

TECHNIQUES COMPLEMENTAIRES UTILISEES POUR LE DIAGNOSTIC DES MALADIES TROPHOBLASTIQUES GESTATIONNELLES AVEC VILLOSITES

ALLIAS Fabienne, GAILOT-DURAND Lucie, DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN Mojgan.

Centre de Pathologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, 103 grande rue de la Croix-Rousse, 69317 LYON Cedex 04.

I – Etude immunohistochimique avec l’anticorps anti-p57.

La protéine kinase inhibitrice cycline-dépendante 1C (CDKN1C/p57/Kip2) est le produit du gène CDKN1C situé sur le chromosome 11 (11p15.5). C’est un gène suppresseur de tumeur qui induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Ce gène est soumis à empreinte parentale en raison de phénomènes de méthylation régulant son expression. Ainsi, un individu normal hérite d’un allèle maternel et d’un allèle paternel, mais l’allèle paternel est silencieux, et seul l’allèle maternel s’exprime.

Dans un *tissu placentaire normal ou simplement hydropique*, les cellules du stroma villositaire, le cytotrophoblaste et le trophoblaste intermédiaire expriment p57 (Figure 1). La caduque sert de témoin interne positif. Il s’agit d’un **marquage nucléaire** intense.

En cas de *môle hydatiforme complète*, les deux lots chromosomiques sont d’origine paternelle. Le gène CDKN1C est donc silencieux, entraînant une perte d’expression de p57 dans les cellules du stroma villositaire et du cytotrophoblaste. Le trophoblaste intermédiaire reste positif (Figure 2).

En cas de *môle hydatiforme partielle*, la présence d’un allèle maternel permet de maintenir une expression normale de la p57 dans le stroma villositaire et le cytotrophoblaste (Figure 3). Attention, il peut exister des aspects de faux négatif en cas de nécrose villositaire avancée.

On obtient alors les profils suivants (Jun 2003, Banet 2014) :

	Cytotrophoblaste	Stroma villositaire	
MHC	-	-	
MHP	+	+	
Avortement hydropique	+	+	
Aberration chromosomique	+	+	
Dysplasie mésoenchymateuse Mosaïque/chimérisme androgénétique/biparental	+	-	p57 discordante (Figure 4)

Modalités d'interprétation (Vang 2012) :

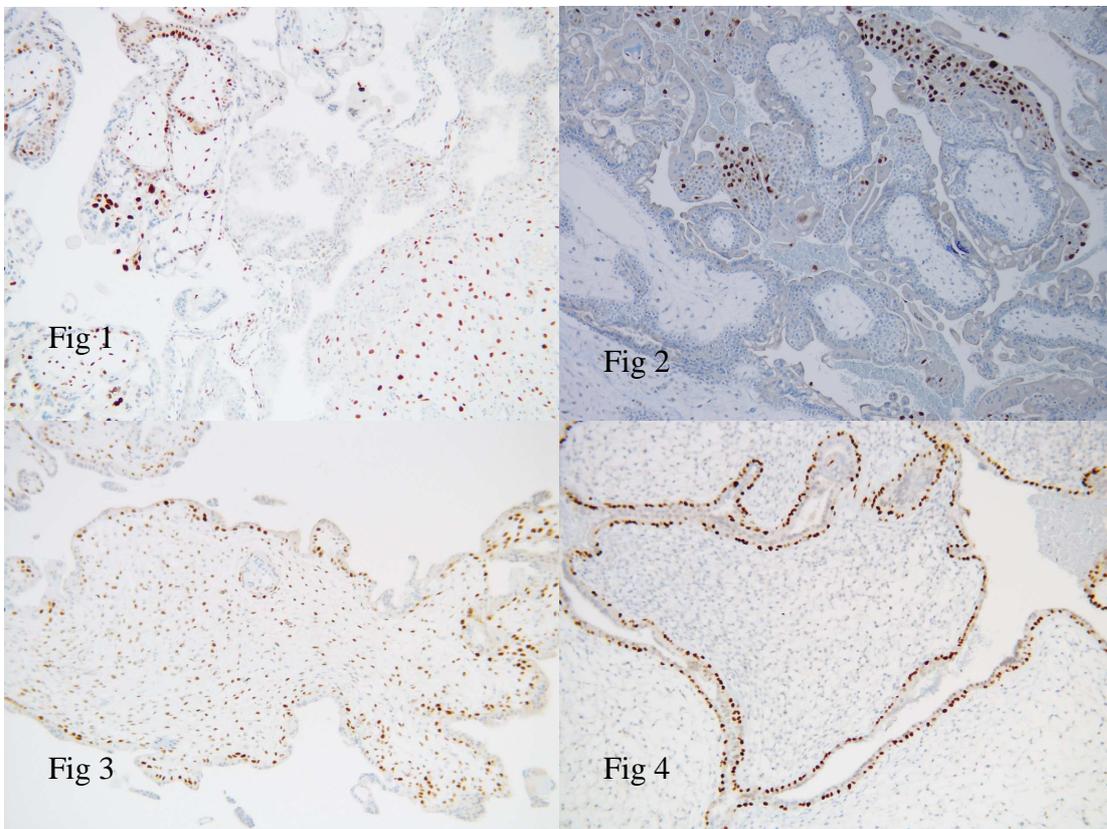
- moins de 10% de cellules positives = marquage négatif
- plus de 50% de cellules positives = marquage positif
- entre 10 et 50% de cellules positives = **marquage ambigu ou équivoque**(Figure 5). Une nouvelle étude IHC est recommandée sur un autre bloc, voire un génotypage moléculaire. Ne pas interpréter comme positif un marquage cytoplasmique sans marquage nucléaire.

On parle de **p57 divergente** quand il existe plusieurs contingents villositaires (Figure 6). L'association de plusieurs populations villositaires peut se voir dans les contextes de grossesse gémellaire avec MHC, ou de mosaïques/chimérismes parfois très complexes pouvant associer jusqu'à 4 populations (un contingent stroma+, cytotrophoblaste + ; un contingent stroma -, cytotrophoblaste - ; un contingent stroma -, cytotrophoblaste + ; un contingent stroma +, cytotrophoblaste -).

Les *moles hydatiformes complètes diploïdes* par mutation du gène NRLP7 (au autre gène), rencontrées dans les contextes de môles familiales ou récurrentes, ont le même profil immunohistochimique qu'une môle hydatiforme complète diandrique : perte d'expression de p57 dans les cellules du stroma villositaire et du cytotrophoblaste.

L'étude immunohistochimique à l'aide de l'anticorps anti-p57 est une technique facile, peu coûteuse, sensible et spécifique.

A noter que, dans la littérature, il a été décrit d'exceptionnels cas de faux positifs : MHC diandrique p57 positive par gain d'un chromosome 11 maternel (MHC + trisomie 11) (Mac Connel 2009) et de faux négatifs : MHP p57 négative par triploïdie diandrique avec perte du chromosome 11 maternel (De Scipio 2011).



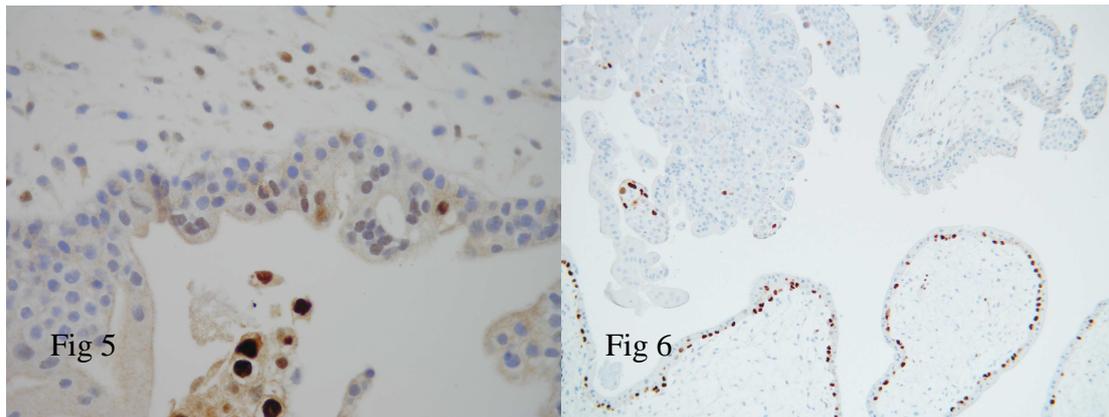


Figure 1 : Expression normale de p57 dans un produit d'avortement non molaire. P57 exprimée par les cellules du stroma villositaire, le cytotrophoblaste, le trophoblaste intermédiaire et la caduque.

Figure 2 : MHC. Perte d'expression de p57 dans le cytotrophoblaste et le stroma villositaire.

Figure 3 : MHP. Profil d'expression normal de p57.

Figure 4 : p57 discordante. Perte d'expression de p57 dans le stroma mais pas dans le cytotrophoblaste.

Figure 5 : p57 ambiguë. Marquage de 10 à 50% des cellules du stroma villositaire. L'intensité est toutefois moins forte que dans le témoin interne adjacent (trophoblaste intermédiaire).

Figure 6 : p57 divergente. Présence de 2 populations villositaires de profil immunohistochimique p57 différent. En haut villosités molaires p57 négatif dans le stroma et le cytotrophoblaste. En bas contingent villositaire p57 négatif dans le stroma, positif dans le cytotrophoblaste.

A noter une forte positivité du trophoblaste intermédiaire servant de témoin interne.

Bibliographie :

- Banet N, DeScipio C, Murphy KM, Beierl K, Adams E, Vang R, Ronnett BM. Characteristics of hydatidiform moles : analysis of a prospective series with p57 immunohistochemistry and molecular genotyping. *Mod Pathol.* 2014 ;27 :238-54.
- DeScipio C, Haley L, Beierl K, Pandit AP, Murphy KM, Ronnett BM. Diandric triploid hydatidiform mole with loss of maternal chromosome 11. *Am J Surg Pathol.* 2011 ;35 :1586-91.
- Jun SY, Ro JY, Kim KR. p57kip2 is useful in the classification and differential diagnosis of complete and partial hydatidiform moles. *Histopathology.* 2003 ;43 :17-25
- McConnell TG, Norris-Kirby A, Hagenkord JM, Ronnett BM, Murphy KM. Complete hydatidiform mole with retained maternal chromosomes 6 and 11. *Am J Surg Pathol.* 2009 ;33 :1409-15.
- Vang R, Gupta M, Wu LS, Yemelyanova AV, Kurman RJ, Murphy KM, Descipio C, Ronnett BM. Diagnostic reproducibility of hydatidiform moles : ancillary techniques (p57 immunohistochemistry and molecular genotyping) improve morphologic diagnosis. *Am J Surg Pathol.* 2012 ;36 :443-53.

II - Etude de la ploïdie par hybridation in situ

L'hybridation in situ fluorescente ou colorimétrique sur tissu fixé est utile pour déterminer la ploïdie du tissu fœtal. Elle ne permet cependant pas de préciser l'origine paternelle ou maternelle des chromosomes.

On utilise soit une seule sonde centromérique pour un chromosome non sexuel généralement non impliqué dans les trisomies, c'est-à-dire autre que 13, 16, 18, 21 (Chew 2000), soit au moins deux sondes (Maggiore 2007).

La sonde dirigée contre le **centromère du chromosome 17** utilisée dans le **kit Her2** du sein peut convenir pour cette technique (LeGallo 2008), avec la réserve qu'une trisomie 17 ne peut être exclue de façon formelle.

Le tissu foetal est considéré comme **triploïde** quand **plus de 20% des cellules du stroma villositaire comportent trois spots** (Figure 7). Le compte ne doit pas être réalisé sur les cellules trophoblastiques, car elles sont davantage proliférantes et peuvent donc être facilement polyplœides.

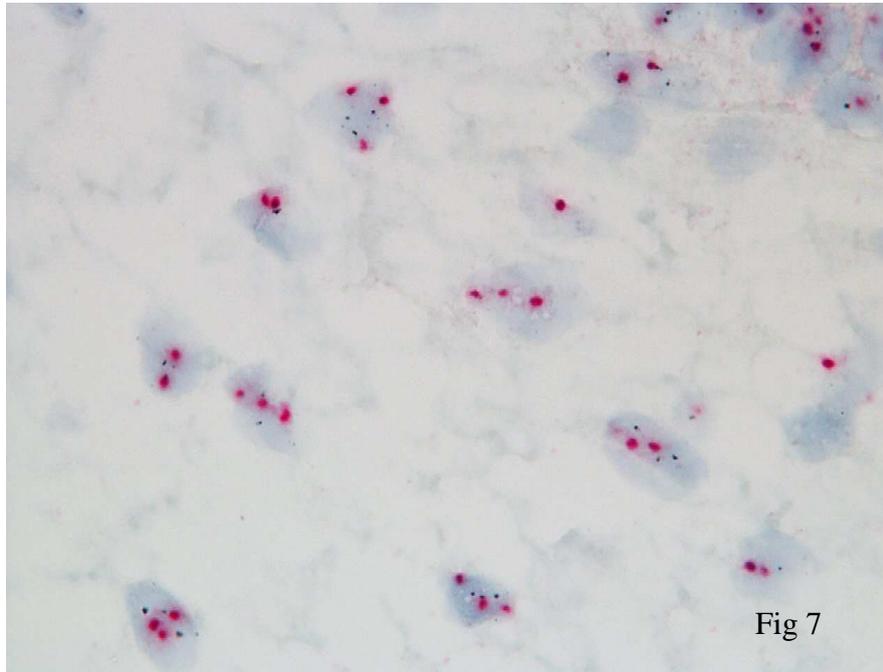


Figure 7 : SISH à l'aide de la sonde Her2/centromère du chromosome 17. Présence de 3 spots rouges (chromosome 17) dans plus de 20% des cellules du stroma villositaire en faveur d'un tissu foetal triploïde.

Bibliographie :

- Chew SH, Perlman EJ, Williams R, Kurman RJ, Ronnett BM. Morphology and DNA content analysis in the evaluation of first trimester placentas for partial hydatidiform mole (PHM). Hum Pathol. 2000;31:914-24
- LeGallo RD, Stelow EB, Ramirez NC, Atkins KA. Diagnosis of hydatidiform moles using p57 immunohistochemistry and HER2 fluorescent in situ hybridization. Am J Clin Pathol. 2008;129:749-55.
- Maggiori MS, Peres LC. Morphological, immunohistochemical and chromosome in situ hybridization in the differential diagnosis of Hydatidiform Mole and Hydropic Abortion. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007;135:170-6.

III- Génotypage moléculaire

Dans la littérature, le **génotypage moléculaire des produits ovulaires** a été décrit comme une méthode valide de diagnostic en routine. Cette technique permet d'une part, de déterminer la ploïdie des villosités, et d'autre part, de déterminer l'origine paternelle ou maternelle du génome en comparant le profil des villosités et le profil maternel.

Il permet ainsi:

- de discriminer une diploïdie androgénique (môle hydatiforme complète) et une diploïdie biparentale (avortement hydropique)
- de discriminer une triploïdie paternelle (môle hydatiforme partielle) d'une triploïdie maternelle (non molaire).

-de discriminer une triploïdie paternelle (môle hydatiforme partielle) d'une diploïdie biparentale (avortement hydropique). En pratique, c'est dans cette indication que le génotypage moléculaire est le plus couramment réalisé.

Le principe du génotypage des grossesses molaïres repose sur la comparaison des génotypes entre l'ADN des villosités suspectes et l'ADN maternel (extrait de la caduque).

Un génotype est la combinaison de 2 allèles. Un STR ou "Short Tandem Repeat" est composé de 2 à 7 bases qui se répètent. Chaque allèle contient un certain nombre de répétitions et la différence de longueur entre 2 allèles peut être visualisée par électrophorèse, après amplification de l'ADN, et lorsqu'une molécule fluorescente est incorporée.

La technique comporte plusieurs étapes. L'étape pré-analytique consiste à sélectionner sur une lame colorée à l'Hématoxyline-Eosine-Safran, des zones de caduque gestationnelle maternelle, et des zones de villosités placentaires.



Une macrodissection des zones de caduque et de villosités placentaires est réalisée, suivie de l'extraction des ADN. Le kit utilisé est un kit de PCR multiplex (kit mpIF1STR®Profiler® de chez Applied Biosystems).

Les résultats sont interprétés selon l'algorithme proposé par Murphy et al. (Murphy K. et al. J Mol Diagn. 2009 Nov;11(6):598-605).

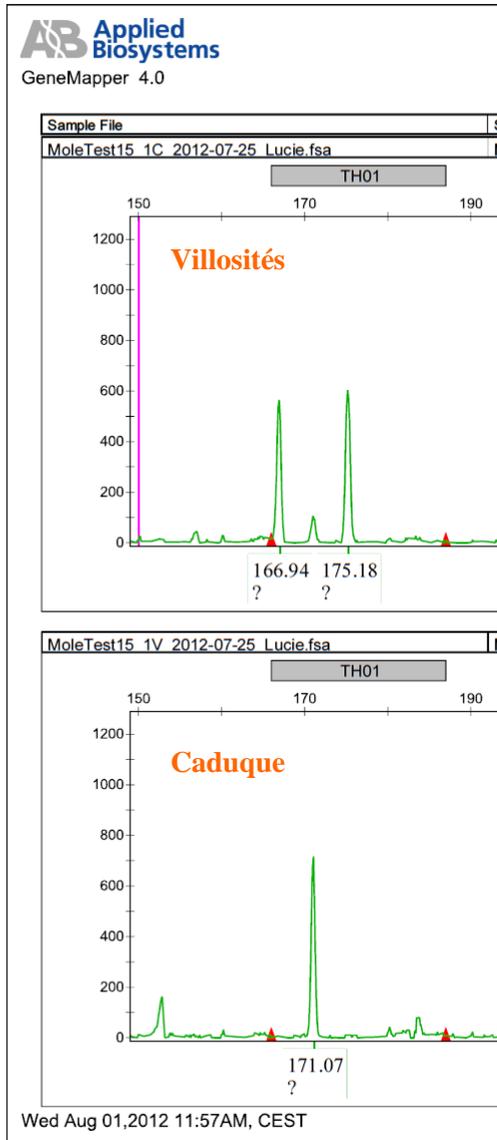
La première étape de l'interprétation se limite à l'ADN des villosités placentaires : elle consiste à examiner pour chaque locus le nombre d'allèle obtenu et le ratio entre la hauteur des allèles. Cette analyse semi-quantitative renseigne sur la ploïdie. La deuxième étape de l'interprétation consiste à comparer l'ADN villositaire avec l'ADN maternel pour en déduire l'origine paternelle ou maternelle des allèles.

Il s'agit d'une technique longue, coûteuse et qui nécessite un plateau technique de biologie moléculaire avec une technicienne expérimentée. Les résultats sont interprétables dans environ 2/3 des cas. Les cas non contributifs correspondent le plus souvent à des **problèmes de contamination** entre les ADN villositaires et maternels, plus rarement à des ADN trop faiblement amplifiés.

En pratique, il est donc important de disposer de lames sur lesquelles la caduque maternelle et les villosités ne sont pas trop intriquées, afin d'éviter les contaminations lors de la macrodissection.

Exemples de résultats obtenus :

Môle hydatiforme complète



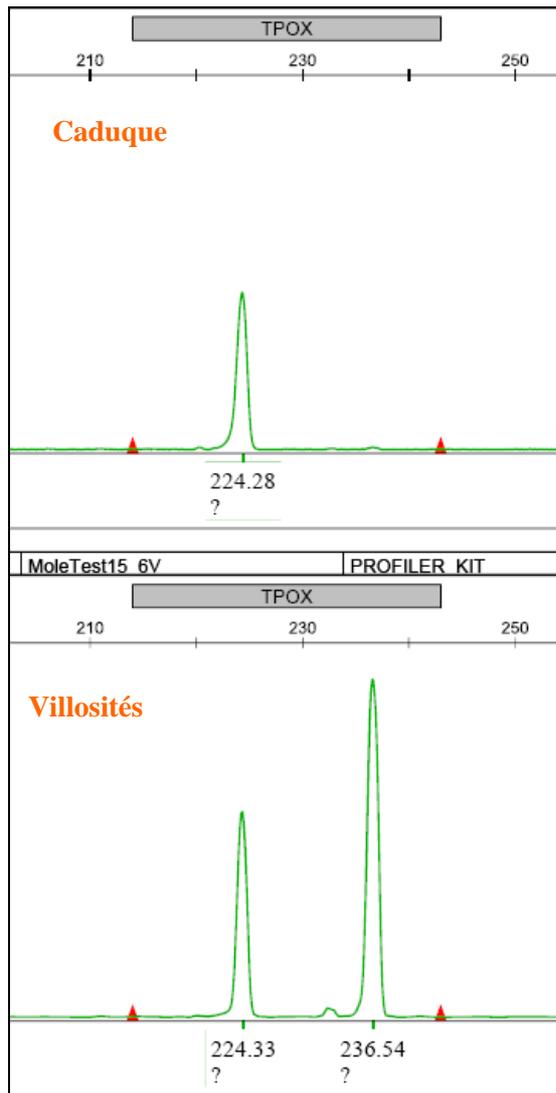
Exemple d'interprétation pour un locus :

- Pour l'ADN villositaires, il existe deux pics (= deux allèles)
- le rapport de hauteur entre ces pics est de proche de 1: ces deux allèles sont en quantité égale, en faveur d'une DIPLOIDIE.

- si l'on compare avec le profil maternel (monozygote pour ce locus), on voit que les deux allèles des villosités sont différents de l'allèle maternel : il s'agit d'un matériel D'ORIGINE PATERNELLE.

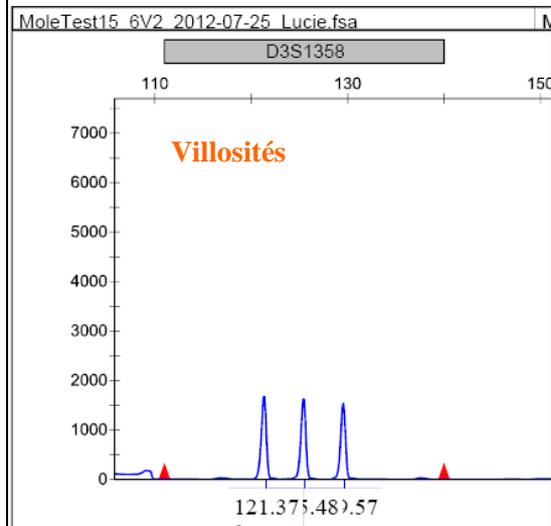
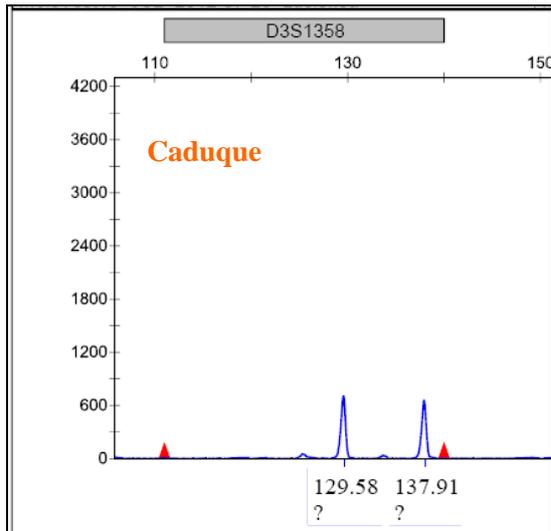
- pour ce locus : le profil est en faveur d'une mole hydatiforme complète (il faudra ensuite comparer avec l'analyse de l'ensemble des locus).

Mole hydatiforme partielle



Exemple d'interprétation pour un locus :

- Pour l'ADN villositaires, il existe deux pics (= deux allèles)
- le rapport de hauteur entre ces pics montre qu'un des allèles est en double quantité par rapport à l'autre, en faveur d'une TRIPLOIDIE.
- l'allèle en double dosage n'est pas partagé avec la mère. Il s'agit d'une triploïdie d'ORIGINE DIANDRIQUE



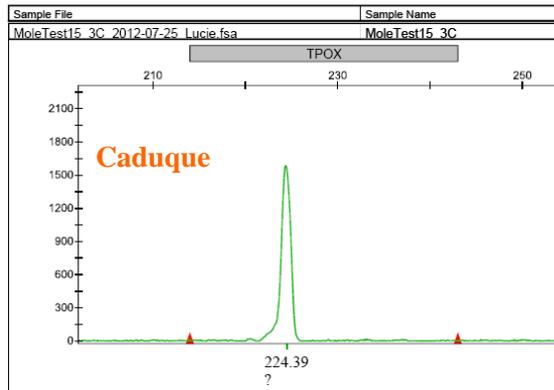
Exemple d'interprétation pour un locus :

- Pour l'ADN villositaires, il existe trois pics (= trois allèles)
- ces trois pics sont de hauteur égale, en faveur d'une TRIPLOIDIE.
- deux des allèles ne sont pas partagés avec la mère. Il s'agit d'une triploidie d'ORIGINE DIANDRIQUE

Produit d'avortement hydropique non molaire

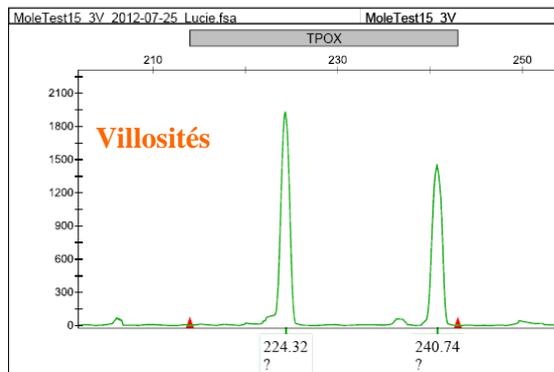
Applied Biosystems
eneMapper 4.0

M



Exemple d'interprétation pour un locus :

- Pour l'ADN villositaires, il existe deux pics (= deux allèles)
- le rapport de hauteur entre ces pics est de proche de 1 (entre 0,61 et 1,17): ces deux allèles sont en quantité égale, en faveur d'une DIPLOIDIE.



- si l'on compare avec le profil maternel (monozygote pour ce locus), on voit que l'un des pic est partagé avec la mère et que l'autre est d'origine paternelle, en faveur d'une DIPLOIDIE D'ORIGINE BI-PARENTALE.

Wed Aug 01, 2012 12:02PM, CEST

Pr