation du pourcentage de cellules néoplasiques colorées par rapport au nombre total de cellules néoplasiques dans la lésion (Marck, 2010 ; Kim SW *et al.*, 2016).

7.1. Situation du dépistage à Sétif

Le diagnostic et/ ou le dépistage du cancer du col utérin sont basés sur l'examen clinique pratiqué par un médecin, sur le frottis de dépistage et sur la colposcopie en cas d'atypies de haut grade. Ces dernières sont détectées lors d'un examen gynécologique par FCU. Elles sont confirmées par un examen anatomopathologique et/ ou par des examens d'imagerie médicale (ESMO et FAC, 2012).

Les atypies sont des lésions intra-épithéliales de gravité croissante dont le traitement assure une guérison quasi-totale. L'introduction de dépistage cytologique par FCU inventé par George Papanicolaou à la fin des années 1940 avait une grande réussite dans la prévention du cancer du col utérin (Bergström *et al.*, 1999). Avant, le cancer du col de l'utérus était la principale cause de décès par cancer chez les femmes dans le monde.

Le frottis est certes reconnu universellement comme un examen imparfait, mais il continue à faire l'objet d'efforts pour améliorer son efficacité. En 1989, est proposé le système de Bethesda qui, d'une part permet de mieux orienter les cliniciens vers une thérapeutique adaptée et, d'autre part, demande impérativement de préciser la qualité des prélèvements dans les comptes rendus cytologiques afin d'en améliorer la performance. La fin du 20^{ème} siècle, l'OMS reconduit le FCU comme le meilleur moyen de dépistage de lésions précurseurs du cancer du col, et mobilise le monde pour essayer de diminuer le taux de faux négatifs. Une autre période est née : celle de l'assurance de qualité du FCU. De nouvelles techniques se développent : la lecture automatisée où

l'ordinateur isole les cellules suspectes, et la technique cytologique en couche mince qui assurerait une meilleure qualité des lames. Ces techniques restent encore en période d'évaluation, mais semblent tout à fait prometteuses (Bouhadeb *et al.*, 2016). Nous verrons ci-après la situation de cet examen dans la wilaya de Sétif.

7.1.1. Nombre et qualité de frottis réalisés à Sétif (2013-2017)

À Sétif, 16461 frottis ont été réalisés entre 2013 et 2017. Une augmentation progressive du nombre des frottis a été observée de 2013 jusqu'au 2015 puis une diminution du nombre de frottis réalisés en 2016 et 2017. En effet, plusieurs facteurs influencent tout programme de lutte contre le cancer du col de l'utérus dont l'éducation et le conseil.

En Algérie, c'est le système de Bethesda 2001/ 2014 qui est utilisé pour l'interprétation des FCU. Ce système implique une appréciation de l'interprétabilité, une description des aspects morphologiques observés et une conclusion précise qualifiée. Sur la base de ces critères, les frottis sont classés comme : satisfaisants ou insatisfaisants. Les patientes avec des frottis insatisfaisants refont généralement un autre frottis dans quelques mois (Adams *et al.*, 2005, Bouhadeb *et al.*, 2016). Dans notre série, la qualité des frottis est très satisfaisante avec 96,1% et uniquement 3,9% sont mauvais. Ce pourcentage est similaire à celui rapporté par Balaha *et al.* (3,58%), mais inférieure à celui rapporté par Boublenza *et al.* en 2013 (7,7%). Cela signifie que pour la majorité des frottis, le prélèvement était dans la zone de transformation afin de contenir des cellules endo-cervicales et exo-cervicales. Techniquement, le délai entre le prélèvement et sa fixation était le plus court possible, le matériel de prélèvement était adapté en fonction du type de col selon l'âge de la patiente et les praticiens ont été choisis pour leur compétence dans ce domaine.

Cependant, la sensibilité et la spécificité des FCU ne sont pas absolues comme le mentionnent presque tous les auteurs du monde. On espère améliorer la technique de frottis en utilisant celle en milieu liquide qui permettra sûrement de réduire le nombre des frottis non interprétables. Vacher-Lavenu *et al.* (2002) montrent que cette technique représente un prérequis pour l'optimisation du dépistage.

7.1.2. Âge des patientes au premier frottis

L'âge moyen de découverte du cancer invasif du col de l'utérus se situe autour de 50 ans, c'est la raison pour laquelle le frottis doit se faire bien avant cet âge (Duport, 2008). À Sétif, l'incidence de cancer du col utérin augmente rapidement entre 55-59 ans et entre 65-69 ans, puis cette incidence descend progressivement. L'âge médian lors du diagnostic est de 55,8 ans. L'âge d'apparition du cancer du col chez la jeune femme est à partir de 30 ans (Hamdi Cherif *et al.*, 2017a). La société américaine du cancer recommande un dépistage cytologique tous les 3 ans à partir de 21 ans mais pas avant cet âge. La raison pourquoi laquelle le dépistage répété des frottis cervico-utérins est recommandé parce que la desquamation du col de l'utérus est irrégulière, donc des tests répétés sur le temps augmente les chances de détecter une anomalie manquée dans un test précédent (ACS, 2012). Dans notre série, 10,4% des FCU 1 sont réalisés chez les femmes avant les 30 ans et 68,2% des FCU 1 sont réalisés chez les femmes âgées entre l'âge de 30 ans et l'âge de 50 ans. Les mêmes résultats ont été observés à Tlemcen (Boublenza *et al.*, 2013) où 69,8% des frottis ont été réalisés entre 30 ans et 50 ans seulement 12,2% des FCU ont été réalisés avant les 30 ans malgré les recommandations que le dépistage s'effectue à partir de 25 ans.

7.1.3. Résultats des frottis

Dans notre étude, 42,1% des frottis étaient normaux et 47,8% étaient des cas de changements réactionnels bénins, notamment des inflammations et des infections. Ces taux se rapprochent de ceux de Balaha *et al.* (Normaux : 43,1% ; inflammatoires : 53,3 %), et de Boublenza *et al.* (Normaux : 36,3% ; inflammatoires : 43%), mais différents de ceux d'El Gnaoui *et al.* (Normaux : 10% ; inflammatoires : 87 %). Les lésions détectées représentaient 3,5% de tous les frottis, elles étaient de bas-grade (20,4%), AGC (15,8%) et ASC-US (12,8%). Les taux des autres lésions de haut-grade et de type ASC-H étaient faibles (4,4% et 2,5% respectivement). Ces résultats sont différents de ceux trouvés dans d'autres études. El Gnaoui *et al.* ont trouvé les valeurs de 36% pour les lésions de bas grade, 30% pour les lésions de type ASC-US et 21% pour les lésions de haut grade. L'équipe de Boublenza ont trouvé les valeurs de 36,8% pour les lésions de bas grade, 40,6% des lésions de type ASC-US, 5,8% pour les lésions de type AGC et 13,3% pour les lésions de type haut-grade (El Gnaoui *et al.*, 2010 ; Boublenza *et al.*, 2013). Le taux du carcinome épidermoïde était nul et d'adénocarcinome *in situ* était 0,1%. Boublenza *et al.* ont reporté de faibles taux de carcinome épidermoïde (1,5%) et d'adénocarcinome (1,9%). Ces taux faibles n'excluent pas la

présence de cas de cancer invasif et métastatique dans la wilaya de Sétif. Ces cas montrent que la majorité des femmes atteintes de cancers du col ne se sont jamais faites dépistées. Réellement, et selon le registre du cancer de la wilaya de Sétif, le carcinome du col utérin était classé au deuxième rang après le cancer du sein (Hamdi Cherif *et al.*, 2017a).

7.1.4. Recommandations de laboratoire

Concernant les recommandations, le frottis répété après 6 mois, après un an, après 3 ans ou bien après un traitement sont les plus recommandés. Malgré toutes les précautions, le FCU manque de spécificité, d'où le besoin pour des tests plus sensibles. La réalisation d'une colposcopie et/ ou d'une biopsie d'une part et le test HPV d'autre part sont de plus en plus recommandés. Cela dépend ou non du résultat de frottis pour chaque patiente.

En pathologie nous avons proposé dans le cadre de cette thèse l'utilisation d'anticorps spécifiques à certains marqueurs utiles pour améliorer le diagnostic et le dépistage du cancer cervical. La technique 'immunohistochimie' serait une des solutions testées de manière plus fiable. Nous la présentons dans ce qui suit.

7.2. Détection des protéines p53 et Bcl-2 dans les biopsies cervicales

Le développement des tumeurs du col de l'utérus est associé avec l'altération de l'apoptose ou la perte de la suppression tumorale, la perturbation de la surveillance immune, l'augmentation de la prolifération cellulaire, ce qui conduit à la prolifération incontrôlée. Autrement dit, les cellules cancéreuses porteuses des mutations ou des gènes endommagés évitent les voies qui conduisent à leurs autodestruction (Tjalma *et al.*, 2001 ; Grace *et al.*, 2003). Naturellement, l'apoptose joue un rôle important dans la balance entre la mort et la prolifération cellulaire. Ceci est influencé par l'expression d'un ensemble de gènes spécifiques. Le gène du type sauvage *p53* peut induire l'apoptose alors que quelques gènes de la famille Bcl-2 l'inhibent. Or, la mutation de *p53* peut aussi prévenir l'apoptose (Hartl et Jones, 2004). Plus précisément, la surexpression de *p53* peut induire la régulation négative de l'expression de Bcl-2 au niveau de la protéine (Crawford *et al.*, 1998 ; Graflund *et al.*, 2002). L'inhibition de l'expression de Bcl-2 dérègle d'une part la voie de la différenciation, et sert à faciliter la réponse apoptotique. Dans la carcinogénèse du col de l'utérus, les expériences *in vitro* ont montré que l'inactivation de *p53* est associée avec l'augmentation de l'expression de Bcl-2, qui pourrait contribuer à la transformation tumorale (Saegusa *et al.*, 1995).

7.2.1. Expression de Bcl-2

Dans notre étude, nous avons trouvé presque toutes les formes d'expression de la protéine Bcl-2, négative, faible et modérée dans 38,96% (30/77), 50,65% (39/77) et 10,39% (8/77) des cas de CÉ respectivement, et une expression négative ou faible dans 76,92% (10/13) et 23,08% (3/13) des cas d'adénocarcinome respectivement. Plusieurs études ont évalué l'expression de Bcl-2 dans le cancer du col de l'utérus. La plupart de ces études ont montré une augmentation de l'expression dans les stades avancés du cancer du col de l'utérus (Tjalma *et al.*, 1998 ; Wootipoom *et al.*, 2004 ; Munakata *et al.*, 2005 ; Shukla *et al.*, 2014).

L'importance de la voie apoptotique dans le développement et la progression des tumeurs malignes humaines est un sujet de discussion important. La Bcl-2 est l'une des protéines qui jouerait un rôle régulateur important dans le maintien de la cellule en vie. La protéine Bcl-2 empêcherait les cellules d'emprunter l'apoptose (Tjalma *et al.*, 1998). Il est généralement clair qu'une survie cellulaire prolongée avec inhibition de l'apoptose est associée à la carcinogenèse. Depuis 17 ans déjà, Tjalma *et al.* (2001), ont montré que la Bcl-2 pourrait être un paramètre de pronostic à cause de son expression positive progressive lors du développement tumoral, suggérant que la régulation de l'apoptose jouerait un rôle critique dans le comportement des carcinomes cervicaux. D'autre part, Shukla *et al.* (2014), ont étudié l'expression de la Bcl-2 et de la p53 dans des lésions pré-malignes et malignes du col utérin. Ils n'ont montré aucune association significative entre l'infection par l'HPV 16/ 18 et l'expression de p53 et Bcl-2, bien que la coloration de Bcl-2 ait montré une différence significative entre les CIN et le carcinome. Ils ont conclu que l'immunomarquage de Bcl-2 pourrait être utilisé comme un biomarqueur de diagnostic pour différencier les lésions malignes des lésions précancéreuses. Looi *et al.* (2008) quant à eux, ont montré que l'immuno-détection de Bcl-2 était évidente dans le cytoplasme. Une positivité a également été notée dans les cellules épithéliales basales normales dans les cas de lésions de haut grade. Par contre, aucun cas de CIN1 (bas grade) n'était positif en Bcl-2.

En cas de CIN3, la coloration cytoplasmique de Bcl-2 était présente dans toutes les couches de l'épithélium. Dans les cas du CÉ, un marquage cytoplasmique plus fort était observé. Les auteurs de cette étude (Looi *et al.*, 2008) ont conclu que l'expression de Bcl-2 n'a pas une relation significative avec le stade du cancer du col utérin, sauf que la Bcl-2 était significativement plus

CHAPITRE 7. Discussion

exprimée dans les CIN3 par rapport aux CIN1 et CIN2. Cependant, il n'avait pas une différence significative dans le marquage de Bcl-2 entre la CIN3 et le CÉ du col de l'utérus.

Plusieurs études ont montré une immuno-réactivité de Bcl-2 dans les cellules épithéliales basales normales, avec une augmentation de l'expression de Bcl-2 observée dans les cellules dysplasiques (CIN3) et une coloration diffuse de la protéine Bcl-2 dans le CÉ (Saegusa *et al.*, 1995 ; Jain *et al.*, 2003 ; Looi *et al.*, 2008).

L'expression de cette protéine anti-apoptotique dans les cellules épithéliales normales peut refléter le rôle progéniteur des cellules basales. Les cellules épithéliales normales nécessiteraient une réponse adaptative visant à protéger contre une perte cellulaire excessive due à l'apoptose pour assurer la régénération de l'épithélium entier (Ter Harmsel *et al.*, 1996). Saegusa *et al.* (1995) ont suggéré que l'expression de Bcl-2 serait sous-réglée par les facteurs de la différenciation et l'apoptose. Ainsi, la surexpression de Bcl-2 dans la CIN3 peut être étroitement liée à la perte de la différenciation cellulaire et de l'apoptose qui entraînerait le développement d'un carcinome. La surexpression de Bcl-2 faciliterait la progression du cancer en prolongeant la survie cellulaire, qui passe ensuite au stade avancés du cancer (Saegusa *et al.*, 1995 ; Dimitrakakis *et al.*, 2000 ; Looi *et al.*, 2008). Dimitrakakis *et al.* (2000) ont montré que l'expression de Bcl-2 augmente en relation avec le grade de CIN. En outre, une différence significative entre l'expression de Bcl-2 dans les lésions précancéreuses et dans les carcinomes a été signalée dans la même étude.

7.2.2. Expression de p53

Dans tous les cas de carcinomes épidermoïdes et d'adénocarcinomes du col de l'utérus étudiés dans notre étude, la protéine Bcl-2 était plus exprimée que la protéine p53. Cela pourrait être dû à la dégradation de p53 par l'ubiquitination médiée par la protéine E6 de l'HPV. En effet, nous avons montré l'expression négative et positive de cette protéine par l'immunohistochimie dans 75,32% (58/77) et 24,68% (19/77) respectivement des cas de CÉ. Pour les cas d'adénocarcinomes, la plupart des cas ont montré une expression négative (92,30%, 12/13) seulement 1 cas sur 13 était positif (7,70%). Les cas du carcinome épidermoïde étudiés ont montré un foyer occasionnel de cellules immunoréactives pour la p53 où les cellules présentaient moins de 5% de positivité de cette protéine, lorsqu'on utilise un anticorps qui détecte non seulement la protéine p53 mutée mais aussi la protéine sauvage.

CHAPITRE 7. Discussion

Les cas négatifs pourraient être expliqués par la courte demi-vie de la protéine p53 de type sauvage dans les cellules, et qui ne pourraient pas être détectés par immunohistochimie (Gronostajski *et al.*, 1984 ; Cattoretti *et al.*, 1988). De plus, cette technique serait considérée comme n'étant pas suffisamment sensible par rapport à la détection de l'ADN par PCR et/ ou par hybridation. Cependant, plusieurs autres formes de la protéine p53, comme par exemple la p53 surexprimée ou mutée, qui ont une plus longue demi-vie, peuvent, par conséquent, être détectée par immunohistochimie. Également, la protéine p53 mutée complexée avec d'autres protéines, comme la protéine du choc thermique, ne serait pas complètement dégradée par le système de protéases impliquant les produits du gène *E6* de l'HPV et peut être détectée par immunohistochimie (Finlay *et al.*, 1988 ; Akasofu et Oda, 1995).

Plusieurs études ont évalué l'expression de p53 dans le cancer du col de l'utérus. Certaines d'entre elles incluaient également des cas de suivi de l'infection génitale par les HPV (Cheah et Looi, 2002 ; Grace *et al.*, 2003). En effet, elles ont montré des taux d'expression de p53 différents. Certains auteurs ont trouvé des taux de positivité élevés variant entre 60% et 80% (Tan *et al.*, 2007 ; Baskaran *et al.*, 2013). D'autres travaux ont montré que les carcinomes du col de l'utérus présentaient 50% de positivité de p53 (Shukla *et al.*, 2014). De nombreux auteurs sont en accord avec notre travail, ils ont rapporté des taux de positivité faibles variant entre 10 et 50% (Rajkumar *et al.*, 1998 ; Chen HY *et al.*, 2000 ; Ngan *et al.*, 2001). Dans l'étude réalisée sur le cancer du col utérin par Dimitrakakis *et al.* (2000), l'expression de Bcl-2 et p53 fut plus élevée dans le CÉ invasif que dans les adénocarcinomes, bien qu'il n'y ait aucune corrélation significative entre l'expression de p53 et le type histologique de carcinome cervical.

La différence de pourcentage dans l'expression de p53 observée dans la littérature pourrait s'expliquer par la différence dans les protocoles utilisés, le type d'anticorps utilisés qui reconnaît la protéine p53 de type sauvage et/ ou mutant, et l'adoption de différents seuils d'évaluation de l'expression de la protéine.

Les rapports de Cattoretti *et al.* (1988) et Caamano *et al.* (1991) ont montré que le niveau d'expression de la protéine p53 normale est trop faible pour être détecté par immunohistochimie. Cependant, sous certaines circonstances, comme a été expliqué par Koyamatsu *et al.* (2003) la formation du complexe du p53 type sauvage avec d'autres protéines cellulaires tel que la protéine

mdm2 peut conduire à l'accumulation de la protéine p53 type sauvage et qui peut être détectée par IHC dans les cellules épithéliales normales. Jain *et al.* (2003) ont observé une immuno-positivité nucléaire de p53 dans le CÉ du col de l'utérus, ainsi que dans la membrane basale normale. Les cellules du col normal ne devraient pas être marquées par les anticorps anti-p53 de type sauvage. Looi *et al.* (2008) n'ont pas trouvé une immuno-réactivité de p53 dans tous les cas de CIN, mais un marquage évident de p53 a été trouvé dans les cas de CÉ. Il a été suggéré qu'il y a un endommagement de l'ADN de manière cumulative dans le cancer du col de l'utérus conduit à l'augmentation de la synthèse de la protéine p53 pour tenter de réparer ces abérations chromosomiques (Vassallo *et al.*, 2000 ; Tjalma *et al.*, 2001).

La dérégulation de la fonction de p53, dans le cancer du col de l'utérus, par neutralisation directe de cette protéine par l'oncogène viral E6 produit par les HPV 16 et HPV 18, a été prouvée (Werness *et al.*, 1990). L'élimination de la protéine p53 par E6 est une étape importante dans la tumorigenèse du cancer du col de l'utérus associé au HPV (Scheffner *et al.*, 1990). Une surexpression de la protéine p53 ne se produirait pas dans les tumeurs associées au HPV 16/ 18 où E6 se lie et dégrade la protéine p53. La mutation de p53 ne semble pas jouer un rôle dans la cancérogenèse du cancer du col de l'utérus négatif au HPV 16/ 18. Certaines études ont montré que l'accumulation de la protéine p53 peut être un événement précoce dans la cancérogenèse, tandis que pour d'autres, la surexpression ou la mutation de p53 ne semble pas jouer un rôle significatif dans la tumorigenèse du col utérin (Mittal *et al.*, 1995 ; Ngan *et al.*, 1997).

7.2.3. Expression simultanée de p53 et de Bcl-2

Dans notre étude, la corrélation entre l'expression de la protéine Bcl-2 et p53 n'est pas significative, la valeur de p était de 0.352. Grace *et al.* (2003) ont montré une expression cytoplasmique anormale de la protéine Bcl-2 et l'expression nucléaire de la protéine p53 a été observée en utilisant l'immunocytochimie dans des frottis cervicaux mais pas dans des échantillons normaux. L'intensité des protéines p53 et Bcl-2 varie selon les différents stades des lésions du col. Dans cette étude, il a été suggéré que le marquage des deux protéines, p53 et Bcl-2, dans le carcinome épidermoïde du col de l'utérus pourrait être utilisé comme un biomarqueur de diagnostic indépendant pour le cancer du col utérin associé à la détection de l'infection par l'HPV. Il a été suggéré que l'infection par les HPV-HR est responsable de la co-surexpression des deux protéines p53 et de Bcl-2 dans le cancer du col de l'utérus, même si ces deux protéines sont antagonistes. En

effet, Liang *et al.* (1995) ont trouvé une relation inverse entre les niveaux de p53 et Bcl-2. La perte de l'expression de p53 peut induire une régulation positive de l'expression de Bcl-2 et conduire à une survie cellulaire prolongée. Le rôle est bien connu de l'oncoprotéine E6 de l'HPV dans l'inactivation de la protéine p53. C'est cette oncoprotéine virale qui conduit à la dégradation de la protéine p53 et par conséquent la surexpression de la protéine Bcl-2 (Liang *et al.*, 1995 ; Grace *et al.*, 2003). Par contre, Looi *et al.* (2008), suggèrent que l'expression de Bcl-2 et de p53 n'a pas de relation significative avec le grade de la tumeur cervicale. Selon ces auteurs, il n'y a aucune corrélation entre l'expression de Bcl-2 et p53 dans tous les cas positifs de CIN et du CÉ. Dans certaines cellules, la p53 peut induire l'apoptose et peut réguler à la baisse de Bcl-2 (Myashita *et al.*, 1994).

7.3. Détection des protéines p16 et Ki-67 dans les biopsies cervicales

7.3.1. Expression de la protéine p16

La protéine p16^{INK4a} est une protéine régulatrice du cycle cellulaire ayant une fonction dans la suppression tumorale. C'est un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines agissant en phase S du cycle cellulaire. La phosphorylation de pRb par CDK 4/ 6 libère le facteur de transcription E2F de sa fixation avec pRb et conduit à l'expression des gènes de la phase S. L'activité de CDK 4/ 6 est bloquée par p16 qui a été activée par E2F et bloquée par le complexe pRb/ E2F. La dérégulation de l'activation de la phase S dans les cellules normales conduirait à l'apoptose. En cas de l'infection par l'HPV-HR, l'oncoprotéine E7 conduit à la perturbation de la fixation E2F-pRb et à la surexpression de p16 à cause de la perte de la répression pRb/E2F et l'activation forte par E2F libre. Cependant, les gènes de la phase S sont activés de façon continue depuis la répression de CDK 4/ 6 médiée par p16 n'a aucun effet en aval sur pRb. Par conséquent, la protéine p16 est un biomarqueur pour la détection de l'infection par un HPV-HR. C'est un marqueur substitutif de l'inactivation médiée par E7 de la fonction suppresseur de tumeur de la protéine pRb et marque les cellules dysplasiques (Klaes *et al.*, 2001 ; Jedpiyawongse *et al.*, 2008 ; Schmidt *et al.*, 2011).

La protéine p16 détectée par IHC donne un marquage nucléaire et cytoplasmique. La coloration est diffuse/ faible dans les cellules basales de l'épithélium normal et dans les tissus issus de biopsies métaplasiques du col utérin. Elle est généralement nucléaire dans la CIN1, mais cytoplasmique dans la CIN2, la CIN3 et le cancer invasif. Tous les cas positifs en HPV expriment

CHAPITRE 7. Discussion

la p16 alors que tous les cas positifs en p16 ne sont pas HPV-positifs. La protéine p16 donne une coloration forte et diffuse dans toutes les lésions pré-néoplasiques (LSIL et HSIL) et dans le carcinome épidermoïde et en cas d'infection au HPV à haut risque ou intermédiaire. L'intensité de la coloration est focale, faible dans les cas négatifs en HPV ou les cas infectés par les HPV à bas risque. La positivité en p16 suggère, donc, une progression vers la malignité. Il faut souligner cependant que l'immuno-réaction à p16 est parfois positive dans les cellules métaplasiques squameuses, les cellules endocervicales, les cellules géantes, l'endométriome malin ou bénin, en cas d'infection à *Trichomonas*, où les cellules glandulaires atypiques, les koilocytes et les cellules atrophiques présentent une aberration nucléaire minimale (Duncan *et al.*, 2008).

Dans notre étude, le score de la protéine p16 dans les tissus du cancer du col de l'utérus comprend 4 niveaux : 0 (< 5%) ; 1+ (5%-25%) ; 2+ (26%-50%) et 3+ (> 50%). La plupart de nos échantillons 41/54 (75,93%), n'expriment pas la protéine p16. Ces cas sont les cols normaux, les cervicites, les condylomes et même les koilocytes, les CIN1 et les ADC. Quelques cas de carcinomes (6/54 des cas ce qui représente 11,11%) ont une expression faible ou modérée de la p16. Seulement 7/54 échantillons expriment fortement cette protéine, ce qui représente 12,96% des cas. En somme, les cas de CÉ et CIN3 montrent une expression positive et intense alors que les autres stades ont une expression négative ou faible. Donc la plupart des cas, en plus des cols normaux ont un taux de positivité nul, à l'exception de certains cas de CIN3 et de carcinomes ont un taux positif élevé d'expression de cette protéine (de 100% pour la CIN3 et le carcinome adénosquameux et de 91,67% pour le carcinome épidermoïde).

Plusieurs travaux ont montré que le marquage immunohistochimique de la protéine p16 dans les tissus normaux du col utérin est négatif (Tam *et al.*, 1994 ; Sano *et al.*, 1998 ; Murphy *et al.*, 2005 ; Jedpiyawongse *et al.*, 2008), dans notre travail nous avons trouvé le même résultat pour ces cas. L'expression de la p16 est aussi négative dans les cas des cervicites et des condylomes. Les mêmes constatations ont été enregistrées dans les études de Krishnappa *et al.* (2014) et de Kim et Lee en 2017. Nos résultats sont en accords avec certains travaux (tableau XIX) à savoir que les cas de CIN1 soient négatifs en p16, qu'ils sont en harmonie avec d'autres travaux (Agoff *et al.*, 2003 ; Murphy *et al.*, 2003 ; Lesnikova *et al.*, 2009 ; Kishore et Patil, 2017). Les deux cas d'ADC étudiés dans notre travail où la coloration de p16 est négative peuvent être expliqués par la faible sensibilité de la technique d'immunohistochimie. Par contre, Eleutério-Jr *et al.* (2017), ont montré dans leur

CHAPITRE 7. Discussion

étude réalisée sur des cas d'ADC que la majorité des cas expriment la protéine p16, peu de cas se sont avérés négatifs pour cette protéine.

Tableau XIX : Expression de la protéine p16 dans le cancer du col de l'utérus dans différentes études.

Étude	Col normal	CIN1	CIN2	CIN3	Carcinome	ADC
Agoff <i>et al.</i> , 2003.	11%	57%	75%	91%	92%	71%
	(14/133)	(43/76)	(60/80)	(103/113)	(42/46)	(5/7)
Murphy <i>et al.</i> , 2003.	ND	100%	100%	98%	100%	ND
		(38/38)	(33/33)	(45/46)	(10/10)	
Benevolo <i>et al.</i> , 2006	ND	31%	90%	ND	100%	ND
		(17/54)	(9/10)		(11/11)	
Lesnikova <i>et al.</i> , 2009	0%	72.3%	91%	98.3%	98.5%	ND
	(0/15)	(180/249)	(212/233)	(178/181)	(131/133)	
Kumari et Vadivelan, 2013	0%	62,5%	75%	81,25%	100%	ND
	(0/15)	(10/16)	(12/16)	(13/16)	(16/16)	
Kishore et Patil, 2017	0%	25%	50%	75%	100%	ND
	(0/20)	(1/4)	(1/2)	(3/4)	(47/47)	
Notre étude	0%	0%	ND	100%	91,67%	0%
	(0/8)	(0/10)		(1/1)	(11/12)	(0/2)

ND : non déterminé

Plusieurs autres études ont évalué par immunohistochimie l'expression de ce biomarqueur dans les lésions intraépithéliales et le carcinome invasif du col de l'utérus. Sano *et al.* (1998) ont étudié l'expression de la protéine p16 dans une série de 139 biopsies du col de l'utérus enrobées dans la paraffine. Ils ont étudié la corrélation entre l'expression de cette protéine avec le typage HPV sur les mêmes échantillons. Une surexpression de la protéine p16 est observée avec un immunomarquage fort et diffus dans toutes les lésions pré-néoplasiques portant les génomes de certains types d'HPV à haut risque (16, 18, 31, 33, 52 et 58) ou à risque intermédiaire, et aussi dans tous les cas du carcinome invasif. Les lésions qui ont été associées avec les types HPV à bas risque 6 et 11 comme les condylomes et les lésions intraépithéliales de bas grade ont montré un marquage focal et faible.

Dans une étude similaire réalisée en 2001, Klaes *et al.* ont observé une surexpression de p16 dans toutes les lésion CIN1 (n=47) excepté 7 cas qui ont été associés avec les types HPV à bas risque. En addition, la protéine p16 a été surexprimée dans tous les cas CIN2 (n=32), CIN3 (n=60),

et dans 97% des cas du carcinome invasif. Ces résultats suggèrent que la surexpression de la protéine p16 survient en cas de lésions épidermoïdes du col de l'utérus associées aux types HPV à haut risque.

Keating *et al.* (2001) ont reporté les résultats d'une étude de 99 biopsies, incluant 24 cas des lésions squameuses intraépithéliale de bas grade ; 36 cas des lésions squameuses intraépithéliale de haut grade ; 29 cas des métaplasies squameuses différenciées et indifférenciées et 15 cas d'atrophies ou d'épithéliums atypiques ou métaplasiques. Les résultats de l'immunohistochimie de la protéine p16 étaient corrélés avec le diagnostic histologique. L'immunomarquage positif de p16 a été soit modéré, diffuse ou fort ou bien un marquage focal. Tous les cas de lésions de bas grade étaient positifs, avec un marquage fort et diffus pour la protéine p16 qui a montré une association significative avec les lésions associées aux HPV-HR. Dans quelques cas normaux et d'épithélium métaplasique, un marquage diffus et faible de p16 a été noté dans la partie des cellules basales, avec une positivité forte, focale et occasionnelle.

Notre étude montre que les lésions et le cancer du col de l'utérus des femmes algériennes présentent une coloration positive de p16 dans les stades avancés de ce type du cancer. Dans les autres cas étudiés les cols normaux ; les cervicites ; les condylomes ; les koïlocytes ; les CIN1 et même les ADC avaient une expression négative de la protéine p16. Il nous a paru possible d'utiliser cette protéine comme marqueur pour différencier les cols normaux et lésions cervicales. Il est particulièrement important de noter que la coloration de p16 apparaît être très utile pour l'interprétation des études histopathologiques du col de l'utérus. Le tableau XIX résume les résultats de l'expression de la protéine p16 obtenus dans notre travail et dans d'autres études en utilisant l'IHC.

7.3.2. Expression de la protéine Ki-67

L'estimation du taux de prolifération des cellules tumorales est actuellement l'un des paramètres pronostiques les plus importants. Deux méthodologies sont disponibles, l'index mitotique (MI) et l'index Ki-67. La détermination de l'index mitotique se fait par comptage du nombre de mitoses au sein de la prolifération tumorale, à partir d'une coupe tissulaire préparée et colorée selon les techniques conventionnelles, au fort grossissement, dans une surface déterminée. La détermination de l'index Ki-67 se fait par une technique immunohistochimique, en comptant le

pourcentage de cellules tumorales dont le noyau est marqué par un anticorps. Ce dernier est dirigé contre la protéine nucléaire Ki-67. Il est reconnu par l'anticorps monoclonal Ki-67 et utilisé sur des coupes de tissu fixé et inclus en paraffine. Mais les deux méthodes sont complémentaires car leurs significations sont différentes : l'index mitotique permet d'estimer le nombre de cellules effectivement capables de se diviser tandis que l'index Ki-67 permet d'évaluer la fraction de cellules tumorales entrées en cycle cellulaire, mais qui ne se diviseront pas forcément. La détermination de l'index mitotique ne présente pas de difficultés mais nécessite un échantillon de taille suffisante ce qui est rarement le cas avec une biopsie. L'estimation de l'index Ki-67 est plus complexe mais peut s'appliquer à des prélèvements de très petite taille (Nakano et Oka, 1993).

La protéine Ki-67 est un marqueur de prolifération étudié par les pathologistes par immunohistochimie à partir des prélèvements tissulaires qui permet le diagnostic, le typage histologique et le grading histo-pronostique du cancer du sein (Dowsett *et al.*, 2011). Il s'agit d'un antigène qui fut décrit pour la première fois par Gerdes en 1983. Ce chercheur a pu le caractériser après immunisation des souris par injection de noyaux de cellules de lymphome provenant d'un lymphome de Hodgkin. Cette protéine nucléaire est exprimée puis localisée autour des chromosomes des cellules prolifératives en phase G1, S, G2 et M. Elle permet de maintenir les chromosomes mitotiques séparés les uns des autres. Donc elle serait un facteur qui participe au maintien du pouvoir prolifératif du cycle cellulaire (Gerdes *et al.*, 1983).

Dans l'épithélium du col utérin normal, l'expression de la protéine Ki-67 est observée seulement dans les couches basale et parabasale. La surexpression est observée dans la dysplasie et le carcinome épidermoïde. Dans les cas de CIN, l'expression augmente avec le grade de la dysplasie. Elle a donc une valeur pronostique potentielle. Ce marqueur pronostique présente par conséquent une corrélation avec le grade histologique du carcinome du col de l'utérus. L'expression est d'autant plus élevée dans les tumeurs qu'elles sont associées à l'infection par HPV-HR (16/ 18) comparés aux HPV à bas risque (Munhoz *et al.*, 2009).

Nous avons estimé dans notre travail, le taux de l'expression de la protéine Ki-67 dans les échantillons de notre série. Le marquage de la protéine Ki-67 était nucléaire, avec un pourcentage gradué par le système semi-quantitatif de quatre niveaux. Négative, 1+, 2+ et 3+ ont été attribués quand l'expression de Ki-67 était moins de 5%, de 5% à 25%, de 26 à 50% et plus de 50%

respectivement (Zhong *et al.*, 2015). Nous avons montré que 36/54 des cas (66,66%) n'ont pas exprimé la protéine Ki-67. Ce groupe comprend les cols normaux, des cervicites, des condylomes, des koilocytes, des CIN1, des CÉ et d'ADC. Nous avons montré que 10/54 des cas (18,52%) ont une expression faible. Parmi ces cas existent les cervicites ; les condylomes ; les CIN1 ; les CIN3 et même les CÉ. Une proportion de 4/54 (7,41%) des cas ont une expression modérée de la protéine Ki-67, parmi lesquels sont quelques cas du CÉ et du carcinome adénosquameux. Le même nombre de cas de CÉ ont donné une forte expression de cette protéine. Les carcinomes épidermoïdes (10/54 cas) ont toujours une expression positive de la protéine Ki-67 qui était de l'ordre de 40%. Le taux positif était élevé dans les cas de CIN3, des CÉ et des carcinomes adénosquameux (100%, 83,33% et 100% respectivement). Par contre, dans les cas de cervicites, de condylomes, de CIN1 et d'ADC ce taux était faible (28,57%, 25%, 30% et 0% respectivement).

Les résultats obtenus dans notre travail sont similaires aux résultats obtenus dans plusieurs études (Yang SF *et al.*, 2006 ; Looi *et al.*, 2008 ; Sansanwal *et al.*, 2015). Yang SF *et al.* (2006) ont montré une faible expression de la protéine Ki-67 dans les tissus normaux du col de l'utérus étudiés (10/10 cas). La majorité des cas (95%) de CIN1 ont une expression faible de Ki-67, les cas de CIN2 ont une expression modérée ou élevée, avec environ 65,1% des cas de CIN3 qui ont une expression élevée et 64,7% des cas de CÉ ont une expression élevée aussi. Agoff *et al.* (2003) ont montré dans leur étude que 90% des cols normaux ont une expression faible de la protéine Ki-67, 42% des cas de CIN1 ont une expression modérée, alors que 55% des cas de CIN2, 76% des cas de CIN3, 87% des cas de CÉ et 67 des cas d'ADC ont une expression élevée de la protéine Ki-67.

L'immunomarquage de cette protéine est principalement présent dans la couche parabasale de l'épithélium. Cette expression augmente avec l'avancement du grade histopathologique du cancer du col de l'utérus et élargi de la couche parabasale à la couche superficielle. Les cas de CIN3 et du carcinome épidermoïde étudiés dans notre travail montrent une expression positive de la protéine Ki-67. Les résultats de l'expression de la protéine Ki-67 obtenus dans notre travail et dans d'autres études sont résumés dans le tableau XX.

CHAPITRE 7. Discussion

Tableau XX : Expression de la protéine Ki-67 dans le cancer du col de l'utérus dans différentes études.

Étude	Col normal	CIN1	CIN2/	CIN3	Carcinome	ADC
Agoff <i>et al.</i> , 2003	10,1%	60%	85%	91%	93%	83%
	(8/79)	(33/55)	(62/73)	(96/105)	(42/45)	(5/6)
Walts et Bose, 2009	0%	39,1%		98%	ND	ND
Cavalcante <i>et al.</i> , 2012	5,5%	32%		74%	ND	ND
Kanthiya <i>et al.</i> , 2016	11,3%	22,6%		75,4%	100%	ND
Notre étude	0%	30%	ND	100%	83,33%	0%
	(0/8)	(3/10)	ND	(1/1)	(10/12)	(0/2)

ND : non déterminé

7.3.3. Évaluation des performances des marqueurs p16 et Ki-67

Badr *et al.* (2008) ont rapporté que la sensibilité et la spécificité de l'expression de la protéine p16 sont très élevées pour détecter les stades avancés de cancer du col de l'utérus (Se : 97% ; Sp : 90% ; VPP : 86% ; VPN : 98%). Dans notre étude les valeurs de la sensibilité et la spécificité de la protéine p16 serait aussi fiables pour détecter les stades CIN3 et les carcinomes (Se : 81,2% ; Sp : 100% ; VPP : 100% ; VPN : 72,7%) ce qui montre que cette protéine serait très spécifique et très sensible pour détecter les stades avancés du cancer du col de l'utérus.

Pour la protéine Ki-67, les valeurs de la Se ; la Sp ; la VPP et la VPN obtenues pour les stades des condylomes/koilocytes/CIN1 sont 17,39% ; 100% ; 100% et 29,6% respectivement. Cependant, ces valeurs sont 75% ; 100% ; 100% et 66,66% pour les CIN3/carcinomes/ADC respectivement. Ces dernières valeurs sont similaires aux résultats obtenus par Badr *et al.* Ces résultats montrent que la protéine Ki-67 est plus sensible et spécifique pour détecter les stades avancés du cancer du col utérin, CIN3 et les carcinomes (tableau XXI).

CHAPITRE 7. Discussion

Tableau XXI : Valeurs de la Se, la Sp, la VPP et la VPN de l'expression de p16 et Ki-67 dans les différentes études.

Étude	p16				Ki-67			
	Se	Sp	VPP	VPN	Se	Sp	VPP	VPN
Badr <i>et al.</i> , 2008	97	90	86	98	89	88	82,5	93
Kanthiya <i>et al.</i> , 2016	84,5	90,5	93,4	78,6	82,1	88,6	92	75,8
Pinto <i>et al.</i> , 2008	84	63	ND	ND	94	53	ND	ND
Cavalcante <i>et al.</i> , 2012	86,9	87,7	76,9	93,4	73,9	77,7	60,7	86,3
Notre étude	81,2	100	100	72,7	75	100	100	66,66

ND : Non déterminée

7.3.4. Le double marquage des protéines p16/ Ki-67

Pour faciliter le diagnostic du cancer du col de l'utérus et l'interprétation des observations histologiques, la double coloration immunocytochimique (Dual staining), avec recherche simultanée des deux protéines p16 et du Ki-67, a été utilisé dans plusieurs études. Yu *et al.* (2016a) ont réalisé une étude sur une population de 1079 patientes (dans un but de dépistage), le taux de positivité de ce double marquage était de 21,5%, celui-ci était de 15,8% quand le frottis était normal, 32,4% en cas de frottis ASC-US, 70,1% en cas de frottis bas grade et 94,5% en cas de frottis de haut grade. L'utilisation du double marquage en sélection des anomalies mineures présentait une sensibilité pour le diagnostic des lésions de CIN2 de 87,5%, une spécificité de 66,4%, une valeur prédictive positive de 37,5%, une valeur prédictive négative de 95,8%. Ceci permet de réduire le nombre de patientes qui seront adressées en colposcopie (de 43,8%). L'utilisation du test HPV dans la même situation présentait une sensibilité de 91,7%, une spécificité inférieure avec 55,8%, une VPP de 32,4%, une VPN de 96,7% et un taux de patientes adressées en colposcopie supérieur avec 53,1%. Le test HPV présente donc dans cette situation une sensibilité légèrement supérieure mais une spécificité inférieure à la double coloration. Les auteurs ont aussi testé le « Dual staining » pour sélectionner des patientes après un dépistage primaire positif par un test HPV pour le diagnostic des CIN2+. Ainsi le Dual staining a une Se de 92,7%, et une Sp de 52,7%, le génotypage HPV 16/ 18 a une Se inférieure avec 71,1% et une Sp de 74,7%, et la cytologie en deuxième intention a une Se supérieure avec 94,5% et une spécificité de 53,5%. Le

taux de patientes adressées en colposcopie était respectivement de 68,7% pour le double marquage p16/ Ki-67, de 46,9% pour le génotypage partiel HPV 16/ 18 et de 69,1% pour la cytologie.

Dans une autre étude, les sensibilités respectives du double marquage et du test HPV pour le diagnostic des CIN2+ étaient similaires avec les valeurs de 94,4% et de 100% après un diagnostic ASC-US, tandis que les spécificités étaient bien supérieures pour le double marquage avec 78,7% et de 60,4% pour le test HPV. De même, après un diagnostic d'une lésion de bas grade avec des Se respectives de 85,7% et de 98,4% et des Sp de 53,3% pour le double marquage et seulement 15,6% pour le test HPV-HR (Bergeron *et al.*, 2015).

Dans une autre étude menée aux pays bas, testant les mêmes caractéristiques mais cette fois ci dans le dépistage des CIN3 parmi les patientes présentant un dépistage primaire positif pour les HPV à haut risque, la sensibilité du double marquage p16/ Ki-67 était de Se : 93,8% avec une Sp de 51,2%, alors que la cytologie de seconde intention présentait une Se : 87,7% similaire mais une spécificité inférieure (Sp : 44,9%). Ces auteurs ont aussi testé la place du génotypage partiel HPV 16/ 18 couplé à la cytologie avec une Se plus élevée de 95,1% mais une spécificité très basse à 25,8%. Les auteurs concluent donc ici aussi à l'utilité clinique du double marquage dont les performances permettent une meilleure sélection des patientes après un test HPV positif (Luttmer *et al.*, 2016).

7.4. Détection des protéines MCM2 et TOP2A dans les biopsies cervicales et évaluation des valeurs de performances de ces marqueurs

Au cours de la réplication d'ADN, le complexe MCM 2-7 est activé durant la phase G1-S pour dérouler les deux brins de l'ADN grâce à son activité hélicase pour permettre la synthèse d'ADN et il joue un rôle important durant l'élongation des fourches de réplication (Singleton *et al.*, 2007 ; Symeonidou *et al.*, 2012). La TOP2A est responsable de la dissociation enzymatique de l'ADN double brins pendant la réplication. MCM2 et TOP2A fonctionnent ensemble dans la régulation de la réplication de l'ADN en phase S et sont surexprimées quand l'induction du cycle cellulaire dans cette phase est aberrante. Durant l'activation de la transcription du cycle cellulaire aberrant, les niveaux de MCM2 et TOP2A augmentent dans les cellules proliférantes. Elles sont

surexprimées dans divers processus dysplasiques et malins, y compris les néoplasies du col de l'utérus liées aux HPV à haut risque (Kelly *et al.*, 2006 ; Shi *et al.*, 2007).

7.4.1. Expression de la protéine MCM2

Selon l'Atlas des protéines humaines l'expression nucléaire de la protéine MCM2, par l'utilisation de différents anticorps en immunohistochimie, a été évaluée dans le tissu normal et le cancer du col de l'utérus. Le taux de l'expression de cette protéine est nul dans les cellules glandulaires et faible dans les cellules épithéliales basales. Dans le cancer du col de l'utérus l'expression de ce biomarqueur est positive dans l'adénocarcinome et le carcinome épidermoïde (<http://www.proteinatlas.org>).

Dans notre travail, nous avons d'abord désigné quatre niveaux de l'expression nucléaire de la protéine MCM2 dans le cancer du col de l'utérus comme suit : $\leq 25\%$ (score 1) ; 25%-50% (score 2) ; 51%-75% (score 3) et $> 75\%$ (score 4). Il ressort de cette investigation que 38 cas sur 54 (70,37%) ont un score 1+ d'expression de la protéine MCM2, 8/54 des cas (14,81%) ont un score 2+, 5/54 des cas (9,26%) ont un score 3+ et 3/54 des cas (5,56%) ont un score 4+. Il est à noter que tous les cas de cervicite, de CIN1, de CIN3 et les différents types de carcinome étaient positifs. Pour les cols normaux et les autres lésions (condylomes, koïlocytes et ADC) le taux d'expression de MCM2 variait entre 20 et 77,77%. D'autre part, Zheng (2015) a rapporté un taux d'expression de MCM2 de 43,86% dans les cas de cervicites, 58,62% dans les CIN1, 81,82% dans les CIN2, 97,37% dans les CIN3 et 97,30% dans les cas de carcinomes épidermoïdes. Quant à nos résultats et leur comparaison avec les études citées ci-dessus, ils sont résumés dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Expression de la protéine MCM2 dans le cancer du col de l'utérus dans différentes études.

	Étude	Col normal	CIN1	CIN2	CIN3	Carcinome	ADC
MCM2	Saritha <i>et al.</i> , 2018	9,1%	75,5%		83,63%	90,50%	ND
		1/11	37/49		46/55	57/63	
	Zheng, 2015	ND	58,62%	81,82%	97,37%	97,30%	ND
			17/29	18/22	37/38	36/37	
	Notre étude	66,67%	100%	ND	100%	100%	50%
		2/3	10/10		1/1	12/12	½

ND : Non déterminée

Selon Saritha *et al.* (2018) les valeurs de la Se, la Sp, la VPP, la VPN pour les carcinomes étaient 95%, 21%, 72% et 67% respectivement. Dans la même étude, et concernant les LSIL, ces valeurs étaient 73%, 48%, 61% et 61% par le même ordre. Quant à notre étude, ces valeurs (Se, Sp, VPP et VPN) sont 93,7%, 62,5 %, 83,3% et 83,3% respectivement sachant que les prélèvements utilisés correspondent à des stades avancés du cancer du col de l'utérus. Par ailleurs et concernant les lésions précancéreuses les valeurs pour la Se, la Sp, la VPP et la VPN sont de 82,6%, 62,5%, 86,3% et 55,5% en testant des lésions précancéreuses du col de l'utérus. D'après nos résultats, il apparaît que les performances du test d'expression de MCM2 pour la détection des stades avancés du cancer du col de l'utérus sont meilleures que ceux obtenus par Saritha *et al.* (2018) sauf la valeur de la Se qui serait proche. Quand on a testé les lésions précancéreuses cervicales, les performances obtenues étaient aussi supérieures à celles obtenus par Saritha *et al.* (2018), à l'exception de la VPN où ils ont obtenu de meilleurs résultats.

7.4.2. Expression de la protéine TOP2A

Selon l'Atlas des protéines humaines (<http://www.proteinatlas.org>), l'expression nucléaire de la protéine TOP2A, par l'utilisation de différents anticorps en immunohistochimie, a été évaluée dans le tissu normal et le cancer du col de l'utérus. L'expression de la protéine TOP2A est modérée dans les cellules épithéliales et les cellules glandulaires normales. Dans le cancer du col de l'utérus l'expression de ce biomarqueur est positive dans l'adénocarcinome et le cancer épidermoïde. Les quatre niveaux de l'expression nucléaire de cette protéine dans le cancer du col de l'utérus sont comme suit : $\leq 25\%$ (score 1) ; 25%-50% (score 2) ; 51%-75% (score 3) et $> 75\%$ (score 4).

Dans notre étude, 28/54 (51,85%) des cas ont une expression $\leq 25\%$ de la protéine TOP2A ; 15/54 cas (27,78%) ont un taux d'expression de 25-50% de cette protéine. La majorité des cas sont des carcinomes, 9/54 cas (16,67%) ont un taux d'expression de 50-75% et 2/54 cas (3,70%) expriment fortement la protéine TOP2A. Parmi ces cas, on enregistre des CIN3 et des carcinomes. Tous les stades de développement de la tumeur cervicale ont un taux positif, soit moyen ou élevé. Le taux d'expression de la protéine TOP2A même dans les cols normaux était compris entre 50 et 100%. Une étude immunocytochimique réalisée par Peres *et al.* en 2016 sur des cellules cervico-vaginales montre une expression positive de TOP2A dans 71,9% des cas. La protéine TOP2A était positive dans tous les échantillons infectés par HPV 6, HPV 11, HPV 16 et HPV 18. Une proportion de 13/19 (68%) des cas LSIL, de 8/8 (100%) des cas HSIL, de 2/5 (40%)

CHAPITRE 7. Discussion

des cas ASC-US et de 28/78 (36%) des cas normaux montrent une expression positive. Branca *et al.* (2006) ont montré que l'expression de TOP2A augmente avec l'évolution vers le cancer des lésions cervicales, pour devenir plus intense dans le carcinome invasif.

Pour notre part, une expression forte a été observée dans les stades avancés du cancer du col de l'utérus. Nous sommes donc de l'avis d'autres auteurs pour conclure que la TOP2A pourrait être un marqueur de la prolifération cellulaire du cancer du col de l'utérus, seulement pour la détection des stades avancés de ce cancer.

Nous étions surpris par la coloration positive dans les les prélèvements des cas normaux algériens, ce qui n'a pas été le cas pour Davidson *et al.* (2000), qui n'ont pas détecté d'expression de la TOP2A dans les cols normaux. Cependant, les résultats de Branca *et al.* (2006) appuient nos résultats.

À notre connaissance, il n'y a pas de travaux concernant la détection de TOP2A et même de MCM2 dans les cervicites, les condylomes et l'ADC. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas pu faire une comparaison et évalué nos résultats.

Les valeurs de la Se, Sp, VPP et VPN de l'expression de la protéine TOP2A, pour les stades précoces du cancer du col de l'utérus, obtenus dans notre travail sont : 95,6% ; 25% ; 78,5% et 66,6% respectivement. Pour les stades avancés ces valeurs sont 93,7% ; 25% ; 71,4% et 66,6%. Par contre, nous avons remarqué une diminution dans les valeurs de la Se et la VPP lors de la détection de la protéine TOP2A entre les lésions de bas grades et les lésions de haut grade. Néanmoins, les valeurs de la Sp et la VPN sont identiques entre ces lésions.

Il apparaît donc que la protéine TOP2A n'est pas un marqueur sensible et spécifique pour diagnostiquer le cancer du col de l'utérus, bien que les résultats trouvés par Branca *et al.* (2006) étaient différent des nôtres. Ces auteurs ont rapporté les valeurs suivantes dans les CIN : une Se de 68,1%, une Sp de 80%, une VPP de 97,9% et une VPN de 15,7% pour l'expression de la protéine TOP2A respectivement. Alors que pour les stades avancés du cancer du col de l'utérus (CIN3 et CÉ) ces valeurs étaient : 86,4%, 72%, 93,5% et 52,9% respectivement.

Le profile transcriptionnel et l'analyse de l'ADN des gènes codant pour les protéines MCM2 et TOP2A par micro-puce à ADN, ont montré une surexpression de ces deux marqueurs dans le cancer du col de l'utérus (Chen Y *et al.*, 2003). L'expression de la protéine MCM2 et la protéine TOP2A à la fois dans les tissus normaux et les tissus malins du col de l'utérus a été déterminée par l'utilisation d'un cocktail d'anticorps murin pour le marquage de ces deux protéines (ProEx C). Ce test existe sur le marché. Il est appliqué sur des spécimens histologiques et cytologiques (Pinto *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que ce cocktail d'anticorps, appliqué soit sur des biopsies soit sur des prélèvements cytologiques liquides du col de l'utérus, est un indicateur fiable pour les CIN de haut grade et pourra prédire si les lésions qui tendent à progresser vers le cancer (Shi *et al.*, 2007 ; Pinto *et al.*, 2008 ; Yang QC *et al.*, 2013). L'usage de ces anticorps par certains auteurs sur les lésions de haut et de bas grades et d'autres lésions des muqueuses squameuses bénignes a montré une sensibilité de 78,6% pour la détection des lésions de haut grade. La spécificité était 100% pour ces lésions. C'est surtout la spécificité de ces anticorps qui étaient toujours élevées (Shi *et al.*, 2007).

Shi et ses collaborateurs ont rapporté en 2007 dans une étude de 62 échantillons de tissus du col de l'utérus (bénins, bas et haut grade), un grand nombre de cas ont présenté une coloration positive dans les CIN de haut grade avec le cocktail d'anticorps (ProEx C). Ils ont conclu que ce cocktail pourrait être un marqueur des lésions intraépithéliales de bas grade du col de l'utérus et les carcinomes épidermoïdes avec une grande sensibilité (Shi *et al.*, 2007).

7.5. Relation entre l'expression des protéines p16, Ki-67, MCM2, TOP2A et l'infection par HPV-HR

Nos données sur le géotypage HPV ont montré des infections par les HPV à haut risque dans 52% des cas, avec une prépondérance des types HPV 16 et 18, c'est à dire 48% des cas seraient révélés HPV négatifs. Selon les valeurs du coefficient de Pearson, concernant la corrélation entre l'infection par un type HPV à haut risque et le taux de l'expression de chaque protéine, seule l'expression de la protéine TOP2A n'est pas corrélée significativement avec l'infection virale.

Les cas p16-positifs sont des cas associés aux HPV-HR, donc il y a une corrélation significative entre l'expression de cette protéine et l'infection au HPV à haut risque ($p = 0.005$).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans plusieurs études (Keating *et al.*, 2001 ; Klaes *et al.*, 2001 ; Murphy *et al.*, 2005 ; Nam *et al.*, 2008 ; Zouheir *et al.*, 2016). Il a été rapporté que les niveaux de p16 augmentent en réponse à la dérégulation inactivatrice du cycle cellulaire résultant de la perturbation de l'interaction de pRb avec le facteur de transcription E2F en présence de l'oncogène E7 d'HPV (Brown CA *et al.*, 2012).

L'expression de Ki-67 est aussi bien corrélée avec l'infection au HPV-HR ($p : 0.004$). Comme cela a été rapporté par Yu et al (2016b), à savoir que la co-expression de la protéine Ki-67 est fortement associé à la persistance de l'HPV à haut risque, bien que d'autres auteurs n'ont pas trouvé cette association significative (Nam *et al.*, 2008 ; Zhong *et al.*, 2015 ; Xing *et al.*, 2017).

De sa part, l'expression de la protéine MCM2 est corrélée significativement avec cette infection ($p : 0.04$). Nos résultats sont similaires à ceux trouvés dans plusieurs études (Amaro Filho *et al.*, 2014 ; Zheng, 2015) concernant la corrélation qui est significative entre l'expression de la protéine MCM2 et l'infection au HPV à haut risque. Il a été rapporté que l'infection à HPV à haut risque libérerait le facteur de transcription E2F et entraînerait une augmentation de l'expression de MCM2. Ce niveau anormalement élevé de MCM2 serait détectable dans les cas de carcinomes du col de l'utérus et des CIN (Halloush *et al.*, 2008).

Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de liaison entre l'expression de la protéine TOP2A et l'infection à HPV à haut risque, dans notre travail. Il n'y a pas de corrélation significative ($p = 0.127$) entre l'infection HPV et l'expression de la protéine TOP2A. Branca *et al.* (2006) ont trouvé une association étroite avec l'infection au l'HPV-HR est vraisemblablement expliquée par le fait que l'oncoprotéine E7 de ces virus (mais pas HPV-BR) bloque l'inhibition médiée par pRb en dégradant le Rb de type sauvage.

7.6. Avantages de l'utilisation de l'application ImmunoRatio

Plusieurs auteurs ont confirmé l'efficacité de l'application de l'ImmunoRatio dans le comptage automatique du marquage de quelques protéines tel que le récepteur de l'estrogène (ER), le récepteur de la progestérone (PR), la protéine Ki-67 et la protéine TOP2A (Tuominen *et al.*, 2010 ; González-González *et al.*, 2016 ; Chen JR *et al.*, 2017 ; Yeo *et al.*, 2017). Dans notre travail, on a utilisé cette application pour évaluer le marquage nucléaire des protéines Ki-67 ; MCM2 et

CHAPITRE 7. Discussion

TOP2A pour la détermination des scores de marquage de chaque protéine. Les résultats obtenus étaient acceptables. Nous croyons qu'elle pourra aider les pathologistes pour évaluer le marquage nucléaire des protéines.

En générale cette application pourrait aider les pathologistes à déterminer le pourcentage du marquage nucléaire de plusieurs protéines nucléaires. Dans le cas du cancer du col utérin, il s'avère difficile de révéler ces marqueurs quand les cellules du stroma expriment aussi les mêmes protéines avec un marquage de même taille que celui des cellules épithéliales ou glandulaires. Par conséquent, son application doit être considérée avec beaucoup de prudence. Il serait possible d'utiliser cette application pour déterminer le pourcentage de coloration des stades avancés comme les carcinomes épidermoïdes parce que les résultats obtenus étaient de ceux obtenus par des pathologistes expérimentés.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical line on the left and a horizontal line on the top and right, featuring small circular motifs at the corners.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Si le cancer du col est dépisté au premier stade asymptomatique, il peut être guéri dans la quasi-totalité des cas par la chirurgie ou la radiothérapie. Il est encore très important de noter que le dépistage précoce des lésions précancéreuses par examen cytologique est l'axe principal de la lutte mondiale contre ce type du cancer. Une évaluation du programme national de dépistage du cancer du col, en juin 2014, a prouvé les fortes exigences auxquelles doit répondre le système de santé de notre pays pour garantir la qualité et la couverture adéquate de ce dépistage. Les insuffisances stratégiques et pratiques mises en relief devraient être corrigées en partie grâce à l'introduction de nouvelles techniques de dépistage comme, les frottis en phase liquide, le test HPV et l'immunocytochimie.

Le marquage de quelques biomarqueurs, par l'immunohistochimie, offre une amélioration significative à la coloration à l'hématoxyline-éosine conventionnelle pour éviter les ambiguïtés dans l'interprétation des résultats, et en plus le diagnostic reproductible des néoplasies cervicales intraépithéliales et faciliter ce dernier. Il pourra être une aide précieuse pour l'identification et l'interprétation de l'histologie du cancer du col de l'utérus.

Les résultats obtenus dans notre étude montrent la possibilité de l'utilisation de la protéine Bcl-2 comme un marqueur de détection du carcinome épidermoïde (taux positif est 61,03%). Alors que la protéine p53 n'aurait aucune valeur de détection (taux positif est 24,67%). L'importance pronostique de ces deux protéines pourrait être confirmée si nous avons étudié l'expression des protéines Bcl-2 et p53 dans les stades avancés du cancer du col utérin. La corrélation entre le pourcentage de l'expression des protéines Bcl-2 et p53 n'aurait aucune valeur significative.

Pour la protéine p16 et la protéine Ki-67 auraient une très forte sensibilité et spécificité pour la détection des stades avancés de cancer du col de l'utérus comme la CIN3 et les carcinomes. Le taux positif de l'expression de la protéine p16 est 81,25% dans ces stades et ce de la protéine Ki-67 est de 75%.

La protéine MCM2 pourrait être un biomarqueur de détection des stades avancés aussi du cancer du col utérin (taux positif est 93,75%). Le résultat obtenu avec la protéine TOP2A nécessite d'être étudié autre fois parce que sa valeur de sensibilité dans les stades avancés est inférieure à celle dans les stades précoces du cancer du col de l'utérus. Alors que les taux élevés de l'expression

de cette protéine sont très élevés dans la CIN3 ; les carcinomes et les adénocarcinomes (taux positif est 93,75%). Donc les protéines p16, Ki-67 et MCM2 pourraient jouer un rôle comme des biomarqueurs de détection des stades avancés du cancer du col de l'utérus.

Pour la prévalence des virus HPV dans notre région nous avons trouvé que les types HPV 16 et 18 sont les plus fréquents par un pourcentage de 20% et 12% des cas testés respectivement. L'expression des protéines p16 ; Ki-67 et MCM2 avait une corrélation significative avec l'infection par des virus HPV à haut risque ($p < 0.05$) alors que l'expression de la protéine TOP2A n'aurait pas cette corrélation significative avec ce type d'infection.

Les résultats de détermination du pourcentage de marquage nucléaire des protéines Ki-67 ; MCM2 et TOP2A par l'application ImmunoRatio donnent des résultats proches de l'estimation du pathologiste. Cette application pourrait aider les pathologistes dans ce domaine de l'évaluation des taux de l'expression des protéines nucléaires.

L'une des difficultés durant la réalisation de cette étude était l'obtention des échantillons frais. Les résultats seraient plus nets si les biopsies du col de l'utérus ou bien les cellules prélevées de frottis soit fraîchement collectées. La conservation de ces derniers est aussi cruciale. Cet obstacle réduit le nombre des expériences que l'on peut réaliser sur les échantillons. En effet, les échantillons frais permettent l'étude de plus de caractères, tel que le travail sur les marqueurs sous forme d'ARNm et sous forme d'ADN. Aussi pour une meilleure appréciation il fallait réaliser les expériences sur des prélèvements frais pour ne pas exclure les biomarqueurs génétiques et épigénétiques.

Un autre obstacle était l'obtention d'un nombre suffisant mais limité des blocs paraffinés pour chacun des différents stades du cancer du col utérin. Encore une limite à cette étude est le manque de fonds suffisants pour l'approvisionnement en produits et des réactifs de laboratoire tels que les anticorps pour réaliser l'IHC et les kits des tests HPV.

La qualité des blocs et la taille des fragments est un autre facteur limitant pour le génotypage des HPV due à la présence d'ADN dégradé pour l'amplifier par l'utilisation de la PCR. Ceci génère une inégalité des tailles des fragments rendant la comparaison entre les échantillons difficile. La qualité des blocs influence également la coloration HE ou même l'IHC.

Enfin, chaque spécimen doit contenir des cellules de la zone de jonction plus une partie de l'exocol et une autre de l'endocol.

Perspectives et recommandations :

- La sensibilisation des femmes au FCU par le biais des associations.
- La réalisation d'une enquête pour évaluer le dépistage du cancer du col de l'utérus par FCU effectué par le secteur privé.
- Le développement de nouveaux tests (virologique, cellulaire et histologique) comme les puces à ADN et l'immunocytologie pour étudier d'autres biomarqueurs.
- L'amélioration du diagnostic et le dépistage par l'utilisation des biomarqueurs. Par l'augmentation de l'effectif et la réalisation des contrôles de qualité pour ces marqueurs etc.

A decorative horizontal scroll border with rounded ends and a small circular detail at the top right corner.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A.

- A Abbara. Interactif en Gynécologie Obstétrique (Frottis cervico-utérin (FCU), Frottis cervico-vaginal). 2013. Disponible à :
http://www.aly-abbara.com/livre_gyn_obs/termes/frottis_cervicovaginal.html
- ACS (American Cancer Society). New Screening Guidelines for Cervical Cancer, 2012. Disponible à :
<http://www.cancer.org/cancer/news/new-screening-guidelines-for-cervical-cancer>
- AL Adams, J Gidley, J Roberson, W Wang, I Eltoum, and DC Chhieng. Clinical significance of unsatisfactory conventional pap smears owing to inadequate squamous cellularity defined by the Bethesda 2001 criterion. *American journal of clinical pathology*, 123: 738-43, 2005.
- SN Agoff, P Lin, J Morihara, C Mao, NB Kiviat, and LA Koutsky. p16^{INK4a} expression correlates with degree of cervical neoplasia : a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Modern pathology*, 16 (7): 665-73, 2003.
- M Akasofu and Y Oda. Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of human papillomavirus types 16 and 18. *Virchows archiv*, 425 (6): 593-602, 1995.
- ES Alnemri, DJ Livingston, DW Nicholson, G Salvesen, NA Thornberry, WW Wong, and J Yuan. Human ICE/ CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87 (2): 171, 1996.
- SM Amaro Filho, GJ Nuovo, CB Cunha, L de Oliveira Ramos Pereira, M Oliveira-Silva, F Russomano, A Pires, and AF Nicol. Correlation of MCM2 detection with stage and virology of cervical cancer. *International journal of biological markers*, 29 (4): e363-71, 2014.
- E Appella and CW Anderson. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry*, 268 (10): 2764-72, 2001.
- PC Ashe and MD Berry. Apoptotic signaling cascades. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 27 (2): 199-214, 2003.

B.

- RE Badr, AE Walts, F Chung, SB Fai, and S Bose. BD ProEx C: A sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *American journal of surgical pathology*, 32 (6): 899-906, 2008.

Références bibliographiques

- MH Balaha, MS Al Moghannum, N Al Ghowinem, and S Al Omran. Cytological pattern of cervical papanicolaou smear in eastern region of Saudi Arabia. *Journal of cytology*, 28: 173-7, 2011.
- JJ Baldauf et E Baulon. Carcinome micro-invasif et invasif. À partir du livre : Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus, sous la direction de Joseph Monsonogo, Paris. *Springer Link* : Pp : 365-70, 2007.
- JG Baseman and LA Koutsky. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of clinical virology*, 32 (S1): S16-24, 2005.
- K Baskaran, S Karunanithi, I Sivakamasundari, NJ Sundresh, B Thamaraiselvi, and S Swaruparani. Overexpression of p53 and its role as early biomarker in carcinoma of uterine cervix. *International journal of research in pharmaceutical sciences*, 4 (2): 198-202, 2013.
- A Basu and S Haldar. The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular human reproduction*, 4 (12): 1099-109, 1998.
- M Benevolo, M Mottotese, F Marandino, G Vocaturo, R Sindico, G Piperno, L Mariani, P Canalini, RP Donnorso, and A Vocaturo. Immunohistochemical expression of p16 (INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Modern pathology*, 19 (3): 384-91, 2006.
- ZB Benlahrech, A Kerbboua, et K Bouzid. Prévention et dépistage du cancer du col de l'utérus. *Revue El-Hakim*, Vol III : 24-29, 2018.
- C Bergeron, H Ikenberg, M Sideri, K Denton, J Bogers, D Schmidt, F Alameda, T Keller, S Rehm, R Ridder, and PALMS study group. Prospective evaluation of p16/ Ki-67 dual-stained cytology for managing women with abnormal Papanicolaou cytology: PALMS study results. *Cancer cytopathol*, 123 (6): 373-81, 2015.
- R Bergström, P Sparén, and HO Adami. Trends in the cancer of the cervix uteri. *British journal of cancer*, 81: 159-66, 1999.
- JA Bolli, DL Doering, JR Bosscher, TG Day Jr, CV Rao, K Owens, B Kelly, and J Goldsmith. Squamous cell carcinoma antigen: clinical utility in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol oncology*, 55 (2): 169-73, 1994.
- G Borras, R Molina, J Xercavins, A Ballesta, and J Iglesias. Tumor antigens CA 19.9, CA 125, and CEA in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic oncology*, 57 (2): 205-11, 1995.
- L Boublenza, S Moulessehoul, H Beldjillali, K Hadeif, F Boulenouar, N Chabni, et K Meguenni. Analyse des activités de dépistage du cancer du col de l'utérus dans une région de l'ouest Algérien entre 2007 et 2011. *Journal Africain du cancer*, 5: 11-5, 2013.
- A Bouhadeif, F Asselah, A Boudriche, N Chaoui, FZ Benserai, A Kaddouri-Slimani et collaborateurs. Cytopathologie de dépistage des précurseurs et du cancer du col de l'utérus, 2^{ème} édition, 253p, 2016.

Références bibliographiques

M Branca, C Giorgi, M Ciotti, D Santini, L Di Bonito, S Costa, A Benedetto, D Bonifacio, P Di Bonito, P Paba, L Accardi, L Mariani, M Ruutu, SM Syrjänen, C Favalli, K Syrjänen, and HPV-PathogenISS Study Group. Over-expression of topoisomerase II alpha is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high-risk human papillomavirus (HPV), but does not predict prognosis in cervical cancer or HPV clearance after cone treatment. *International journal of gynecological pathology*, 25 (4): 383-92, 2006.

CA Brown, J Bogers, S Sahebali, CE Depuydt, F De Prins, and DP Malinowski. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer sPrograms. *Journal of oncology*, Volume 2012: 1-12, 2012.

DC Brown and KC Gatter. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*, 40 (1): 2-11, 2002.

EM Burd. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical microbiology reviews*, 16 (1): 1-17, 2003.

C.

J Caamano, B Ruggeri, S Momiki, A Sickler, SY Zhang, and AJP Klein-Szanto. Detection of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell lines. *American journal pathology*, 139 (4): 839-45, 1991.

K Canene-Adams. Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for immunohistochemistry. *Methods in enzymology*, 533: 225-33, 2013.

R Catarino, P Petignat, G Dongui, and P Vassilakos. Cervical cancer screening in developing countries at a crossroad: Emerging technologies and policy choices. *World journal clinical oncology*, 6 (6): 281-90, 2015.

G Cattoretti, F Rilke, S Andreola, L D'Amato, and D Delia. p53 expression in breast cancer. *International journal cancer*, 41 (2): 178-83, 1988.

DM Cavalcante, LM Linhares, ML Pompeu, PC Giraldo, and J Eleuterio. The utility of p16^{INK4a} and Ki-67 to identify hig-grade squamous intraepithelial lesion in adolescents and young women. *Indian journal med Microbiol*, 55: 339-42, 2012.

PL Cheah and LM Looi. p53 immunohistochemical expression: Messages in cervical carcinogenesis. *Pathology*, 34 (4): 326-31, 2002.

HY Chen, CT Hsu, WC Lin, HD Tsai, and WC Chang. Prognostic value of p53 expression in stage IB1 cervical carcinoma. *Gynecologic and obstetric investigation*, 49 (4): 266-71, 2000.

JR Chen, HP Chien, KS Chen, CC Hwang, HY Chen, KY Yeh, TY Hsieh, LC Chang, YC Hsu, RJ Lu, and CC Hua. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in a series of Taiwanese breast cancer. *Medicine (Baltimore)*, 96 (2): 1-9, 2017.

Références bibliographiques

- Y Chen, C Miller, R Mosher, X Zhao, J Deeds, M Morrissey, B Bryant, D Yang, R Meyer, F Cronin, BS Gostout, K Smith-McCune, and R Schlegel. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer research*, 63 (8): 1927-35, 2003.
- SK Chiou, L Rao, and E White. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 14 (4): 2556-63, 1994.
- N Ciano, MG Galasso, R Campisi, L Bivona, M Migliore, and GU Di Maria. Prognostic value of p53 and Ki-67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer. *Multidisciplinary respiratory medicine*, 7 (1): 1-6, 2012.
- CIRC (Centre international de Recherche sur le Cancer). Colposcopie et Traitement des Néoplasies Cervicales Intraépithéliales : Manuel à l'usage des débutants, Chapitre 1 : Introduction à l'anatomie du col de l'utérus. Database : 978-92-832-0414-5 (Version en ligne), 2004a.
- CIRC. Histopathologie du col utérin atlas numérique (<http://screening.iarc.fr/atlascyto.php?lang=2>), 2004b.
- CIRC. Colposcopie et Traitement des Néoplasies Cervicales Intraépithéliales : Manuel à l'usage des débutants, Chapitre 9 : Lésions inflammatoires du col de l'utérus. (Version en ligne), 2004c.
- CIRC. Colposcopie et Traitement des Néoplasies Cervicales Intraépithéliales : Manuel à l'usage des débutants, Chapitre 3: Introduction au cancer invasif du col de l'utérus. (Version en ligne), 2004d.
- T Cortèse et A Zemmar. Études de p53 et Blocage du cycle cellulaire en G1/S. Université Paul Sabatier, Toulouse III, 1-24, 2007.
- RAF Crawford, C Caldwell, RK Iles, D Lowe, JH Shepherd, and T Chard. Prognostic significance of the bcl-2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *British journal of cancer*, 78 (2): 210-4, 1998.
- J Cuzick, MH Mayrand, G Ronco, P Snijders, and P Wardle. Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine*, 24 (S3): S90-7, 2006.

D.

- DM Da Silva, MP Velders, JD Nieland, JT Schiller, BJ Nickoloff, and WM Kast. Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *International immunology*, 13 (5): 633-41, 2001.
- Dako (catalogue). Monoclonal Mouse Anti-Human BCL-2 Oncoprotein, Clone 124, Code M0887, 2002a.
- Dako (catalogue). Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7, Code M 7001, 2002b.

Références bibliographiques

- S Dasari, W Rajendra, and L Valluru. Evaluation of soluble CD44 protein marker to distinguish the benign and squamous cell carcinoma cases in cervical cancer Patients. *Medical oncology*, 31: 1-7, 2014.
- S Dasari, W Rajendra, and L Valuru. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clinica Chimica Acta*, 445: 7-11, 2015.
- B Davidson, I Goldberg, L Lerner-Geva, WH Gotlieb, G Ben-Baruch, I Novikov, and J Kopolovic. Expression of topoisomerase II and Ki-67 in cervical carcinoma-clinicopathological study using immunohistochemistry. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 108 (3): 209-15, 2000.
- D Decaudin, S Geley, T Hirsch, M Castedo, P Marchetti, A Macho, R Kofler, and G Kroemer. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer research*, 57: 62-7, 1997.
- D Decaudin, I Marzo, C Brenner, and G Kroemer. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (Review). *International journal of oncology*, 12 (1): 141-93, 1998.
- F Denis, S Hanz, and S Alain. Clairance, persistance et récidence de l'infection à papillomavirus. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, 36 (4): 430-40, 2008.
- JE Deweese and N Osheroff. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing. *Nucleic acids research*, 37 (3): 738-48, 2009.
- C Dimitrakakis, G Kymionis, E Diakomanolis, I Papaspyrou, A Rodolakis, I Arzimanoglou, E Leandros, and S Michalas. The possible role of p53 and Bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecologic oncology*, 77 (1): 129-36, 2000.
- J Ding, Z Zhang, GJ Roberts, M Falcone, Y Miao, Y Shao, XC Zhang, DW Andrews, and J Lin. Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *The journal of biological chemistry*, 285 (37): 28749-63, 2010.
- PJ Disaia, CP Morrow, BJ Haverback, and BJ Dyce. Carcinoembryonic antigen in cancer of the female reproductive system: Serial plasma values correlated with disease state. *Cancer*, 39 (6): 2365-70, 1977.
- J Doorbar. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*, 32S: S7-S15, 2005.
- M Dowsett, TO Nielsen, RA'Hern, J Bartlett, RC Coombes, J Cuzick, M Ellis, NL Henry, JC Hugh, T Lively, L McShane, S Paik, F Penault-Llorca, L Prudkin, M Regan, J Salter, C Sotiriou, IE Smith, G Viale, JA Zujewski, DF Hayes, and International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki-67 in breast cancer: recommendations from the International Ki-67 in breast cancer Working Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 103 (22): 1656-64, 2011.

Références bibliographiques

L Duncan, S Jacob, and E Hubbard. Evaluation of p16^{INK4a} as a diagnostic tool in the triage of Pap smears demonstrating atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer*, 114 (1): 34-48, 2008.

N Duport. Données épidémiologiques sur le cancer du col de l'utérus. État des connaissances – Actualisation 2008. Institut de Veille Sanitaire – France ; Mai 2008.

E.

N El Gnaoui, R Saile, et H Benomar. Le frottis cervicovaginal un test incontournable dans le dépistage des lésions du col de l'utérus. *Journal Africain du cancer*, 2: 9-13, 2010.

J Eleutério Jr, T Silva Lima, M do Perpétuo, S Cunha, DI Magno Cavalcante, and AM Holanda Silva. Immunohistochemical expression of the tumor suppressor protein p16^{INK4a} in cervical adenocarcinoma. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 39: 21-25, 2017.

ESMO (European Society for Medical Oncology) and FAC (Fonds Anticancer). Le cancer du col utérin : un guide pour les patientes (www.esmo.org ; www.fondsanticancer.org). 1-33, 2012.

F.

J Ferlay, I Soerjomataram, M Ervik, R Dikshit, S Eser, C Mathers, M Rebelo, DM Parkin, D Forman, and F Bray. GLOBOCAN 2012 v1.2, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible à : <http://globocan.iarc.fr>.

CA Finlay, PW Hinds, TH Tan, D Eliyahu, M Oren, and AJ Levine. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70-p53 with an altered half-life. *Molecular and cellular biology*, 8 (2): 531-9, 1988.

AH Fischer, KA Jacobson, J Rose, and R Zelle. Hematoxylin and Eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring harbor protocols*, 3 (5): 1-2, 2008.

EL Franco, J Cuzick, A Hildesheim, and S de Sanjose. Chapter 20: Issues in planning cervical cancer screening in the era of HPV vaccination. *Vaccine*, 24 (Suppl 3): S171-7, 2006.

G.

P Gariglio, J Organista-Nava, and E Alvarez-Rios. Role of HR-HPVs E6 and E7 oncoproteins in cervical carcinogenesis. *Journal of molecular and genetic medicine*, 10 (2): 1-11, 2016.

GP Garnett, JJ Kim, K French and SJ Goldie. Modeling the impact of HPV vaccines on cervical cancer and screening programs. *Vaccine*, 24 (S3): S178-86, 2006.

J Gerdes, U Schwab, H Lemke, and H Stein. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer*, 31 (1): 13-20, 1983.

Références bibliographiques

- GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Cancer fact sheets: cervical cancer. Lyon, 2012.
- GLOBOCAN 2018. Cancer Today Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018. Disponible à : <http://gco.iarc.fr/today/home>.
- A Goffard. Infections à papillomavirus (cours de virologie). Université de Lille de Droit et Santé, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de Lille. 1-11, 2012.
- R González-González, N Molina-Frechero, RG Carreón-Burciaga, S López-Verdín, C Robles-Bonilla, V Pereira-Prado, and R Bologna-Molina. Comparison between manual and automated methods for Ki-67 immunoexpression quantification in ameloblastomas. *Analytical cellular pathology*, 1-8, 2016.
- VM Grace, JV Shalini, TT Iekha, SN Devaraj, and H Devaraj. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic oncology*, 91 (1): 51-8, 2003.
- M Graflund, B Sorbe, and M Karlsson. Immunohistochemical expression of p53, bcl-2, and p21WAF1/CIP1 in early cervical carcinoma: Correlation with clinical outcome. *International journal of gynecological cancer*, 12 (3): 290-8, 2002.
- PE Gravitt and RL Winer. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses*, 9 (10): 1-10, 2017.
- M Grigore, S Teleman, D Ungureanu, and A Mares. Molecular markers in cervical screening – a promise for the future. *Revista Română de medicină de laborator*, 21: 231-9, 2013.
- RM Gronostajski, AL Goldberg, and AB Pardee. Energy requirement for degradation of tumor associated protein p53. *Molecular and cellular biology*, 4: 442-8, 1984.

H.

- RA Halloush, I Akpolat, QJ Zhai, MR Schwartz, and DR Mody. Comparison of ProEx C with p16^{INK4a} and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material: a pilot study. *Cancer*, 14: 474-80, 2008.
- M Hamdi Cherif, E Bidoli, S Birri, A Mahnane, Z Zaidi, H Boukharouba, H Moussaoui, L Kara, A Ayat, K Makhouloufi, I Bouchaïbi, Atoui, S Virdone, and D Serraino. Cancer estimation of incidence and survival in Algeria 2014. *Journal of cancer research & therapy*, 3 (9): 100-4, 2015.
- M Hamdi Cherif, K Bouharati, L Kara, H Rouabah, D Hammouda, et Z Fouatih. Les cancers en Algérie Données Épidémiologiques du Réseau National des Registres du Cancer, 2015. Journée Mondiale Contre le Cancer, Sétif 2017a.

Références bibliographiques

- M Hamdi Cherif, A Mahnane, H Boukharouba, L Kara, N Dilmi, K Makhoulfi, K Bouharathi, Z Guezati, A Boudiaf, K Foudi, N Keskes, et H Rouabah. 3^{ème} atlas du register de cancer de Sétif 1986-2016 incidence, tendance et survie. Pp : 53-54, Pp : 77, 2017b.
- S Hantz, S Alain, and F Denis. Vaccins anti-papillomavirus et prévention du col de l'utérus. *La press medicale*, 34 (10): 745-53, 2005.
- DL Hartl and EW Jones. Genetics Analysis of Genes and Genomes. Boston, Jones and Bartlett Publishers, 6th edition, Sudbury, Pp : 636-75, 2004.
- HAS (Haute Autorité de Santé, www.has-sante.fr). Dépistage et prévention du cancer du col de l'utérus Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé (EPS). 1-55, 2013.
- T Hiller and T Iftner. The human papillomavirus (The health professional's HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer). Taylor & Fransis, London, Pp : 19, 2004.
- Z Hongmei. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway. *InTech*, Chapter 1: 1-22, 2012.
- HybriBio. 21 HPV GenoArray Diagnostic Kit. REF HBGA-21, 2012.

I.

- M Ishihara, H Mukai, S Nagai, M Onozawa, K Nihei, T Shimada, and N Wada. Retrospective analysis of risk factors for central nervous system metastases in operable breast cancer: effects of biologic subtype and Ki-67 overexpression on survival. *Oncology*, 84 (3): 135-40, 2013.
- Y Ishimi, I Okayasu, C Kato, HJ Kwon, H Kimura, K Yamada, and SY Song. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem*, 270 (6): 1089-101, 2003.

J.

- D Jain, R Srinivasan, FD Patel, and S Kumari Gupta. Evaluation of p53 and bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol*, 88 (1): 22-8, 2003.
- A Jedpiyawongse, P Homcha-em, A Karalak, and P Srivatanakul. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with cervical cancer in Thailand. *Asian Pacific cancer Prev*, 9: 625-30, 2008.
- A Josefsson, P Wikström, L Egevad, T Granfors, L Karlberg, P Stattin, and A Bergh. Low endoglin vascular density and Ki-67 index in Gleason score 6 tumours may identify prostate cancer patients suitable for surveillance. *Scand J Urol Nephrol*, 46 (4): 247-57, 2012.

Références bibliographiques

K.

- M Kadaja, T Silla, E Ustav, and M Ustav. Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology*, 384 (2): 360-8, 2009.
- K Kanthiya, J Khunnarong, S Tangjitgamol, N Puripat, and S Tanvanich. Expression of the p16 and Ki-67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17 (7): 3201-6, 2016.
- JT Keating, A Cviko, S Riethdorf, L Riethdorf, BJ Quade, D Sun, S Duensing, EE Sheets, K Munger, and CP Crum. Ki-67, cyclin E, and p16^{INK4} are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 25 (7): 884-91, 2001.
- D Kelly, E Kincaid, Z Fansler, DL Rosenthal, and DP Clark. Detection of cervical high grade squamous intraepithelial lesions from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx C). *Cancer*, 108 (6): 494-500, 2006.
- JF Kerr, AH Wyllie, and AR Currie. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26 (4): 239-57, 1972.
- A Khenchouche. Le cancer du col de l'utérus : coïnfection par le papillomavirus humain et par le virus d'Epstein-Barr. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif-1, Algérie, Pp : 2, 2014.
- SN Khleif, J De Gregori, CL Yee, GA Otterson, FJ Kaye, JR Nevins, and PM Howley. Inhibition of cyclin D-CDK4/ CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (9): 4350-4, 1996.
- HJ Kim and CM Lee. p16-negative warty carcinoma of the uterine cervix with superficial invasion to the endometrium: A case report focusing on diagnostic pitfalls. *Case Reports in Clinical Pathology*, 4 (3): 12-5, 2017.
- SW Kim, J Roh, and CS Park. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 50: 411-8, 2016.
- V Kishore and AG Patil. Expression of p16^{INK4A} protein in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of uterine cervix. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11 (9): EC17-20, 2017.
- SK Kjaer, AJ van den Brule, G Paull, EI Svare, ME Sherman, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, and Meijer CJ. Type specific persistence of high risk humanpapillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *Br Med J*, 325: 1-7, 2002.
- R Klaes, T Friedrich, D Spitkovsky, R Ridder, W Rudy, U Petry, G Dallenbach-Hellweg, D Schmidt, and MVK Doeberitz. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for

Références bibliographiques

- dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer*, 92 (2): 276-84, 2001.
- Y Koyamatsu, M Yokoyama, Y Nakao, K Fukuda, T Saito, K Matsukuma, and T Iwasaka. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol*, 90 (3): 547-51, 2003.
- P Krishnappa, I Binti Mohamad, YJ Lin and A Barua. Expression of p16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. *Diagnostic Pathology*, 19 (202): 1-6, 2014.
- G Kroemer, N Zamzami, and SA Susin. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, 18 (1): 44-51, 1997.
- B Ku, C Liang, JU Jung, and BH Oh. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res*, 21 (4): 627-41, 2011.
- K Kumari and AA Vadivelan. p16^{INK4A} expression in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Brunei Int Med J*, 9 (3):165-71, 2013.
- L.**
- K Labib and JF Diffley. Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Current Opinion in Genetics and Development*, 11 (1): 64-70, 2001.
- PF Lambert. Papillomavirus DNA replication. *Journal of Virology*, 65 (7): 3417-20, 1991.
- MC Lebart, J Mariani, et G Furelaud. Neurobiologie des Signaux Intracellulaire (cours en ligne) l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). Biologie et Multimédia, 2004.
- I Lesnikova, M Lidang, HS Dutiot, and J Koch. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic Pathology*, 4: 22, 2009.
- J Lessard, Kh Moqadem, P Goggin, MH Mayrand, M de Guise, et Jim Boulanger. Comparaison des stratégies de dépistage du cancer du col de l'utérus avec le test de détection des virus du papillome humain (test VPH) ou la cytologie gynécologique (test Pap), Québec, 74p, 2017.
- XH Liang, S Mungal, A Ayscue, JD Meissner, P Wodnicki, D Hockenbery, S Lockett, and B Herman. Bcl-2 protooncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. *J Cell Biochem*, 57: 509-21, 1995.
- S Lim and P Kaldis. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140 (15): 3079-93, 2013.

Références bibliographiques

- ML Looi, AZ Dali, SA Ali, WZ Ngah, and YA Yusof. Expression of p53, Bcl-2 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anal Quant Cytol Histol*, 30 (2): 63-70, 2008.
- R Luttmer, MG Dijkstra, PJ Snijders, J Berkhof, FJ van Kemenade, L Rozendaal, TJ Helmerhorst, RH Verheijen, WA Ter Harmsel, WM van Baal, PG Graziosi, WG Quint, JW Spruijt, DK van Dijken, DA Heideman, and CJ Meijer. p16/ Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre)cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population. *Mod Pathol*, 29 (8): 870-8, 2016.
- M.**
- DJ MacEwan. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British Journal of Pharmacology*, 135 (4): 855-75, 2002.
- V Marck. Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie Théorie et pratique. Elsevier Masson, Paris: Pp : 51-59, 2010.
- C Marth, F Landoni, S Mahner, M McCormack, A Gonzalez-Martin, N Colombo, and ESMO Guidelines Committee. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 28 (S4): iv72-83, 2017.
- E Megevand, L Denny, K Dehaeck, R Soeters, and B Bloch. Acetic acid visualization of the cervix: an alternative to cytologic screening. *Obstetrics and Gynecology*, 88(3): 383-6, 1996.
- J Melnikow, J Nuovo, AR Willan, BK Chan, and LP Howell. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 92 (4 Pt 2): 727-35, 1998.
- A Mishra and M Verma. Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time? *Cancers*, 2 (1): 190-208, 2010.
- KR Mittal, O Lin, W Chan, S Goswami, and RI Demopoulos. Cervical squamous dysplasias and carcinomas with immunodetectable p53 frequently contain HPV. *Gynecol Oncol*, 58 (3): 289-94, 1995.
- R Molina, X Filella, JM Augé, E Bosch, A Torne, J Pahisa, JA Lejarcegui, A Roviro, B Mellado, J Ordi, and A Biete. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. *Anticancer Res*, 25 (3A): 1765-71, 2005.
- G Monaco, E Decrock, H Akl, R Ponsaerts, T Vervliet, T Luyten, M De Maeyer, L Missiaen, CW Distelhorst, H De Smedt, JB Parys, L Leybaert, and G Bultynck. Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca^{2+} signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-XL. *Cell Death Differ*, 19 (2): 295-309, 2012.
- R Monier. Aspects fondamentaux : mécanismes de cancérogenèse et relation dose-effet. *C.R. Acad. Sci (Elsevier)*, 323 (7): 603-10, 2000.

Références bibliographiques

- C Mougin and V Dalstein. Epidémiologie, histoire naturelle et détection des infections à HPV. *Biotribune*, 9 (1): 16-8, 2004.
- C Mougin, O Humbley, C Gay, et D Riethmuller. Papillomavirus humains, cycle cellulaire et cancer du col de l'utérus. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 29 (1): 13-20, 1999.
- C Mougin, M Nicolier, et AZ Decrion-Barthod. HPV et cancers : mécanismes de l'oncogenèse. *Revue Francophone des Laboratoires*, Volume 2008 (405): 35-42, 2008.
- PA Muller and KH Vousden. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*, 15 (1): 2-8, 2013.
- S Munakata, O Watanabe, K Ohashi, and H Morino. Expression of Fas ligand and bcl 2 in cervical carcinoma and their prognostic significance. *Am J Clin Pathol*, 123 (6): 879-85, 2005.
- K Münger, A Baldwin, KM Edwards, H Hayakawa, CL Nguyen, M Owens, M Grace, and K Huh. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 78 (21): 11451-60, 2004.
- NG Munhoz, DA Rodrigues, JF Pedregosa, JO Rodrigues, MSG Junqueira, PTK Yonamine, SF Pereira, S Uezato, T Pandossio, EKL Martins, FB de Oliveira, JA Cordeiro, JL Bonilha, and PM Cury. The use of molecular markers (p16, Ki-67 and E-Cadherin) in uterine cervical biopsies. *The Open Pathology Journal*, 3: 10-7, 2009.
- N Murphy, M Ring, CC Heffron, B King, AG Killalea, C Hughes, CM Martin, E McGuinness, O Sheils, and JJ O'Leary. p16^{INK4A}, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 58 (5): 525-34, 2005.
- N Murphy, M Ring, AG Killalea, V Uhlmann, MO Donovan, F Mulcahy, M Turner, E McGuinness, M Griffin, C Martin, O Sheils, and JJ O'Leary. p16^{INK4A} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and CGIN in cervical biopsies and thin prep smears. *Journal Of Clinical Pathology*, 56: 56-63, 2003.
- M Murtaza, NA Ajaz, El Illzam, AM Sharifa, M Suleiman, and B Yanggau. Risk factors for cervical cancer: diagnosis and management. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 15 (6):104-10, 2016.
- T Myashita, S Krajewski, M Krajewska, H Wang, HK Lin, B Hoffman, D Lieberman, and JC Reed. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 9 (6): 1799-805, 1994.

N.

- Dj Nadir, S Touami, N Kaouadji, M Benkaddour, H Hellal, A Mahnane, N Hammouda, A Djaker, et A Meziane. Enquête nationale sur la mesure du poids des facteurs de risque des Maladies Non Transmissibles, STEPwise OMS/ Algérie 2016-2017. Journée mondiale diabète, Alger. Bureau Coordination Enquête, 2018.

Références bibliographiques

- PK Nakane and GB Pierce. Enzyme-labeled antibodies preparations and application for the localization of antigen. *J Histochem Cytochem*, 14 (12): 929-31, 1967.
- T Nakano and K Oka. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population. An assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer*, 72 (8): 2401-8, 1993.
- EJ Nam, JW Kim, JW Hong, HS Jang, SY Lee, SY Jang, DW Lee, SW Kim, JH Kim, YT Kim, S Kim, and JW Kim. Expression of the p16^{INK4a} and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol*, 19 (3): 162-8, 2008.
- MR Nendaz et A Perrier. Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test de diagnostic. *Rev Mal Respir*, 21 (2): 390-3, 2004.
- PE NeufCoeur, M Arafa, P Delvenne, et S Saussez. Implication des papillomavirus humains dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. *Bulletin du cancer*, 96 (10): 941-50, 2009.
- HY Ngan, ANY Cheung, SS Liu, DK Cheng, TY Ng, and LC Wong. Abnormal expression of p53, c-myc and tp53 in squamous cell carcinoma of cervix: Correlation with HPV and prognosis. *Oncol Rep*, 8: 557-61, 2001.
- HY Ngan, SW Tsao, SS Liu, and M Stanley. Abnormal expression and mutation of p53 in cervical cancer a study at protein, RNA and DNA levels. *Genitour in Med*, 73 (1): 54-8, 1997.
- O.**
- FO Okogbo, OC Ezechi, OM Loto, and PM Ezeobi. Uterine Leiomyomata in South Western Nigeria: a clinical study of presentations and management outcome. *Afr Health Sci*, 11 (2): 271-8, 2011.
- M Olivier, M Hollstein, and P Hainaut. TP53 mutations in human cancers. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2 (1): 1-17, 2010.
- OMS. Lutte contre le cancer du col de l'utérus : guide des pratiques essentielles. Genève, Pp : 32-34, 2007.
- OMS. La lutte contre le cancer du col de l'utérus, Guide des pratiques essentielles 2^{ème} édition, Genève, Pp : 27-85, 2017.
- TS Onon. Viral treatment and prophylactic vaccination strategie (The health professional's HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer). Taylor & Fransis, London, Pp : 58-61, 2004.
- G Orth. Les papillomavirus humains et leur rôle dans l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus. Perspectives dans le domaine de la prévention de ce cancer. In : Blanc B., Eds Le dépistage du cancer du col de l'utérus. *Springer*, Pp : 15-33, 2005.

Références bibliographiques

W Ouahioune, B Djedeat, S Oukrif, et Si Feraoun. Manuel pour prise en charge du cancer du col de l'utérus. 9-48, 2016.

Ould-Kada, editors. Etablissement Hospitalier El Mohgoun Arzew, Oran. Recueil de textes sur la Prévention : Programme national de dépistage du cancer du col de l'utérus. December 2008.

P.

J Park, E Hwang, S Park, HK Ahn, SJ Um, CJ Kim, SJ Kim, and SE Namkoong. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol*, 65 (1): 121-9, 1997.

AL Peres, KM Paz E Silva, RF de Araújo, JL de Lima Filho, MR de Melo Júnior, DB Martins, and NT de Pontes Filho. Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care. *J Biomed Sci*, 23 (1): 1-8, 2016.

M Pett and N Coleman. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*, 212 (4): 356-67, 2007.

F Pezzella, AG Tse, JL Cordell, KA Pulford, KC Gatter, and DY Mason. Expression of the Bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14 ; 18 chromosomal translocation. *American Journal of Pathology*, 137 (2): 225-32, 1990.

J Pflaum, S Schlosser, and M Müller. p53 family and cellular stress responses in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4 (285), 1-15, 2014.

AP Pinto, CP Crum, and MS Hirsch. Molecular markers of early cervical neoplasia. *Diagn Histopathol (Oxf)*, 16 (10): 445-54, 2010.

AP Pinto, NF Schlecht, TYC Woo, CP Crum, and ES Cibas. Biomarker (ProEx™ C, p16INK4A, and MiB-1) distinction of high-grade squamous intraepithelial lesion from its mimics. *Mod Pathol*, 21: 1067-74, 2008.

EC Pirog. Cervical Adenocarcinoma Diagnosis of Human Papillomavirus–Positive and Human Papillomavirus–Negative Tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 141: 1653-67, 2017.

Q.

MA Quinn, JL Benedet, F Odicino, P Maisonneuve, U Beller, WT Creasman, AP Heintz, HY Ngan, and S Pecorelli. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 95 (1): S43-103, 2006.

R.

T Rajkumar, S Rajan, RK Baruah, U Majhi, G Selvaluxmi, and A Vasanthan. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*, 19 (6): 556-60, 1998.

Références bibliographiques

D Riethmuller et JL Brun. Le point sur le vaccin HPV. *Mt pédiatrie*, 13 (1): 84-91, 2010.

ME Rusiniak, D Kunnev, A Freeland, GK Cady, and SC Pruitt. Mcm2 deficiency results in short deletions allowing high resolution identification of genes contributing to lymphoblastic lymphoma. *Oncogene*, 31 (36): 4034-44, 2012.

S.

M Saegusa, Y Takano, M Hashimura, Y Shoji, and I Okayasu. The possible role of bcl-2 expression in the progression of tumors of the uterine cervix. *Cancer*, 76 (11): 2297-303, 1995.

T Saha, RK Kar, and G Sa. Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 117 (2-3): 250-63, 2015.

H Sancho-Garnier, Y Chami Khazraji, M Hamdi Cherif, A Mahnane, M Hsairi, A El Shalakamy, N Osgul, M Tuncer, A O. Jumaan, and M Seoud. Overview of Cervical Cancer Screening Practices in the Extended Middle East and North Africa Countries. *Vaccine*, 31S: G51-7, 2013.

T Sano, T Oyama, K Kashiwabara, T Fukuda and T Nakajima. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*, 153 (6): 1741-8, 1998.

P Sansanwal, M Sankala, G Singh, and M Kathuria. Immunohistochemical detection of proliferative tumor cells in cervical cancer using monoclonal antibody Ki-67. *IJHSR*, 5 (6): 166-71, 2015.

VN Saritha, VS Veena, KM Jagathnath Krishna, T Somanathan, and K Sujathan. Significance of DNA replication licensing proteins (MCM2, MCM5 and CDC6), p16 and p63 as markers of premalignant lesions of the uterine cervix: its usefulness to predict malignant potential *Asian Pac J Cancer Prev*, 19 (1): 141-8, 2018.

M Scheffner, BA Werness, JM Huibregtse, AJ Levine, and PM Howley. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63 (6): 1129-36, 1990.

M Schiffman, J Doorbar, N Wentzensen, S de Sanjosé, C Fakhry, BJ Monk, MA Stanley, and S Franceschi. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease primers*, 2: 1-20, 2016.

M Schiffman, N Wentzensen, S Wacholder, W Kinney, JC Gage, and PE Castle. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 103 (5): 368-83, 2011.

A Schinzel, T Kaufmann, and C Borner. Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta*, 1644 (2-3): 95-105, 2004.

Références bibliographiques

- D Schmidt, C Bergeron, JK Denton, and R Ridder. p16/ Ki-67 dual stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathology*, 119 (3): 158-66, 2011.
- AJ Schoeffler and JM Berger. DNA topoisomerases: Harnessing and constraining energy to govern chromosome topology (Review). *Quarterly Reviews of Biophysics*, 41 (1): 41-101, 2008.
- K Seedorf, G Krämmer, M Dürst, S Suhai, and WG Röwekamp. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 145: 181-5, 1985.
- M Segondy. Classification des papillomavirus (HPV). *La Revue Francophone des Laboratoires*, Volume 2008 (405): 23-5, 2008.
- A Shamas-Din, J Kale, B Leber, and DW Andrews. Mechanisms action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5 (4): 1-21, 2013.
- J Shi, H Liu, M Wilkerson, Y Huang, S Meschter, W Dupree, C Schuerch, and F Lin. Evaluation of p16^{INK4a}, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase IIA, ProEX C, and p16INK4a/ ProEX C in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol*, 38 (9): 1335-44, 2007.
- S Shimizu, Y Eguchi, H Kosaka, W Kamlika, H Matsuda, and Y Tsujimoto. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-XL. *Nature*, 374 (6525): 811-3, 1995.
- S Shukla, J Dass, and M Pujani. p53 and Bcl-2 expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human papillomavirus 16 and 18. *South Asian Journal of Cancer*, 3 (1): 48-53, 2014.
- WA Siddiqui, A Ahad, and H Ahsan. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol*, 89 (3): 289-317, 2015.
- MR Singleton, MS Dillingham, and DB Wigley. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 23-50, 2007.
- Société canadienne du cancer. Tumeurs non cancéreuses du col de l'utérus. 2017a. Disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/cervical/cervical-cancer/non-cancerous-tumours/?region=on>
- Société canadienne du cancer. Tumeurs cancéreuses du col de l'utérus. 2017b. Disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/cervical/cervical-cancer/cancerous-tumours/?region=qc>
- Société canadienne du cancer. États précancéreux du col de l'utérus. 2017c. Disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/cervical/cervical-cancer/non-cancerous-tumours/?region=qc>

Références bibliographiques

- SA Susin, N Zamzami, M Castedo, E Daugas, HG Wang, S Geley, F Fassy, JC Reed, and G Kroemer. The central executioner of apoptosis: Multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD-95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med*, 186 (1): 1-13, 1997.
- IE Symeonidou, S Taraviras, and Z Lygerou. Control over DNA replication in time and space. *FEBS Letters*, 586 (18): 2803-12, 2012.
- T.**
- M Takeda, N Sakuragi, K Okamoto, Y Todo, S Minobe, E Nomura, H Negishi, M Oikawa, R Yamamoto, and S Fujimoto. Preoperative serum SCC, CA-125 and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 81 (5): 451-7, 2002.
- SW Tam, JW Shay, and M Pagano. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin dependent kinase inhibitor p16^{INK4A}. *Cancer Res*, 54 (22): 5816-20, 1994.
- GC Tan, NA Sharifah, S Salwati, MS Shiran, AZ Hattaa, and HO Ng. Immunohistochemical study of p53 expression in premalignant and malignant cervical neoplasms. *Med Health*, 2: 125-32, 2007.
- B Ter Harmsel, F Smedts, J Kuijpers, M Jeunink, B Trimbos, and F Ramaekers. Bcl-2 immunoreactivity increases with severity of CIN: A study of normal cervical epithelia, CIN, and cervical carcinoma. *J Pathol*, 179 (1): 26-30; 1996.
- W Tjalma, E De Cuyper, J Weyler, E van Marck, C De Pooter, G Albertyn, and P van Dam. Expression of bcl-2 in invasive and *in situ* carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol*, 178 (1): 113-17, 1998.
- WA Tjalma, JJ Weyler, JJ Bogers, C Pollefliet, M Baay, GC Goovaerts, JB Vermorken, PA Van Dam, EA Van Marck, and PM Buytaert. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*, 97 (2): 223-30, 2001.
- ML Tornesello, L Buonaguro, P Giorgi-Rossi, and FM Buonaguro. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *BioMed Research International*, Volume 2013: 1-10, 2013.
- P Tranbaloc. Histoire naturelle des lésions précurseurs du cancer du col utérin. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 36 (6): 650-655, 2008.
- Y Tsujimoto. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*, 3 (11): 697-707, 1998.
- Y Tsujimoto and CM Croce. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 (14): 5214-8, 1986.

Références bibliographiques

VJ Tuominen, S Ruotoistenmaki, A Viitanen, M Jumppanen, and J Isola. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res*, 12 (4): 1-12, 2010.

V.

JW Vaandrager, E Schuurin, T Raap, K Philipppo, K Kleiverda, and P Kluin. Interphase FISH detection of BCL-2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes and Cancer*, 27 (1): 85-94, 2000.

MC Vacher-Lavenu, S Arkwright, et A Arnolin. Le point sur le frottis cervico-utérin en milieu liquide. *Revue française de laboratoire*, N° 346: 48-53, 2002.

J Vassallo, SF Derchain, GA Pinto, EZ Martinez, KJ Syrjänen, and LA Andrade. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Obst*, 71 (1): 45-8, 2000.

W.

AE Walts and S Bose. p16, Ki-67, and BD ProEx immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol*, 40: 957-64, 2009.

PM Watt and ID Hickson. Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J*, 303 (Pt 3): 681-95, 1994.

GF Weber. Molecular mechanisms of cancer. *Springer*, (e-book). Dordrecht. 645p, 2007.

TJ Wendorff, BH Schmidt, P Heslop, CA Austin, and JM Berger. The structure of DNA-bound human Topoisomerase II Alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *Journal of Molecular Biology*, 424 (3-4): 109-24, 2012.

N Wentzensen and M von Knebel Doeberitz. Biomarkers in cervical cancer screening. *Disease Markers*, 23 (4): 315-30, 2007.

BA Werness, AJ Levine, and PM Howley. Association of human papillomavirus 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248 (4951): 76-9, 1990.

E Wiebe, L Denny, and G Thomas. FIGO CANCER REPORT, 2012 Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 119 (S2): S100-9, 2012.

V Wootipoom, N Lekhyananda, T Phungrassami, P Boonyaphiphat, and P Thongsuksai. Prognostic significance of Bax, Bcl 2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol*, 94 (3): 636-42, 2004.

Références bibliographiques

X.

Y Xing, C Wang, and J Wu. Expression of geminin, p16, and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasm and normal tissues. *Medicine*, 96 (26): 1-5, 2017.

Y.

QC Yang, Y Zhu, HB Liou, XJ Zhang, Y Shen, and XH Ji. A cocktail of MCM2 and TOP2A, p16^{INK4A} and Ki-67 as biomarkers for the improved diagnosis of cervical intraepithelial lesion. *Pol J Pathol*, 1: 21-7, 2013.

SF Yang, SS Yuan, YT Yeh, SC Hung, MT Wu, JH Su, and CY Chai. Positive association between STAT3 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia. *Kaohsiung J Med Sci*, 22 (11): 539-46, 2006.

MK Yeo, HE Kim, SH Kim, BJ Chae, BJ Song, and A Lee. Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer. *J Clin Pathol*, 70 (8): 715-9, 2017.

LL Yu, W Chen, XQ Lei, Y Qin, ZN Wu, QJ Pan, X Zhang, BF Chang, SK Zhang, HQ Guo, and YL Qiao. Evaluation of 16/Ki-67 dual staining in detection of cervical precancer and cancers: a multicenter study in China. *Oncotarget*, 7 (16): 21181-9, 2016a.

LL Yu, HQ Guo, XQ Lei, Y Qin, ZN Wu, LN Kang, X Zhang, YL Qiao, and W Chen. p16/ Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: a 3-year cohort study in China. *Oncotarget*, 7 (40): 64810-9, 2016b.

Z.

J Zheng. Diagnostic value of MCM2 immunocytochemical staining in cervical lesions and its relationship with HPV infection. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (1): 875-80, 2015.

P Zhong, JF Li, YQ Gu, Y Liu, AC Wang, YF Sun, and LJ Lu. p16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (3): 2979-86, 2015.

M Zitouni. Plan National Cancer 2015-2019, Nouvelle vision stratégique centrée sur le malade. Pp61, 2014.

Y Zouheir, T Fechtali, and N Elgnaoui. Human papillomavirus genotyping and p16^{INK4a} expression in cervical lesions: a combined test to avoid cervical cancer progression. *Journal of cancer prevention*, 21 (2): 121-5, 2016.

H zur Hausen. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature*, 2 (5): 342-50, 2002.

Références bibliographiques

Sites.

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/gyneco/gyneco.pdf>

<http://www.umvf.univ-nantes.fr/gynecologie-et-obstetrique>

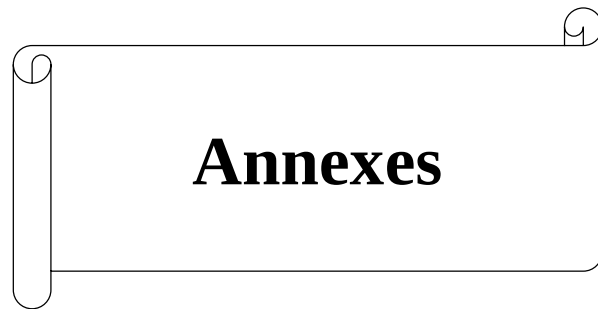
http://screening.iarc.fr/atlashisto_list.php?cat=B2&lang=2

<http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/cancers-feminins/cancer-du-col-de-l-uterus/maladie/les-tumeurs-malignes.html>

<http://www.sinobiological.com/immunohistochemical-ihc-protocol.html>

<http://www.proteinatlas.org>

<http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>



Annexes

Annexe I : Cellules malpighiennes anormales (Société canadienne du cancer, 2017c).

Lésion malpighienne intra-épithéliale (SIL)	Néoplasie intra-épithéliale cervicale (CIN)	Dysplasie cervicale	Description
SIL de bas grade (LSIL)	CIN1	Légère	- On observe des changements précoces dans les cellules, donc leur apparence diffère un peu de celle des cellules normales. - On considère que les cellules sont légèrement anormales.
SIL de haut grade (HSIL)	CIN2 CIN3	Modérée Sévère	- On observe des changements marqués de la taille et de la forme des cellules, alors leur apparence diffère de celle des cellules normales. - On considère que les cellules sont anormales. - Les changements subis par les cellules engendrent une hausse du risque d'évolution en cancer ou peuvent signifier qu'il y a un cancer sous-jacent. - La CIN3 comprend aussi le carcinome <i>in situ</i> (cancer de stade très précoce dont les cellules n'ont pas encore envahi les tissus voisins).

Annexe II : Classification histogénétique des tumeurs malignes du col utérin : OMS 2014 (<http://screening.iarc.fr>).

- Carcinome malpighien
- Carcinome verruqueux
- Carcinome condylomateux
- Carcinome malpighien *in situ* papillaire
- Carcinome de type lympho-épithélial
- Adénocarcinome mucineux
- Adénocarcinome à déviation minime
- Adénocarcinome villoglandulaire
- Adénocarcinome endométrioïde
- Adénocarcinome à cellules claires
- Adénocarcinome papillaire séreux
- Adénocarcinome mésonéphrotique
- Carcinome à cellules vitreuses
- Carcinome adénosquameux
- Carcinome adénoïde basal
- Carcinome adénoïde kystique
- Carcinome à petites cellules

Annexes

Annexe III : Classification TNM et FIGO 2009 (<http://screening.iarc.fr>).

T1 / p T1	Limité à l'utérus a : carcinome micro-invasif a1 : invasion en profondeur < 3 mm et en surface < 7 mm a2 : invasion en profondeur > 3 mm et < 5 mm et en surface < 7 mm b : supérieur à T1a2 b1 : < 4 cm b2 : > 4 cm La présence d'embolies vasculaires ne change pas la classification
T2 / p T2	Extension extra-utérine a- vagin (2/3 supérieurs) b- 1 ou 2 paramètres c- a et b
T3 / p T3	Extension à la paroi pelvienne et / ou au 1/3 inférieur du vagin a- vagin (1/3 inférieur) b- 1 ou 2 paramètres, avec fixation à la paroi pelvienne + / - hydronéphrose c- a et b
T4 / p T4	Envahissement de : a- vessie b- rectum c- a et b d- extension extra pelvienne
N1 / p N1	Adénopathie régionale Hypogastrique, iliaque, para cervicale, paramétriale

Annexes

TNM	FIGO	Description
Tx		Tumeur primitive non évaluable
T0		Pas de lésion du col
Tis	Stade 0	Cancer <i>in situ</i>
T1	Stade I	Tumeur limitée au col de l'utérus
T1a	Ia	Tumeur non visible diagnostiquée par histologie
T1a1	• Ia1	Invasion du stroma minime
T1a2	• Ia2	Invasion < 5 mm de profondeur ou 7 mm de largeur
T1b	Ib	Tumeur visible
T1b1	• 1b1	Lésion clinique inférieure ou égale à 4 cm
T1b2	• 1b2	Lésion clinique supérieure à 4 cm
T2	Stade II	Tumeur dépassant le col
T2a	Ila	Atteinte du vagin ne dépassant pas le 1/3 inférieur
T2b	IIf	Atteinte du paramètre mais non la paroi pelvienne
T3	Stade III	Tumeur atteignant le pelvis, le 1/3 inférieur du vagin ou entraînant une hydronéphrose
T3a	IIIa	Extension au 1/3 inférieur du vagin
T3b	IIIb	

Annexes

		Atteinte du paramètre jusqu'à la paroi ou hydronéphrose
T4	Stade Iva	Envahissement vessie, rectum ou au-delà du pelvis
M1	Stade IVb	Métastase à distance

Annexe IVa : SYSTEME BETHESDA, version 2001 (<http://screening.iarc.fr>).

Type du prélèvement (conventionnel, phase liquide, ou autre)

Qualité du prélèvement :

- Satisfaisant pour l'évaluation (indiquer la présence ou l'absence de cellules endocervicales, de cellules de la zone de jonction et signaler tout autre indicateur de qualité, par exemple : masquage partiel par du sang, une inflammation, etc.)
- Non satisfaisant pour l'évaluation.
- Document rejeté et non lu.
- Document lu et interprété mais non satisfaisant pour l'interprétation des anomalies épithéliales.

Catégorie globale (optionnel) :

- Négatif pour une lésion intraépithéliale ou maligne.
- Autre (concerne exclusivement « la présence de cellules endométriales chez une femme de 40 ans ou plus »).
- Anomalies des cellules épithéliales : voir le chapitre interprétation / Résultats (préciser les termes de malpighien ou glandulaire).

Interprétation –résultats

1) Négatif pour une lésion intra épithéliale ou maligne (quand il n'y a pas de signes cytologiques évidents de néoplasie, le mentionner dans le chapitre. Catégorie globale ci-dessus et/ou dans le chapitre. Interprétation /résultats qu'il y ait ou non des micro-organismes ou d'autres éléments non néoplasiques.

Micro-organismes :

- *Trichomonas vaginalis*.
- Eléments mycéliens dont la morphologie est compatible avec *Candida* spp.
- Modifications de la flore suggérant une vaginose bactérienne.
- Bactéries dont la morphologie est compatible avec *Actinomyces* spp.
- Modifications cellulaires compatibles avec le virus Herpès simplex.

Autres éléments non néoplasiques :

- Modifications cellulaires réactionnelles associées à :

Annexes

- Inflammation (comprenant la réparation simple).
- Radiation.
- Dispositif contraceptif intra-utérin.
- Cellules glandulaires après hystérectomie totale.
- Atrophie.

2) Autres : Cellules endométriales chez une femme de ≥ 40 ans (préciser si « négatif pour une lésion intra épithéliale ou maligne »).

3) Anomalies des cellules épithéliales :

Des cellules malpighiennes :

- Cellules malpighiennes atypiques :

- De signification indéterminée (ASC-US).
- Sans pouvoir exclure une LMIEHG (ASC-H).
- Lésion malpighienne intra épithéliale de bas grade (LMIEBG) (LSIL).
- Incluant HPV/ dysplasie légère /CIN1.
- Lésion malpighienne intra épithéliale de haut grade (LMIEHG) (HSIL).

• Incluant dysplasie modérée et sévère, CIN2 et CIN3, CIS.

• Avec des éléments faisant suspecter une invasion.

- Carcinome épidermoïde

Des cellules glandulaires :

- Atypiques :

- Cellules endocervicales sans autre spécificité.
- Cellules endométriales sans autre spécificité.
- Cellules glandulaires sans autre spécificité.
- Atypiques en faveur d'une néoplasie :

• Cellules endocervicales en faveur d'une néoplasie.

• Cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie.

- Adénocarcinome endocervical *in situ*.

- Adénocarcinome :

- Endocervical
- Endométrial
- Extra-utérin
- sans autre spécificité

4) Autres néoplasies malignes (préciser)

Tests complémentaires : (si oui, indiquer les résultats)

Contrôle par une technique de lecture automatisée (si oui, indiquer laquelle et ses résultats)

Notes informatives et suggestions (optionnel).

Annexe IVb : SYSTEME BETHESDA, version 2014 (Bouhade *et al.*, 2016)

Type du prélèvement (conventionnel, phase liquide, ou autre)

Qualité du prélèvement :

- Satisfaisant pour l'évaluation (indiquer la présence ou l'absence de cellules endocervicales, de cellules de la zone de jonction et signaler tout autre indicateur de qualité, par exemple : masquage partiel par du sang, une inflammation, etc.)
- Non satisfaisant pour l'évaluation.
 - Document rejeté et non lu.
 - Document lu et interprété mais non satisfaisant pour l'interprétation des anomalies épithéliales.

Catégorie globale (optionnel) :

- Négatif pour une lésion intraépithéliale ou maligne.
- Autre (concerne exclusivement « la présence de cellules endométriales chez une femme de 40 ans ou plus »).
- Anomalies des cellules épithéliales : voir le chapitre interprétation / Résultats (préciser les termes de malpighien ou glandulaire).

Interprétation –résultats

1) Négatif pour une lésion intra épithéliale ou maligne (quand il n'y a pas de signes cytologiques évidents de néoplasie, le mentionner dans le chapitre. Catégorie globale ci-dessus et/ou dans le chapitre. Interprétation /résultats qu'il y ait ou non des micro-organismes ou d'autres éléments non néoplasiques.

Aspects (éléments) non néoplasiques

- Modifications cellulaires non néoplasiques :
 - Metaplasie malpighienne
 - Modifications keratosiques
 - Metaplasie tubaire
 - Atrophie
 - Modifications associées à la grossesse
- Modifications cellulaires réactionnelles associées à :
 - Inflammation (comprenant la réparation)
- Cervicite folliculaire
 - Radiation.
 - Dispositif contraceptif intra-utérin.
- Cellules glandulaires après hystérectomie totale.

Organismes (Micro- organismes)

- Trichomonas vaginalis.
- Eléments mycéliens dont la morphologie est compatible avec le « Candida » spp.
- Modification de la flore suggérant une vaginose bactérienne.
- Bactéries dont l'aspect évoque une Actinomyces spp.
- Modifications cellulaires compatibles avec le virus Herpès simplex.
- Modifications cellulaires compatibles avec le cytomégalovirus.

2) Autres : Cellules endométriale chez une femme de ≥ 45 ans (préciser si « négatif pour une lésion intra épithéliale ou maligne).

3) Anomalies des cellules épithéliales :

Cellules malpighiennes :

- Cellules malpighiennes atypiques :
 - De signification indéterminée (ASC-US).
 - Sans pouvoir exclure une LMIEHG (ASC-H).
- Lésion malpighienne intra épithéliale de bas grade (LMIEBG) (LSIL).
- Incluant HPV/ dysplasie légère /CIN1.
- Lésion malpighienne intra épithéliale de haut grade (LMIEHG) (HSIL).
- Incluant dysplasie modérée et sévère, CIN2 et CIN3, CIS.
- Avec des éléments faisant suspecter une invasion.
- Carcinome épidermoïde.

Cellules glandulaires :

- Atypiques
 - Cellules endocervicales sans autre spécificité
 - Cellules endométriales sans autre spécificité
 - Cellules glandulaires sans autre spécificité
- Atypiques
 - Cellules endocervicales en faveur d'une néoplasie
 - Cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie
- Adénocarcinome endocervical *in situ*
- Adénocarcinome :
 - Endocervical
 - Endométrial
 - Extra-utérin
 - Autres sans autre spécificité

4) Autres néoplasies malignes.

Tests complémentaires : (si oui, indiquer les résultats).

Contrôle par une technique de lecture automatisée (si oui, indiquer laquelle et ses résultats).

Notes informatives et suggestions (optionnel).

Annexes

Annexe V : Les effets des complexes CDK/cycline (Lebart *et al.*, 2004).

Moment du cycle	Complexe CDK/ Cycline	Effets du complexe
G1	CDK4/ Cycline D et CDK6/ Cycline D	Phosphorylent et inactivent la protéine Rb, ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/ S et pour la progression de S (synthèse des cyclines E et A, entre autres.
G1/S	CDK2/ Cycline E	Responsable de la transition G1/ S. Phosphoryle la protéine Rb. Induit la duplication du centrosome dans certains cas.
S	CDK2/ Cycline A	Phosphoryle des substrats qui déclenchent et entretiennent la réplication de l'ADN et l'inactivation de facteurs de transcription de la phase G1. Induit la duplication du centrosome chez les mammifères.
G2/M	CDK1/ Cycline B	Dirige la transition G2/ M par phosphorylation de nombreux substrats et conduit la progression de la mitose.

Annexes

Annexe VI : Répartition des frottis selon leur qualité.

Année	FA / %	Bonne qualité	Insatisfaisant	Total
2013	FA	2 035	124	2 159
	%	94,3	5,7	100
2014	FA	3 386	90	3 476
	%	97,4	2,6	100
2015	FA	4 216	142	4 358
	%	96,7	3,3	100
2016	FA	3 479	147	3 626
	%	95,9	4,1	100
2017	FA	2 706	136	2 842
	%	95,2	4,8	100
Total	FA	15 822	639	16 461
	%	96,1	3,9	100

Annexe VII : Résultats des FCU réalisés en 2013-2017 à Sétif.

Résultats	FA	%
Frottis normaux	6 923	42,1
Changements réactionnels bénins	7 876	47,8
Anomalies cellulaires	574	3,5
Autres	449	2,7
Ininterprétables	639	3,9
Total	16 461	100

Annexes

Annexe VIII : Répartition des résultats des FCU en fonction des changements réactionnels bénins et des anomalies cellulaires.

Résultats	FA	%
Changements réactionnels bénins		
Inflammatoire	6 667	84,6
Autres	1 209	15,4
Total	7 876	100
Résultats	FA	%
Anomalies cellulaires		
ASC-US	131	12,8
ASC-H	26	2,5
AGC	162	15,8
Bas-grade	209	20,4
Haut-grade	45	4,4
AIS	1	0,1
CÉ	0	0,0
ADC	0	0,0
Autres	449	43,9
Total	1 023	100

Annexes

Annexe IX : Recommandations de laboratoires.

Année	FA / %	FCU 6 mois	FCU 1 an	FCU 3 ans	FCU post-traitement	Refaire meilleurs délais	Test HPV	Colpo/ Biopsie	Autres	Total
2013	FA	486	587	306	555	48	7	43	3	2 035
	%	23,9	28,8	15,0	27,3	2,3	0,3	2,1	0,1	100
2014	FA	872	1 272	579	182	120	74	193	94	3 386
	%	25,7	37,6	17,1	5,4	3,5	2,2	5,7	2,8	100
2015	FA	759	1 361	541	1 226	212	20	69	28	4 216
	%	18	32,3	12,8	29,1	5,0	0,5	1,6	0,7	100
2016	FA	776	1 300	755	462	86	4	26	70	3 479
	%	22,3	37,4	21,7	13,3	2,5	0,1	0,7	2	100
2017	FA	838	1 254	293	156	14	77	25	49	2 706
	%	31	46,3	10,8	5,8	0,5	2,8	0,9	1,8	100
Total	FA	3 731	5 774	2 474	2 581	480	182	356	244	15 822
	%	23,6	36,5	15,6	16,3	3	1,2	2,3	1,5	100

ينتقل داء سرطان عنق الرحم عن طريق العلاقات الجنسية، يسببه أساسا الفيروس الحليمي البشري (HPV) بالإضافة إلى عوامل أخرى ضرورية لظهور هذا النوع من السرطان. يعتمد الكشف المبكر عن المراحل ما قبل سرطانية بشكل أساسي على اختبار مسحة عنق الرحم والذي يبقى الخيار الأفضل لمكافحة هذا المرض، لكنه يفتقد للنوعية. لهذا الغرض، بُذلت العديد من الجهود لتطوير مؤشرات حيوية جديدة في مجال كشف وتشخيص سرطان عنق الرحم. تم في هذه الدراسة إحصاء 16461 مسحة عنق رحم أجريت خلال الفترة الممتدة من 2013 إلى غاية 2017، على مستوى ولاية سطيف. أكثر من 90٪ من المسحات كانت ذات نوعية جيدة. شكلت فئة النساء اللاتي تتراوح أعمارهن بين 40 و45 سنة الفئة الأكثر فحصا. لتحديد مؤشرات هذا السرطان مخبريا، استخدمنا اختبارات تعتمد على التقنية المناعية-النسجية-الكيميائية، من خلالها قيمنا معدل التعبير عن البروتينات Bcl-2 و p53 في سرطان الخلايا الظهارية وسرطان الغدد لعنق الرحم. تبين من خلال النتائج أن حوالي 61,04٪ من الحالات لديها تعبير إيجابي عن البروتين Bcl-2، بينما 24,68٪ فقط من هذه الحالات المدروسة لديها تعبير إيجابي عن البروتين p53 في سرطان الخلايا الظهارية. أما فيما يخص سرطان الغدد فكان التعبير الإيجابي عن كل من Bcl-2 و p53 ضعيفا. التعبير عن هذين البروتينين في سرطان الخلايا الظهارية ليس لديه أي ارتباط معنوي ($p < 0.05$). كما قيمنا أيضا معدل التعبير عن البروتينات p16 ؛ Ki-67 ؛ MCM2 و TOP2A في مراحل مختلفة من سرطان عنق الرحم. كما تم تحديد أنواع الفيروس الحليمي البشري المنتشرة في منطقتنا. أظهرت النتائج أن المعدل الإيجابي للتعبير عن البروتينات p16 ؛ Ki-67 و MCM2 كان عاليا في المراحل المتقدمة من سرطان عنق الرحم. كما أن هذا التعبير لديه ارتباط معنوي بعدوى الفيروس الحليمي البشري عالي الخطورة ($p > 0.05$). كخلاصة، النتائج المُتحصل عليها من خلال هذه الدراسة تُبين أن البروتين Bcl-2 يُمكن أن يشكل مؤشرا حيويًا للكشف عن سرطان الخلايا الظهارية و أن البروتينات p16 ؛ Ki-67 ؛ MCM2 يُمكن أن تشكل مؤشرات حيوية للكشف عن المراحل المتقدمة من سرطان عنق الرحم.

الكلمات المفتاحية: سرطان عنق الرحم، كشف المبكر، مسحة عنق الرحم، مؤشر حيوي، التقنية المناعية-النسجية-الكيميائية، الفيروس الحليمي البشري.

Résumé

Le cancer du col de l'utérus est causé principalement par une infection sexuellement transmissible dont l'origine est le papillomavirus humain (HPV) mais d'autres facteurs sont nécessaires à l'apparition de ce type du cancer. Le dépistage précoce des lésions précancéreuses repose principalement sur le frottis cervico-utérin (FCU) qui reste la meilleure option pour lutter contre cette maladie, mais ce test manque de sensibilité. À cet effet, beaucoup d'efforts ont été déployés pour déterminer de nouveaux biomarqueurs dans le domaine de détection et du diagnostic du cancer du col de l'utérus. Dans la présente étude, et durant la période 2013-2017, un nombre de 16461 FCU a été réalisé au niveau de la wilaya de Sétif. Plus de 90% des frottis étaient de bonne qualité. Les femmes âgées entre 40-45 ans étaient les plus dépistées. Des tests d'immunohistochimie ont été utilisés au laboratoire afin de détecter des marqueurs de ce cancer. Les taux d'expression des protéines Bcl-2 et p53 dans le carcinome épidermoïde (CÉ) et l'adénocarcinome (ADC) du col de l'utérus ont été évalués. Les résultats montrent que environ 61,04% des cas ont montré une expression positive de Bcl-2, alors que seulement 24,68% des cas ont montré une expression positive de p53 dans le CÉ. L'expression positive de Bcl-2 et p53 était faible dans les ADC. L'expression de ces deux protéines n'a pas été significative dans les cas du CÉ ($p > 0.05$). De même, le taux d'expression des protéines p16 ؛ Ki-67 ؛ MCM2 et TOP2A dans des différents stades du cancer du col de l'utérus a aussi été évalué. D'autre part, le test HPV a été utilisé pour identifier les types d'HPV circulants dans notre région. Les résultats montrent que le taux positif de l'expression des protéines p16 ؛ Ki-67 et MCM2 est élevé dans les stades avancés. Cette expression a une corrélation avec l'infection par les virus HPV à haut risque ($p < 0.05$). En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la protéine Bcl-2 pourrait être considérée comme un biomarqueur de détection pour les CÉ et que les protéines p16 ؛ Ki-67 et MCM2 pourraient être considérées comme des biomarqueurs de détection des stades avancés du cancer du col de l'utérus.

Mots clés : Cancer du col de l'utérus, Dépistage précoce, Frottis Cervico-Utérin, Biomarqueur, Immunohistochimie, Papillomavirus humain.

Abstract

Cervical cancer is caused mainly by a sexual transmitted infection whose origin is human papillomavirus (HPV) but other factors are necessary for the appearance of this kind of cancer. Early screening of precancerous lesions remains the best option for fighting against this disease. This screening relies primarily on Pap smear test, but it has a weak sensitivity. For this purpose, much efforts have been expended to develop new biomarkers in the field of detection and diagnosis of cervical cancer. In this present study, during the 2013-2017 period, 16461 cervical smears were performed in the wilaya of Sétif. More than 90% of smears are of a good quality. Women aged between 40-45 years are the most screened. In the laboratory, we have used tests based on immunohistochemistry to detect biomarkers of this cancer. We have evaluated Bcl-2 and p53 expression levels in squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (ADC) of the cervix. The results show that about 61,04% of cases were Bcl-2 positive expressed, while only 24,68% of these cases had p53 positive expression in SCC. The Bcl-2 and p53 expression was weak in ADC. The expression of these two proteins was not significant ($p > 0.05$) in SCC. The expression level of p16 ؛ Ki-67 ؛ MCM2 and TOP2A proteins was also evaluated at different stages of cervical cancer. We also looked for types of HPV circulating in our region. The results show that the positive expression of p16 ؛ Ki-67 and MCM2 is high in the advanced stages of cervical cancer. This expression is correlated with HPV-HR infection ($p < 0.05$). As conclusion, the results obtained in this study show that the Bcl-2 protein may be considered as a detection biomarker for the SCC and that p16 ؛ Ki-67 and MCM2 proteins may be considered as biomarkers for the detection of advanced stages of cervical cancer.

Keywords: Cancer of the uterine cervix, Screening, Pap smear test, Biomarker, Immunohistochemistry, Human papillomavirus.

Immunohistochemical Expression of p53 and Bcl-2 in Algerian Cervical Carcinoma

DEFFAR KHALISSA^{1*}, KHENCHOUCHE ABDELHALIM²,
XING XIE³, YING LI³, OUHIDA SORAYA⁴ and MAHNANE ABBES⁵

¹Department of Biochemistry, School of Nature and Life Sciences,
Ferhat Abbas University Sétif-1-, Sétif, Algeria.

²Department of Microbiology, School of Nature and Life Sciences,
Ferhat Abbas University Sétif-1-, Sétif, Algeria.

³Women's Hospital, School of Medicine, Department of Gynecologic Oncology,
Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang Province, China.

⁴Department of Pathological Anatomy, University Hospital Center, Sétif, Algeria.

⁵Department of Medicine, Ferhat Abbas University Sétif-1-, Sétif, Algeria.

*Corresponding author E-mail: khalissa_deffar@yahoo.com

<http://dx.doi.org/10.13005/bpj/1348>

(Received: November 19, 2017; accepted: January 30, 2018)

ABSTRACT

The Objective of the present study is to evaluate the expression levels of Bcl-2 and p53 proteins in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix, and try to explain their role as prognostic markers for this cancer. The cohort comprised 90 cases of the cervix lesions. The samples were assessed by immunohistochemistry for the expression of Bcl-2 and p53 proteins. The results showed that the Bcl-2 expression was either absent, low or moderate respectively in 38.96%; 50.65% and 10.39% of SCC cases. However, it was absent or expressed in 76.92% and 23.08% of adenocarcinoma cases respectively. The p53 protein was absent or present respectively in 75.32% and 24.68% of SCC cases as demonstrated by immunohistochemistry. p53 was almost absent in adenocarcinoma samples where only 7.70% of cases were positive. There was no significant correlation between Bcl-2 and p53 expression ($p=0.352$). We conclude that p53 expression, detected by immunohistochemistry, does not appear to be a prognostic marker for cervical cancer. Nevertheless, Bcl-2 expression seems to provide more information for this disease. It may represent an important indicator for cervical cancer.

Keywords: Cervix cancer, Bcl-2, p53, Squamous cell carcinoma, Adenocarcinoma, Prognosis.

INTRODUCTION

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women worldwide with an estimated one-half million of new cases in 2012. A large majority of the global burden occurs in developing countries. There were an estimated 266.000 deaths

from this cancer worldwide in the same year. In Algeria, cervical cancer is the third most common cancer in women, with an incidence of 1,288 cases and 510 deaths estimated in 2012¹. The uterine cervix carcinoma includes both slowly and rapidly progressing tumours. The alteration in apoptosis disturbance, in immune surveillance, uncontrolled



This is an Open Access article licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), which permits unrestricted Non Commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

proliferation caused by increased of cell growth and/or loss of growth suppression are the characteristics of cervical cancer progression².

Almost all cervical cancers are caused by the infection with high-risk human papillomaviruses (HR-HPV). In this case, the viral DNA integration mainly occurs into the human chromosomal DNA. The tumour suppressor genes are deactivated by viral oncoproteins, or the proto-oncogenes are activated to oncogenes. This emphasizes the rates of cell proliferation and leading to cervical intraepithelial neoplasia (CIN)³. Authors insist that the persistence of infection by HR-HPV is the best predictor of increased risk of cervical cancer but others consider that the over-expression of several other markers of cell proliferation and apoptosis such as p53, Bcl-2, p16, Ki-67 are also important^{4,5}.

The Bcl-2 gene family seems to act as a regulatory of the apoptotic pathway. In this family, Bcl-2 and Bax are most important apoptosis regulating proteins. Bcl-2 is a member of the anti-apoptotic sub-family and Bax is a member of the pro-apoptotic sub-family⁶. Originally, the Bcl-2 gene was detected in B-cell lymphomas bearing a chromosomal translocation t(14, 18)⁷. The Bcl-2 protein is localized at the mitochondrial outer membrane, in the nuclear envelope, plasma membrane and endoplasmic reticulum^{8,9}. The over-expression of Bcl-2 protein looks like to be associated with the blocking of apoptosis¹⁰. The expression of Bcl-2 and the formation of hetero and homo dimers between members of the Bcl-2 family are important for the ability of Bcl-2 to inhibit programmed cell death¹¹. Liang et al. claimed, by in vitro experiments, that increased Bcl-2 expression under conditions of p53 inactivation might provide cervical carcinomas cells with a selective growth advantages. This finding could imply that Bcl-2 expression may play an important role in the genesis and progression of cervical cancer¹².

The p53 protein has 53 kDa in its molecular weight, it is encoded by p53 gene located on chromosome 17 that is involved in many cellular processes such as cell cycle control, DNA repair, initiation of apoptosis and control of cell differentiation^{13,14}. The p53 is a transcriptional

regulator, with a short half life time of several minutes; it both activates and represses several genes^{13,15,16,17,18,19}. The rise in p53 protein level lead to changes in expression of p53 responsive genes in response to cellular stress, particularly DNA damage, which allow a subsequent cell cycle arrest and/or cell death. Growth arrest or apoptosis prevents damaged DNA from being replicated and suggests a role of p53 in preserving the integrity of the genome. In some cells and in addition of these role, p53 can induce apoptosis and can down-regulate Bcl-2^{13,20}.

On the other hand, the inactivation of p53 in certain cancers is usually the result of a point mutation in exons 5-8 leading to an amino acid change in the p53 protein which will lose the ability to turn off the cell cycle and show a great genomic instability^{21,22}. Not all human cancers associated with p53 protein have a high frequency of point mutations²³. The mutated gene product of this mutation can be detected by immunohistochemistry, which demonstrated a longer half-life than the wild type protein and increased genetic instability²⁴. The mutations are rare in cervical cancers which are associated mainly with HPV infection^{25,26}. Molecular biology data on the natural history of this infection and cervical cancer suggest that viral infections interfere with the mechanism of cellular growth, DNA repair and immunologic responses. Inactivation of p53 protein by E6 oncoprotein of HPV has been proven²⁷. The contradictory reports make the association between Bcl-2 and p53 expression of cervical cancer not well-understood^{5,28,29}.

The purpose of this study is to evaluate the expression of p53 and Bcl-2 in Algerian cervical carcinoma samples in an attempt to explain their prognosis value using the immunohistochemistry detection.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples

Ninety cases of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the uterine cervix were used in this cohort. All the samples were collected from the pathology laboratory of Sétif's Hospital. The patient's mean age of diagnosis was 51 years

(SD $\pm$ 10.18). All these samples were HPV 16 and/or 18 positive. The nature of specimens was cervical biopsies embedded in formalin paraffin.

Immunohistochemistry

Paraffin blocks of these patients were retrieved and three sections of 3-5 μ m thickness were taken on Poly L lysine coated slides. The first group of slides were stained with routine Hematoxylin and Eosin coloration. The two other groups of slides were stained by the use of monoclonal mouse anti-human Bcl-2 oncoprotein (clone 124 ; code M0887 antibody, Dako) and monoclonal mouse anti-human p53 protein (clone DO-7; code M7001, Dako) antibodies. These antibodies were used separately. The Bcl-2 and p53 immunohistochemistry was carried out on sections tissues using Dako REALTMENVisionTMDetection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse. This system offers the Dako REALTM DAB+ Chromogen to visualize the reaction. The monoclonal mouse anti human Bcl-2 oncoprotein and monoclonal mouse anti-human p53 protein were used at the dilution of 1:50 when applied on paraffin-embedded sections of cervical cancer.

Bcl-2 staining gave brown cytoplasmic reactivity. A case was taken as positive if more than 10% cells show cytoplasmic reactivity³⁰. The staining of p53 gave brown nuclear reactivity. A case was considered positive if more than 5% nuclei were stained³¹.

Statistical analysis

The SPSS 20 and Excel 2013 software have been used for the statistical analyses. Correlation between variables (the percentage of both Bcl-2 expression and p53 expression) was determined by Pearson's coefficient, p value of 0.05 or less was considered statistically significant. The bivariate regression analysis was performed on the percentage of both Bcl-2 expression and p53 expression. The crude and adjusted odds ratios (ORs [95% CI]) for the negative and positive Bcl-2 and p53 expression were also reported.

RESULTS

Immunohistochemical analysis of protein expression

The immunostaining evaluation of all slides

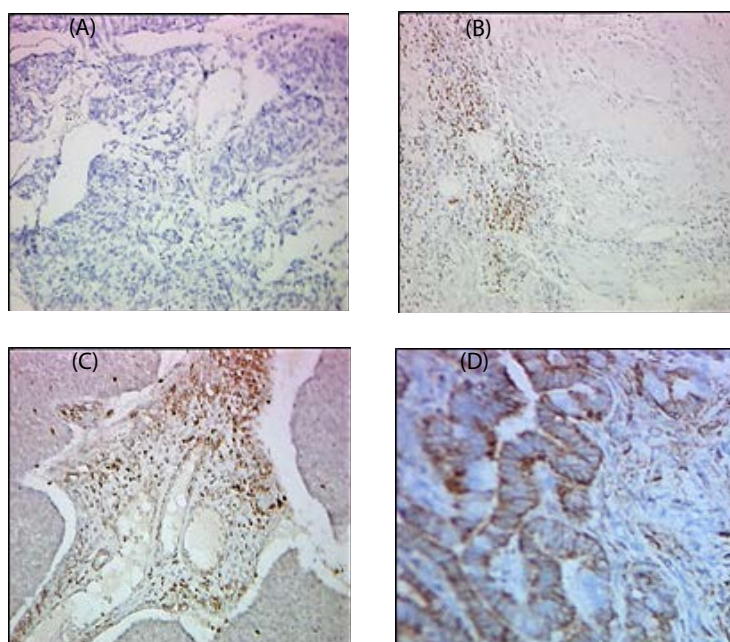


Fig. 1: A. Negative expression (< 5%) of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix (x200). B. Weak expression (5-50%) of Bcl-2 in squamous cell carcinoma (x200). C. Moderate expression (> 50%) of Bcl-2 in squamous cell carcinoma (x200). D. Moderate expression (> 50%) of Bcl-2 adenocarcinoma (x400)

was done. A Bcl-2 staining was semi quantified as negative (< 5% positive cells), weak (5 to 50% positive cells), moderate (50 to 90% positive cells) or strong (> 90% positive cells)³². The p53 staining was scored in two categories < 5% and $\geq$ 5% of the cells being p53 positive². The Bcl-2 expression was always diffusely localized in the cytoplasm of the cells and was present in 47 of squamous cell carcinoma (61.04%). However, within the same tumour, the expression of Bcl-2 was heterogeneous and it could sometimes vary from strongly positive to negative (Figure 1). The immunoreactivity of p53 was nuclear in the neoplastic cells and was present in 19 cases of squamous cell carcinoma (24.68%). Sometimes cytoplasmic staining of p53 was seemed in dispersion. The analyses are based on the results of nuclear staining only (Figure 2). The photomicroscopy of the slides were taken in different magnifications (x50 ; x100 ; x200 and x400) using an optic microscope connected with a digital camera

(Leica, Germany). The results of Bcl-2 and p53 staining are resumed in table 1 and table 2.

The Bcl-2 is more expressed in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma of the uterine cervix (ORs= 5.55, 95% CI). The correlation between p53 and Bcl-2 expression, determined in the 77 cases of the squamous cell carcinoma, was poor for p value of 0.352. That shows the independence of two proteins expression (Figure 3).

DISCUSSION

In our work, in all cases of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of uterine cervix, Bcl-2 protein was more demonstrated than p53 protein. This could be due to p53 degradation by ubiquitination E6-HPV mediated. We demonstrated negative and positive expression of p53 protein

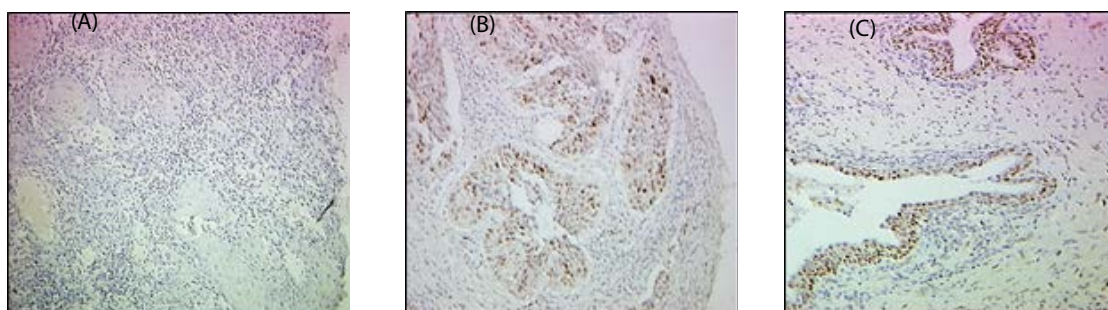


Fig. 2: A. Negative expression (< 5%) of p53 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix (x200). B. Positive expression ($\geq$ 5%) of p53 in squamous cell carcinoma (x200). C. Positive expression ($\geq$ 5%) of p53 adenocarcinoma (x400)

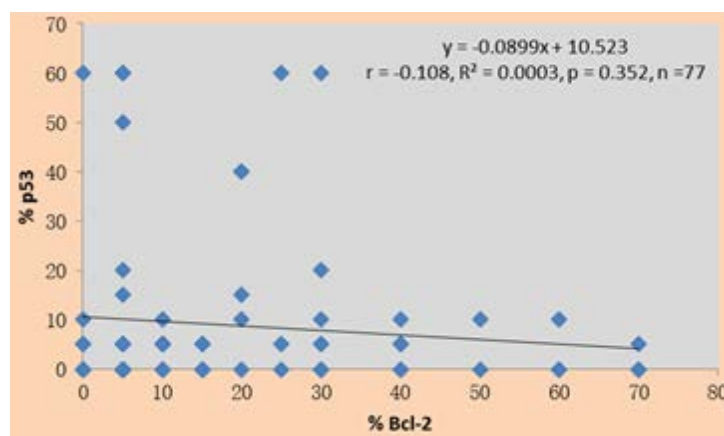


Fig. 3: Correlation between p53 and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix

Table 1: Staining results of Bcl-2 protein

	< 5%, n (%)	5-50%, n (%)	> 50%, n (%)	Total, N
Squamous cell carcinoma	30 (38.96)	39 (50.65)	8 (10.39)	77
Adenocarcinoma	10 (76.92)	3 (23.08)	0 (0)	13
				90

Table 2: Staining results of p53 protein

	< 5%, n (%)	≥ 5%, n (%)	Total, N
Squamous cell carcinoma	58 (75.32)	19 (24.68)	77
Adenocarcinoma	12 (92.30)	1 (7.70)	13
			90

(n: number of cases)

by immunohistochemistry in 75.32 (58/77) and 24.68% (19/77) of SCC cases respectively. For the adenocarcinoma samples, almost cases showed negative expression (92.30%, 12/13) only 7.70% (1/13) of cases were positive. The tumours studied showed an occasional focus of p53 immunoreactive cells where cells exhibited less than 5% of p53 positivity, by the use of an antibody which detects not only mutated but also wild type p53 protein. In cervical cancer, the p53 immunohistochemistry results have been somewhat confusing. The half-life time of wild type p53 protein is very short, and it cannot be detected by immunohistochemistry^{33,34}. Moreover, this technique is considered not sufficiently sensitive as compared with DNA detection. However, over-expression or mutated p53 protein have a long half-life and can be recognized by immunohistochemistry. Mutated p53 protein complexed with other proteins, such as heat shock protein may not be completely degraded by the proteases system involving the gene E6 products of HPV and can be detected by immunohistochemistry^{35,36}.

Several studies have evaluated p53 expression in cervical cancer. Some of whom also included cases under follow-up for genital HPV infection^{5,28,37}. Many studies have showed difference rates of p53 expression. High positivity rates ranging between 60% and 80% were found

by many authors^{38,39}. Other work showed the carcinomas cervix exhibited 50% of p53 positivity⁴⁰. However many authors have found lower positivity rates ranging between 10 and 50%^{41,42,43} which we have also found in our study but only in few cases of cervical cancer. A study done by Dimitrakakis et al. (2000), to assess the expression and clinical significance of Bcl-2 and p53 in the progression of cervical cancer, showed that despite the expression of p53 was higher in invasive SCC than in adenocarcinomas but there was no significant correlation between the expression of p53 and the histological type of cervical carcinoma²⁹.

The different percentage of p53 expression observed in literature could be explained by the difference in the used protocols, the type of antibody used that recognizes wild type and mutant p53, and different scoring cut-off of the protein expression. Normal cervical epithelium adjacent to tumour did not stain p53 protein, which confirms reports by Cattoretti et al. and Caamano et al. that the state level of normal p53 protein is too low to be detected by immunohistochemistry^{33,44}.

The deregulation of p53 function, in cervical cancer, through direct neutralization of the protein by E6 produced by HPV types 16 and 18, has been proven^{45,46}. Elimination of p53 protein by E6 is an

important step in tumorigenesis of HPV-associated cervical cancer⁴⁷.

Over-expression of p53 protein would not be found to occur in HPV 16-18 associated tumours where E6 binds and degrades the p53 protein. The p53 mutation could only play a role in the tumorigenesis of HPV 16-18 negative cervical cancer. Some studies showed that p53 protein accumulation may be an early event in carcinogenesis, while for others, p53 over-expression or mutation did not seem to play a significant role in cervical tumorigenesis^{48,49,50}. A study of Chen et al. suggested that expression of p53 might be indicative of an unfavourable prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix⁴¹.

In this study, we found a negative, low and moderate expression of Bcl-2 protein in 38.96% (30/77), 50.65% (39/77) and 10.39 (8/77) of SCC cases respectively, and negative or low expression in respectively 76.92% (10/13) and 23.08 (3/13) of adenocarcinoma cases. Several studies evaluated the Bcl-2 expression in cervical cancer. Almost of these studies found the increased expression in the advanced stages of cervical cancer^{40,51,52} contrary to that observed by Tjalma et al³².

During the last years, the significance of the apoptotic pathway in the development and progression of human malignant tumours has become an important subject of discussion. Bcl-2 is one of the proteins that have a regulating role in the programmed cell death. Bcl-2 prevents cells from apoptosis and it is a strong independent prognostic parameter³². It is commonly clear that prolonged cell survival with inhibition of apoptosis is associated with carcinogenesis. Earlier Tjalma et al. (2001), found that the expression of Bcl-2 is a strong prognostic parameter because this expression is lost during tumour progression and, suggesting that the regulating of apoptosis plays a critical role in the behaviour of cervical carcinomas². Otherwise Shukla et al. (2014), used premalignant and malignant lesion of uterine cervix in their study, showed no significant association between HPV 16/18 infection and p53 and Bcl-2 expression. Although Bcl-2 staining showed a significant difference between CIN and carcinoma cervix. They conclude that Bcl-2 immunostaining may be used as a diagnostic biomarker to differentiate

malignant lesions from the premalignant lesions⁴⁰. Dimitrakakis et al. showed that Bcl-2 expression was increased in relation with the grade of CIN. In addition, a significant difference between the expression of Bcl-2 in premalignant lesions and in carcinomas was found in the same study²⁹.

Grace et al. showed an abnormal cytoplasmic expression of bcl-2 protein and nuclear expression of p53 protein were observed using immunocytochemistry in biopsies of cervical lesions but not in normal samples. The intensity of immunoreactivity for both p53 and Bcl-2 proteins varied between different grades of cervical lesions. By this study, it suggested that the immunodetection of both p53 and Bcl-2 proteins in squamous cell carcinoma of the uterine cervix can be used as an independent diagnostic biomarker for cervical cancer associated with HPV infection. The highly significant association of these proteins with HPV infection suggests that the HR-HPV infection may be responsible for the co-overexpression of p53 and Bcl-2 in cervical cancer even though both of them are antagonistic in their function²⁸. In breast cancer, there is a negative correlation between p53 accumulation and Bcl-2 expression⁵³. In some cells, p53 can induce apoptosis and can down-regulate Bcl-2^{13,20}. In this study, the p value was 0.352 means that the correlation between the expression of Bcl-2 and p53 protein is not significant.

CONCLUSION

The evaluation of Bcl-2 expression may provide additional prognostic information for the cervical cancer and therefore to be developed as a prognostic biomarker for this disease. In cervical cancer, the results of p53 immunohistochemistry have been somewhat confusing, and does not appear to be a prognostic parameter for this type of cancer. Among different cancers, the Bcl-2 and p53 pathway leading to programmed cell death may not be regulated in the same way. It has been demonstrated in vitro that the absence of functional p53 in the cervical cells it has increased Bcl-2 expression. This increased expression under conditions of p53 inactivation may provide cells with a selective advantage for cell survival and consequently play a role in the development of cervical tumorigenesis.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the pathology division members, Sétif Hospital, Algeria, for their help to collect the samples. We are grateful to Professor Xing Xie and his research team for their help and support to realize several experiments in the Women's Hospital, School

of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China. We like to thank also the pathology division team, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China, for their help.

REFERENCES

1. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, Pollefiet C, Baay M, Goovaerts GC, Vermorken JB, van Dam PA, van Marck E, Buytaert PM. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*; 97:223-30 (2001).
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*; 189:12-9 (1999).
4. Filho LA, Utagawa ML, Shirata NK, Pereira SM, Namiyama GM, Kanamura CT, Santos Gda C, de Oliveira MA, Wakamatsu A, Nonogaki S, Roteli-Martins C, di Loreto C, Mattosinho de Castro FerrazMda G, Maeda MY, Alves VA, Syrjänen K. Immunocytochemical expression of p16^{INK4A} and Ki 67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol*; 24:118-24 (2005).
5. Kurvinen K, Syrjänen K, Syrjänen S. p53 and bcl 2 proteins as prognostic markers in human papillomavirus associated cervical lesions. *J Clin Oncol*; 14:2120-30 (1996).
6. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*; 281:1322-6 (1998).
7. Tsjimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226:1097-9 (1984).
8. Chen-Levy Z, Cleary ML. Membrane topology of the bcl-2 protooncogenic protein demonstrated in vitro. *J Biol Chem*; 265: 4929-33 (1990).
9. Krajewski S, Tanaka S, Takkayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*; 53: 4701-14 (1993).
10. Reed JC. Bcl-2 and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*; 124:1-6 (1994).
11. Young E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for bcl-XL and bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell*; 80:285-91 (1995).
12. Liang XH, Mungal S, Ayscue A, Meissner JD, Wodnicki P, Hockenbery D, Lockett S, Herman B. Bcl-2 protooncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. *J Cell Biochem*; 57:509-21 (1995).
13. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper of growth and division. *Cell*; 88:323-31 (1997).
14. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor RW, Chernova O, Sharma Y, Stark RG. A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci*; 95: 14775-80 (1998).
15. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*; 10:1054-72 (1996).
16. Zhang Q. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein- Barr virus latency. *Mol Cell Biol*; 14:1929-38 (1994).
17. Seol WD, Chen Q, Smith LM, Zarnegar R. Regulation of the c-met proto-oncogene

- promoter by p53. *J Biol Chem*; 274: 3565-72 (1999).
18. Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*; 272:10983-86 (1997).
 19. Budhram-Mahadeo V, Morris PJ, Smith MD, Midgley CA, Boxer LM, Latchman DS. p53 suppresses the activation of the BCL-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *J BiolChem*; 274: 15237-44 (1999).
 20. Myashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang H, Lin HK, Hoffman B, Lieberman D, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*; 9:1799-805 (1994).
 21. Greenblatt MS, Bennel WP, Hollstein M, Harris C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*; 54: 4855-78 (1994).
 22. Nayak BK, Baral RN, Das BR. p53 gene mutation in relation to p53 protein accumulation in male and female breast cancer. *Neoplasma*; 43:305-10 (1996).
 23. Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Baflifora H, Cline M. Rearrangement of p53 gene in human osteosarcomas. *Proc Natl Acad Sci*; 84:7716-19 (1987).
 24. Bremer GL, Tieboschb ATMG, van der Putten HWHM, de Haan J, Arends JW. p53 tumor suppressor gene protein expression in cervical cancer: relationship to prognosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*; 63:55-59 (1995).
 25. Crook T, Vousden KH. Properties of p53 mutations detected in primary and secondary cervical cancers suggest mechanisms of metastasis and involvement of environmental carcinogens. *EMBO J*; 11:3935-40 (1992).
 26. Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Iwamoto S, Enomoto T. Alterations of the p53 gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection. *Cancer Res*; 52:5323-27 (1992).
 27. Thomas M, Pin D, Banks L. The role of E6 and p53 interaction in molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*; 18:7690-700 (1999).
 28. Grace VM, Shalini JV, Iekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co overexpression of p53 and bcl 2 proteins in HPV induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*; 91:51-8 (2003).
 29. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, Leandros E, Michalas S. The Possible Role of p53 and bcl-2 Expression in Cervical Carcinomas and Their Premalignant Lesions. *Gynecologic Oncology*; 77:129-36 (2000).
 30. Dako (catalogue). Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein, Clone 124, Code M0887, (2002).
 31. Dako (catalogue). Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7, Code M 7001, (2002).
 32. Tjalma W, De Cuyper E, Weyler J, van Marck E, De Pooter C, Albertyn G, van Dam P. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol*; 178:113-17 (1998).
 33. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer*; 41:178-83 (1988).
 34. Gronostajski RM, Goldberg AL, Pardee AB. Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. *Mol Cell Biol*; 4:442-48 (1984).
 35. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70-p53 with an altered half-life. *Mol Cell Biol*; 8:531-39 (1988).
 36. Akasofu M, Oda Y. Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of human papillomavirus types 16 and 18. *Virchows Arch. A Pathol Anat Hist*; 425:593-602 (1995).
 37. Cheah PL, Looi LM. p53 immunohistochemical expression: Messages in cervical carcinogenesis, *Pathology*; 34:326-31 (2002).
 38. Tan GC, Sharifah NA, Salwati S, Shiran MS, Hattaa AZ, Ng HO. Immunohistochemical study of p53 expression in premalignant and malignant cervical neoplasms. *Med Health*; 2:125-32 (2007).
 39. Baskaran K, Karunanithi S, Sivakamasundari I, Sundresh NJ, Thamaraiselvi B, Swaruparani S. Overexpression of p53 and its role as early biomarker in carcinoma of uterine cervix. *Int J Res Pharm Sci*; 4:198-202 (2013).
 40. Shukla S, Dass J, Pujani M. p53 and Bcl-2

- expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human papilloma virus 16 and 18. *South Asian Journal of Cancer*; 3:48-53 (2014).
41. Chen HY, Hsu CT, Lin WC, Tsai HD, Chang WC. Prognostic value of p53 expression in stage IB1 cervical carcinoma. *Gynecol Obstet Invest*; 49:266-71 (2000).
 42. Rajkumar T, Rajan S, Baruah RK, Majhi U, Selvaluxmi G, Vasanthan A. Prognostic significance of Bcl 2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*; 19:556-60 (1998).
 43. Ngan HY, Cheung AN, Liu SS, Cheng DK, Ng TY, Wong LC. Abnormal expression of pan-ras, c-myc and tp53 in squamous cell carcinoma of cervix: Correlation with HPV and prognosis. *Oncol Rep*; 8:557-61 (2013).
 44. Caamano J, Ruggeri B, Momiki S, Sickler A, Zhang SY, Klein-Szanto AJP. Detection of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol*; 139:839-45 (1991).
 45. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*; 248:76-9 (1990).
 46. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci*; 88:5523-7 (1991).
 47. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*; 63:1129-36 (1990).
 48. Lakshmi S, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK, Pillai MR. p53 protein and tumorigenesis in the uterine cervix. *Gen Diagn Pathol*; 142:281-7 (1997).
 49. Mittal KR, Lin O, Chan W, Goswami S, Demopoulos RI. Cervical squamous dysplasias and carcinomas with immunodetectable p53 frequently contain HPV. *Gynecol Oncol*; 58:289-94 (1995).
 50. Ngan HY, Tsao SW, Liu SS, Stanley M. Abnormal expression and mutation of p53 in cervical cancer-a study at protein, RNA and DNA levels. *Genitourin Med*; 73:54-8 (1997).
 51. Munakata S, Watanabe O, Ohashi K, Morino H. Expression of Fas ligand and bcl 2 in cervical carcinoma and their prognostic significance. *Am J Clin Pathol*; 123:879-85 (2005).
 52. Wootipoom V, Lekhyananda N, Phunggrassami T, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. Prognostic significance of Bax, Bcl 2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol*; 94:636-42 (2004).
 53. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*; 86:499-504 (1994).