



HAL
open science

Évaluation prospective de la performance de l'aspiration de bile associée au brossage biliaire par CPRE dans le diagnostic des sténoses biliaires malignes

Gaël Stéphane Wenceslas Roth

► To cite this version:

Gaël Stéphane Wenceslas Roth. Évaluation prospective de la performance de l'aspiration de bile associée au brossage biliaire par CPRE dans le diagnostic des sténoses biliaires malignes. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01213969

HAL Id: dumas-01213969

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01213969>

Submitted on 9 Oct 2015

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Année : 2014-2015

Evaluation prospective de la performance de l'aspiration de bile associée au brossage biliaire par CPRE dans le diagnostic des sténoses biliaires malignes.

Thèse présentée pour l'obtention du doctorat en médecine

DIPLÔME D'ÉTAT

Gaël Stéphane Wenceslas ROTH

Né(e) le 18/08/1987

À LA TRONCHE

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE *

Le : 07/09/2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : M. le Professeur Jean-Pierre Zarski

Membres

M. le Docteur Jean Auroux

M. le Professeur Jacques Balosso

M. le Professeur Thomas Decaens (Directeur de Thèse)

Mme le Docteur Michèle Fior-Gozlan

M. le Professeur Vincent Leroy

**La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

REMERCIEMENTS

Merci à tous les membres de mon jury de thèse :

À Thomas, alias futur Pr Decaens, mon directeur de thèse, de master, etc. Merci pour ta disponibilité, ta patience, et ton aide précieuse dans la réalisation de ce travail. Merci pour tout ce que tu as rendu possible cette année par tes conseils, dans l'organisation de mon cursus hospitalo-universitaire.

Au Pr Vincent Leroy pour m'avoir permis de réaliser ce travail, pour m'avoir guidé tout au long de mon internat et m'avoir laissé le temps de choisir librement l'universitaire et l'oncologie digestive.

Au Pr Jean-Pierre Zarski pour me faire l'honneur de présider ce jury et pour son soutien en tant que chef de service, dans mes décisions.

À Jean, alias Dr Auroux, pour avoir accepté de faire partie de ce jury en qualité d'endoscopiste interventionnel. Merci pour ta gentillesse, tes idées et ton expertise.

Au Dr Michèle Fior-Gozlan pour son immense contribution dans ce travail en tant que cytologiste, et pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Au Pr Jacques Balosso pour son intérêt pour la recherche clinique et préclinique en cancérologie et pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci à toute ma famille :

À mes parents pour tout ce qu'ils m'ont apporté et car sans eux, rien de tout cela ne serait possible. Merci notamment à mon père pour son rôle de biostatisticien référent dans ce travail, et pour m'avoir toujours poussé à viser plus haut.

À mon frère pour m'avoir supporté pendant tant d'années, même si tu n'avais pas vraiment le choix.

À ma grand-mère et à tous les autres.

A ceux qui ne sont plus là mais que je n'oublie pas : Papy, Yoman et Yopa.

A mes beaux-parents et à toute ma belle-famille.

Merci à tous mes amis :

A Guillaume et Daniele, mes meilleurs amis, et à leurs moitiés Elena et Marine pour leur présence pendant toutes ces années et pour tous ces bons moments passés ensemble.

A Romain mon compagnon d'Erasmus qui me rappelle que le boulot c'est bien, mais que les voyages c'est pas mal non plus.

A Manon ma savoyarde préférée, à ma petite Benhamou, à Ju notre artiste maison et à tous les autres.

Merci à tous mes collègues :

À ma co-interne Juju avec qui j'ai vécu ces merveilleux et reposants premiers mois d'internat. À mes anciennes co-internes qui sont maintenant assistantes : Laetitia pour ton soutien lors de nos débuts et ton mégaphone intégré, Camille, Aude M. et Audrey. A mes autres co-internes Bleuenn, Sandie, Mélodie, Laurence, Aude T. et Thomas et aux plus jeunes que j'ai moins connus. À tous ceux que j'ai croisé dans les différents stages : Aurélie C, Loredana, Delphine, Valérie, Johan, Stéphanie et tous les autres.

À tous les médecins du service qui m'ont guidé et formé pendant mon internat : Aurélie pour m'avoir tant appris en cancérologie digestive et en soins palliatifs, et pour ton monitoring infallible de la kaliémie, à Victoire pour ta gentillesse et tes conseils, à Nicolas pour ton savoir et ta disponibilité malgré tous tes « dates », à Marie-Noëlle pour la richesse des profils psychiatriques de tes patients, à Mr Bonaz, Caroline, Jean N., Christian C. et à tous les autres.

À ceux qui sont partis : Oana, ma première CCA, pour tout ce que tu m'as appris, à Philippe pour avoir été à l'origine de ce travail.

À Mathieu et Christine en HDJ d'oncologie pour m'avoir appris toutes vos recettes cytotoxiques.

À l'équipe infirmière du 7^{ème} : Yvelise, Amel, Margaux, et toutes les autres.

Aux secrétaires (pardons pour tous ces courriers), aux aides soignantes, aux diététiciennes, aux ASH et à tous les autres.

À l'équipe de radiothérapie du CHU : Julie, Caroline, Nadine et tous les autres.

À l'équipe d'hépatogastroentérologie de Chambéry : Simona, Maria pour tout ce que vous m'avez appris en endoscopie, Francois, Olivier, Christophe et Delphine.

À l'équipe d'hépatogastroentérologie d'Annecy que je croise régulièrement aux congrès et réunions.

Et évidemment,

A ma femme, Camille qui m'a toujours soutenu et sans qui je ne serais rien.

TABLES DES MATIERES

Remerciements	3
Table des matières	7
Liste des abréviations	8
Résumé français	11
Partie I : Cholangiocarcinome - Revue de la littérature	13
Epidémiologie	14
Facteurs de risque	14
Classifications	15
Physiopathologie	17
Diagnostic	23
Traitement	27
Partie II : Article original	37
Partie III : Discussion	67
Discussion	68
Méthodes diagnostiques alternatives ou complémentaires	72
Références - Parties I et III	76
Annexes	85
Conclusion	91
Liste des enseignants	93
Serment d'Hippocrate	97

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

AKT-1 : protéine kinase B ou sérine thréonine kinase 1

APC : adenomatous polyposis coli

ARN : acide ribonucléique

AUC : aire sous la courbe ou area under ROC curve

BRAF : v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

CA 19-9 : carbohydrate antigène 19-9

CCA : cholangiocarcinome

iCCA : cholangiocarcinome intra-hépatique

pCCA : cholangiocarcinomes péri-hilaire ou proximal

dCCA : cholangiocarcinomes distal

CDKN2 : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CECAM6 : carcinoembryonic cell adhesion molecule 6

CHC : carcinome hépato-cellulaire

CK2 : caséine kinase 2

COX-2 : cyclo-oxygénase 2

CPRE : cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique

CSAB : cellules souches de l'arbre biliaire

CSH : cellules souches hépatiques

CSP : cholangite sclérosante primitive

CT scan : computed tomography scan

DEB-TACE : drug eluting bead-TACE

EEBP : écho-endoscopie bilio-pancréatique

EGFR : epidermal growth factor receptor

ERBB2 : V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

ERCP: Endobiliary brushing during endoscopic retrograde cholangiopancreatography

ERK : extracellular-signal-regulated kinase

FFCD : fédération francophone de cancérologie digestive

FISH : fluorescence in situ hybridization

GEMCIS : gemcitabine-cisplatine

GEMOX : gemcitabine-oxaliplatine

HGF: facteur de croissance hépatocytaire

hMLH1 : human MutL homolog 1

HOXB7 : homeobox B7

H-Ras : Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

IC95 : intervalle de confiance à 95%

IL-6 : interleukine

IMP3 : insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IRM : imagerie par résonance magnétique

KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LT-SV40 : large T-simian virus 40

MAP : mitogen-activated protein

MCL-1 : myeloid cell leukemia 1

MEK : mitogen-activated protein kinase/ERK kinase

MMR : mismatch repair

MRI: magnetic resonance imaging

mTOR : mechanistic target of rapamycin

NEK2 : sérine/thréonine kinase 2

NPV : negative predictive value

OMS : organisation mondiale de la santé

P38 : famille des « mitogen activated protein » (MAP)-kinases

PBH : ponction biopsie hépatique

PCR : polymerase chain reaction

PDGFB : platelet-derived growth factor-beta

PPV : positive predictive value

PTEN : phosphatase and TENsin homolog

RCC : radiochimiothérapie concomitante

RFP : radiofréquence percutanée

RNA : ribonucleic acid

SBRT : stereotactic body radiotherapy

Se : sensitivity

SG : survie globale

SIRT : selective intraarterial radiotherapy

SMAD4 : mothers against decapentaplegic homolog 4

SOCS3 : suppressor of cytokine signaling 3

Sp : specificity

SSP : survie sans progression

STAT-3 : signal transducer and activator of transcription 3

TACE : transarterial chemoembolisation

TDM : tomodensitométrie

TEP-FDG : tomographie par émission de positons au 18-fluoro-désoxyglucose

TGF β : transforming growth facteur β

TNF : tumor necrosis factor

TNM - AJCC - UICC : tumor node metastasis - American Joint Committee on Cancer - Union
for International Cancer Control

TP53 : tumor protein p53

RESUME

Le brossage biliaire des sténoses suspectes au cours d'une cholangiopancreatographie rétrograde endoscopique (CPRE) est considéré comme spécifique mais très peu sensible. L'objectif de cette étude était de comparer l'association du brossage biliaire et de l'aspiration de bile avant et après brossage biliaire par CPRE, au brossage biliaire seul.

Patients et Méthode :

Entre janvier 2007 et décembre 2012, les patients ayant bénéficié d'une CPRE dans le traitement d'une sténose biliaire ont été inclus. Les sténoses secondaires à une compression extrinsèque ont été exclues, et les sténoses étaient considérées comme indéterminées lorsque les imageries pré opératoires ne permettaient aucune orientation étiologique. Les résultats des examens cytologiques étaient confirmés soit par analyse histologique, soit par le suivi du patient.

Au cours de la CPRE, une cytobrosse protégée par un cathéter de 8 Fr était montée sur fil guide et mise en place au niveau de la sténose. 3 à 10 ml de bile étaient aspirés par le cathéter avant et après le brossage biliaire et les 3 prélèvements étaient analysés en cytologie. Le résultat était considéré comme positif lorsque la présence de cellules malignes était constatée.

Résultats :

111 patients ont été inclus. 51 présentaient une sténose maligne (46%) dont 43 cholangiocarcinomes. 60 sténoses étaient bénignes (54%). La cellularité des aspirations de bile étaient statistiquement supérieure à celle du brossage ($p < 0,0001$). Tous les prélèvements avaient une spécificité et une valeur prédictive négative de 100%. La sensibilité de l'association des 3 prélèvements étaient significativement supérieure au brossage seul : Se=84% vs 67% ($p=0,004$). L'incorporation des résultats suspects aux résultats positifs permettait une augmentation de la sensibilité à 94% pour l'association vs 80% pour le brossage seul ($p=0,008$). Enfin, l'association était supérieure au brossage dans les sténoses indéterminées de manière non significative : Se=63% vs 44% ($p=0,06$).

Conclusion :

L'aspiration de bile avant et après brossage, associée au brossage biliaire est une procédure simple et efficace qui permet une augmentation significative des performances diagnostiques de la cytologie biliaire. Elle doit donc être ajoutée à la procédure diagnostique standard pour optimiser le diagnostic des sténoses biliaires malignes.

PARTIE I

Cholangiocarcinome - Revue de la littérature

EPIDEMIOLOGIE

Le cholangiocarcinome (CCA) est la deuxième cause de tumeur hépatique primitive dans sa forme intra hépatique, et le deuxième cancer bilio-pancréatique dans sa forme extra hépatique. Cela reste une maladie rare qui représente 3% des cancers digestifs (1) et qui a une incidence de 1,3 cas pour 100 000 habitants en France (2) (Annexe 1). Cette dernière est cependant en augmentation (3, 4), est très variable d'une région à l'autre du monde, et peut atteindre jusqu'à 80 cas pour 100 000 habitants dans le Nord de la Thaïlande (2). La grande majorité des patients présente une maladie non résecable au moment du diagnostic avec une survie médiane inférieure à 12 mois (1) et une survie à 5 ans inférieure à 5% (5). Lorsqu'une résection est possible, la survie à 5 ans varie entre 8 et 47% pour les cholangiocarcinomes proximaux, et entre 20 et 54% pour les tumeurs distales, selon les séries (1).

FACTEURS DE RISQUE

Les principaux facteurs de risque décrits sont l'âge, avec 65% des patients ayant un âge supérieur à 65 ans au diagnostic (1), et la présence d'une cholangite sclérosante primitive (CSP) avec une incidence cumulée au cours de la vie de 5 à 10% et un âge moyen au diagnostic de 40 ans (6, 7). Cette dernière est plus fortement associée aux cholangiocarcinomes périhilaires (pCCA) (7), et dans 30 à 50 % des cas, le CCA se développe dans les 24 mois qui suivent le diagnostic de CSP (6, 7). Une autre pathologie semble clairement associée à la survenue de cholangiocarcinome, il s'agit de la maladie de Caroli avec une incidence cumulée au cours de la vie de 6 à 30% et un âge moyen au diagnostic de 32 ans (7). Il a également été décrit d'autres facteurs de risque tels qu'un antécédent d'adénome des voies biliaires, ou de sphinctérotomie biliaire, la présence d'une

papillomatose des voies biliaires, de lithiases cholédociennes chroniques, de kystes cholédociens avec un risque de transformation de 5%, et le tabagisme notamment lorsqu'il est associé à la CSP (1, 4, 8).

Un certain nombre de facteurs de risque semblent plus spécifiquement associés au cholangiocarcinome intra-hépatique (iCCA) tels que le syndrome métabolique, la cirrhose, l'hépatite B, surtout dans les pays asiatiques et l'hépatite C dans les pays occidentaux (5, 7). Enfin, les lithiases intra-hépatiques, rares en occident, mais plus fréquentes en Asie, semblent également être un facteur de risque puisque 7% des patients qui en sont porteurs, développeront un iCCA au cours de leur vie (9).

Enfin, certains polymorphismes génétiques semblent associés à un risque augmenté de cholangiocarcinome. Cela concerne les gènes MTHFR, TYMS, GSTO1, et XRCC1 impliqués dans la réparation de l'ADN, les gènes ABCC2, CYP1A2, et NAT2 responsables de la protection cellulaire contre les toxines, et les gènes KLRK1, MICA, et PTGS2, acteurs de l'immunosurveillance anti-tumorale (7).

Toutefois, la plupart des cholangiocarcinomes restent sporadiques, et aucune étiologie n'est retrouvée dans la majorité des cas.

CLASSIFICATIONS

Les cholangiocarcinomes sont classés en 3 catégories selon leur topographie : les cholangiocarcinomes péri-hilaires ou proximaux, qui représentent 50 à 70% des cas et qui correspondent aux tumeurs siégeant au niveau des canaux hépatiques droit et gauche, le hile et le canal hépatique commun (incluent les tumeurs anciennement appelées Klatskin), les cholangiocarcinomes distaux (dCCA) qui concernent les tumeurs localisées au niveau de la voie biliaire principale en aval de l'insertion du canal cystique (20 à 40% des cas), et les cholangiocarcinomes intra-hépatiques, qui représentent moins de 10% des CCA (1, 7). La

proportion de iCCA a souvent été surestimée dans les anciennes séries car un certain nombre d'entre elles incluait les tumeurs péri-hilaires dans les iCCA.

Le degré d'envahissement loco-régional, ainsi que les extensions ganglionnaire et métastatique de ces 3 catégories de CCA sont évalués selon 3 classifications TNM-AJCC-UICC 2010 distinctes détaillées en annexe 2. Il existe également une classification TNM-AJCC-UICC 2010 pour les cholangiocarcinomes vésiculaires qui ne sont pas traités dans ce travail. Aussi, les formes mixtes associant iCCA et carcinome hépatocellulaire (CHC) ont été récemment considérées comme un sous-type à part entière de cholangiocarcinome et représentent moins de 1% des tumeurs intra-hépatiques (7).

Enfin, les iCCA sont eux-mêmes classés en fonction de leur type de croissance tumorale, selon qu'il y a formation d'une véritable masse tumorale bien individualisée (« mass-forming type »), une infiltration péri-canalaire avec extension longitudinale (« periductal-infiltrating type »), ou une extension intra-canalaire avec formation d'un thrombus tumoral intra canalaire (« intraductal growth type ») (10, 11). Le premier sous-type est le plus fréquent et a le plus mauvais pronostic avec les tumeurs péri-canalaire (7). Les iCCA correspondent souvent à une association de plusieurs sous-types qui doivent clairement apparaître dans leur description radiologique et/ou anatomopathologique. De la même manière, les pCCA sont divisés en 2 catégories : la forme exophytique qui peut soit prendre l'aspect d'une masse tumorale bien individualisée (forme la plus fréquente de pCCA), soit avoir une extension péri-canalaire, et la forme intra-canalaire qui inclut les formes à croissance intra-canalaire, les formes mucineuses, les formes papillaires et les formes kystiques (7, 10, 11).

PHYSIOPATHOLOGIE

Origine cellulaire

L'histoire naturelle du cholangiocarcinome respecte la séquence hyperplasie, dysplasie de bas à haut grade, néoplasie intra-épithéliale puis carcinome invasif. Dans 90% des cas il s'agit d'un adénocarcinome peu à bien différencié, mais il existe de nombreux autres types histologiques au niveau intra et extra-hépatique détaillés dans la Table 1. Différents modèles tentent de définir l'origine cellulaire des cholangiocarcinomes, or cette dernière semble multiple, et varie selon les types histologiques de CCA.

CCA intra-hépatiques	CCA extra-hépatiques
Adénocarcinome	Adénocarcinome
Carcinome adénosquameux ou squameux	Adénocarcinome papillaire
Carcinome cholangiocellulaire	Adénocarcinome mucineux
Carcinome mucineux	Adénocarcinome de type intestinal
Carcinome à cellules en bague à chaton	Adénocarcinome à cellulaires claires
iCCA sarcomateux	Carcinome adénosquameux
Carcinome lympho-épithéliomateux	Carcinome à cellules en bague à chaton
Carcinome à cellules claires	Carcinome à cellules claires
Carcinome muco-épidermoïde	Carcinome à cellules squameuses
	Carcinome indifférencié

Table 1 : Différents types histologiques de cholangiocarcinome selon la classification histologique de l'OMS 2000 (12)

Les cellules souches semblent fortement impliquées dans la cancérogénèse du cholangiocarcinome. Au niveau hépato-biliaire, 2 types de cellules souches sont présentes : les cellules souches hépatiques (CSH) et les cellules souches de l'arbre biliaire (CSAB). Les CSH sont présentes au niveau des canaux de Hering et ont la capacité de se différencier en hépatocytes ou en cholangiocytes. Étant activées dans la plupart des hépatopathies chroniques, elles peuvent induire divers processus tumoraux selon les stimuli pathologiques qu'elles reçoivent. Les CSH semblent être à l'origine de la formation des formes mixtes de CHC et de iCCA (13), et lorsqu'elles sont au stade de cholangiocytes immatures, elles sont impliquées dans la formation des iCCA tels que le carcinome cholangiocellulaire (14, 15).

Les CSAB sont situées au niveau des glandes péri-biliaires qui sont des glandes mucineuses présentes de l'extrémité distale de la voie biliaire principale aux canaux intra-hépatiques segmentaires. Elles sont particulièrement nombreuses au niveau de la région péri-hilaire, du canal cystique et de l'ampoule de Vater qui sont des localisations classiques de CCA extra-hépatique. Les CSAB sont impliquées dans la tumorigénèse des CCA extra-hépatiques, et les iCCA des canaux biliaires de gros calibre (15).

Les cellules épithéliales biliaires matures sont également, via leur transformation, à l'origine de processus de cancérogénèse. En effet, les cholangiocarcinomes extra-hépatiques proximaux et distaux peuvent être issus de la transformation de cholangiocytes matures (11), de même que les CCA extra-hépatiques et les iCCA de types mucineux peuvent être issus de la transformation de cellules cylindriques productrices de mucine présentes au niveau hilaire et au niveau des canaux biliaires intra-hépatiques de gros calibre. Ils partagent dans ce cas des profils génétiques et immunohistochimiques similaires (10, 15). Aussi, une étude récente a démontré que quelque soit le degré de maturité des cellules issues de la lignée des CSH, leur transformation peut induire la formation de iCCA et de CHC. En effet, sur lignées cellulaires puis dans un modèle murin, la transfection par les oncogènes « Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog » (H-Ras) et « Large T-Simien virus 40 » (LT-SV40) d'hépatocytes, d'hépatoblastes, et de CSH aboutissait à une véritable reprogrammation cellulaire avec la capacité de se différencier en divers types cellulaires, et l'initiation de processus de tumorigénèse à l'origine de différents types histologiques du CHC jusqu'au iCCA. Ce modèle corrobore l'hypothèse des multiples origines cellulaires des cholangiocarcinomes et confirme l'intrication probable de plusieurs mécanismes dans la cancérogénèse des voies biliaires (16).

Inflammation et cancérogénèse

Dans les pathologies associées à un risque augmenté de cholangiocarcinome, il existe souvent un contexte d'inflammation chronique. Cette dernière est à l'origine de la production de nombreux facteurs tels que des cytokines, et des signaux intra et/ou

extracellulaires qui peuvent participer à la cancérogénèse comme illustré par la Figure 1. Par exemple, les cytokines pro-inflammatoires vont activer l'oxyde nitrique syntase inductible, aboutissant à des lésions de l'ADN et à une inhibition des enzymes réparateurs de l'ADN.

L'interleukine (IL)-6, de son côté, va stimuler la survie et la prolifération cellulaires par des mécanismes autocrines ou paracrines, et va amplifier l'expression du gène « myeloid cell leukemia » (MCL)-1, qui va induire une résistance à l'apoptose médiée par le « tumor necrosis factor » (TNF). L'amplification de MCL-1 est secondaire à l'activation du « signal transducer and activator of transcription » (STAT)-3 et de la protéine kinase B ou sérine thréonine kinase (AKT)-1 par l'IL-6 (17, 18). STAT-3 est impliquée dans la différenciation cellulaire, l'apoptose et la prolifération cellulaire (11). AKT-1 est un acteur majeur de la voie de signalisation « mechanistic target of rapamycin » (mTOR)/AKT ; il va induire des signaux de survie, de prolifération, d'angiogénèse, et de migration cellulaire avec la production de métastases (19, 20). Par conséquent, les cytokines pro-inflammatoires ont un effet mutagène via des lésions de l'ADN, un effet anti-apoptotique, et un effet prolifératif favorisant ainsi la transformation cellulaire et la tumorigénèse.

Le récepteur au facteur de croissance épidermique ou « epidermal growth factor receptor » (EGFR) a également un rôle pivotale dans la cancérogénèse du CCA, car comme illustré dans la Figure 1, il active la voie Ras/Raf/« Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase » (MEK)/« extracellular-signal-regulated kinase » (ERK) induisant ainsi des signaux de survie cellulaire, de prolifération et d'angiogénèse. L'EGFR stimule également la voie mTOR/AKT (11, 21), et son activation est souvent associée à l'amplification d'un autre récepteur tyrosine-kinase de la même famille, le récepteur de la protéine erbB-2 également appelé « V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 » (ERBB2). Ce dernier est amplifié dans 30% des CCA et est associé à un mauvais pronostic (22). Dans le contexte d'inflammation, l'EGFR est à la fois activé par l'hyper-expression d'IL6, mais également par la surexpression du facteur de croissance hépatocytaire (HGF) et de son récepteur, le proto-oncogène MET. Par ailleurs, la surexpression de HGF et MET est associée à une augmentation de l'invasivité tumorale et

du potentiel métastatique des CCA, ainsi qu'à l'activation de différentes voies de signalisation telles que mTOR-AKT, STAT3, et la voie des « mitogen-activated protein » (MAP) kinases (23).

Enfin, la cholestase, est également impliquée dans la tumorigénèse du cholangiocarcinome par l'activation de l'EGFR via l'accumulation des acides biliaires, et par l'activation de la cyclo-oxygénase (COX)-2 qui entretient l'inflammation (11) (Figure 1).

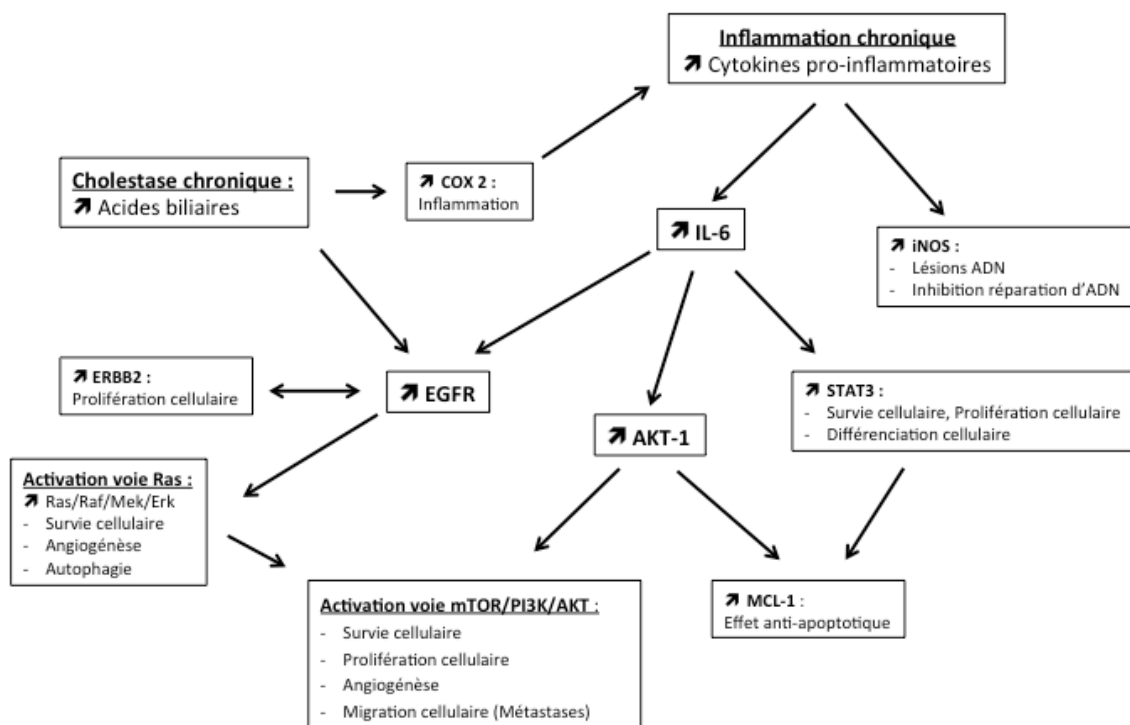


Figure 1 : Implication de l'inflammation et de la cholestase dans la cancérogénèse du cholangiocarcinome

iNOS : « inducible nitric oxide synthase »

IL6 : interleukine 6

STAT3 : « signal transducer and activator of transcription »

AKT-1 : sérine-thréonine kinase 1 ou protéine kinase B

P38 : famille des « mitogen activated protein » (MAP)-kinases

MCL-1 : « myeloid cell leukemia sequence » 1

EGFR : « epidermal growth factor receptor»

COX2 : cyclo oxygénase 2

ERBB2 : « V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

Génétique et cancérogénèse

Dans la cancérogénèse du cholangiocarcinome, de multiples voies de signalisation telles que les voies mTOR/AKT ou Ras/Raf/MEK/ERK comme précédemment décrit, sont dérégulées par divers stimuli ou situations pathologiques. Par ailleurs, un certain nombre d'aberrations chromosomiques, de mutations génétiques et de modifications épigénétiques ont également été retrouvées au niveau des tumeurs de CCA. Ces modifications sont autant de voies d'échappement potentielles aux différentes thérapies ciblées, pouvant expliquer les échecs thérapeutiques et le développement rapide de résistances.

Au niveau des tumeurs de CCA, de nombreuses aberrations chromosomiques sont observées, et sont responsables d'un polymorphisme du nombre de copies de certains gènes d'intérêt à l'origine d'une dysrégulation probable des voies de signalisation. En effet, une étude récente portant sur 32 CCA dont 7 iCCA et 25 CCA extra-hépatiques, a mis en évidence des duplications au niveau des régions codant pour le récepteur ERBB2, la protéine « mitogen-activated protein kinase kinase 2 » (MEK2) de la voie Ras/Raf/MEK/ERK, le facteur de croissance « platelet-derived growth factor-beta » (PDGFB), dans la totalité des échantillons. Par ailleurs, des duplications ont aussi été retrouvées au niveau du gène MTOR dans 88% des cas, et au niveau des gènes « vascular endothelial growth factor » (VEGF)-A et EGFR dans respectivement 38 et 31% des cas (24).

De multiples mutations génétiques sont impliquées dans la cancérogénèse du CCA. Ainsi l'inactivation du gène suppresseur de tumeur « tumor protein p53 » (TP53) est retrouvée dans 44% des CCA (7), et l'activation de l'oncogène « Kirsten rat sarcoma viral oncogene Homolog » (KRAS), dans 53% des pCCA et dans 17% des iCCA. Par ailleurs, l'inactivation du gène « mothers against decapentaplegic homolog » (SMAD)4 est présente dans 17% des CCA et est à l'origine d'une dérégulation du « transforming growth factor β » (TGF β). Ce dernier perd alors ses fonctions normales (induction de l'apoptose, régulation de la différenciation cellulaire, inhibition de la prolifération et de la migration cellulaires), et va à l'inverse augmenter l'invasivité tumorale et la formation de métastases en induisant une immunotolérance de l'environnement péri-tumoral, et une inhibition des enzymes dégradant

les composants de matrice extra-cellulaire. Il va de plus stimuler l'angiogénèse (25). Enfin, une mutation activatrice du proto-oncogène « v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B » (BRAF) est retrouvée dans 0-20% des cas selon les séries, et aucune mutation de ERBB2 ne semble impliquée dans la cancérogénèse du CCA (26)

Sur le plan épigénétique, un certain nombre de modifications post-traductionnelles ont été mises en évidence dans la cancérogénèse du CCA. Ainsi, l'hyperméthylation est un processus épigénétique responsable de l'extinction de gènes suppresseurs de tumeur tels que le gène « cyclin-dependent kinase inhibitor 2A » (CDKN2) codant pour la protéine p16^{INK4a} qui a un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire, le gène « human MutL homolog 1 » (hMLH1) qui code pour le système de réparation de l'ADN « mismatch repair » (MMR), ou encore le gène « adenomatous polyposis coli » (APC) dans respectivement 17 à 83%, 19 à 45% et 27 à 47% des iCCA (26). Le gène « suppressor of cytokine signaling 3 » (SOCS3) est également éteint dans 63% des iCCA, ce qui aboutit à une hyperactivation de la voie IL6-STAT3 décrite précédemment, notamment chez les patients porteurs de CSP. Enfin, l'activation de l'EGFR par l'IL6 (Figure 1) semble également secondaire à un mécanisme épigénétique puisque l'hyper-expression d'IL6 est responsable d'une diminution de la méthylation du promoteur de l'EGFR, ce qui aboutit à une augmentation de son expression (21).

Ces différentes modifications génétiques et épigénétiques sont essentielles dans la compréhension de la physiopathologie du CCA, et ont souvent un intérêt pronostique. Ainsi, une activation ou une augmentation d'expression de KRAS, BRAF, EGFR, ERBB2, TGFβ ou encore MET sont associées à un mauvais pronostic, de même qu'une inhibition de p53 ou du gène suppresseur de tumeur « phosphatase and TENsin homolog » (PTEN) (7, 22, 26).

DIAGNOSTIC

Le principal symptôme inaugural du cholangiocarcinome est l'ictère plus ou moins associé à une angiocholite, et survenant dans un contexte d'asthénie, d'amaigrissement, et plus rarement, de douleurs abdominales. Le diagnostic est souvent tardif du fait d'une longue phase initiale asymptomatique de développement du cancer. Cette phase de latence clinique est particulièrement fréquente dans les iCCA et, est en partie responsable du mauvais pronostic de cette pathologie.

Examens radiologiques

La réalisation d'examens morphologiques est indispensable à la fois pour les diagnostics positif et différentiel, mais aussi dans l'évaluation de l'extension loco-régionale et à distance, ainsi que dans le bilan de résecabilité.

Tomodensitométrie (TDM) avec injection de produit de contraste

La TDM avec injection de produit de contraste reste l'examen de référence. Elle est très performante dans la détection des lésions intra-hépatiques de plus de 1 cm (1) et dans l'évaluation de la résecabilité des iCCA (10, 11). À l'inverse du CHC, les caractéristiques radiologiques typiques du iCCA consistent en une hypodensité spontanée, et une prise de contraste progressive d'abord périphérique au temps artériel, puis étendue à la totalité de la lésion au temps portal, sans lavage tardif (2, 7). Une récente étude rétrospective de 32 patients cirrhotiques avec iCCA prouvé histologiquement a démontré que si la détection des nodules intra-hépatiques était bonne, évaluée à 95%, le diagnostic différentiel entre iCCA, et CHC reste difficile, car seulement 70% des iCCA avaient des caractéristiques radiologiques typiques (27). Enfin, la TDM est nettement moins performante dans l'évaluation de la résecabilité des lésions périhilaires avec une précision diagnostique de 60-88%, et dans l'évaluation de l'envahissement ganglionnaire avec une sensibilité de seulement 54% (10).

IRM hépatique et cholangio-IRM

L'IRM est également un examen de choix dans le diagnostic du cholangiocarcinome, et elle doit associer des séquences de cholangio-IRM pour une bonne visualisation de l'arbre biliaire, et d'IRM hépatique avec injection de gadolinium pour une analyse optimale du parenchyme hépatique. Elle présente des performances comparables à la TDM dans le diagnostic des iCCA, et semble supérieure dans l'évaluation de la résécabilité et de l'extension intra-canaulaire des cholangiocarcinomes extra-hépatiques avec une précision diagnostique supérieure à 95% grâce aux séquences de cholangio-IRM (11).

Tomographie par émission de positons au 18-Fluoro-désoxyglucose (TEP-FDG)

La TEP-FDG n'est pas considérée comme une référence dans le bilan diagnostic systématique, qu'il s'agisse du diagnostic positif ou du bilan d'extension, car elle présente des performances diagnostiques inférieures. C'est dans les formes intra-hépatiques, qu'elle est la plus intéressante avec une sensibilité dans la détection des nodules intra-hépatiques de plus de 1 cm, lorsqu'ils sont bien individualisés, de 80 à 95% selon les études et une spécificité proche de 100% (2, 7, 10). Dans les formes hilaires et distales, sa sensibilité et sa spécificité sont proches de 70% (10). Par ailleurs, les performances de la TEP-FDG restent très hétérogènes dans la littérature, et elle est moins performante dans les formes infiltrantes de CCA. Enfin, son utilité est discutée car sa réalisation modifie la conduite à tenir dans seulement 20 à 30% des cas (1, 2, 28).

Les examens morphologiques sont donc une aide indispensable au diagnostic positif du cholangiocarcinome intra ou extra hépatique, mais ils ne sont pas suffisants pour faire le diagnostic de certitude. Lorsque la tumeur est considérée comme résécable, et que la suspicion de cholangiocarcinome après le bilan radiologique est très forte, alors une exérèse chirurgicale peut être envisagée sans examen anatomopathologique préalable. En dehors de cette situation, une preuve anatomopathologique est requise.

Diagnostic anatomopathologique

Ponction Biopsie Hépatique (PBH) percutanée

Lorsqu'il s'agit d'une lésion intra-hépatique, la PBH percutanée échoguidée est indiquée pour confirmation histologique et immunohistochimique avec recherche des cytokératines 7 et 20 dont la positivité permettra d'exclure un CHC (2, 10) ou une forme mixte de iCCA-CHC, et orientera vers un iCCA, sans exclure cependant une métastase d'un cancer primitif bilio-pancréatique ou gastrique (10).

Cytoponction guidée par écho-endoscopie bilio-pancréatique (EEBP).

Cette technique permet à la fois d'aider au diagnostic positif, d'évaluer l'extension loco-régionale et notamment ganglionnaire, et de réaliser un prélèvement cytologique pour obtention d'un diagnostic de certitude. Ses performances dans l'étude de l'envahissement ganglionnaire sont excellentes (10), comparables à celles de la cholangio-IRM, mais elle est plus invasive, et la réalisation d'une cytoponction peut-être responsable d'un essaimage métastatique (10, 11). Une étude récente a en effet montré dans une série de patients en cours de bilan pré-transplantation après chimiothérapie néo-adjuvante dans le traitement d'un cholangiocarcinome, que lorsqu'une cytoponction était réalisée, un envahissement péritonéal métastatique était retrouvé dans 83% des cas au moment du staging chirurgical, versus 8% chez les patients non ponctionnés (29). D'autres part, pour les iCCA, la PBH est plus facilement réalisable avec un meilleur rendement, et concernant les pCCA, et les dCCA, une cholangiopancreatographie rétrograde endoscopique est souvent réalisée en première intention afin d'effectuer un drainage biliaire. Si l'EEBP est réalisée dans le cadre du bilan d'extension loco-régionale, la cytoponction n'est justifiée qu'en l'absence de résécabilité.

Brossage biliaire par cholangiopancreatographie rétrograde endoscopique (CPRE)

La CPRE ne doit être réalisée que lorsqu'elle présente un intérêt thérapeutique, du fait de son caractère invasif. Elle permet en effet la réalisation d'un drainage biliaire par sphinctérotomie et pose d'endoprothèse biliaire plastique ou métallique en regard de la

sténose. Cette étape est souvent nécessaire de manière précoce dans la prise en charge des patients du fait de la fréquence de l'ictère et de l'angiocholite au moment du diagnostic de cholangiocarcinome, notamment lorsqu'il est péri-hilaire ou distal. La CPRE est également très performante sur le plan diagnostique car elle permet une visualisation et une caractérisation optimales de la sténose,, et offre une cartographie de l'arbre biliaire, très utile dans la recherche d'éventuelles localisations tumorales biliaires secondaires.

Par ailleurs, au cours de cette CPRE, des prélèvements endobiliaires peuvent être réalisés afin d'obtenir un diagnostic cytologique de la sténose, notamment par brossage. En effet, le brossage endobiliaire est la technique de référence, décrite en 1975 par Osnes *et al* (30). Elle permet l'obtention de prélèvements cytologiques sans augmenter l'invasivité du geste, mais malgré une excellente spécificité proche de 100%, sa sensibilité reste médiocre, variant entre 41 et 45% dans la littérature (31-33).

D'autres prélèvements sont classiquement réalisés au cours de la CPRE, tels que les biopsies intra-canalaires, mais souffrent également d'un rendement modeste avec une sensibilité inférieure à 50% (33).

Marqueurs sériques :

Le marqueur sérique carbohydate antigène (CA) 19.9 a une sensibilité et une spécificité de 60% dans les iCCA, et dans les formes extra-hépatiques (2, 11). Il semble légèrement plus performant dans un contexte de cholangite sclérosante primitive avec une sensibilité et une spécificité de 80%. Malgré ses faibles performances diagnostiques, il est encore classiquement utilisé car il peut avoir un intérêt pronostique et dans le suivi des patients (2, 10).

TRAITEMENT

Résection chirurgicale et transplantation hépatique

Cholangiocarcinome intra-hépatique

Lorsque la maladie est considérée comme résécable sur les imageries pré-opératoires, si la suspicion de cholangiocarcinome est forte, une exérèse chirurgicale doit être envisagée d'emblée (2, 7, 10, 11). Cette résection doit respecter des marges d'exérèse d'au moins 1 cm en zone saine pour être considérée comme R0, ce qui n'est possible que dans 30% des cas (7). Elle requiert la réalisation d'une hépatectomie majeure et/ou d'une résection de la convergence biliaire dans respectivement 78% et 29% des cas (2), mais ces dernières ne doivent en aucun cas être systématiques. Le curage ganglionnaire n'est pas un standard et son intérêt est controversé, mais il semble apporter des informations pronostiques intéressantes (2). En effet, dans une étude récente, 30% des patients bénéficiant de l'analyse anatomopathologique d'au moins un ganglion, présentaient un envahissement ganglionnaire, ce qui était associé à une baisse significative de la survie globale (SG) (34). Après résection chirurgicale, le pronostic reste mauvais, avec 60 à 65% de récurrence, une survie sans progression (SSP) médiane de 26 mois, et une survie globale à 5 ans de 15 à 40% (2). Ce pronostic est particulièrement sombre en cas d'envahissement vasculaire et d'envahissement ganglionnaire macroscopique avec une survie à 5 ans inférieure à 20%, c'est pourquoi leur présence doit contre-indiquer la résection (2).

La transplantation hépatique n'est pour l'instant pas recommandée dans la prise en charge du iCCA du fait de ses résultats décevants (2, 7, 11). En effet, 70% des patients bénéficiant d'une transplantation hépatique dans cette indication vont récidiver dans les 5 ans, avec une survie médiane sans progression de 8 mois (11), et les études rapportent des survies globales à 3 ans variant entre 30 et 50% (2). Ces résultats sont donc bien inférieurs aux 73% de survie à 5 ans obtenus lorsque l'indication de la transplantation hépatique est la cirrhose (2). Seuls les iCCA inférieurs à 2 cm, survenus dans un contexte de cirrhose

semblent bénéficier de la transplantation hépatique avec des résultats comparables à ceux obtenus dans le traitement du CHC (11).

Cholangiocarcinome extra-hépatique proximal

Il s'agit d'une chirurgie complexe et standardisée dont la réalisation dépend de la classification de Bismuth-Corlette, basée sur la localisation et l'extension canalaire de la tumeur, ainsi que son extension vasculaire veineuse et artérielle (35). Cette chirurgie associe une lobectomie hépatique, une résection monobloc de la voie biliaire principale, un curage ganglionnaire régional, et une dérivation biliaire hépatico-jéjunale avec un montage de type anse en Y (7, 11). En cas de volume hépatique post-opératoire insuffisant, une embolisation portale pré-opératoire du futur lobe réséqué peut être réalisée, afin de créer une hypertrophie controlérale compensatoire (11). Les envahissements vasculaires et/ou ganglionnaires sont des facteurs de mauvais pronostic qui doivent sérieusement remettre en question la réalisation d'une chirurgie car cette dernière s'avère souvent futile. Lorsque l'envahissement vasculaire est contro-latéral ou bilatéral, ou lorsque l'extension canalaire est bilatérale et va au-delà des canaux hépatiques droit et gauche, la chirurgie est formellement contre-indiquée (11).

Enfin, si un ictère important, ou une angiocholite sont présents, un drainage avec pose d'endoprothèse biliaire doit être effectué dans un premier temps, afin de lever l'obstruction biliaire et le sepsis, permettant ainsi d'améliorer l'état général du patient et de réaliser un traitement chirurgical dans de meilleures conditions (7). Lorsqu'une résection chirurgicale est considérée comme R0, le pronostic reste péjoratif avec une survie à 5 ans variant entre 11 et 41% (11).

En cas de maladie localisée avec une tumeur inférieure à 3 cm et considérée comme non résécable, l'association d'un traitement néo-adjuvant et de la transplantation hépatique semble donner des résultats intéressants. En effet, une étude rétrospective récente rapporte une survie à 5 ans de 65%, et une survie à 10 ans de 59% dans une série de patient ayant bénéficié d'une radiochimiothérapie, et/ou d'une curithérapie, et/ou d'une chimiothérapie

d'entretien, avant transplantation hépatique (36). Ces résultats sont comparables aux autres indications de transplantation, sous réserve que cette analyse de survie n'inclut pas les patients ayant échappé aux traitements adjuvants réalisés dans l'attente de la transplantation hépatique. En effet, en analyse en intention de traiter, la survie à 5 ans était abaissée à 53% (36).

La transplantation est toujours en cours d'évaluation, elle ne constitue donc pas un standard thérapeutique, et sa réalisation ne peut avoir lieu que dans le cadre de protocoles de recherche clinique.

Cholangiocarcinome extra-hépatique distal

Le traitement chirurgical du dCCA consiste en une résection de la voie biliaire principale avec une duodéno pancréatectomie céphalique et un curage ganglionnaire régional. Lorsque la résection est considérée comme R0, la survie à 5 ans est de 27% (11). Il n'y a pas d'indication de transplantation hépatique dans le traitement des dCCA.

Traitements loco-régionaux

Seulement 30% des patients sont résécables au moment du diagnostic, or l'apparition de métastases est tardive dans la physiopathologie du cholangiocarcinome. Ainsi, de nouvelles techniques thérapeutiques se sont développées afin d'améliorer le pronostic des patients ne pouvant bénéficier d'une chirurgie à visée curative malgré une maladie considérée comme localisée.

Radiofréquence percutanée

La radiofréquence percutanée (RFP) ne constitue pas un standard thérapeutique, mais peut être discutée dans des iCCA non résécables inférieurs à 5 cm et notamment de moins de 3 cm. La proximité de la lésion tumorale avec des axes vasculaires, où une taille supérieure à 5 cm doivent cependant favoriser une autre technique thérapeutique (37). Une étude de 17 patients avec une grande majorité de lésions inférieures à 5 cm et de patients

non opérables du fait d'un volume hépatique résiduel insuffisant, rapporte une survie sans progression médiane de 32,2 mois, et une survie globale médiane de 38,5 mois (38), avec un faible nombre de complications en dehors d'un décès par abcès hépatique. Une autre étude de 7 patients avec une taille tumorale médiane de 2,4 cm rapporte une SSP et une SG de respectivement 21,8 et 38,5 mois (39). Ainsi, le niveau de preuve en faveur de l'efficacité de la radiofréquence percutanée dans le traitement des iCCA reste très faible car ces données sont basées sur des études rétrospectives non contrôlées avec des effectifs très réduits.

Chimioembolisation artérielle

La chimioembolisation artérielle ou « transarterial chemoembolisation » (TACE) est un standard thérapeutique dans le traitement des CHC localement avancés, qui sont des tumeurs très vascularisées, permettant ainsi une bonne efficacité anti-tumorale. La vascularisation des cholangiocarcinomes intra-hépatiques est moins riche, l'efficacité de la TACE est donc moins évidente dans cette indication. L'étude de Park *et al*, incluant 155 patients et comparant de manière rétrospective, une TACE à base de cisplatine, aux soins de support exclusifs, montre une survie globale médiane de 12,2 mois chez les 72 patients traités par TACE, versus 3,3 mois de SG dans le groupe contrôle ($p < 0,001$) (40). Kiefer *et al*, dans une série rétrospective de 62 patients avec iCCA ($n=37$) ou adénocarcinome indéterminé ($n=25$) rapporte une survie globale médiane de 15 mois en réalisant une chimioembolisation associant mitomycine C, doxorubicine, et cisplatine (41). Il s'agissait cependant d'une étude non contrôlée, avec une population hétérogène, car les patients pouvaient avoir été traités par chirurgie, chimiothérapie systémique, ou RFP au préalable. Enfin, Shen *et al* a évalué l'intérêt d'une chimioembolisation adjuvante après une résection à visée curative, et cette dernière ne permettait pas d'améliorer la survie sans récurrence de manière significative, lorsque comparée à la surveillance seule (42).

Une autre technique en cours d'évaluation est la chimioembolisation par billes chargées ou « drug eluting bead-TACE » (DEB-TACE). Une étude récente compare

rétrospectivement 3 études prospectives non contrôlées non randomisées évaluant respectivement une TACE à base de mitomycine, une chimioembolisation par des microsphères d'irinotécan, et une chimiothérapie systémique par gemcitabine-oxaliplatine. L'analyse suggère que la chimiothérapie par billes chargées est supérieure à la TACE conventionnelle (SG = 11,7 vs 5,7 mois), et donne des résultats comparables à la chimiothérapie systémique (SG = 11,0 mois) (43) sous réserve d'une méthodologie discutable, et d'un index de Karnofsky significativement inférieur dans le groupe traité par TACE conventionnelle.

La plupart des études évaluant la chimioembolisation sont également rétrospectives, avec des schémas de chimiothérapie non standardisés, n'offrant ainsi qu'un faible niveau de preuve (7). Cette technique semble intéressante mais il est indispensable que des essais randomisés contrôlés soient réalisés afin de pouvoir la considérer comme une option thérapeutique sérieuse.

Radiothérapie externe et radiochimiothérapie concomitante

La radiothérapie conformationnelle classique, du fait de la radiosensibilité du parenchyme hépatique, ne permet une irradiation qu'à des doses limitées et sur un volume hépatique réduit car la dose totale hépatique ne doit pas excéder 30 Gy. Ainsi la radiothérapie stéréotaxique ou « stereotactic body radiotherapy » (SBRT) se développe pour permettre une escalade de dose au niveau tumoral, tout en limitant la dose délivrée au parenchyme non tumoral. Une étude récente non contrôlée incluant seulement 10 sujets, dont 6 étaient porteurs d'un iCCA et 3 d'un pCCA, a démontré que l'on pouvait délivrer jusqu'à 60 Gy sur la tumeur selon un schéma hypofractionné. Cela permettait un contrôle tumoral dans 25% des cas, la SSP médiane était de seulement 6,1 mois et la SG à 1 an, de 73% au prix d'une toxicité non négligeable puisqu'un sujet est décédé des suites d'une insuffisance hépato-cellulaire secondaire à l'irradiation, et un autre a présenté une sténose biliaire post-radique (44). Une autre étude rétrospective non contrôlée de 58 patients porteurs d'un iCCA nouvellement diagnostiqué (n=28) ou récidivant (n=30), traités par SBRT

à une dose médiane de 45 Gy selon un schéma hypofractionné rapporte une SG médiane de 5 mois dans le premier groupe, et de 13 mois dans le groupe de récurrences dont la grande majorité étaient tardives, préjugant de maladies moins agressives. La SG et la SSP à 1 an n'étaient que de respectivement 45 et 26% (45). Ces résultats restent donc modestes et le niveau de preuve de l'efficacité de la SBRT dans le CCA est très faible.

Certaines équipes ont donc évalué l'association d'une chimiothérapie systémique à cette irradiation externe afin de potentialiser son efficacité. Ainsi, une étude prospective de 10 patients porteurs d'un pCCA, a évalué l'association gemcitabine et SBRT (30 Gy en 3 fractions) avec des résultats prometteurs. La SSP et la SG étaient en effet respectivement de 30,0 et 35,5 mois (46). Néanmoins, il s'agissait exclusivement de CCA péri-hiliaires qui sont de meilleur pronostic que les iCCA et cette étude n'était pas contrôlée.

Enfin, l'essai de phase II FFCD 9902 a comparé une radiochimiothérapie concomitante (RCC) à base de 5-Fluorouracile et cisplatine avec une irradiation de 50 Gy en 25 fractions, au schéma GEMOX. Cette étude a été arrêtée prématurément en 2011 du fait d'un rythme d'inclusion trop lent, mais elle a montré que la chimiothérapie seule (n=16) était supérieure à la RCC (n=18), tant en survie sans progression (SSP médiane = 11,0 vs 5,8 mois), qu'en survie globale (SG = 19,9 vs 13,5 mois) (47). De même que la radiothérapie seule, le niveau de preuve d'un bénéfice de la radiochimiothérapie concomitante reste très faible avec la nécessité d'études cliniques complémentaires. Ces traitements doivent donc être discutés au cas par cas et dans un cadre pluridisciplinaire.

Radioembolisation artérielle à l'yttrium 90

La radioembolisation artérielle ou « selective intraarterial radiotherapy » (SIRT) utilise des microsphères d'yttrium 90 qui est un émetteur β pur qui se dégrade en zirconium 90 libérant ainsi une énergie moyenne de 0,94 megaélectron volt avec une demi-vie de 2,67 jours et une pénétration moyenne de 2,5 mm, jusqu'à 11 mm au maximum (37). Cette nouvelle technique semble efficace dans le cholangiocarcinome intra-hépatique, notamment du fait de sa radiosensibilité. Une étude pilote a évalué l'efficacité de la SIRT dans le

traitement des iCCA non résécables chez 58 patients et a rapporté une SG médiane de 14,9 mois dans l'ensemble de la cohorte, et de 31,8 mois chez les patients OMS 0 (n=12). Lorsqu'il s'agissait de tumeurs périphériques, la SG était de 31,8 mois versus 5,7 mois dans les formes tumorales infiltrantes, et les patients naïfs de chimiothérapie présentaient également une SG médiane de 31,8 mois versus 4,4 mois chez les patients déjà traités par chimiothérapie (48). Récemment, une autre étude rétrospective, non contrôlée, évaluant la SIRT dans une cohorte de 33 patients avec iCCA non résécables, ayant déjà reçu divers traitements préalables (chirurgie, RFP, TACE, chimiothérapie systémique) a rapporté une SSP et une SG médianes de respectivement 9,8 et 22,0 mois dans l'ensemble de la population étudiée. Elle a par ailleurs confirmé le bénéfice supérieur de la SIRT chez les patients OMS 0 avec une SSP et une SG médianes de 17,5 et 29,4 mois, et chez les patients naïfs de chimiothérapie avec une SG médiane de 22,7 versus 11,9 mois chez les patients ayant déjà reçu de la chimiothérapie (49). La SIRT semble donc être une option prometteuse dans le traitement des iCCA non résécables, notamment chez les patients en bon état général et naïfs de chimiothérapie. Ces résultats doivent cependant être confirmés par des études prospectives randomisées contrôlées dont certaines sont en cours.

L'ensemble des stratégies thérapeutiques loco-régionales sont donc en cours d'évaluation avec un niveau de preuve insuffisant à l'heure actuelle pour en faire des standards thérapeutiques. Par ailleurs, il est difficile de favoriser une technique plutôt qu'une autre comme l'a démontré Hyder *et al* dans une analyse rétrospective incluant 198 patients porteurs d'un iCCA, ayant été traités par TACE, DEB-TACE, embolisation seule, ou radioembolisation à l'yttrium 90. Cette étude rapporte en effet une survie globale de 13,2 mois sans différence significative entre ces différentes techniques (50). Il est donc indispensable de réaliser des essais prospectifs, randomisés et contrôlés avec une standardisation des schémas, afin d'évaluer plus rigoureusement ces techniques, et de définir différentes stratégies thérapeutiques selon les types de cholangiocarcinome.

Chimiothérapie

Traitement adjuvant

Aucun traitement adjuvant n'est à l'heure actuelle validé. Une récente méta-analyse incluant 6712 patients présentant un cholangiocarcinome extra-hépatique ou vésiculaire, a comparé chirurgie seule versus chirurgie associée à un traitement adjuvant (chimiothérapie ou radiothérapie ou radiochimiothérapie concomitante). Elle a démontré que la réalisation d'un traitement adjuvant n'augmentait pas de manière significative la survie. Cependant, les sous-groupes présentant un envahissement ganglionnaire, et/ou des marges envahies R1 semblaient bénéficier de manière significative de la chimiothérapie adjuvante (51). Il paraît donc raisonnable d'envisager une chimiothérapie adjuvante dans ces conditions, c'est pourquoi un certain nombre d'essais ont été réalisés dans ce sens. L'essai français de phase III PRODIGE 12-ACCORD 18 dont les résultats sont en attente, compare ainsi l'association gemcitabine-oxaliplatine (GEMOX) en situation adjuvante, à la surveillance seule. Par ailleurs, l'essai allemand ACTICCA-1 compare l'association gemcitabine-cisplatine (GEMCIS) à la surveillance seule, et est encore en cours d'inclusion.

A l'heure actuelle, la chimiothérapie adjuvante doit donc se discuter au cas par cas, en fonction notamment de la présence ou non de critères anatomopathologiques de mauvais pronostic, mais elle ne constitue en aucun cas un standard thérapeutique.

Traitement métastatique

Lorsque les patients présentent une maladie qui n'est ni accessible à un traitement chirurgical, ni à un traitement local ou loco-régional, une chimiothérapie palliative est indiquée. Le schéma de référence actuel est le GEMCIS. En effet, l'essai ABC-02 a démontré la supériorité de cette association à la gemcitabine seule, tant sur la survie globale (11,7 vs 8,1 mois ; $p < 0,001$) qui était l'objectif principal, que sur la survie sans progression (8,0 vs 5,0 mois ; $p < 0,001$) lorsque l'analyse incluait l'ensemble des sujets (52). Ce bénéfice était indépendant du stade tumoral et de la localisation du cholangiocarcinome intra ou extra-

hépatique, en dehors du sous-groupe des cholangiocarcinomes hilaires dans lequel il n'était pas significatif. La toxicité n'était par ailleurs pas significativement majorée.

Une autre option envisageable en cas d'intolérance au cisplatine, est l'association gemcitabine-oxaliplatine ou GEMOX, qui semble intéressante en terme de survie et de tolérance. Elle n'a fait l'objet que d'essais non randomisés non contrôlés de phase II (53, 54), mais est classiquement utilisée notamment dans certains essais de phase 3 évaluant des thérapies ciblées associées au GEMOX (55, 56). Un de ces essais de phase II a analysé l'efficacité et la tolérance du GEMOX dans deux groupes de patients selon leur statut de performance OMS inférieur ou supérieur à 2. Ces deux groupes présentaient, une survie globale de respectivement 15,4 et de 7,6 mois mais ils n'étaient comparé à aucun groupe contrôle (54).

Aucune thérapie ciblée n'a pour l'instant montré un bénéfice dans le traitement du cholangiocarcinome localement avancé ou métastatique. L'étude récente de phase II BINGO comparant le GEMOX seul au GEMOX-cetuximab n'a pas montré de supériorité de l'association en survie globale et sans progression (56), de même, que l'étude de phase III comparant le GEMOX seul au GEMOX-erlotinib (55). De nombreux autres essais sont en cours, évaluant ainsi le sunitinib (inhibiteur des récepteurs PDGF-R et VEGF-R, et du proto-oncogène c-Kit), le vemurafenib (inhibiteur de BRAF), le RAD001 ou everolimus (inhibiteur de mTOR), le Nab-paclitaxel, le cabozantinib (inhibiteur de cMET et VEGFR2), le CX-4945 (inhibiteur de la caséine kinase (CK)2 impliquée dans la production de métastases), etc.

En deuxième ligne, aucun schéma de chimiothérapie n'est validé dans le cholangiocarcinome. Cependant, une revue systématique de 104 essais de chimiothérapie de première ligne réalisés entre 1985 et 2006 dont seulement deux essais randomisés de phase II et un de phase III, et incluant 2810 patients au total, suggère que les fluoropyrimidines, la gemcitabine et les sels de platines sont les trois candidats les plus efficaces. Leurs performances restent cependant limitées avec un taux de réponse médian de 23%, et des survies sans progression et globale médianes de respectivement 4,1 et 8,2 mois (57). Ainsi, si les schémas GEMCIS ou GEMOX ont été réalisés en première ligne, un

schéma de deuxième ligne à base de fluoropyrimidine pourrait donc être envisagé. Des essais randomisés contrôlés doivent cependant confirmer cette stratégie.

Le cholangiocarcinome est une maladie de très mauvais pronostic avec une survie à 5 ans inférieure à 5 %. L'unique situation où un prélèvement à visée anatomopathologique n'est pas indispensable est lorsque le CCA est considéré comme résécable d'emblée sur les examens radiologiques, ce qui représente moins de 30% des cas. Ainsi, une preuve anatomopathologique devra être obtenue chez plus de 70% des patients afin de déterminer la suite de la prise en charge. Par ailleurs, les pCCA et dCCA sont majoritairement révélés par un ictère obstructif et nécessitent par conséquent, un drainage dans les premiers temps de la prise en charge.

Ainsi, l'objectif de notre étude était d'évaluer une nouvelle méthode de prélèvement cytologique endobiliaire associant aspiration de bile et brossage biliaire au cours de la CPRE dans le but d'améliorer les performances diagnostiques de la cytologie biliaire dans le diagnostic du cholangiocarcinome.

PARTIE II

Article original

Performance of bile aspiration plus brushing to diagnose malignant biliary strictures during endoscopic retrograde cholangiopancreatography

Authors' names : Gael S. Roth ¹, Philippe Bichard ^{1*} (M.D.), Michele Fior-Gozman ^{2*} (M.D.), Hubert Roth ^{3,4,5} (Eng.), Jean Auroux ¹ (M.D.), Olivier Risse ⁶ (M.D.), Christian Letoublon ^{6,7,8} (M.D., PhD), Marie Hélène Laverrière ² (M.D.), Ivan Bricault ^{7,8,9} (M.D., PhD), Vincent Leroy ^{1,7,8} (M.D., PhD) and Thomas Decaens ^{1,7,8} (M.D., PhD).

Authors' affiliations and locations:

1. Clinique Universitaire d'Hépato-gastroentérologie, Pôle Digidune, CHU Grenoble, France
2. Clinique Universitaire de Cytologie et Pathologie, Pôle Biologie et Pathologie, CHU Grenoble, France
3. Pôle Recherche, CHU Grenoble, France
4. Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Lyon, France
5. Inserm U1055-Bioénergétique, Université Grenoble Alpes, France
6. Clinique Universitaire de chirurgie digestive, Pôle Digidune, CHU Grenoble, France
7. INSERM U823, Grenoble, France
8. Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France
9. Clinique Universitaire de Radiologie et Imagerie Médicale, Pôle Imagerie, CHU Grenoble, France

*These authors equally contributed to this work

E-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author:

Thomas Decaens

Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, Pôle Digidune, CHU Grenoble

BP 217 38043 Cedex 09 Grenoble, France

E-mail address: tdecaens@chu-grenoble.fr

Tel: +33 4 76 76 54 41

Fax: +33 4 76 76 51 79

Short title: Bile aspiration and brushing during ERCP

Word count of manuscript : 3557

AUTHORSHIP

Guarantor of the article: T. Decaens.

Author contributions:

- Conception and design of the study: GSR, PB, MFG, HR, JA, OR, CL, MHL, IB, VL, TD
- Acquisition of data: GSR, PB, MFG, JA, OR, CL, MHL, IB
- Analysis and interpretation of data: GSR, MFG, HR, VL, TD
- Drafting the article: GSR, VL, TD
- Critical revising the article for important intellectual content: GSR, PB, MFG, HR, JA, OR, CL, MHL, IB, VL, TD
- Approval of the final version: GSR, PB, MFG, HR, JA, OR, CL, MHL, IB, VL, TD

Abstract

Background and Aim: Endobiliary brushing during endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) is the main technique used to diagnose a malignant stricture, but has very poor sensitivity.

This prospective study evaluated the diagnostic performance of bile aspiration associated with biliary brushing during ERCP to diagnose a malignant stricture, compared with brushing alone.

Patients and Methods: Between January 2007 and December 2012, patients undergoing ERCP to treat a biliary stricture were included. After a biliary sphincterotomy, 3–10 mL of bile was aspirated into the brush catheter and collected in a dry sterile tube before and after brushing (to yield three samples). Brushing was performed as commonly recommended.

Results: 111 consecutive patients (68 males, 43 females) were included; mean age 67 ± 15.4 years. A final diagnosis of a malignant stricture was established in 51 patients, including 43 cholangiocarcinomas; 60 patients had benign strictures. Specificity and positive predictive values were 100% for all samples. The diagnostic performance of the three-sample combination of bile aspiration + brushing + bile aspiration was significantly greater than brushing alone ($p=0.004$): sensitivity (Se)=84.3% vs. Se=66.7%. The three combined samples gave a negative predictive value of 88.2%, with 92.8% of patients correctly classified. When the cytology in the three combined samples was considered normal, the negative predictive value was 94.7%.

Conclusion: In cases of biliary stricture, conducting bile aspiration before and after brushing significantly increased the ability to diagnose a malignant stricture with a sensitivity of 84.3% ($p=0.004$).

(Abstract words: 236)

Key words: biliary stricture; endoscopic retrograde cholangiopancreatography; bile aspiration; cholangiocarcinoma; sensitivity

Introduction

Cholangiocarcinoma is the second most common primary malignancy of the liver; incidence and mortality rates are increasing worldwide ⁽¹⁾. This disease is often revealed by an icterus or a cholangitis caused by a biliary stenosis in the context of asthenia, weight loss or, rarely, abdominal pain ^(2, 3). One of the difficulties in its diagnosis resides in an often silent initial tumor-growth phase, with late symptomatic presentation. Consequently, most patients have an unresectable disease at the time of diagnosis and die within 12 months, whereas the 5-year overall survival rates of resected patients vary from 8–47% for proximal cholangiocarcinomas and 20–54% for distal tumors ⁽⁴⁾.

About 70% of cholangiocarcinomas arise at the bifurcation of the hepatic ducts and are called peri-hilar cholangiocarcinomas: >90% are adenocarcinomas ⁽⁴⁾.

Some risk factors have been well defined for the development of cholangiocarcinoma as primary sclerosing cholangitis, with a reported life-time incidence of between 5 and 10% ^(5, 6): i.e., age (65% of patients are aged >65 years) ², bile-duct adenoma, biliary papillomatosis, chronic choledocholithiasis, Caroli disease (cystic dilatation of ducts, lifetime risk 7%), choledochal cysts (~5% will transform, risk increases with age), Thorotrast, and smoking (increased risk associated with primary sclerosing cholangitis) ^(1, 2, 7). Other recently identified risk factors are cirrhosis and viral hepatitis B or C, with a stronger association with intrahepatic cholangiocarcinoma ^(6, 8). Nevertheless, most cases occur sporadically ⁽⁷⁾.

Non-invasive techniques, such as magnetic-resonance cholangiopancreatography, have shown great sensitivity and specificity in detecting malignant biliary strictures ⁽⁹⁾, particularly contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) ⁽¹⁰⁾. Magnetic-resonance cholangiopancreatography is also very efficient at evaluating the resectability of a biliary tumor, but has no therapeutic action and does not provide an anatomopathological examination. Indeed, because only <20% of cholangiocarcinomas are suitable for surgical resection ⁽⁴⁾, in cases of symptomatic biliary stenosis, biliary drainage using endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) is often needed. Also, because of the severity

and poor prognosis of this disease, with a global 5-year survival rate of <5% ⁽⁸⁾, an anatomopathological diagnosis has to be looked for to obtain a positive diagnosis and to guide a therapeutic approach.

ERCP was firstly described in 1968 ⁽¹¹⁾. Osnes et al. ⁽¹²⁾, in 1975, were the first to report the possibility of using ERCP and brushing to diagnose malignant stenoses. Nowadays, it is the most commonly used diagnostic technique in cases of symptomatic biliary stricture to provide both a diagnosis as well as being a first-line therapy. It is a safe and simple diagnostic technique ^(13, 14) but its diagnostic performance is considered insufficient, as reported in three recent meta-analyses, with sensitivities between 41% and 45% ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

With the aim of increasing diagnostic yield from biliary cytology, many studies have also evaluated the new-generation cytobrush, but with disappointing results ⁽¹⁸⁾, or have found a better rate of diagnosis ⁽¹⁹⁾ but only for small series of patients. This increase in diagnostic accuracy may be due to improvements in cellular yields, which seem to be key in cytological diagnoses.

The aim of our study was to evaluate the diagnostic accuracy of bile aspiration in association with biliary brushing used during ERCP. This combination was compared with brushing alone in a large prospective cohort of patients with a biliary stricture.

Patients and Methods

Patients

This prospective study was realized at the University Hospital of Grenoble, France, from January 1st, 2007 to December 31st, 2012. Every patient that underwent ERCP to treat a biliary stricture with an undetermined diagnosis was analyzed. Every stenosis was confirmed from preoperative imaging studies. If no etiology was suspected after these preoperative examinations, the stenoses were considered to be undetermined.

Patients with a previous diagnosis of bile-duct malignancy were excluded. Stenoses caused by an extrinsic compression identified by pre-operative imaging were excluded. The different types of compressive lesions were the following: pancreatic adenocarcinomas, and other tumors like ampullary nodules, hepatocellular carcinoma, hepatic or pancreatic metastasis, lymph node, pancreatic cyst, or pseudocyst. In cases of lithiasis extraction, patients were included if a stenosis was revealed by post-extraction opacification; these stenoses were called post-lithiasis stenoses if no other diagnosis was found.

Groups of patients were defined according to the undetermined character or not of the stenosis, the necessity or not to perform a dilatation before the sampling procedure, and the presence or not of an intraductal prosthesis placed during a previous procedure.

Results of a second ERCP were considered only if the first procedure did not give a clear diagnosis i.e., normal cytology with suspicious imaging or suspicious cytology without clear malignant cells. These ERCPs were analyzed separately.

Every patient gave their informed written consent. Our study was approved by an institutional review board and respected the principles of the Declaration of Helsinki.

Sampling technique

After a biliary sphincterotomy, a guide wire was placed through the stenosis. A single-use cytology brush protected by an 8-Fr catheter (ref. FS-CB-1.5-S Cook[®]) was slipped onto the guide wire and positioned above the stricture. Initially, 3–10 mL of bile was aspirated into the brush catheter using a connected syringe. The bile was collected in a dry sterile tube. Brushing was then conducted using 10 passages in a to-and-fro motion across the stricture, before this underwent classical cytological analyses (May Grumwald Griemsa, Papanicolaou staining) and thin-layer cytology (PreservCyt[®])⁽²⁰⁾. If the stenosis was considered too narrow, it was dilated using a biliary dilatation balloon before brushing.

After brushing, a second bile aspiration was conducted according to the same criteria as that used for the first. After centrifugation of the two bile samples, classical cytological analyses

were performed (May Grumwald Griemsa, Papanicolaou). Thus, three samples were obtained from each patient: two aspirates and one from brushing.

Six endoscopists participated in the study: their minimal experience to obtain the three-sample combination was the same as that to perform an usual ERCP brushing.

For each sample, the cytologist determined cellularity according to four categories (insufficient; poor; medium; rich) and the types of cells found (malignant; atypical or suspicious; inflammatory; normal; uninterpretable). When possible, the type of malignant cell was described. One cytologist analyzed all three samples from each patient, and had access to their clinical data. Three cytologists with a minimum of 5 years experience participated in the study.

For each sample, a positive result was defined as the presence of malignant cells: all other results were considered negative. At least one of the three samples had to have evidence of malignant cells for the three-sample combination to be considered positive. In addition, we analyzed the diagnostic accuracy of each sample if suspicious results were included with a positive result.

A diagnosis of malignancy was confirmed by histopathological analysis or using evidence of clinical and radiological progression during the follow-up period. A benign stricture was defined as a stricture without suggestive evolution of a malignancy during a 1-year minimum follow-up, which included clinical, radiological, and biological surveillance, or histopathological analyses. Histological confirmation was obtained using different complementary procedures: ultrasound-guided fine-needle aspiration was performed if a pancreatic nodule or a compressive node appeared during the follow-up period, ampullary biopsy if there was suspicion of an ampulloma, or per cholangioscopy biopsy was conducted in cases of undetermined stenoses. Confirmation could also be obtained from a post-operative histopathological examination in cases of a resectable lesion or by a biopsy of a supposed metastatic site.

Statistical analyses

We used the non-parametric Wilcoxon paired tests to compare the cellularity of the different samples from each patient. The sensitivity/specificity (Se/Sp) balance, according to the diagnosis obtained from each sampling method, was represented by area under ROC curves (AUC) (with 95% CI), and paired analyses were used to compare the AUCs between the three combined samples and brushing alone (Stata's *roccomp* command for correlated data), with a Bonferroni correction for multiple tests when required. AUCs were also used to compare the diagnostic performances of each sample between the different groups of patients, as described in "Patients and methods" (Stata's *roccomp* command for independent data). When the AUC comparison was not adapted to assess if sensitivity was significantly increased or not for important variations in specificity, both sensitivity and specificity were compared on their respective sides, between different sampling techniques, using the McNemar test.

All statistical tests were two-sided, and a p -value of <0.05 was regarded as statistically significant. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics software, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY), and Stata 13 (Stata Corp., College Station, TX).

Results

Characteristics of the patients

From January 1st, 2007 to December 31st, 2012, 295 patients with a biliary stricture underwent an ERCP. As shown in Figure 1, 127 patients were excluded because of a compressive pancreatic adenocarcinoma, 38 patients because of other compressive lesions, 15 patients because of a too short follow-up, and four patients because a histological diagnosis had been obtained before the ERCP. Thus, a total of 111 consecutive patients were included in the analyses.

The patients' main characteristics are summarized in Table 1. There were 68 males and 43 females, with a mean age of 66.8 ± 15.4 years. Only 55 patients had a history of biliary disease. Biliary stenoses were located in the common bile duct in 77 cases (69.4%), on the bile-duct bifurcation in 27 cases (24.3%), and 7 had intrahepatic strictures (6.3%).

Eighteen patients already had an endobiliary prosthesis before the ERCP, from a previous procedure. These patients were included only if they presented with a true undetermined stenosis and had not benefited from our new technique during the first ERCP, when performed in another center or during an emergency. Twenty-four patients had a dilatation before brushing because the stenosis was too narrow.

Seventy-six patients (68%) presented with an undetermined stenosis because the preoperative imaging could not determine a diagnosis. Sixteen of these were later diagnosed as being malignant (22%). In contrast, 35 (32%) diagnoses of a tumoral stenosis were already suspected from preoperative imaging because of the presence of an intraductal process or metastasis.

A final diagnosis of a malignant stricture was established in 51 patients (Table 2): i.e., 7 pancreatic adenocarcinomas without any nodules, 43 cholangiocarcinomas (24 peri-hilar tumors, 18 of the common bile duct, and 1 intrahepatic cholangiocarcinoma), and 1 ampulloma. Sixteen malignant stenoses were confirmed after a histological examination.

In 60 cases, the stenosis was considered benign (Table 2): 16 stenoses were caused by pancreatitis (13 chronic pancreatitis, 3 acute pancreatitis), 10 by primary sclerosing cholangitis, 10 by postoperative stenoses, 8 by post-lithiasis, 7 by odditis or other ampullary benign stenoses, and 9 had undetermined benign strictures. Ten benign stenoses were confirmed after a histological examination.

Among all the patients, there were nine ERCPs with adverse events (8.1%): three angiocholitis (2.7%), three pancreatitis (2.7%), one perforation (0.9%), and two cases of hemorrhage (1.8%). In two-thirds of these cases (6/9), biliary stenosis was secondary to cholangiocarcinoma with four peri-hilar stenoses, the patients' mean age was 78 ± 10.3

years, all patients presented with jaundice before the procedure, and all ERCPs resulted in the placement of a prosthesis.

Cytology yield

All included ERCPs allowed all three samples to be obtained: i.e., two bile-aspirations and one brushing sample.

As shown in Figure 2, bile aspiration produced samples with rich cellularity in most cases: 62 (55.9%) samples were rich in cells when bile aspiration was done before brushing and 66 (59.5%) when it was done after brushing, whereas only 17 (15.3%) samples were rich in cells when only brushing was done. If we added samples with medium cellularity to the cell-rich samples within the analyses, and considered that they both represented "useful samples", we found that 83 (74.8%) and 89 (80.2%) of "useful samples" were obtained when bile aspiration was done before and after brushing, respectively, whereas only 58 (52.3%) of samples were "useful" when only brushing was done. Samples were considered as insufficient in respectively 4 and 2 patients, with bile aspiration before and after brushing, and in 4 patients with brushing.

Wilcoxon paired tests showed there was richer cellularity when bile aspiration was done before or after brushing compared to brushing alone, respectively, in 55.9% ($p < 0.0001$) and 59.5% of patients ($p < 0.0001$). Consequently, bile aspiration provided better-quality samples than brushing alone. In contrast, there was no significant difference between when bile aspiration was conducted before versus after brushing ($p = 0.484$).

Diagnostic performances

The data on the diagnosis of malignant stenoses and the detection of malignant cells through cytology are shown in Table 3. Each sampling technique had a specificity (Sp) and a positive predictive value (PPV) of 100%. The sensitivities (Se) and negative predictive values (NPV) were as follows: 72.6% and 81.1% when bile aspiration was done before brushing, 66.7%

and 77.9% for brushing alone, and 76.5% and 83.3% when bile aspiration was done after brushing. None of these results varied significantly from each other.

When combining the results of bile aspiration conducted before and after brushing with brushing alone, Se and NPV reached 84.3% and 88.2%, respectively, with 92.8% of patients correctly classified. AUC comparison showed that the diagnostic accuracy of the combined-three samples was significantly superior to brushing alone ($p=0.004$).

We assessed if reducing the number of samples could increase the cost-effectiveness of the technique. We tested the combination of brushing plus only one bile-aspiration sample, i.e., either before or after brushing, as shown in Table 3. Both two-sample combinations still gave significantly higher results than brushing alone, and the combination of brushing and then bile aspiration gave a similar ability to diagnose a malignant stenosis as the three combined samples, i.e., bile aspiration conducted both before and after brushing.

We also assessed the accuracy of diagnosing malignant stenoses with the inclusion of suspicious cells in addition to malignant cells. As shown in Table 4, this increased the sensitivity and NPV for all types of samples, but decreased specificity and PPV. Thus, data for brushing-alone were able to diagnose malignant stenosis at Sp = 95% and Se = 80.4%, whereas the three combined samples (aspiration + brushing + aspiration) gave Sp = 91.7% and Se = 94.1%. AUC comparisons regarding the diagnosis of a malignant stricture did not reach statistical significance when the three combined samples were compared with brushing alone (AUC=0.945 vs. 0.877; $p=0.054$); however, sensitivity was statistically greater with the three combined samples compared to data for brushing alone (McNemar's test, $p=0.008$), but with no significant decrease in specificity ($p=0.157$).

Finally, we analyzed the NPV of "normal" cytological results: this was 94.7% with only two false negative results when the three samples were combined (and all three samples were "normal"), whereas a normal result with brushing alone had an NPV of 84.4% and eight false negative results.

Group analyses

Data for undetermined stenosis ($n=76$) are summarized in Table 5. Sp and NPV were still 100%, and Se and NVP were as follows: brushing alone gave 43.8% and 87.0%, and the three combined samples gave 62.5% and 90.9%. No statistical differences were found ($p=0.06$).

The combined suspicious cytological results with the "positive-diagnosis" results are shown in Table 6. The main results are as follows: brushing alone gave Sp=95.0%, Se=68.8%, PPV=78.6%, NPV=91.9%, and the three combined samples gave Sp=91.7%, Se=87.5%, PPV=73.7%, NPV=96.5%. No statistical difference was found to diagnose malignancy among the undetermined stenoses (AUCs comparison: $p=0.136$; McNemar test: $p=0.0833$) despite a great increase in the sensitivity of the three combined samples.

When patients with a biliary dilatation before sampling ($n=24$) (Supplementary Table S1) were compared to patients without a dilatation, sensitivity was not modified according to data for brushing alone (Se=66.7%), but it was significantly increased in the three combined samples: i.e., 100% after dilatation versus 83.7% without dilatation ($p=0.002$). All samples had a Sp and PPV of 100%.

In patients with a prosthesis from a previous procedure ($n=18$), diagnostic accuracy was dramatically decreased compared to patients without a prosthesis (Supplementary Table S2), respectively: brushing alone had a Se=40.0% versus 69.6% ($p=0.245$) for those with or without a prosthesis, and the three combined samples gave a Se=40.0% versus 89.9% for those with or without a prosthesis ($p=0.049$).

In patients with a final diagnosis of pancreatic adenocarcinoma without nodules ($n=7$) or cholangiocarcinomas ($n=43$), the sensitivities were, respectively, 85.7% and 86.0% for the three combined samples, whereas they were 42.9% and 72.1% for brushing alone.

In this series, six patients had a second ERCP with the three combined samples. This was done in four patients because of a suspicious cytological result from a first ERCP, and in two because of suspicious radiologic findings. Second ERCPs revealed the presence of malignant cells in three cases, confirmed the presence of suspicious cells in one case, which

was in fact a cholangiocarcinoma, and confirmed the absence of malignant cells in two cases.

Discussion

This study shows that the combination of bile aspiration and brushing increased diagnostic yield and gave richer cellularity and, thus, greater diagnostic accuracy from cytological analyses compared to brushing alone. At the least, the combination of one bile aspiration sample plus brushing is required, and the bile-aspiration sample obtained after brushing seemed to have the greatest yield, reaching the same rate of diagnosis as the three combined samples to detect malignant cells, with a sensitivity of 84.3%, and a specificity of 100%.

Bile-aspiration samples provide much richer cellularity, which increases the probability of detecting any tumor cells. This is probably due to the large amount of desquamated cells in suspension within bile. Moreover, even if brushing alone has a low yield and is often not sufficient to establish a clear diagnosis, it probably increases desquamation of bile-duct cells through its mechanical action. Thus, it is still useful because it potentiates the cytological yield from bile aspiration conducted after brushing.

Furthermore, our study confirmed the results of a previous study, conducted in 2012, which assessed bile aspiration in 42 patients with a suspected malignant biliary stricture and found a sensitivity of 89% to detect malignant stenosis ⁽²¹⁾.

In this study, we first tested malignant cells only, to obtain a positive-diagnosis result, and excluded suspicious results from the analyses. However, we then tested the diagnostic performances of each of the three different samples individually and in combination when suspicious results were included with the positive results. The three combined samples showed very high sensitivity (94.1%), which was statistically superior to brushing alone ($p=0.008$) and did not significantly decrease specificity.

ERCP is often done after determinant imaging, such as CT scans or MRI. Consequently, in our study, the large majority of malignant biliary stenoses were already strongly suspected after the preoperative work-up. Nevertheless, we wanted to analyze the diagnostic performance of our technique in cases of biliary stenoses when imaging could not provide a suspected diagnosis. This corresponds to a classical but difficult situation for clinicians. In these undetermined stenoses, a diagnosis of malignancy within each sample remained low, without a significant difference between brushing alone and the three combined samples, with respectively, Se=43.8% vs. 62.5% ($p=0.063$). This was probably because of a lack of statistical power.

The inclusion of suspicious results with those that had a positive-diagnosis revealed a sensitivity to diagnose malignant stenoses of almost 90% in undetermined stenoses when the three samples were combined, with only two false-negative results (one for an ampullary adenocarcinoma diagnosed one year later), whereas the sensitivity of brushing alone remained inferior to 70% ($p=0.083$). Even if this did not reach statistical difference, it shows again how much bile aspiration seemed to aid the detection of malignant stenoses.

Furthermore, because the presence of an endobiliary prosthesis dramatically decreased the sensitivity of all samples, it seems essential to assess the three combined samples before any prosthesis placement to increase the chance of achieving a cytological diagnosis.

In our study, the overall adverse events rate was comparable with large series in the literature ^(13, 14, 22), with an equivalent post-ERCP pancreatitis rate, and a slightly higher post-ERCP infection rate with 3 cholangitis (2.7%). All three patients presented well-known risk factors for post-ERCP infections as cholangiocarcinoma, the presence of jaundice, age >80 years, and the placement of a stent during the procedure ^(14, 23).

In addition, by its greater sensitivity to diagnose malignant biliary stenosis, our combination of bile aspiration and brushing, should reduce the number of unnecessary surgical procedures and additional diagnostic procedures. Even though cost-effectiveness was not investigated, this should reduce the overall cost of diagnosing biliary strictures. Moreover, we emphasize that this is a new technique that can be used by all biliary endoscopists who

perform brushing, as the technicality of this combination (bile aspiration plus brushing) is the same as for brushing alone. Also, our method seemed to have a much higher diagnostic yield than other simple and routinely used techniques, such as per ERCP intraductal biopsy, which had a sensitivity of 48.1% in a recent meta-analysis ⁽¹⁷⁾.

In contrast, several studies report on methods attempting to improve diagnostic yields from endobiliary samples through researching new markers, detecting RNA in bile, immunostaining, as well as new endoscopic techniques, such as per cholangioscopy biopsies ⁽²⁴⁾ or confocal laser endomicroscopy ⁽²⁵⁾. There are interesting results, as reported in a meta-analysis published in 2014 by Burnett et al. ⁽²⁶⁾, but the procedures are complex and expensive, and are still undergoing evaluation.

Our study shows that performing bile aspiration before and after brushing during ERCP significantly increased the ability to diagnose malignant bile-duct strictures. This method could be used as a standard procedure to improve the diagnosis of malignant strictures, especially cholangiocarcinoma.

Acknowledgements

Declaration of personal interests: None.

Declaration of funding interests: None.

References (article only)

1. Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC, Gentile R, et al. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2010;2:407-416.
2. Khan S, Davidson B, Goldin R, Pereira S, Rosenberg W, Taylor-Robinson S, Thillainayagam A, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 2002;51:vi1-vi9.

3. Corvera CU, Blumgart LH, Darvishian F, Klimstra DS, DeMatteo R, Fong Y, D'Angelica M, et al. Clinical and Pathologic Features of Proximal Biliary Strictures Masquerading as Hilar Cholangiocarcinoma. *Journal of the American College of Surgeons*;201:862-869.
4. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *The Lancet* 2005;366:1303-1314.
5. Broomé U, Olsson R, Lööf L, Bodemar G, Hultcrantz R, Danielsson A, Prytz H, et al. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996;38:610-615.
6. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *The Lancet* 2014;383:2168-2179.
7. Malhi H, Gores GJ. Review article: the modern diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1287-1296.
8. Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, Zampino MG, Gatta G, Heinemann V. Cholangiocarcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;69:259-270.
9. Varghese JC, Farrell MA, Courtney G, Osborne H, Murray FE, Lee MJ. A prospective comparison of magnetic resonance cholangiopancreatography with endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the evaluation of patients with suspected biliary tract disease. *Clin Radiol* 1999;54:513-520.
10. Kim MJ, Mitchell DG, Ito K, Outwater EK. Biliary dilatation: differentiation of benign from malignant causes--value of adding conventional MR imaging to MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2000;214:173-181.
11. McCune WS, Shorb PE, Moscovitz H. Endoscopic cannulation of the ampulla of Vater: a preliminary report. *Ann Surg* 1968;167:752-756.
12. Osnes M, Serck-Hanssen A, Myren J. Endoscopic retrograde brush cytology (ERBC) of the biliary and pancreatic ducts. *Scand J Gastroenterol* 1975;10:829-831.
13. Vandervoort J, Soetikno RM, Tham TC, Wong RC, Ferrari AP, Jr., Montes H, Roston AD, et al. Risk factors for complications after performance of ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002;56:652-656.
14. Cotton PB, Garrow DA, Gallagher J, Romagnuolo J. Risk factors for complications after ERCP: a multivariate analysis of 11,497 procedures over 12 years. *Gastrointest Endosc* 2009;70:80-88.

15. Trikudanathan G, Navaneethan U, Njei B, Vargo JJ, Parsi MA. Diagnostic yield of bile duct brushings for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2014;79:783-789.
16. Burnett AS, Calvert TJ, Chokshi RJ. Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10-y review of the literature. *J Surg Res* 2013;184:304-311.
17. Navaneethan U, Njei B, Lourdasamy V, Konjeti R, Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2015;81:168-176.
18. Fogel EL, deBellis M, McHenry L, Watkins JL, Chappo J, Cramer H, Schmidt S, et al. Effectiveness of a new long cytology brush in the evaluation of malignant biliary obstruction: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2006;63:71-77.
19. Shieh FK, Luong-Player A, Khara HS, Liu H, Lin F, Shellenberger MJ, Johal AS, et al. Improved endoscopic retrograde cholangiopancreatography brush increases diagnostic yield of malignant biliary strictures. *World J Gastrointest Endosc* 2014;6:312-317.
20. Fior-Gozman M, Bosio C, Croset C, Bichard P. [Value of bile cytology associated with brush cytology of the bile duct: a comparative study of 115 patients]. *Ann Pathol* 2006;26:361-367.
21. Curcio G, Traina M, Mocciaro F, Liotta R, Gentile R, Tarantino I, Barresi L, et al. Intraductal aspiration: a promising new tissue-sampling technique for the diagnosis of suspected malignant biliary strictures. *Gastrointest Endosc* 2012;75:798-804.
22. Masci E, Toti G, Mariani A, Curioni S, Lomazzi A, Dinelli M, Minoli G, et al. Complications of diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:417-423.
23. Committee ASoP, Anderson MA, Fisher L, Jain R, Evans JA, Appalaneni V, Ben-Menachem T, et al. Complications of ERCP. *Gastrointest Endosc* 2012;75:467-473.
24. Siddiqui AA, Mehendiratta V, Jackson W, Loren DE, Kowalski TE, Eloubeidi MA. Identification of cholangiocarcinoma by using the Spyglass Spyscope system for peroral cholangioscopy and biopsy collection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:466-471; quiz e448.

25. Meining A, Chen YK, Pleskow D, Stevens P, Shah RJ, Chuttani R, Michalek J, et al. Direct visualization of indeterminate pancreaticobiliary strictures with probe-based confocal laser endomicroscopy: a multicenter experience. *Gastrointest Endosc* 2011;74:961-968.

26. Burnett AS, Bailey J, Oliver JB, Ahlawat S, Chokshi RJ. Sensitivity of alternative testing for pancreaticobiliary cancer: a 10-y review of the literature. *J Surg Res* 2014;190:535-547.

Table 1: Patients' characteristics.

Population characteristics	Data
Age : mean (SD)	66.8 (15.4)
Gender	
Male	68 (61%)
Female	43 (39%)
Stenosis localization:	
Common bile duct	77 (70%)
Bile-duct bifurcation	27 (24%)
Intra-hepatic ducts	7 (6%)
True undetermined stenosis	
Yes	76 (68%)
No	35 (32%)
Dilatation before brushing	
Yes	24 (22%)
No	87 (78%)
Prosthesis from a previous ERCP	
Yes	18 (16%)
No	93 (84%)
Post-ERCP adverse events	9 (8.1%)
Pancreatitis	3 (2.7%)
Angiocholitis	3 (2.7%)
Hemorrhage	2 (1.8%)
Perforation	1 (0.9%)

Table 2: Final diagnosis.

Type of stenosis	<i>n</i> (%)
Malignant strictures	51 (46%)
Pancreatic adenocarcinoma	7 (6%)
Cholangiocarcinoma	43 (39%)
Peri-hilar tumor	24
Common bile duct	18
Intrahepatic	1
Ampullary carcinoma	1
Benign strictures	60 (54%)
Pancreatitis	16 (14%)
Acute pancreatitis	3
Chronic pancreatitis	13
Primary sclerosing cholangitis	10
Postoperative stenosis	10
Post-lithiasis stenosis	8
Odditis and other benign ampullary stenoses	7
Undetermined benign stenosis	9

Table 3: Accuracy to diagnose malignancy after detecting malignant cells according to the different sampling methods.

Detection of malignant cells	Sp (%)	Se (%)	PPV (%)	NPV (%)	Well-classified patients (%)	AUC [95% CI]	Bonferroni <i>p</i> -value
Brushing alone	100	66.7	100	77.9	87.4	0.833 [0.768:0.899]	Reference
Bile aspiration before brushing	100	72.6	100	81.1	84.7	0.863 [0.786:0.940]	1
Bile aspiration after brushing	100	76.5	100	83.3	89.2	0.882 [0.824:0.941]	0.646
Combination of three samples	100	84.3	100	88.2	92.8	0.922 [0.871:0.972]	0.004
Combinations of two samples							
Bile aspiration and then brushing	100	78.4	100	84.5	89.2	0.892 [0.823:0.922]	0.039
Brushing and then bile aspiration	100	84.3	100	88.2	92.8	0.922 [0.871:0.972]	0.004

Sp: specificity; Se: sensitivity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

Table 4: Accuracy to diagnose malignancy after detecting malignant and suspicious cells according to the different sampling methods.

Detection of malignant and suspicious cells	Sp (%)	Se (%)	PPV (%)	NPV (%)	Well-classified patients (%)	AUC [95% CI] *	p-value
Brushing alone	95.0	80.4	93.2	85.1	88.3	0.877 [0.804:0.950]	Reference
Bile aspiration before brushing	95.0	84.3	93.5	87.7	90.0	0.897 [0.829:0.964]	ND
Bile aspiration after brushing	93.3	86.3	91.7	88.9	90.2	0.898 [0.832:0.964]	ND
Combination of three samples	91.7	94.1	90.6	94.8	92.8	0.945 [0.895:0.994]	0.054

Sp: specificity; Se: sensitivity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

* AUCs were compared between "Brushing alone" and the "Three combined samples".

ND= not determined because of irrelevance of this statistical comparison and the increase of alpha error if done.

Table 5: Accuracy to diagnose malignancy after detecting malignant cells according to the different sampling methods in undetermined stenoses.

Detection of malignant cells	Sp (%)	Se (%)	PPV (%)	NPV (%)	Well-classified patients (%)	AUC [95% CI] *	p-value
Brushing	100	43.8	100	87.0	88.2	0.719 [0.593:0.844]	Reference
Bile aspiration before brushing	100	43.8	100	87.0	88.2		ND
Bile aspiration after brushing	100	50.0	100	88.2	89.5		ND
Combination of three samples	100	62.5	100	90.9	92.1	0.813 [0.690:0.935]	0.063

Sp: specificity; Se, sensitivity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

* AUCs were compared between "Brushing alone" and the "Three combined samples".

ND= not determined because of irrelevance of this statistical comparison and the increase of alpha error if done.

Table 6: Accuracy to diagnose malignancy after detecting malignant and suspicious cells according to the different sampling methods in undetermined stenoses.

Detection of suspicious and malignant cells	Sp (%)	Se (%)	PPV (%)	NPV (%)	Well-classified patients (%)	AUC [95% CI] *	p-value
Brushing	95.0	68.8	78.6	91.9	89.5	0.819 [0.698:0.939]	Reference
Bile aspiration before brushing	95.0	68.8	78.6	91.9	89.5		ND
Bile aspiration after brushing	93.3	68.8	73.3	91.8	88.2		ND
Combination of three samples	91.7	87.5	73.7	96.5	90.8	0.896 [0.805:0.987]	0.136

Sp: specificity; Se: sensitivity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

* AUCs were compared between "Brushing alone" and the "Three combined samples".

ND= not determined because of irrelevance of this statistical comparison and the increase of alpha error if done.

Supplementary Table 1: Detection of malignant cells with or without dilatation before brushing.

Detection of malignant cells	Sp (%)	Se (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC [95% CI]	p-value
Brushing						
Without dilatation	100	66.7	100	75.0	0.833 [0.758:0.908]	Reference
With dilatation	100	66.7	100	78.7	0.833 [0.694:0.973]	1.000
Bile aspiration before brushing						
Without dilatation	100	66.7	100	78.7	0.833 [0.758:0.908]	Reference
With dilatation	100	91.7	100	92.3	0.958 [0.877:1.000]	0.027
Bile aspiration after brushing						
Without dilatation	100	71.8	100	81.4	0.859 [0.787:0.931]	Reference
With dilatation	100	91.7	100	92.3	0.958 [0.877:1.000]	0.073
Combination of three samples						
Without dilatation	100	83.7	100	85.7	0.897 [0.833:0.962]	Reference
With dilatation	100	100	100	100	1.000 [1.000:1.000]	0.002

Sp: specificity; Se: sensitivity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

Supplementary Table 2: Detection of malignant cells with or without a prosthesis before the ERCP.

Detection of malignant cells	Sp (%)	Se (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC [95% CI]	p-value
Brushing						
Without a prosthesis	100	69.6	100	77.0	0.847 [0.781:0.915]	Reference
With a prosthesis	100	40.0	100	81.2	0.700 [0.460:0.940]	0.245
Bile aspiration before brushing						
Without a prosthesis	100	78.7	100	82.5	0.891 [0.831:0.952]	Reference
With a prosthesis	100	20.0	100	76.5	0.600 [0.404:0.796]	0.005
Bile aspiration after brushing						
Without a prosthesis	100	80.4	100	83.9	0.902 [0.844:0.960]	Reference
With a prosthesis	100	40.0	100	81.2	0.700 [0.460:0.940]	0.109
Combination of three samples						
Without a prosthesis	100	89.1	100	90.4	0.945 [0.900:0.991]	Reference
With a prosthesis	100	40.0	100	81.2	0.700 [0.460:0.940]	0.049

Sp: specificity; Se: sensitivity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

Figure 1: Flow chart of 295 patients with biliary stricture plus per-ERCP three-sample combination. Data were collected between January 2007 and December 2012.

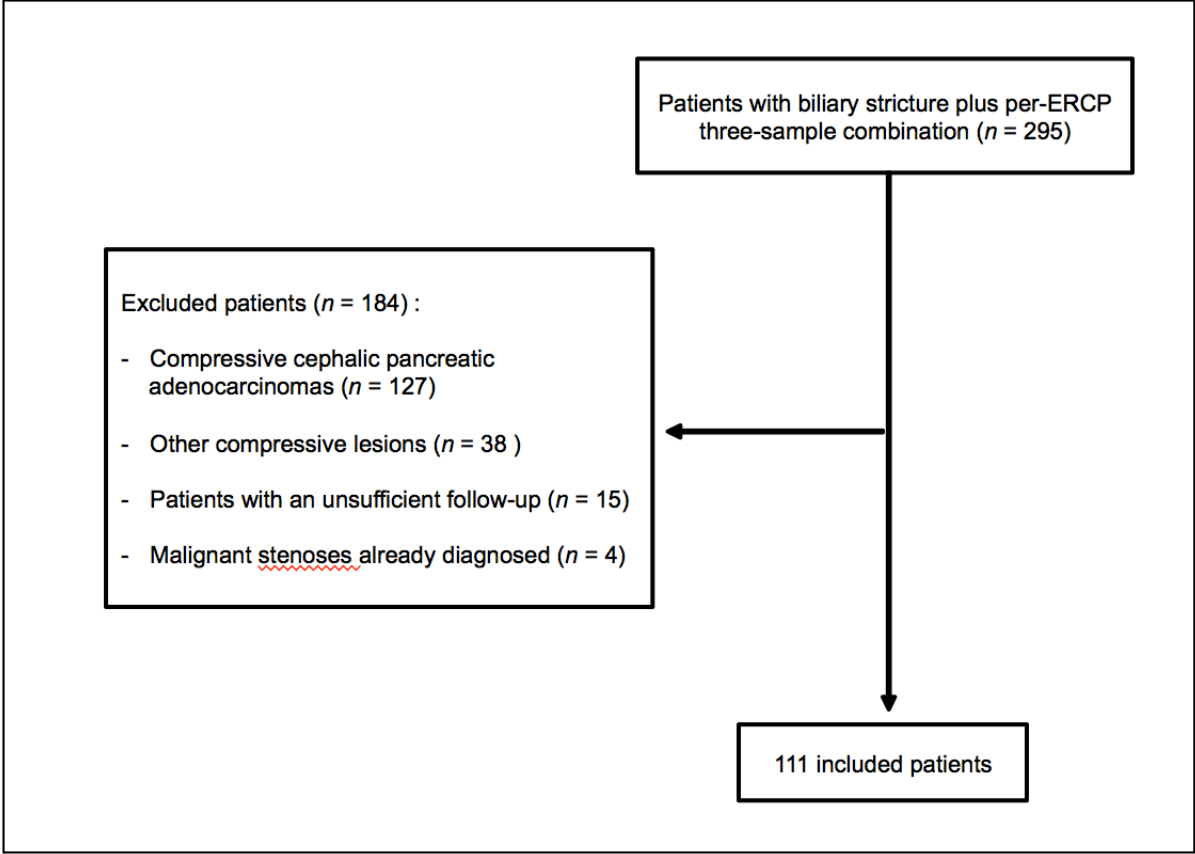
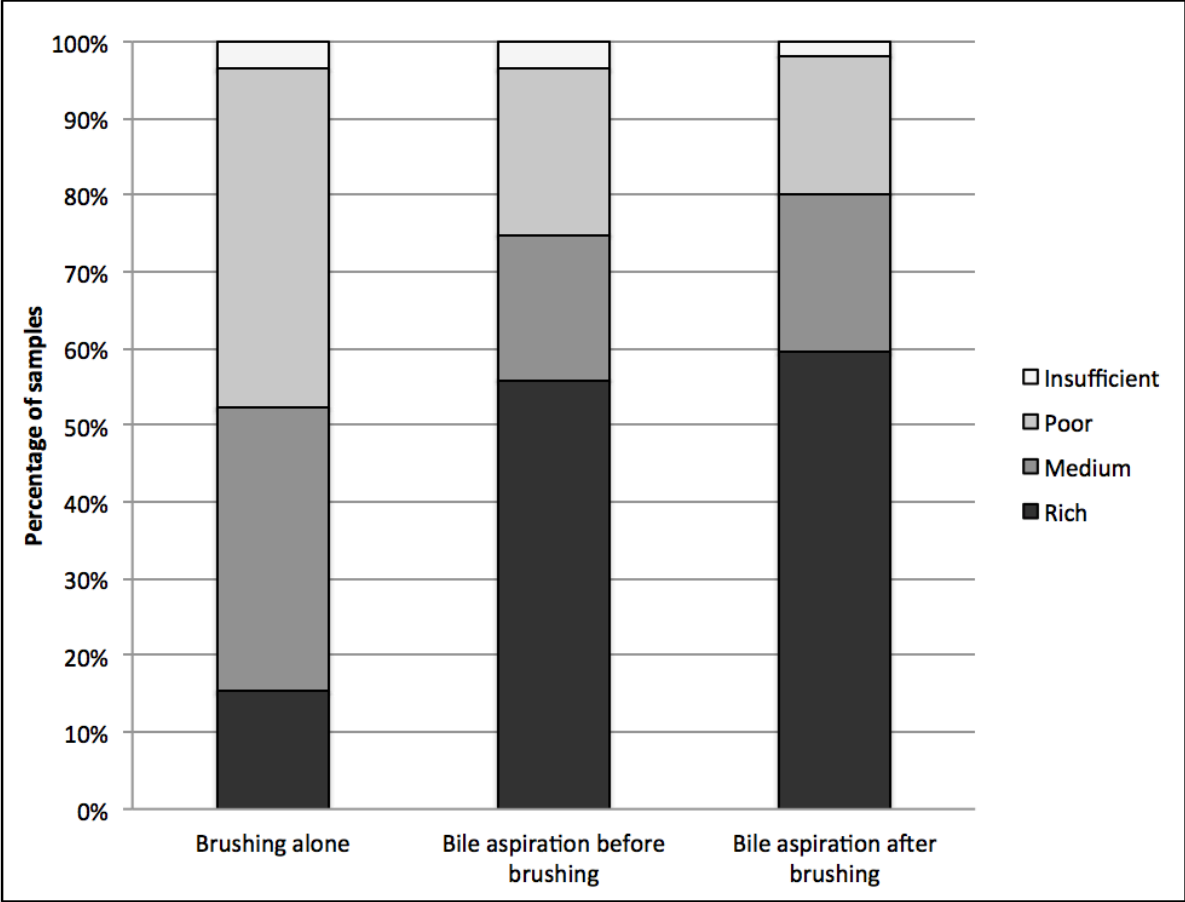


Figure 2: Cellularity within the cytological samples.



STARD checklist for reporting of studies of diagnostic accuracy

Section and Topic	Item		On page
TITLE/ABSTRACT/ KEYWORDS	1	Identify the article as a study of diagnostic accuracy (recommend MeSH heading 'sensitivity and specificity').	1
INTRODUCTION	2	State the research questions or study aims, such as estimating diagnostic accuracy or comparing accuracy between tests or across participant groups.	6
METHODS			
<i>Participants</i>	3	The study population: The inclusion and exclusion criteria, setting and locations where data were collected.	6-7
	4	Participant recruitment: Was recruitment based on presenting symptoms, results from previous tests, or the fact that the participants had received the index tests or the reference standard?	6-8
	5	Participant sampling: Was the study population a consecutive series of participants defined by the selection criteria in item 3 and 4? If not, specify how participants were further selected.	6-7
	6	Data collection: Was data collection planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)?	7-9
<i>Test methods</i>	7	The reference standard and its rationale.	7-8
	8	Technical specifications of material and methods involved including how and when measurements were taken, and/or cite references for index tests and reference standard.	7-8
	9	Definition of and rationale for the units, cut-offs and/or categories of the results of the index tests and the reference standard.	7-8
	10	The number, training and expertise of the persons executing and reading the index tests and the reference standard.	8
	11	Whether or not the readers of the index tests and reference standard were blind (masked) to the results of the other test and describe any other clinical information available to the readers.	8
<i>Statistical methods</i>	12	Methods for calculating or comparing measures of diagnostic accuracy, and the statistical methods used to quantify uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	8-9
	13	Methods for calculating test reproducibility, if done.	Not done
RESULTS			
<i>Participants</i>	14	When study was performed, including beginning and end dates of recruitment.	10
	15	Clinical and demographic characteristics of the study population (at least information on age, gender, spectrum of presenting symptoms).	10-11
	16	The number of participants satisfying the criteria for inclusion who did or did not undergo the index tests and/or the reference standard; describe why participants failed to undergo either test (a flow diagram is strongly recommended).	11
<i>Test results</i>	17	Time-interval between the index tests and the reference standard, and any treatment administered in between.	NA
	18	Distribution of severity of disease (define criteria) in those with the target condition; other diagnoses in participants without the target condition.	NA
	19	A cross tabulation of the results of the index tests (including indeterminate and missing results) by the results of the reference standard; for continuous results, the distribution of the test results by the results of the reference standard.	No
	20	Any adverse events from performing the index tests or the reference standard.	9-10
<i>Estimates</i>	21	Estimates of diagnostic accuracy and measures of statistical uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	10-14 23-28
	22	How indeterminate results, missing data and outliers of the index tests were handled.	11
	23	Estimates of variability of diagnostic accuracy between subgroups of participants, readers or centers, if done.	Not done
	24	Estimates of test reproducibility, if done.	Not done
DISCUSSION	25	Discuss the clinical applicability of the study findings.	16-17

PARTIE III

DISCUSSION

Dans cette étude nous avons montré que l'association de l'aspiration de bile au brossage augmente le rendement diagnostique grâce à une densité cellulaire des prélèvements de bile significativement supérieure à celle du brossage. Par ailleurs, nous avons constaté que l'association du brossage avec le prélèvement de bile après brossage seul, permettait d'obtenir des résultats comparables à l'association des 3 prélèvements, et que ce prélèvement de bile après brossage analysé seul, offrait un rendement cellulaire et des performances diagnostiques supérieures au prélèvement de bile réalisé avant le brossage. Cette supériorité n'était pas significative, probablement du fait d'un défaut de puissance, mais cela suggère le rôle potentialisateur qu'a le brossage, en augmentant la desquamation des cellules malignes.

Une étude récente de 42 patients dont 14 cholangiocarcinomes a évalué l'aspiration de bile après un brossage plus agressif de la sténose à l'aide d'un stylet positionné au bout d'un cathéter. Cette dernière a rapporté une sensibilité de 89% (58), ce qui suggère que l'action mécanique du brossage et l'efficacité de l'aspiration de bile pour collecter les cellules sont synergiques et que leur association doit être privilégiée. Par ailleurs, aucun prélèvement de bile seul n'était statistiquement supérieur au brossage, il semble donc essentiel d'associer plusieurs prélèvements pour obtenir un rendement diagnostique optimal, d'autant plus que la spécificité de la cytologie biliaire restait à 100% quel que soit le nombre de prélèvements.

Dans cette étude, nous avons décidé d'exclure les sténoses secondaires à une compression extrinsèque pour des raisons physiopathologiques d'une part, et parce que la démarche diagnostique est souvent différente d'autre part. En effet, dans le cholangiocarcinome, la tumeur a un développement initial intra-mural à partir de l'épithélium biliaire ou des glandes péri-biliaires, puis son extension peut prendre différents aspects comme décrit précédemment. Ainsi, lorsqu'il y a une sténose, le mécanisme obstructif est directement secondaire à l'envahissement tumoral, ce qui justifie la réalisation de prélèvements endobiliaires. Lorsque la sténose est secondaire à une compression extrinsèque par une adénopathie, ou une lésion pancréatique céphalique bien individualisée,

l'envahissement tumoral intra-canalair est inconstant, et une approche diagnostique par cytoponction sous écho-endoscopie bilio-pancréatique est plus adaptée. Néanmoins, dans notre série, la sensibilité de l'association des 3 prélèvements chez les patients avec un diagnostic final d'adénocarcinome pancréatique était de 86% ce qui suggère que lorsqu'une lésion tumorale pancréatique céphalique est à l'origine d'une sténose biliaire, cette méthode diagnostique est aussi très performante. Il serait donc intéressant d'évaluer la performance de notre méthode dans le diagnostic de l'adénocarcinome pancréatique, comparée à la cytoponction sous EEBP comme méthode de référence (59).

Dans notre série, la présence d'une prothèse biliaire était associée à une diminution de la sensibilité de l'ensemble des prélèvements, et ce de manière significative concernant l'association des 3 prélèvements. Il semble donc primordial de réaliser ces prélèvements cytologiques dès la première procédure endoscopique quand cela est envisageable. En revanche, la réalisation d'une dilatation avant d'effectuer les prélèvements cytologiques, dans le cas d'une sténose très serrée, ne semblait pas préjudiciable. Les performances étaient même supérieures lorsqu'une dilatation avait été réalisée, ce qui est probablement dû au fait que le caractère serré d'une sténose correspond à un envahissement tumoral intra-canalair plus important et non à l'action mécanique du ballonnet de dilatation.

Cette méthode diagnostique est réalisable par tout endoscopiste formé à la CPRE, car son niveau de technicité est comparable à la réalisation d'un brossage biliaire seul. En revanche, sur le plan cytologique, une des limites de cette étude, est que la quasi-totalité des prélèvements a été lue par la même cytologiste, or il existe une variabilité inter-observateur. En effet, dans une série de 55 sténoses biliaires bénéficiant d'une CPRE avec brossage endobiliaire, deux cytologistes expérimentés analysant les lames en aveugle lors de deux sessions à 4 mois d'intervalle, ont conclu au même diagnostic dans 65% et 73% des cas (60). De même, l'absence de lecture en aveugle est également un biais potentiel à l'origine d'une inflation des performances diagnostiques des méthodes évaluées. Cependant, dans le

groupe de sténoses indéterminées où aucune orientation n'était connue au moment de l'analyse cytologique, la supériorité de la nouvelle méthode étudiée est proche du seuil de significativité ($p=0,063$). Cette différence n'est pas significative, du fait d'un défaut de puissance car seulement 16 sténoses tumorales étaient initialement considérées comme indéterminées.

Une autre limite de cette étude est le fait que la lecture des 3 prélèvements était réalisée dans le même temps. Ainsi, lorsqu'un prélèvement mettait en évidence des cellules malignes, cela pouvait influencer l'analyse des deux autres prélèvements associés, ce qui peut expliquer les performances supérieures du brossage biliaire dans notre étude par rapport à la littérature (31-33). Cela a probablement également été à l'origine d'une inflation du risque de première espèce.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer les performances diagnostiques de cette nouvelle association de 3 prélèvements endobiliaires dans le diagnostic des sténoses malignes. Pour cela, les résultats étaient considérés comme positifs uniquement lorsque des cellules malignes étaient retrouvées sur l'analyse cytologique. Cependant, certaines études considèrent la présence de cellules suspectes comme un résultat positif (32, 33). Ces dernières ont en effet un réel intérêt diagnostique car leur présence induit systématiquement la réalisation d'examens complémentaires augmentant ainsi les chances d'obtenir un diagnostic de malignité. Dans notre étude, leur inclusion dans les résultats positifs augmente la sensibilité de l'association des 3 prélèvements à 94,1%, mais au prix d'une baisse de la spécificité à 91,7%, aboutissant ainsi à une comparaison des aires sous la courbe (AUC) non significative ($p=0,054$) entre l'association des 3 prélèvements et le brossage. Cependant, lorsque la sensibilité et la spécificité étaient analysées séparément par des tests de McNemar, la sensibilité de notre nouvelle méthode était significativement supérieure ($p=0,008$), sans qu'il y ait une baisse significative de sa spécificité ($p=0,157$).

Dans la situation des sténoses indéterminées, l'inclusion des cellules suspectes dans les résultats positifs augmentait la sensibilité de notre association de prélèvements de bile et

de brossage à 87,5% versus 68,8% avec le brossage seul ($p=0,083$). Cela confirme l'utilité de cette nouvelle méthode car dans 87,5% des cas, un diagnostic de malignité aura été obtenu soit lors de cette procédure endoscopique, soit lors d'une procédure ultérieure dont la réalisation aura été motivée par la présence de cellules suspectes. Cela permet donc un diagnostic positif plus rapide dans une situation où ce dernier était difficilement obtenu avec le brossage seul, et ce, dans le même temps que le drainage biliaire, souvent indispensable dans les premiers temps de la prise en charge d'une sténose biliaire. Par conséquent, même si aucune évaluation du rapport coût-efficacité n'a été réalisée dans cette étude, la réduction du nombre de procédures diagnostiques nécessaires est probablement à l'origine d'une diminution du coût global du diagnostic des sténoses biliaires, et de sa iatrogénie.

Par ailleurs, dans cette série, le taux de complications est comparable à la littérature (61-63), avec un nombre total de 9 complications (8,1%) dont 3 pancréatites aiguës (2,7%), et 3 angiocholites (2,7%). Les complications infectieuses sont discrètement plus fréquentes que dans les séries précédemment publiées, mais l'ensemble des patients concernés présentaient des facteurs de risque d'infection post-CPRE bien connus, tels que l'ictère, la présence d'un cholangiocarcinome, un âge élevé (supérieur à 80 ans) et la mise en place d'une prothèse biliaire (63, 64).

Cette méthode associant aspiration de bile et brossage biliaire offre donc de très bonnes performances diagnostiques, avec une technicité et une iatrogénicité comparables à la méthode de référence.

Méthodes diagnostiques alternatives ou complémentaires au brossage biliaire

De nombreuses autres méthodes sont en cours d'évaluation ou ont tenté d'améliorer le diagnostic des sténoses malignes. Deux axes se dessinent clairement : l'optimisation de la qualité des prélèvements qui passe par une sophistication du matériel endoscopique, et l'optimisation des analyses réalisées sur ces prélèvements par le biais de diverses méthodes de biologie moléculaire.

Ainsi, les biopsies endobiliaires par CPRE sont réalisées par certains centres car elles sont relativement simples à réaliser quoique légèrement plus invasives. Elles permettent en théorie l'obtention de véritables prélèvements histologiques, mais leur sensibilité est en réalité faible, à 48,1% (33). La cholangioscopie (Spyglass ®) permet d'obtenir de manière plus fiable des biopsies endobiliaires, ainsi qu'une analyse macroscopique par vision directe. Dans une récente méta-analyse, sa sensibilité et sa spécificité étaient de respectivement 66,2% (IC95 = 59,7-72,3%) et 97,0% (IC95 = 94,0-99,0%) dans le diagnostic du CCA, et de 74,7% (IC95 = 63,3-84,0%) et 93,3% (IC95 = 85,1-97,8%) dans le diagnostic de malignité des sténoses considérées comme indéterminées (65).

Une autre technique en cours d'évaluation qui semble prometteuse, est l'endomicroscopie confocale. Dans une récente série prospective de 89 patients, sa sensibilité était excellente, évaluée à 98,0%, mais avec une spécificité de seulement 67% (66). Ces deux techniques ont un coût, et un niveau d'expertise requis élevés, elles restent donc peu accessibles et ne sont disponibles que dans un nombre limité de centres experts.

Les nouvelles méthodes d'analyses semblent également permettre une amélioration notable des performances diagnostiques des prélèvements d'origine biliaire dans le diagnostic des sténoses malignes. Ainsi, l'utilisation de la technique d'hybridation in-situ par fluorescence ou « fluorescence in situ hybridization » (FISH) combinée à la cytologie, permet

de faire le diagnostic de CCA avec une sensibilité variant entre 72,2 et 85,2% dans la littérature (67). Trois anomalies chromosomiques sont classiquement recherchées : la trisomie 7, la tétrasomie, et la polysomie. La FISH est particulièrement intéressante dans la cholangite sclérosante primitive (7, 11), car la présence d'une polysomie semble être un marqueur de haut risque de développer un cholangiocarcinome, détectable en moyenne 2,7 ans avant l'apparition d'une véritable tumeur biliaire (7). Enfin, sur des prélèvements obtenus par brossage, la présence d'une délétion 9q21 du gène suppresseur CDKN2A permet de faire le diagnostic de CCA avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 97% lorsqu'elle est associée à une polysomie (68).

L'immunohistochimie améliore également la sensibilité des prélèvements cytologiques biliaires. Par exemple, l'immunomarquage de la protéine « Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 » (IMP3), surexprimée dans de nombreux cancers dont le cholangiocarcinome, permet d'augmenter la sensibilité du diagnostic de CCA à 86,4±4,9% lorsqu'il est combiné à l'examen cytologique de prélèvements obtenus par cytobrossage ou par cytoponction sous EEBP (67). Cette sensibilité atteint même 100% avec une spécificité de 95% lorsque la recherche de IMP3 et l'analyse cytologique sont associées à l'immunomarquage de la protéine S100A4 également surexprimée dans de nombreux cancers (69).

La recherche de protéines dans la bile par méthode de type protéomique permet également d'optimiser le rendement diagnostique des prélèvements de bile avec des sensibilités variant de 26,5±11,0% à 97,0±5,2% (67). Ainsi, lorsqu'elle est associée au dosage sérique du CA19-9, la lipocalin 2 ou « neutrophil gelatinase-associated lipocalin » a une sensibilité de 90,9% et une spécificité de 66,1% dans le diagnostic de CCA (70). L'association du CA19-9 sérique et de la glycoprotéine « carcinoembryonic cell adhesion molecule 6 » (CECAM6) permet elle, de faire le diagnostic de malignité d'une sténose biliaire avec une sensibilité de 97,0% et une spécificité de 83% (71).

L'analyse de séquences ARN par rétrotranscription et amplification par PCR, de gènes préalablement identifiés comme impliqués dans les cancers bilio-pancréatiques par

des méthodes de type transcriptomique, offre également des performances intéressantes dans le diagnostic des sténoses malignes. Par exemple, l'association des ARNs messagers des protéines IMP3, « homeobox B7 » (HOXB7), et de la sérine/thréonine kinase Nek2 dans des prélèvements biliaires obtenus par brossage, permettait le diagnostic de sténose biliaire maligne avec une sensibilité et une spécificité de respectivement, 77,8% et 87,2% dans une récente série rétrospective de 119 patients dont 52 CCA (72).

Il est aussi possible de rechercher dans la bile les mutations de l'ADN associées à la présence des cancers bilio-pancréatiques et notamment du CCA. Par exemple la recherche des mutations de KRAS dans la bile a une sensibilité de $47,0 \pm 3,6\%$ dans les sténoses malignes (67). Par ailleurs, dans une série de 76 patients dont 56 porteurs d'une CSP, une mutation de KRAS était présente chez 30% des patients porteurs de CSP. Sa présence semblait être associée à un plus grand risque de développer un cholangiocarcinome ou des dysplasies biliaires. La présence d'une mutation KRAS pourrait donc constituer un marqueur d'un stade très précoce de la cancérogénèse biliaire et avoir un intérêt pronostique dans le suivi des CSP (73). Elle n'a cependant aucune valeur diagnostique.

Enfin, l'ARN et l'ADN peuvent également être détectés au niveau plasmatique par des méthodes de type « digital PCR » avec parfois d'excellents résultats. Par exemple, le micro ARN miR-21 est impliqué dans la prolifération, l'invasion et la migration cellulaires, ce qui en fait un marqueur pertinent dans plusieurs cancers. Ainsi, dans une série comprenant 94 sténoses malignes, 23 bénignes, et 50 sujets sains, la présence de miR-21 permet de distinguer les patients avec une sténose maligne, des sujets sains avec une sensibilité et une spécificité de 84,0% et 98,0%, et de faire la différence entre sténoses malignes et sténoses bénignes avec une sensibilité et une spécificité de 71,2% et 91,6%. Lorsque cette recherche était combiné au marqueur sérique CA19-9, les sensibilités et spécificités, étaient respectivement de 90,4% et 100% lorsque comparé aux volontaires sains, et de 79,8% et 91,3% lorsque comparé aux sténoses bénignes (74).

La majeure partie de ces techniques est encore en cours d'évaluation, et ne bénéficie à l'heure actuelle, que d'un faible niveau de preuve scientifique. Si leur sensibilité est parfois excellente, leur spécificité reste souvent insuffisante. De plus, leur niveau de technicité, et l'expertise qu'elles requièrent sont souvent élevés, ce qui les rend inaccessibles à la majorité des centres d'endoscopie digestive.

Notre nouvelle méthode associant aspiration de bile et brossage biliaire permet de faire le diagnostic de malignité des sténoses biliaires avec une sensibilité et une spécificité de respectivement 84,3% et 100% ce qui fait partie des meilleures performances diagnostiques possibles à ce jour. Par ailleurs, étant réalisée au cours d'un geste thérapeutique souvent indispensable dans la prise en charge des patients ayant une sténose biliaire maligne, son coût et sa morbidité restent comparables à la méthode de référence qu'est le brossage biliaire par CPRE. Ainsi, afin d'optimiser l'efficacité du diagnostic des sténoses malignes et notamment du cholangiocarcinome, cette méthode devrait être ajoutée à la procédure diagnostique standard.

Références - Parties I et III

1. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *The Lancet* 2005;366:1303-1314.
2. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, Pawlik TM, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2014;60:1268-1289.
3. Everhart JE, Ruhl CE. Burden of digestive diseases in the United States Part III: Liver, biliary tract, and pancreas. *Gastroenterology* 2009;136:1134-1144.
4. Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC, Gentile R, et al. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2010;2:407-416.
5. Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, Zampino MG, Gatta G, Heinemann V. Cholangiocarcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;69:259-270.
6. Broomé U, Olsson R, Lööf L, Bodemar G, Hultcrantz R, Danielsson A, Prytz H, et al. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996;38:610-615.
7. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *The Lancet* 2014;383:2168-2179.
8. Malhi H, Gores GJ. Review article: the modern diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1287-1296.
9. Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol* 2010;2:419-427.
10. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:512-522.

11. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2013;145:1215-1229.
12. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 2000.
13. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006;25:3818-3822.
14. Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, De Vos R, Verslype C, Aerts R, Yano H, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 2008;47:1544-1556.
15. Cardinale V, Carpino G, Reid L, Gaudio E, Alvaro D. Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity. *World J Gastrointest Oncol* 2012;4:94-102.
16. Holczbauer A, Factor VM, Andersen JB, Marquardt JU, Kleiner DE, Raggi C, Kitade M, et al. Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology* 2013;145:221-231.
17. Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, Gores GJ. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2005;42:1329-1338.
18. Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 2005;128:2054-2065.
19. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-293.
20. Matter MS, Decaens T, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: current state and future trends. *J Hepatol* 2014;60:855-865.

21. Wehbe H, Henson R, Meng F, Mize-Berge J, Patel T. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression. *Cancer Res* 2006;66:10517-10524.
22. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, Conner EA, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 2012;142:1021-1031 e1015.
23. Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, Kosuge T, et al. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011;105:131-138.
24. McKay SC, Unger K, Pericleous S, Stamp G, Thomas G, Hutchins RR, Spalding DR. Array comparative genomic hybridization identifies novel potential therapeutic targets in cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* 2011;13:309-319.
25. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *New England Journal of Medicine* 2000;342:1350-1358.
26. Andersen JB, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:266-272.
27. Iavarone M, Piscaglia F, Vavassori S, Galassi M, Sangiovanni A, Venerandi L, Forzenigo LV, et al. Contrast enhanced CT-scan to diagnose intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013;58:1188-1193.
28. Corvera CU, Blumgart LH, Akhurst T, DeMatteo RP, D'Angelica M, Fong Y, Jarnagin WR. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography influences management decisions in patients with biliary cancer. *J Am Coll Surg* 2008;206:57-65.
29. Heimbach JK, Sanchez W, Rosen CB, Gores GJ. Trans-peritoneal fine needle aspiration biopsy of hilar cholangiocarcinoma is associated with disease dissemination. *HPB (Oxford)* 2011;13:356-360.
30. Osnes M, Serck-Hanssen A, Myren J. Endoscopic retrograde brush cytology (ERBC) of the biliary and pancreatic ducts. *Scand J Gastroenterol* 1975;10:829-831.

31. Trikudanathan G, Navaneethan U, Njei B, Vargo JJ, Parsi MA. Diagnostic yield of bile duct brushings for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2014;79:783-789.
32. Burnett AS, Calvert TJ, Chokshi RJ. Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10-y review of the literature. *J Surg Res* 2013;184:304-311.
33. Navaneethan U, Njei B, Lourdasamy V, Konjeti R, Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2015;81:168-176.
34. de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, Paul A, Alexandrescu S, Marques H, Pulitano C, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment. *J Clin Oncol* 2011;29:3140-3145.
35. Deoliveira ML, Schulick RD, Nimura Y, Rosen C, Gores G, Neuhaus P, Clavien PA. New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011;53:1363-1371.
36. Darwish Murad S, Kim WR, Harnois DM, Douglas DD, Burton J, Kulik LM, Botha JF, et al. Efficacy of neoadjuvant chemoradiation, followed by liver transplantation, for perihilar cholangiocarcinoma at 12 US centers. *Gastroenterology* 2012;143:88-98 e83; quiz e14.
37. Kuhlmann JB, Blum HE. Locoregional therapy for cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29:324-328.
38. Kim JH, Won HJ, Shin YM, Kim KA, Kim PN. Radiofrequency ablation for the treatment of primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2011;196:W205-209.
39. Butros SR, Shenoy-Bhangle A, Mueller PR, Arellano RS. Radiofrequency ablation of intrahepatic cholangiocarcinoma: feasibility, local tumor control, and long-term outcome. *Clin Imaging* 2014;38:490-494.

40. Park SY, Kim JH, Yoon HJ, Lee IS, Yoon HK, Kim KP. Transarterial chemoembolization versus supportive therapy in the palliative treatment of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Radiol* 2011;66:322-328.
41. Kiefer MV, Albert M, McNally M, Robertson M, Sun W, Fraker D, Olthoff K, et al. Chemoembolization of intrahepatic cholangiocarcinoma with cisplatin, doxorubicin, mitomycin C, ethiodol, and polyvinyl alcohol: a 2-center study. *Cancer* 2011;117:1498-1505.
42. Shen WF, Zhong W, Liu Q, Sui CJ, Huang YQ, Yang JM. Adjuvant transcatheter arterial chemoembolization for intrahepatic cholangiocarcinoma after curative surgery: retrospective control study. *World J Surg* 2011;35:2083-2091.
43. Kuhlmann JB, Euringer W, Spangenberg HC, Breidert M, Blum HE, Harder J, Fischer R. Treatment of unresectable cholangiocarcinoma: conventional transarterial chemoembolization compared with drug eluting bead-transarterial chemoembolization and systemic chemotherapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012;24:437-443.
44. Barney BM, Olivier KR, Miller RC, Haddock MG. Clinical outcomes and toxicity using stereotactic body radiotherapy (SBRT) for advanced cholangiocarcinoma. *Radiat Oncol* 2012;7:67.
45. Jung da H, Kim MS, Cho CK, Yoo HJ, Jang WI, Seo YS, Paik EK, et al. Outcomes of stereotactic body radiotherapy for unresectable primary or recurrent cholangiocarcinoma. *Radiat Oncol J* 2014;32:163-169.
46. Polistina FA, Guglielmi R, Baiocchi C, Francescon P, Scalchi P, Febbraro A, Costantin G, et al. Chemoradiation treatment with gemcitabine plus stereotactic body radiotherapy for unresectable, non-metastatic, locally advanced hilar cholangiocarcinoma. Results of a five year experience. *Radiother Oncol* 2011;99:120-123.
47. Balosso J, Bartolomeu, A, Bedenne, L et al. Essai de phase II multicentrique randomisé comparant une radiochimiothérapie (RTCT) à une chimiothérapie seule (CT) associant la gemcitabine et l'oxaliplatine dans les cancers des voies biliaires localement avancés non résécables (FFCD9902).

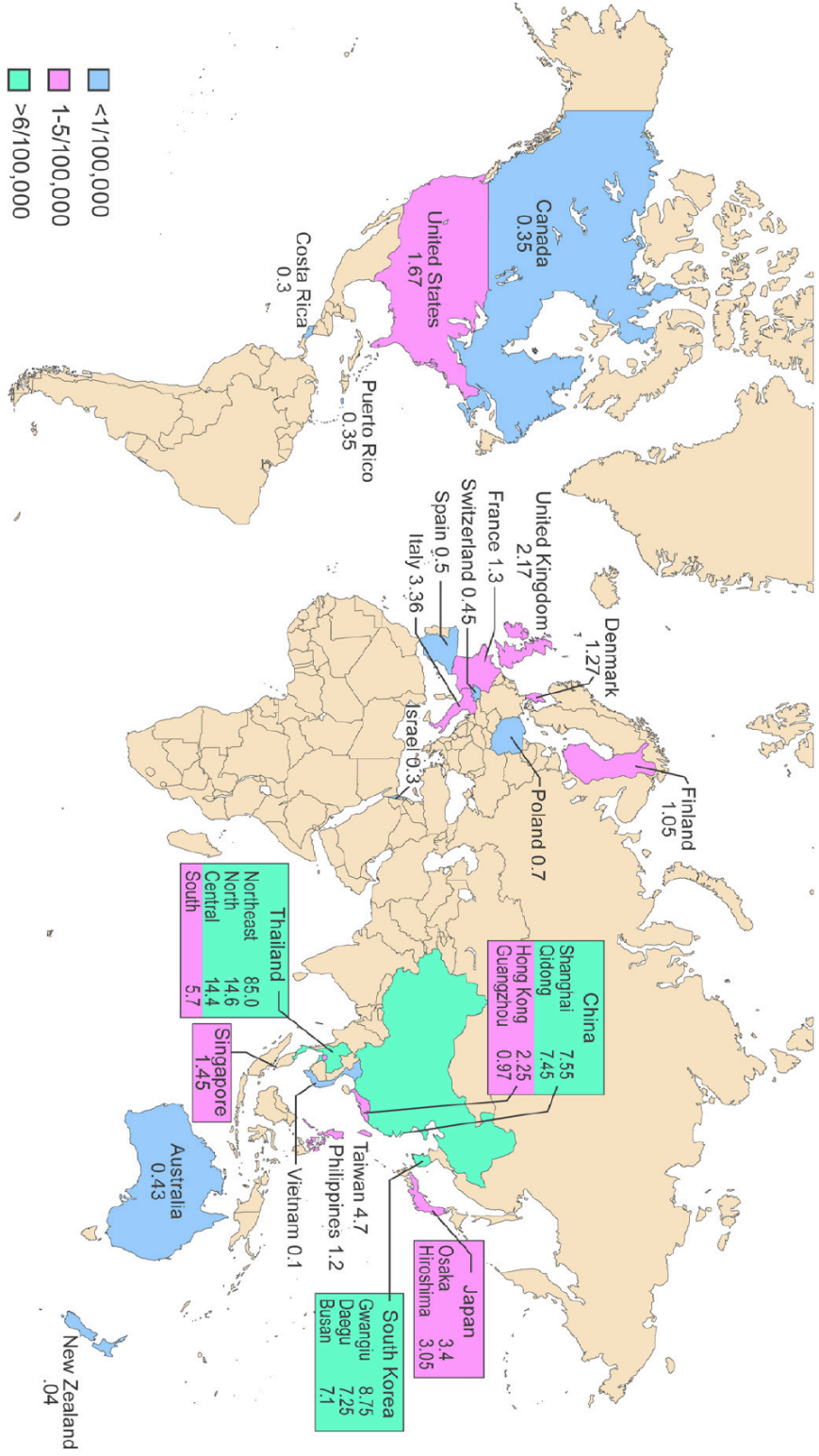
48. Ibrahim SM, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Sato KT, Ryu RK, Masterson EJ, Newman SB, et al. Treatment of unresectable cholangiocarcinoma using yttrium-90 microspheres: results from a pilot study. *Cancer* 2008;113:2119-2128.
49. Hoffmann RT, Paprottka PM, Schon A, Bamberg F, Haug A, Durr EM, Rauch B, et al. Transarterial hepatic yttrium-90 radioembolization in patients with unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: factors associated with prolonged survival. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2012;35:105-116.
50. Hyder O, Marsh JW, Salem R, Petre EN, Kalva S, Liapi E, Cosgrove D, et al. Intra-arterial therapy for advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol* 2013;20:3779-3786.
51. Horgan AM, Amir E, Walter T, Knox JJ. Adjuvant therapy in the treatment of biliary tract cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012;30:1934-1940.
52. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, et al. Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer. *New England Journal of Medicine* 2010;362:1273-1281.
53. Harder J, Riecken B, Kummer O, Lohrmann C, Otto F, Usadel H, Geissler M, et al. Outpatient chemotherapy with gemcitabine and oxaliplatin in patients with biliary tract cancer. *Br J Cancer* 2006;95:848-852.
54. Andre T, Tournigand C, Rosmorduc O, Provent S, Maindrault-Goebel F, Avenin D, Selle F, et al. Gemcitabine combined with oxaliplatin (GEMOX) in advanced biliary tract adenocarcinoma: a GERCOR study. *Ann Oncol* 2004;15:1339-1343.
55. Lee J, Park SH, Chang H-M, Kim JS, Choi HJ, Lee MA, Chang JS, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2012;13:181-188.
56. Malka D, Cervera P, Foulon S, Trarbach T, de la Fouchardière C, Boucher E, Fartoux L, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2014;15:819-828.

57. Eckel F, Schmid RM. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer* 2007;96:896-902.
58. Curcio G, Traina M, Mocciaro F, Liotta R, Gentile R, Tarantino I, Barresi L, et al. Intraductal aspiration: a promising new tissue-sampling technique for the diagnosis of suspected malignant biliary strictures. *Gastrointest Endosc* 2012;75:798-804.
59. Hewitt MJ, McPhail MJ, Possamai L, Dhar A, Vlavianos P, Monahan KJ. EUS-guided FNA for diagnosis of solid pancreatic neoplasms: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2012;75:319-331.
60. Adamsen S, Olsen M, Jendresen MB, Holck S, Glenthøj A. Endobiliary brush biopsy: Intra- and interobserver variation in cytological evaluation of brushings from bile duct strictures. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:597-603.
61. Masci E, Toti G, Mariani A, Curioni S, Lomazzi A, Dinelli M, Minoli G, et al. Complications of diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:417-423.
62. Vandervoort J, Soetikno RM, Tham TC, Wong RC, Ferrari AP, Jr., Montes H, Roston AD, et al. Risk factors for complications after performance of ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002;56:652-656.
63. Cotton PB, Garrow DA, Gallagher J, Romagnuolo J. Risk factors for complications after ERCP: a multivariate analysis of 11,497 procedures over 12 years. *Gastrointest Endosc* 2009;70:80-88.
64. Committee ASoP, Anderson MA, Fisher L, Jain R, Evans JA, Appalaneni V, Ben-Menachem T, et al. Complications of ERCP. *Gastrointest Endosc* 2012;75:467-473.
65. Navaneethan U, Hasan MK, Lourdasamy V, Njei B, Varadarajulu S, Hawes RH. Single-operator cholangioscopy and targeted biopsies in the diagnosis of indeterminate biliary strictures: a systematic review. *Gastrointest Endosc* 2015.
66. Meining A, Chen YK, Pleskow D, Stevens P, Shah RJ, Chuttani R, Michalek J, et al. Direct visualization of indeterminate pancreaticobiliary strictures with probe-based confocal laser endomicroscopy: a multicenter experience. *Gastrointest Endosc* 2011;74:961-968.

67. Burnett AS, Bailey J, Oliver JB, Ahlawat S, Chokshi RJ. Sensitivity of alternative testing for pancreaticobiliary cancer: a 10-y review of the literature. *J Surg Res* 2014;190:535-547.
68. Gonda TA, Glick MP, Sethi A, Ponerros JM, Palmas W, Iqbal S, Gonzalez S, et al. Polysomy and p16 deletion by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of indeterminate biliary strictures. *Gastrointest Endosc* 2012;75:74-79.
69. Ligato S, Zhao H, Mandich D, Cartun RW. KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer) and S100A4-protein immunoreactivity improves the diagnostic sensitivity of biliary brushing cytology for diagnosing pancreaticobiliary malignancies. *Diagn Cytopathol* 2008;36:561-567.
70. Budzynska A, Nowakowska-Dulawa E, Marek T, Boldys H, Nowak A, Hartleb M. Differentiation of pancreatobiliary cancer from benign biliary strictures using neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Physiol Pharmacol*. 2013 64(1):109–114.
71. Farina A, Dumonceau JM, Antinori P, Annessi-Ramseyer I, Frossard JL, Hochstrasser DF, Delhaye M, et al. Bile carcinoembryonic cell adhesion molecule 6 (CEAM6) as a biomarker of malignant biliary stenoses. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844:1018-1025.
72. Nischalke HD, Schmitz V, Luda C, Aldenhoff K, Berger C, Feldmann G, Sauerbruch T, et al. Detection of IGF2BP3, HOXB7, and NEK2 mRNA expression in brush cytology specimens as a new diagnostic tool in patients with biliary strictures. *PLoS One* 2012;7:e42141.
73. Kubicka S, Kühnel F, Flemming P, Hain B, Kezmic N, Rudolph KL, Manns M, et al. K-ras mutations in the bile of patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2001;48:403-408.
74. Kishimoto T, Eguchi H, Nagano H, Kobayashi S, Akita H, Hama N, Wada H, et al. Plasma miR-21 is a novel diagnostic biomarker for biliary tract cancer. *Cancer Sci* 2013;104:1626-1631.

ANNEXES

Annexe 1 : Incidence du cholangiocarcinome dans le monde. Bridgewater et al. Journal of Hepatology 2014



Annexe 2 : Classifications TNM (7e édition) – UICC – AJCC (2010) des cholangiocarcinomes

Annexe 2A : Cancers des voies biliaires intra-hépatiques.

Extension		M0		M1
		N0	N1	
Tis	In situ (carcinome intraductal)	0		
T1	Tumeur solitaire sans invasion vasculaire	I	IV A	IV B
T2a	Tumeur solitaire avec invasion vasculaire	II		
T2b	Tumeurs multiples			
T3	Péritoine viscéral (perforation) Organes extra-hépatiques adjacents	III		
T4	Péri-ductale	IV A		

T : tumeur primitive (TX : non évaluable ; T0 : non décelable).

N : métastases ganglionnaires régionales (NX : non évaluables ; N0 : absence ; N1/N2 : présence).

M : métastases à distance (M0 : absence ; M1 : présence ; N.B. : MX : abandonné).

Annexe 2B : Cancers des voies biliaires extra-hépatiques proximales

Extension		M0			M1
		N0	N1*	N2**	
Tis	In situ	0			
T1	Paroi biliaire (jusqu'au muscle ou au tissu fibreux)	I	III B	IV B	
T2a	Au-delà de la paroi biliaire (jusqu'au tissu adipeux)	II			
T2b	Parenchyme hépatique adjacent	III A			
T3	Veine porte (atteinte unilatérale) Artère hépatique (atteinte unilatérale)	IV A			
T4	Veine porte (tronc ou atteinte bilatérale) Artère hépatique commune Canaux biliaires secondaires - Atteinte bilatérale - Atteinte unilatérale avec envahissement controlatéral de la veine porte ou de l'artère hépatique				

* Le long du canal cystique, du canal hépatique commun, de l'artère hépatique commune et de la veine porte.

** Péri-aortiques, péri-caves, du tronc coeliaque et de l'artère mésentérique supérieure.

T : tumeur primitive (TX : non évaluable ; T0 : non décelable).

N : métastases ganglionnaires régionales (NX : non évaluables ; N0 : absence ; N1/N2 : présence).

M : métastases à distance (M0 : absence ; M1 : présence ; N.B. : MX : abandonné).

Annexe 2C : Cancers des voies biliaires extra-hépatiques distales

Extension		M0		M1
		N0	N1	
Tis	In situ	0		
T1	Paroi biliaire (jusqu'au muscle ou au tissu fibreux)	I A	II B	IV
T2	Au-delà de la paroi biliaire	I B		
T3	Organes adjacents*	II A		
T4	Tronc coeliaque Artère mésentérique supérieure	III		

* Vésicule biliaire, pancréas, duodénum ou autres organes adjacents.

T : tumeur primitive (TX : non évaluable ; T0 : non décelable).

N : métastases ganglionnaires régionales (NX : non évaluables ; N0 : absence ; N1/N2 : présence).

M : métastases à distance (M0 : absence ; M1 : présence ; N.B. : MX : abandonné).

Annexe 3 : Poster présenté à l'AALSD 2014. Boston, USA



Prospective evaluation of the performance of per ERCP bile aspiration combined to endobiliary brushing in the diagnosis of malignant strictures of the biliary tract.

Gaël Roth¹, Philippe Bichard¹, Hubert Roth², Michele Fior-Gozlan³, Jean Arroux¹, Christian Letroublon⁴, Ivan Briçault⁵, Vincent Leroy¹, and Thomas Decaens¹

¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Grenoble University Hospital, Grenoble, Isère, France;
²Department of Gastroenterology, Grenoble University Hospital, Grenoble, Isère, France;
³Department of Endoscopy, Grenoble University Hospital, Grenoble, Isère, France;
⁴Department of Digestive surgery, Grenoble University Hospital, Grenoble, Isère, France;
⁵Department of Radiology, Grenoble University Hospital, Grenoble, Isère, France.



Introduction

- Cholangiocarcinoma (CCA) is the second commonest malignancy of the liver, and its incidence and mortality appear to be increasing worldwide (1)
 - Brushing is considered as the technique of reference in the diagnosis of malignant biliary strictures, but its sensitivity is considered as widely insufficient as shown in two recent meta-analysis in 2013 by Thirukudamathan et al. (2) and Brunei et al. (3) with respectively Se = 43% and 42%.
 - The aim of this prospective study was to evaluate the diagnostic performance of bile aspiration in association with biliary brushing during endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP), compared to brushing alone.

- 1- Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. Lancet 2005; 366: 1303-14
- 2- Thirukudamathan G, Navaneethan U, Neki B, Varoo JI, Parsi MA. Diagnostic yield of the data brushings for endobioaspiration in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. J Clin Gastroenterol 2013; 47: 102-10
- 3- Brunei AS, Chert T, and Chikhal P. Sensitivity of endoscopic average cholangiopancreatography standard cytology: 10-y review of the literature. Journal of surgical research 184 (2013) 304-311

Sample Technique

- ERCP
- Endoscopic sphincterotomy
- Endobiliary tract brushing on a 0.035 inches guide wire : 10 passages across the stenosis with a cytology brush catheter (Cook® Fusion FS-CH1.5-S)
- Aspiration of bile by the catheter device (8 French diameter) of 2 to 10 mL before and after brushing

Cytological analysis

- Brushing :
 - 2 glass slides for classical analysis (May-Grunwald-Giemsa (MGG) + Papanicolaou stainings)
 - Thin layer technique in PreservCyt® tube
- Bile : 3 to 10 ml in a dry sterile tube for classical analysis.
- Two air dried slides reserved for complementary techniques if necessary (Bile Alcan Blue, PAS diastase, immuno cytology)

Patients

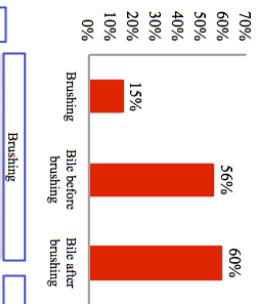
- Every biliary stenoses treated by ERCP from January 2007 to December 2012
- Exclusion criteria:
 - Extrinsec compressions
 - Diagnoses already known
 - n = 111 patients
 - 68 male (61%), 43 female (39%)
 - Mean age ± 84 : 66.5 ± 15.4
 - 74 (67%) strictly undetermined stenoses

Results

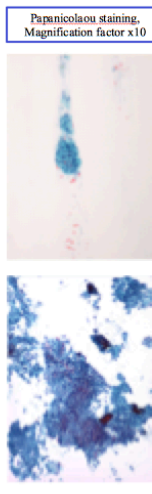
Malignant stenoses	Final diagnosis	
	n = 51 (46%)	n = 60 (54%)
Paracarcinoma adenocarcinomas	7 (14%)	16 (27%)
Cholangiocarcinomas	43 (84%)	10 (17%)
-Klatskin	24	10 (17%)
-Common bile duct	18	8 (13%)
-Intra hepatic	1	7 (12%)
Amplipolycarcinoma	1 (2%)	9 (15%)
		Benign stenoses
		Paracarcinoma
		Primary sclerosing cholangitis
		Post operative stenosis
		Post fibrosis stenosis
		Odditis and other benign ampullary stenosis
		Undetermined benign stenosis

Cellularity

Percentage of rich samples according to the different sampling methods.



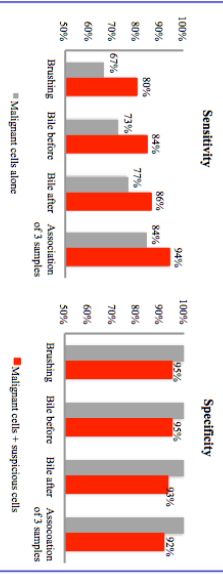
Cellularity of bile before and after brushing superior to brushing (p<0.0001)



Diagnostic performances

Accuracy for malignant diagnosis after detection of malignant cells according to the different sampling methods.	SP (%)		Se (%)		PPV (%)		NPV (%)		Accuracy (%)	Bonferroni P value
	Brushing alone	Bile after brushing	Brushing alone	Bile after brushing	Brushing alone	Bile after brushing	Brushing alone	Bile after brushing		
Detection of malignant cells	100	100	67	77	100	100	78	87	87	Reference
Brushing alone	100	100	67	77	100	100	78	87	87	1
Bile after brushing	100	100	77	84	100	100	83	89	89	0.646
Combination of 3 samples	100	100	84	91	100	100	88	93	93	0.004

Incorporation of suspicious results in positive results



Combination of 3 samples > Brushing (p=0.05)

Accuracy for malignant diagnosis of strictly undetermined stenoses	Sg (%)		Se (%)		PPV (%)		NPV (%)		Accuracy (%)	P value
	Brushing alone	Combination of 3 samples	Brushing alone	Combination of 3 samples	Brushing alone	Combination of 3 samples	Brushing alone	Combination of 3 samples		
Detection of malignant cells	100	100	44	63	100	100	78	88	88	RdC
Brushing alone	100	100	44	63	100	100	78	88	88	RdC
Combination of 3 samples	100	100	63	91	100	100	91	92	92	0.063
Detection of malignant and suspicious cells	94	94	69	79	92	92	89	89	89	RdC
Brushing alone	94	94	69	79	92	92	89	89	89	RdC
Combination of 3 samples	91	91	88	88	75	96	96	91	91	0.140

Conclusion

- Combination of bile aspiration before and after brushing, with brushing :
- Is a quick and secure procedure
- Increases cellularity and diagnostic performance of biliary cytology in the diagnosis of malignant biliary strictures with a sensitivity of 84.3%
- Should be added at the standard procedure

Annexe 4 : Poster présenté aux Journées de la Recherche médicale 2015. Grenoble, France.



Evaluation prospective de la performance de l'aspiration de bile associée au brossage biliaire par CPRE dans le diagnostic des sténoses biliaires malignes.

Gaëll Roth¹, Philippe Richard¹, Michele Fior-Gozlan², Hubert Roth³, Jean Auroux¹, Olivier Risse⁴, Christian Letoubion^{4,5}, Marie Héliène Laverrière², Ivan Bricault^{4,6}, Vincent Leroy^{1,5} et Thomas Decaens^{1,5}

1. Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, Pôle Digestion, CHU Grenoble, France
2. Clinique Universitaire de Cytologie et Pathologie, Pôle Biologie et Pathologie, CHU Grenoble, France
3. Pôle Recherche, CHU Grenoble, France
4. Clinique Universitaire de chirurgie digestive, Pôle Digestion, CHU Grenoble, France.
5. Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.
6. Clinique Universitaire de Radiologie et Imagerie Médicale, Pôle Imagerie, CHU Grenoble, France.



Introduction

Le brossage biliaire des sténoses suspectes au cours d'une cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE) est considéré comme spécifique mais très peu sensible. L'objectif de cette étude est de comparer l'association du brossage biliaire et de l'aspiration de bile avant et après brossage biliaire par CPRE, au brossage biliaire seul.

1 - Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. Lancet 2005;
 2 - Trikudanathan G, Navaneethan U, Njei B, Vargo JJ, Parsi MA. Diagnostic yield of bile duct brushings for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. Gastrointest Endosc 2013
 3 - Burnett AS, Calvert TJ, and Chokshi RJ. Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10-y review of the literature. Journal of surgical research 184 (2013) 304-311

Méthode

Technique de prélèvement

Cholangiopancréatographie endoscopique rétrograde (CPRE) :

- Sphinctérotomie endoscopique
- Cytobrosse protégée par cathéter 8 Fr montée sur fil guide (ref. FS-CB-1.5-S Cook®)
- Prélèvements cytologiques biliaires :
 - Aspiration de bile avant brossage (2-10 mL)
 - Cytobrossage : 10 passages (in to-and-fro fashion)
 - Aspiration de bile après brossage (2- 10 mL)

Examens cytologique :

- Brossage : analyse classique avec colorations de May-Grunwald-Giemsa et Papanicolaou et analyse en couches minces
- Bile avant / après : analyse classique

Critères diagnostiques :

- Preuve anatomo-pathologique de cancer
- Suivi supérieur à 1 an sans développement de cancer

Population étudiée

- Sténoses biliaires traitées par CPRE de janvier 2007 à décembre 2012 au CHU de Grenoble
- Absence d'élément d'orientation étiologique = sténose indéterminée
- Critères d'exclusion :
 - sténoses secondaires à une compression extrinsèque
 - diagnostic déjà connu

Résultats

Caractéristiques de la population

Nombre (n=111)	
Age : moyen (DS)	67 (15.4)
Sexe	
- Hommes	68 (61%)
- Femmes	43 (39%)
Localisation de la sténose	
- Voie biliaire principale	77 (70%)
- Convergence	27 (24%)
- Intra hépatique	7 (6%)
Sténoses indéterminées	74 (67%)

Rendement diagnostique

Aspiration de bile

Brossage biliaire

Cellularité des prélèvements

Pourcentage de prélèvements riches

Prélèvement	Pourcentage
Brossage	15%
Aspiration de bile AVANT	56%
Aspiration de bile APRES	60%

Cellularité des prélèvements de bile avant et après brossage supérieure au brossage (p<0.0001)

Diagnostic final

Sténoses malignes	n = 51 (46%)	Sténoses bénignes	n = 60 (54%)
Adénocarcinomes pancréatiques	7 (14%)	Pancréatites	16 (27%)
Cholangiocarcinomes	43 (84%)	Cholangites sclérosantes primitives	10 (17%)
- Kistatin	24	Sténoses post opératoires	10 (17%)
- Voie biliaire principale	18	Sténoses post lithiasiques	8 (13%)
- Intra hépatique	1		
Adénocarcinome ampullaire	1(2%)	Oddites et autres sténoses ampullaires bénignes	7 (12%)
		Etiologie indéterminée	9 (15%)

Performances diagnostiques

Résultat cytologique positif = présence de cellules malignes						
Type de prélèvement	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Patients bien classés (%)	Bonferroni P value
Brossage seul	100	67	100	78	87	Référence
Aspiration de bile avant brossage	100	73	100	81	85	1
Aspiration de bile après brossage	100	77	100	83	89	0.646
Association des 3 prélèvements	100	84	100	88	93	0.004

Résultat cytologique positif = Présence de cellules malignes + cellules suspectes						
Type de prélèvement	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Patients bien classés (%)	Bonferroni P value
Brossage seul	95	80	93	85	88	Référence
Aspiration de bile avant brossage	95	84	94	88	90	
Aspiration de bile après brossage	93	86	92	89	90	
Association des 3 prélèvements	92	94	91	95	93	0.05

Groupe : sténoses indéterminées						
Résultat cytologique positif = présence de cellules malignes						
Type de prélèvement	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Patients bien classés (%)	Bonferroni P value
Brossage seul	100	44	100	78	88	Référence
Aspiration de bile avant brossage	100	44	100	87	88	
Aspiration de bile après brossage	100	50	100	88	89	
Association des 3 prélèvements	100	63	100	91	92	0.06

Résultat cytologique positif = Présence de cellules malignes + cellules suspectes						
Type de prélèvement	Sp (%)	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)	Patients bien classés (%)	Bonferroni P value
Brossage seul	95	69	79	92	90	Référence
Aspiration de bile avant brossage	95	69	79	92	90	
Aspiration de bile après brossage	93	69	73	92	88	
Association des 3 prélèvements	92	88	74	97	91	0.136

Conclusion : L'aspiration de bile avant et après brossage est une procédure simple et efficace qui permet une augmentation significative des performances diagnostiques de la cytologie biliaire. Elle doit donc être ajoutée à la procédure diagnostique standard pour optimiser le diagnostic des sténoses biliaires malignes.

CONCLUSION

THÈSE SOUTENUE PAR : GAËL ROTH

TITRE : Évaluation prospective de la performance de l'aspiration de bile associée au brossage biliaire par CPRE dans le diagnostic des sténoses biliaires malignes.

Le cholangiocarcinome (CCA) est la deuxième cause de tumeur hépatique primitive dans sa forme intra-hépatique, et le deuxième cancer bilio-pancréatique dans sa forme extra-hépatique. Son pronostic est très sombre avec une survie à 5 ans inférieure à 5 %. Les options thérapeutiques sont limitées, et les patients n'ont accès qu'à un traitement palliatif dans 70% des cas. Dans cette situation, une preuve anatomopathologique est indispensable afin de guider la prise en charge. Par ailleurs, le principal mode de révélation de cette pathologie est un ictère obstructif qui nécessite la réalisation d'un drainage biliaire dans les premiers temps de la prise en charge.

A l'heure actuelle, la méthode de référence pour l'obtention d'un diagnostic cytologique est le brossage biliaire au cours de la cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE). Ce dernier souffre d'une sensibilité médiocre, proche de 40%. L'objectif de notre étude était donc d'évaluer une nouvelle méthode de prélèvement cytologique endobiliaire associant aspiration de bile et brossage biliaire dans le but d'améliorer les performances diagnostiques de la cytologie biliaire dans le diagnostic du cholangiocarcinome.

Nous avons ainsi réalisé une étude prospective incluant 111 patients ayant bénéficié d'une CPRE dans le traitement d'une sténose biliaire entre janvier 2007 et décembre 2012. Les sténoses secondaires à une compression extrinsèque ont été exclues et nous avons

considéré comme indéterminées, les sténoses pour lesquelles les imageries pré-opératoires ne permettaient aucune orientation étiologique.

La procédure endoscopique consistait en une CPRE avec sphinctérotomie première, une aspiration de bile avant et après un cytobrossage classique de sorte à obtenir 3 prélèvements. Les résultats des examens cytologiques étaient confirmés soit par une analyse histologique, soit par le suivi du patient.

Un diagnostic final de sténose maligne a été retenu chez 51 patients (46%) dont 43 cholangiocarcinomes, et 60 sténoses étaient bénignes (54%). La cellularité des prélèvements obtenus par aspiration de bile étaient statistiquement supérieure à celle obtenue par brossage ($p < 0,0001$). La spécificité était de 100% pour l'ensemble des prélèvements. Notre nouvelle méthode associant aspiration de bile et brossage biliaire avait une sensibilité de 84% vs 67% avec le brossage biliaire seul ($p = 0,004$) dans l'ensemble de la population étudiée, et de 63% vs 44% ($p = 0,06$) dans le groupe des sténoses indéterminées.

L'aspiration de bile avant et après brossage, associée au brossage biliaire est une procédure simple et efficace qui permet une augmentation significative des performances diagnostiques de la cytologie biliaire. Elle doit donc être ajoutée à la procédure diagnostique standard pour optimiser le diagnostic des sténoses biliaires malignes et notamment du cholangiocarcinome.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

21/7/2015

LE DOYEN

J.P. ROMANET



LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR J.P. ZARSKI

Pr ZARSKI Jean-Pierre

Hépatogastroentérologie

CHU GRENOBLE

04 76 76 54 41

RPPS 10003869632

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
PU-PH	BETTEGA Georges	Chirurgie maxillo-faciale, stomatologie
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
MCU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie

PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	DE GAUDEMARIS Régis	Médecine et santé au travail
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
MCU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GODFRAIND Catherine	Anatomie et cytologie pathologiques (type clinique)
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation

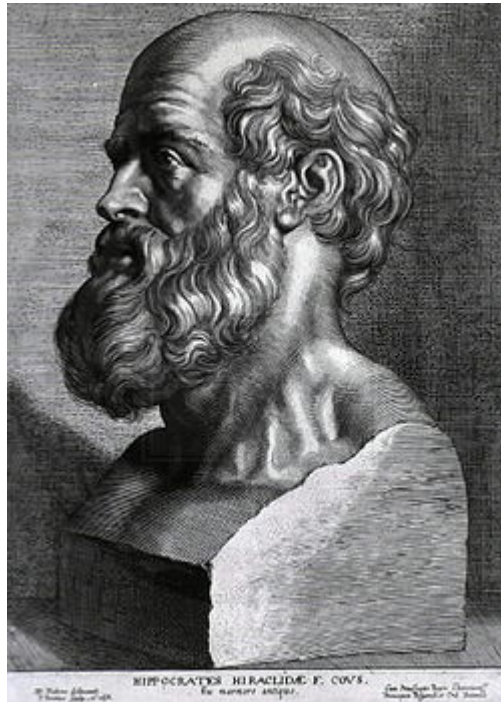
Mise à jour le 14 novembre 2014

PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
PU-PH	LANTUEJOU Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU-PH	LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine	Physiologie
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	chirurgie générale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MACHECOURT Jacques	Cardiologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MCLEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MOUCHET Patrick	Physiologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlogie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé

Mise à jour le 14 novembre 2014

MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
MCU-PH	RAY Pierre	Génétique
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET J. Paul	Ophthalmologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

SERMENT D'HIPPOCRATE



En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires. Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.