

Que peut apporter la protéine p16 à la prise en charge de la pathologie cervicale ?

C. BERGERON *
(Cergy-Pontoise)

Résumé

La surexpression de la protéine p16 sur des prélèvements histologiques ou des frottis en milieu liquide peut être considérée comme un marqueur indirect de l'activité néoplasique de l'oncoprotéine E7 d'un HPV à haut risque (HR-HPV). La détection de la p16 par immunohistochimie permet une amélioration statistiquement significative de la justesse et de la reproductibilité du diagnostic de CIN2 et CIN3 par rapport à la coloration par l'hématoxyline éosine. La détection de la p16 sur des frottis en milieu liquide diagnostiqués ASC-US ou LSIL permet d'obtenir une sensibilité comparable mais une meilleure spécificité que le test HPV pour prédire la présence d'un CIN2+ sur la biopsie. La détection de la p16 associée au Ki67 (p16/Ki67) dans une même cellule est le reflet d'un dérèglement du cycle cellulaire par l'inactivation de pRb dans une cellule en prolifération, ce mécanisme résultant de l'expression de l'E7 d'un HR-HPV. Cette recherche simultanée permet d'obtenir une meilleure spécificité que la détection de la p16 isolée en gardant la même sensibilité sur des frottis diagnostiqués ASC-US et LSIL. La

Laboratoire Pasteur-Cerba - ZI des Béthunes - Rue de l'Équerre - 95310 Saint-Ouen l'Aumône

* Correspondance : bergeron@lab-cerba.com

détection de p16/Ki67 a également été évaluée sur des frottis en milieu liquide en dépistage primaire. Elle permet d'obtenir une meilleure sensibilité que la cytologie avec une spécificité comparable, en particulier chez les femmes de moins de 30 ans. Chez les femmes de plus de 30 ans, le test HPV reste plus sensible mais la détection de p16/Ki67 après un test HPV positif permet d'obtenir une très bonne spécificité pour sélectionner les patientes nécessitant une colposcopie.

Mots clés : p16, Ki67, reproductibilité, spécificité, histologie, cytologie, dépistage, col utérin

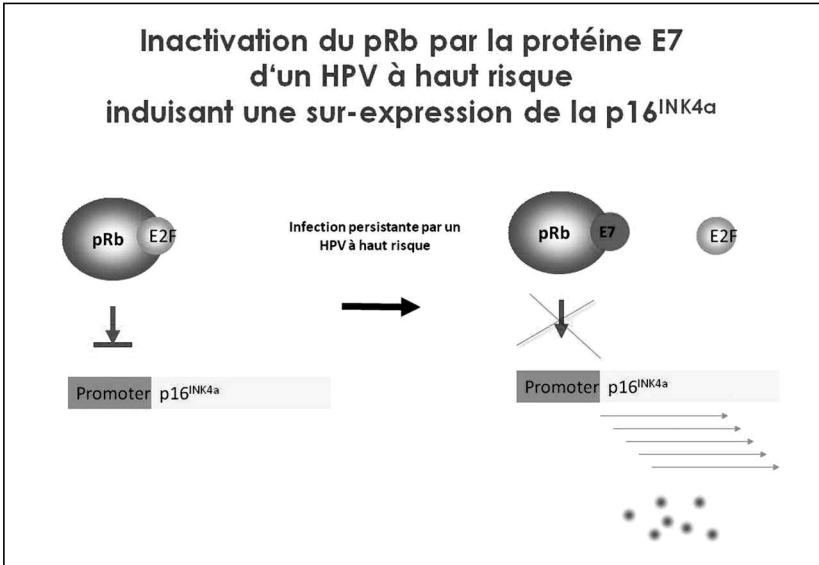
Déclaration publique d'intérêt

Je soussignée, Christine Bergeron, déclare ne pas avoir d'intérêt direct ou indirect (financier ou en nature) avec un organisme privé, industriel ou commercial en relation avec le sujet présenté.

INFECTION À PAPILLOMAVIRUS HUMAINS ET LÉSIONS PRÉCANCÉREUSES DU COL UTÉRIN

L'infection de l'épithélium cervical par un papillomavirus humain à haut risque (HR-HPV) est le plus souvent latente et ne produit pas de modifications morphologiques. Par contre, les lésions précancéreuses et les cancers invasifs du col utérin sont associés dans 95 % des cas à un HR-HPV. La protéine p16 est un biomarqueur qui témoigne de l'expression de l'oncogène viral E7 au cours d'une infection persistante par un HR-HPV. Au niveau moléculaire, la protéine du gène du rétinoblastome (pRb) est habituellement liée à E2F qui bloque l'activation du cycle cellulaire par un mécanisme de phosphorylation. La surexpression de la p16 est liée à une interférence entre l'oncoprotéine virale E7 et pRb. La libération d'E2F induite par la liaison entre l'oncoprotéine virale E7 et pRb aboutit à un important rétrocontrôle négatif sur la répression de la transcription du gène de la p16. La surexpression de la p16 est donc un moyen indirect de diagnostiquer non seulement la présence d'une infection par un HR-HPV, mais aussi l'expression de l'oncoprotéine E7 correspondant à une infection transformatrice (Figure 1).

Figure 1 - Mécanismes biologiques induisant la surexpression de la protéine p16



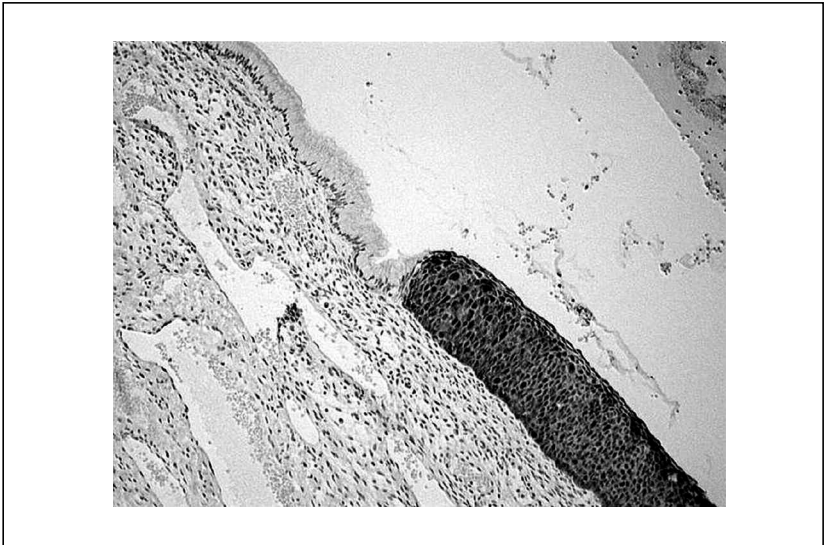
LE DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE

La p16 est présente dans la presque totalité des néoplasies intra-épithéliales cervicales (CIN) de haut grade (CIN2+) et des cancers du col utérin [1]. L'interprétation des prélèvements histologiques du col utérin reste subjective et présente une faible reproductibilité, en particulier dans le diagnostic des CIN1. L'immunomarquage de la p16 est présent au niveau des couches basales de l'épithélium malpighien de manière diffuse dans les CIN de bas grade (CIN1) (Figure 2) et remonte dans les couches intermédiaires et superficielles dans les CIN de haut grade (CIN2 et CIN3) (Figure 3). La détection de la p16 a donc été utilisée pour tester la reproductibilité du diagnostic histologique sur des prélèvements du col utérin avec un diagnostic de CIN1, CIN2 ou CIN3. Une étude impliquant 12 pathologistes européens a montré une amélioration statistiquement significative de la justesse et de la reproductibilité du diagnostic de CIN2 et CIN3, en utilisant la détection immunohistochimique de la p16 en plus de la coloration par l'hémaréose éosine sur 250 biopsies et 250 conisations [2].

Figure 2 - Détection immunohistologique de la p16 dans un CIN1 : le marquage est diffus au niveau des couches basales



Figure 3 - Détection immunohistologique de la p16 dans un CIN3 : un marquage diffus remonte sur les deux tiers de l'épithélium malpighien



LA PLACE DU TEST HPV

Un petit nombre de patientes, 10 % avec un diagnostic d'atypie malpighienne de signification indéterminée (ASC-US) et 20 % avec un diagnostic de lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade (LSIL), présente un CIN de haut grade (CIN2 ou CIN3) sur la biopsie sous colposcopie. La détection de ces quelques CIN de haut grade nécessite l'exploration d'un nombre important de frottis avec des anomalies mineures, et le coût en est élevé. Pour pallier ces inconvénients, le test HPV a été proposé après un diagnostic d'ASC-US pour sélectionner les patientes nécessitant une colposcopie [3]. Le test HPV dans cette indication a une très bonne sensibilité (> 90 %) mais une spécificité médiocre (< 40 %). Après un diagnostic de LSIL, il n'existe pas d'alternative jusqu'à ce jour permettant de sélectionner les patientes pour un examen colposcopique, sinon le suivi cytologique.

Dans le contexte du dépistage primaire, des études randomisées comparant les performances de la cytologie et du test HPV montrent une meilleure sensibilité du test HPV par rapport à la cytologie. Le suivi à 3 ou 5 ans confirme une diminution du nombre de CIN2+ chez les femmes avec un test HPV négatif au départ par rapport à celles avec un frottis normal [4]. La valeur prédictive négative du test HPV est donc meilleure. Il est donc possible d'espacer un test HPV négatif à plus de 3 ans sans risque. Par contre, la spécificité du test HPV est moins bonne que la cytologie. Un deuxième test doit donc sélectionner les patientes à adresser en colposcopie. Jusqu'à présent, la cytologie est le test le plus performant. Seules les patientes avec un test HPV positif et une cytologie anormale seront adressées pour une colposcopie. Les patientes qui ont un test HPV positif et une cytologie normale seront revues à un an.

LA DÉTECTION IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA P16

Dans ce contexte, la détection de la p16 par immunocytochimie a été analysée sur 810 frottis prélevés en milieu liquide et diagnostiqués ASC-US ou LSIL [5]. Cette détection a été couplée à un examen morphologique définissant un frottis anormal selon les critères de la terminologie de Bethesda, car la p16 peut être détectée dans des cellules métaplasiques ou des cellules cylindriques en métaplasie tubaire. Les performances de cette détection ont été comparées à celles du test HPV.

Les calculs de sensibilité et de spécificité ont utilisé comme référence le diagnostic histologique de CIN de haut grade (CIN2+). La détection de la p16 a montré une sensibilité de 95 % après un diagnostic d'ASC-US et de 96 % après un diagnostic de LSIL comparable à celle du test HPV (90 %). La spécificité était comprise entre 66 et 71 % après un diagnostic d'ASC-US et entre 47 et 53 % après un diagnostic de LSIL, statistiquement supérieure à celle du test HPV (36 % après ASC-US et 19 % après LSIL).

Dans le cadre d'une étude randomisée italienne comparant cytologie conventionnelle et HPV en dépistage primaire, la p16 a été analysée après un test HPV positif sur le matériel résiduel des prélèvements faits en milieu liquide de manière rétrospective [6]. Les patientes qui n'avaient pas de surexpression de la p16 ont eu un risque très faible d'avoir un CIN2+ au moment de la colposcopie et/ou de développer un CIN3 dans le suivi à 3 ans. La recherche immunocytochimique de la p16 pourrait donc être une alternative intéressante pour suivre les femmes ayant un test HPV positif en dépistage primaire.

LA DÉTECTION IMMUNOCYTOCHIMIQUE COUPLÉE P16/KI67

La détection immunocytochimique de la p16 demande un examen morphologique des cellules marquées. Cet examen morphologique reste subjectif et est associé à une variabilité interobservateur. Pour contourner cet obstacle, la détection couplée de la p16 et du Ki67 dans une même cellule a été proposée. Ce double marquage dans une même cellule identifie une dérégulation du cycle cellulaire par l'inactivation de pRb dans une cellule en prolifération, ce mécanisme résultant de l'expression de l'E7 d'un HR-HPV. Ce double marquage permet donc de sélectionner les cellules anormales de manière plus spécifique que le marquage de la p16 isolée et ne nécessite pas d'examen morphologique. Un résultat est considéré positif seulement quand une cellule contient un noyau marqué par le Ki67 et un cytoplasme par la p16 (Figure 4).

La détection de p16/Ki67 a été effectuée sur le matériel résiduel de 776 frottis en milieu liquide de la même cohorte décrite précédemment pour détecter la p16 après un diagnostic d'ASC-US (n = 361) et LSIL (n = 415) [7]. La sensibilité obtenue après un diagnostic d'ASC-US a été de 92 % et de 94 % après un diagnostic de LSIL. La spécificité a été de 81 % et 68 %, respectivement (Tableau 1). Cette spécificité de p16/ki67

est, comme attendu, meilleure que celle de la p16 isolée en gardant la même sensibilité. Ce double marquage p16/Ki67 permettrait de réduire le nombre de patientes nécessitant une colposcopie non seulement après un diagnostic d'ASC-US, mais aussi après un diagnostic de LSIL. Dans ce dernier cas, il donnerait une alternative aux cliniciens pour suivre des patientes qui sont le plus souvent jeunes et éviterait des gestes invasifs sur le col à des femmes qui sont en âge de procréer. Il permettrait aussi de réduire le coût de la prise en charge de ces diagnostics et l'anxiété des patientes.

Figure 4 - Détection immunocytochimique de p16/Ki67 dans une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade. Le Ki67 est détecté dans le noyau et la p16 dans le cytoplasme (A et B). x 40

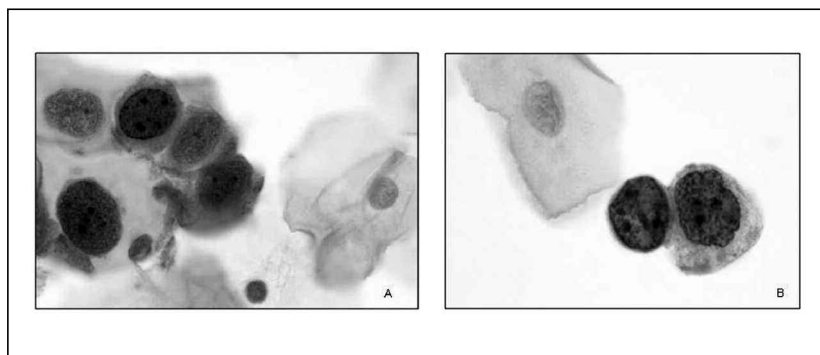


Tableau 1 - Sensibilité et spécificité comparées de p16/Ki67 et du test HPV après un diagnostic d'ASC-US, LSIL et en dépistage primaire avant et après 30 ans pour diagnostiquer une néoplasie intra-épithéliale cervicale de haut grade (CIN2+)

	p16/Ki67		HPV	
	Sensibilité %	Spécificité %	Sensibilité %	Spécificité %
ASC-US * 1	92	81	91	36
LSIL ** 1	94	68	96	19
Dépistage primaire < 30 ans 2	92	92	-	-
Dépistage primaire > 30 ans 2	88	96	96	93
HPV positif et cytologie négative 3	92	82	-	-

* Atypie malpighienne de signification indéterminée ; ** Lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade
 1 : Schmidt *et al.* 2011 ; 2 : Bergeron *et al.* 2010 ; 3 : Petry *et al.* 2011

Concernant le dépistage primaire, une étude européenne incluant 27 000 patientes a analysé la performance de la cytologie, de p16/Ki67 et du test HPV dans ce contexte [8]. Les résultats préliminaires montrent que chez les femmes de moins de 30 ans, p16/Ki67 a une sensibilité plus élevée que la cytologie (92 % *versus* 68 %) pour détecter les CIN2+ avec une spécificité comparable (92 % *versus* 93 %). Le test HPV positif n'a pas été suivi d'une colposcopie en raison de sa faible spécificité dans cette tranche d'âge. Chez les femmes de plus de 30 ans, p16/Ki67 a une sensibilité plus élevée que la cytologie (88 % *versus* 65 %) mais inférieure au test HPV (96 %) (Tableau 1). Par contre, la spécificité de p16/Ki67 est supérieure au test HPV (96 % *versus* 93 %) et identique à celle de la cytologie. Si cette approche de la détection de p16/Ki67 par immunocytochimie était adoptée en dépistage primaire, elle pourrait être faite quel que soit l'âge de la patiente sur un prélèvement en milieu liquide et ne nécessiterait pas une sélection des cas positifs par un deuxième test comme après un test HPV. Enfin, la détection de p16/Ki67 a été analysée sur le matériel résiduel de frottis normaux après un test HPV positif dans le cadre d'un dépistage primaire. La sensibilité et la spécificité de p16/Ki67 pour le diagnostic d'un CIN2+ ont été de 92 % et 82 %, respectivement [9] (Tableau 1).

CONCLUSION

L'avenir nous dira où se positionnera le frottis couplé à l'utilisation d'un marqueur moléculaire dans le dépistage primaire du cancer du col : comme un outil de dépistage primaire ou en deuxième intention après un test HPV positif. La Haute Autorité de santé vient de recommander une nouvelle fois le frottis mais dans un contexte organisé. Dans ces conditions, la détection immunocytochimique de p16/Ki67 dans des frottis avec un diagnostic d'ASC-US et de LSIL aurait toute sa place pour sélectionner les patientes à adresser en colposcopie.

Bibliographie

- [1] Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U *et al.* Overexpression of p16^{INK4a} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.
- [2] Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk M, Keller T, Ridder R. Conjunctive p16ink4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Path* 2010;133:395-406.
- [3] Arbyn M, Buntinx F, van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsh P, Dillner J. Virologic *versus* cytologic triage of women with equivocal pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:280-93.
- [4] Lavoué V, Bergeron C, Riethmuller D, Darai E, Mergui JL, Baldauf JJ, Gondry J, Douvier S, Lopes P, de Reilhac P, Quereux C, Letombe B, Marchetta J, Boulanger JC, Levêque J. Un nouveau paradigme pour le dépistage du cancer du col utérin ? *Gynecol Obstet Biol Reprod* 2010;39:102-115.
- [5] Denton K, Bergeron C, Klement P, Trunk T, Keller T, Ridder R; European CINtec cytology study group. The sensitivity and specificity of p16^{INK4a} cytology *versus* HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL Pap cytology results. *Am J Clin Pathol* 2010;134:12-21.
- [6] Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, del Mistro A, Gillio-Tos A, Giorgio-Rossi P *et al.* Use of p16-^{INK4A} overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2008;9:937-45.
- [7] Schmidt D, Bergeron C, Denton K, Ridder R for the European CINtec cytology study group. P16/Ki-67 dual-stained cytology in the triage of ASC-US and LSIL Pap cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Pap cytology study (EEMAPS). *Cancer Cytopathol* 2011;119:158-66.
- [8] Bergeron C, Schmidt D, Ikenberg H, Ridder R. High sensitivity and high specificity of p16/Ki-67 dual -stained cytology for high-grade CIN-results from screening and triage trials in over 28,000 women. *Cancer Cytopathol* 2010; 118:305-6.
- [9] Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C *et al.* Triage Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* 2011; 121:505-509.

