Étude de la reproductibilité et mise au point des critères cytomorphologiques d'adénocarcinome canalaire pancréatique et de cholangiocarcinome extra-hépatique sur étalements de liquide biliaire

Adeline Bailly

▶ **To cite this version:**

Adeline Bailly. Étude de la reproductibilité et mise au point des critères cytomorphologiques d'adénocarcinome canalaire pancréatique et de cholangiocarcinome extra-hépatique sur étalements de liquide biliaire. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02325324

HAL Id: dumas-02325324

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02325324

Submitted on 22 Oct 2019

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.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

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 SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

UFR DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Année : 2019

ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE ET MISE AU POINT DES CRITERES CYTO-MORPHOLOGIQUES D'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE ET DE CHOLANGIOCARCINOME EXTRA-HEPATIQUE SUR ETALEMENTS DE LIQUIDE BILIAIRE

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DIPLÔME D'ÉTAT

BAILLY Adeline

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE *

Le : 16 Octobre 2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Présidente du jury : Madame le Professeur Nathalie STURM

Membres :

Madame le Docteur Diane GIOVANNINI (Directrice de Thèse)

Madame le Professeur Séverine VALMARY-DEGANO

Monsieur le Docteur Pierre-Yves EYRAUD

Monsieur le Professeur Thomas DECAENS

**L'UFR 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.*

UFR de Médecine

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen de la Faculté : **Pr. Patrice MORAND**

Année 2018-2019

ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BOLLA Michel	Cancérologie-Radiothérapie
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
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
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et de Pathologique Cytologiques
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
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH	CANALI-SCHWEBEL Carole	Réanimation médicale
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	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophtalmologie

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie générale
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-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
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
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	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
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	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	Chirurgie digestive et viscérale
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Virologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	MALLION Jean-Michel	Cardiologie
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
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
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
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
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	POIGNARD Pascal	Virologie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et Biologie Moléculaire
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophtalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
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	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	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
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

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

REMERCIEMENTS

Un grand merci à tous les membres du jury,

- A la présidente du jury, Professeur Nathalie Sturm. Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Merci également pour votre enseignement, votre esprit pédagogique et sympathique au quotidien durant mes 5 années d'internat.

- A ma directrice de thèse, Docteur Diane Giovannini. Merci pour ta disponibilité, ta rigueur, ton encadrement tout au long de cette thèse et pour tout ce que tu m'as transmis. Ce fut un plaisir de travailler avec toi, tout en bonne humeur et je te souhaite le meilleur pour l'avenir, sur le plan professionnel et personnel.

- Au Docteur Pierre-Yves Eyraud, merci d'avoir accepté de m'aider dans ce travail et de faire partie de ce jury. Merci également pour votre disponibilité et votre gentillesse.

- Au Professeur Séverine Valmary-Degano, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et pour votre enseignement dans le service, dont j'ai eu la chance de bénéficier à la fin de mon internat.

- Au Professeur Thomas Decaens, merci d'avoir pris le temps de lire mon travail et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Soyez assurés de toute ma gratitude et de mon plus profond respect.

Merci à ma famille,

- A ma moitié, mon Alexis : merci de m'avoir soutenue durant ces longues études et tous les moments de stress qui les ont accompagnées. Tout cela n'aurait sûrement pas été possible sans toi. Ta présence m'est indispensable et je suis fière de ce que nous avons construit ensemble depuis toutes ces années. J'espère que nos chemins seront liés pour toujours, je t'aime.

- A ma Léna, le petit soleil de ma vie. Merci de me rappeler chaque jour que les meilleures choses sont bien souvent les plus simples. Merci d'être la petite fille vive et drôle que tu es, je t'aime pour toujours.

- A mes parents, qui ont cru en moi depuis le début et qui m'ont soutenu tout au long de ces années d'études, depuis les fiches de lectures de SHS en P1 jusqu'aux petits plats préparés de chez le boucher ! Merci pour votre implication dans toutes les étapes importantes de ma vie.

- A Clémence, ma sœurette, merci pour ta présence et ta bienveillance. Et merci à « tonton Ma » d'être là à tes côtés et de te rendre heureuse.

- A ma belle-famille, Pierre et Sylvie qui m'avez si chaleureusement accueillie, et à Claudie ma belle-sœur, pour ta joie de vivre qui apporte tant de bonne humeur à tous ces moments passés ensemble.

-Un grand merci également à toute ma famille : Nathalie, Martial, Anaïs, Juliette, Florence, Olivier, Alexis, Hugo, Philippe, Sonia, Nalia, Mémé Isabelle et Pépé Gaby.

A mes 5 poulettes de Bresse,

- A toi Justine, ma meilleure amie de toujours. On a grandi ensemble, merci d'être l'amie fidèle et dévouée que tu as toujours été. J'ai de la chance de t'avoir à mes côtés depuis tout ce temps et nous savons toutes les deux que notre amitié est de celles qui durent pour la vie. Et merci à Kévin, Kéké, notre chasseur de la bande, de rendre mon amie si heureuse. Merci à tous les deux de m'avoir confié le deuxième plus beau rôle de ma vie, celui de marraine de Noé, scellant ainsi notre amitié pour toujours.

- A toi Alison, ma moumoute. Merci pour tes petits messages réguliers, où on ne se dit rien de spécial mais on s'envoie plein de petits cœurs et ça me fait du bien. C'est pour moi une chance d'avoir croisé ton chemin, merci pour la complicité que l'on partage, qui durera encore longtemps j'en suis sure !

- A toi Charlotte, merci d'être toujours présente, douce et attentionnée, d'être là pour nous à chaque fois et d'être mon amie depuis tout ce temps. Je sais qu'on ne se lâchera pas et j'en suis fière. Et merci à Alex pour nos fous rires, nos prises de Krav maga (en combat non équitable !) en soirée, et tous ces bons moments passés ensemble.

- A toi Cindy, merci pour ta bonne humeur, tes idées parfois farfelues et ta joie de vivre. Merci d'être là et d'apporter avec toi ce petit grain de folie qui nous fait oublier tous nos soucis. Et merci à Ben de t'apporter l'amour et la stabilité que tu mérites. Je vous souhaite d'être heureux en famille avec la future copine de Léna.

- A toi Marion, notre amie globetrotteuse qui est en sûrement en train de prendre son petit déjeuner à l'autre bout de la Terre à l'heure tardive où j'écris ces mots. Merci pour ces photos partagées qui nous emmènent un peu avec toi (on aimerait y être) et pour tous ces bons moments lors de nos retrouvailles. Et merci à Momo d'être toi, de nous étonner à chaque fois avec ta légèreté, ta bonne humeur à toute épreuve et ta gentillesse. On espère vous retrouver tous les trois avec Maëlik sur Chambéry prochainement si vous rentrez de NZ.

A mes amis de Bourg-en-Bresse et d'ailleurs,

- A Raph & Arnaud : deux voyageurs aussi mais qui heureusement pour nous, reviennent de temps en temps… Merci d'avoir pris votre première douche chez nous, ce qui nous a permis de nouer tout de suite des liens très forts ;-) J'adore nos apéros à rallonge à refaire le monde autour d'un barbecue, d'une tartiflette, d'un *Pandemic* ou autre… On n'a pas besoin de grand-chose mais à chaque fois qu'on se voit, je mesure la chance que j'ai de vous avoir dans ma vie et j'espère des moments de complicité avec vous encore nombreux, à Chambéry ou ailleurs.

- A toi Florimond, le meilleur ami de mon Alex, qui est devenu l'un des miens. Merci d'être là pour Alex, merci pour ton humour et ta gentillesse, et pour ces chansons magnifiques que tu nous fais partager régulièrement. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir, du plus profond de mon cœur.

- A Mel & Guigui, nos presque-voisins, merci pour votre gentillesse, les moments avec vous sont comme on les aime, simples et agréables.

- A Loic & Julia. Merci pour ces bons moments partagés ensemble, vous formez une très belle petite famille avec Lilou!

- A Aurélie & Florian, merci d'être toujours là dans les moments importants et merci de nous avoir accueillis chez vous lors de notre voyage en Guadeloupe.

- A toi Jess, merci d'être toujours à nos côtés malgré la distance. Merci pour tout ce que tu apportes à Alex et pour ta gentillesse et ta douceur. Je te souhaite le meilleur avec Pierrick.

- Un grand merci également à Yoann, Florent, Célia, Gaëlle & Jérémy, Vaness & Julien pour tous ces bons moments passés ensemble. Les occasions de se voir sont devenues rares, mais lorsqu'on se revoit, rien n'a changé et ça me fait plaisir.

- A nos voisins Rue Coquelines : Pam & Julien, Brady, Brooke, Haifa & Slim, Meriam, Zizou. Merci pour ces bons moments partagés sur le palier ou à se faire passer une assiette de temps en temps. On est vraiment chanceux d'avoir eu des voisins comme vous et vous allez beaucoup nous manquer.

A mes tous mes co-internes et assistants/PH,

- A toi Olivier, merci pour ton esprit brillant et drôle. Travailler à tes côtés a été une vraie chance pour moi, merci pour tout ce que tu m'as appris. Merci aussi pour votre bonne humeur avec Marion, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

- A toi Alexia : grâce à toi ces semaines de DIU de fœtopath m'ont paru tellement moins longues. Merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre, tu es un vrai rayon de soleil ! Je te souhaite plein de bonheur pour l'avenir.

- A toi Bruno, merci pour ton esprit geek et tous ces moments partagés, je te souhaite plein de belles choses avec Julia et Paul. J'espère que nos chemins seront amenés à se recroiser.

- A toi Ségolène, la super-mama toujours zen, merci pour ces bons moments passés ensemble, j'espère que nous en aurons encore plein d'autres avant que tu ne partes vers d'autres horizons.

- A toi Antonin, merci pour tes blagues quotidiennes qui, bien que parfois lourdes, apportent de la bonne humeur et un peu de légèreté au travail. Et merci pour toutes ces parties de babyfoot endiablées le midi. Je te souhaite plein de belles choses pour l'avenir.

- A toi Mona : merci pour ta spontanéité, ton humour et ta douceur, je te souhaite de vivre un joli périple en Amérique du Sud.

-A toi PH « tatoué musclé », merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur lors de ces semestres ensemble.

- Merci également : à Hugo pour ta bonne humeur ; à Julie B d'avoir apporté un peu de soleil marseillais dans le service ; à Julie G pour ta gentillesse et ton humour ; à Romane pour ce semestre passé ensemble et à nos hors fillières qui se sont risquées en anapath : Delphine, Coralie, Clémentine et Marion pour ce semestre partagé.

Un très grand merci également

- A toute l'équipe médicale du service d'ACP de Grenoble : au Professeur Hervé Sartelet qui m'a transmis l'amour pour la fœtopathologie, merci pour votre bienveillance et votre gentillesse à mon égard ; au Docteur Eleni Nika qui m'a appris tant de choses notamment en pathologie mammaire avec tellement de gentillesse, au Docteur Marie Hélène Laverrière, au Docteur Camille Emprou, au Docteur Geraldine Saada-Sebag, au Docteur Nicole Pinel, au Docteur Jean Boutonnat, au Docteur Anne Mc Leer pour votre sympathie et votre aide lors de la rédaction de l'article et au Professeur Elisabeth Brambilla. Merci à tous pour votre encadrement et votre enseignement au sein du service. Merci de m'avoir transmis l'amour pour ce métier avec beaucoup de bienveillance.

- A toutes les techniciennes, aides laboratoires et secrétaires du service d'ACP de Grenoble : merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre soutien. Je n'oublierai jamais combien il a été agréable de travailler avec vous, très sincèrement, merci.

- A toute l'équipe du service d'ACP de Chambéry : Docteur Jean-Jacques Roux, Docteur Anne Dieny, Docteur Pierre Pocachard, Docteur Adina Petcu et à l'équipe de techniciens et de secrétaires. Merci pour ce semestre passé avec vous, qui m'a fait évoluer à grands pas en Anapath, et merci pour votre sympathie. C'est avec joie que je vous rejoins dès novembre prochain.

- Au Docteur Seigneurin pour votre aide importante dans l'analyse statistique.

- Au service de génétique de l'HCE où j'ai réalisé mes deux semestres de fœtopathologie. Un grand merci à Guillaume pour ta bonne humeur et ton humour, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Merci à Manon d'avoir rejoint cette équipe et pour ta gentillesse. Merci au Pr Pierre Simon Jouk pour votre gentillesse, votre enseignement notamment lors des séances de cœur et d'encéphale. Votre humilité et votre immense savoir sont un modèle pour moi. Merci également à tous les médecins de génétique : Docteur Florence Amblard, Docteur Françoise Devillard, Docteur Véronique Satre, Docteur Julien Thevenon, Docteur Charles Coutton, Docteur Klaus Dietrich pour votre gentillesse et votre accueil.

Enfin, à tous ceux que j'ai oubliés : merci !

TABLE DES MATIERES

ENSEIGNANTS A L'UFR MEDECINE....3

REMERCIEMENTS....7

ABREVIATIONS....15

RESUME....16

ETAT DE L'ART....17

I) RAPPELS ANATOMIQUES ET HISTOLOGIQUES....17

1) Les voies biliaires intra et extra-hépatiques....17

1.1 Anatomie....17

1.2 Rapports....19

1.3 Vascularisation....19

1.4 Histologie....20

2) Le pancréas....22

2.1 Anatomie....22

2.2 Vascularisation....24

2.3 Innervation....25

2.4 Histologie....25

II) RAPPELS PHYSIOLOGIQUES....30

1) La bile....30

2) Le pancréas....32

III) PATHOLOGIE TUMORALE DES VOIES BILIAIRES ET DU PANCREAS....33

1) Carcinome des voies biliaires extra-hépatiques et de la vésicule biliaire....33

1.1 Epidémiologie....33

1.2 Clinique et biologie....35

1.3 Explorations d'imageries pré-thérapeutiques....35

1.4 Anatomopathologie....37

1.5 Prise en charge et pronostic....41

2) Adénocarcinome canalaire pancréatique....45

2.1 Epidémiologie....45

2.2 Clinique et biologie....45

2.3 Explorations d'imageries pré-thérapeutiques....46

2.4 Anatomopathologie....47

2.5 Prise en charge et pronostic 51

IV) L'EXPLORATION D'UNE STENOSE DES VOIES BILIAIRES 54

1) Technique de la Cholangio-Pancréatographie Rétrograde Endoscopique (CPRE).....54

2) Technique cytologique.....57

V) DEMARCHE DIAGNOSTIQUE EN CYTOPATHOLOGIE PANCREATO-BILIAIRE 58

1) Diagnostic cytopathologique des adénocarcinomes pancréato-biliaires 58

2) Nomenclature de la Papanicolaou Society of Cytopathology (2014) 70

3) Apports de l'immunohistochimie 74

4) Techniques moléculaires……76

VI) OBJECTIFS DE L'ETUDE……..77

REFERENCES……79

ORIGINAL ARTICLE……....82

BILE CYTOLOGY: IN SEARCH OF REPRODUCIBLE CYTOMORPHOLOGICAL CRITERIA FOR MALIGNANCY

ABSTRACT.....83

INTRODUCTION……....84

MATERIAL & METHODS……..86

RESULTS……90

DISCUSSION……...91

REFERENCES……...97

TABLES & FIGURES……99

CONCLUSION ……..106

SERMENT D'HIPPOCRATE ……..107

ABREVIATIONS

CCK : cholécystokinine-pancréozymine

VIP : peptide intestinal vaso-actif

IRM : Imagerie par résonance magnétique

TDM : Tomodensitométrie

CPRE : Cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique

MGG : May-Grünwald Giemsa

HES : Hématoxyline Eosine Safran

DPC : Duodéno-pancréatectomie céphalique

SPG : Spléno-pancréatectomie gauche

TIPMP : Tumeur intracanalaire papillaire et mucineuse du pancréas

PCR : Polymerase chain reaction

FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence

RESUME

L'adénocarcinome canalaire de la tête du pancréas et le cholangiocarcinome extra-hépatique sont les deux causes les plus fréquentes de sténose maligne des voies biliaires explorées au cours de la Cholangio-Pancréatographie Rétrograde Endoscopique. Plusieurs études se sont intéressées au brossage biliaire mais très peu ont étudié les critères cytomorphologiques du liquide biliaire prélevé au cours du même geste endoscopique. Par ailleurs ces dernières portaient sur de petites cohortes. C'est pour cela que nous avons réalisé une étude rétrospective monocentrique au CHU Grenoble Alpes ayant porté sur 135 cas d'étalements biliaires informatifs entre 2009 et 2018, classés en bénins (55 cas), atypiques (11 cas) ou malins (69 cas). Pour les cas bénins et atypiques, un recul d'au moins 5 ans était requis afin de s'assurer de l'absence d'évènement malin. Pour tous les cas malins, une preuve histologique du diagnostic était obtenue. Une double lecture a été réalisée par une interne d'anatomie et cytologie pathologiques et une pathologiste plus "expérimentée" en cytologie biliaire afin de déterminer la reproductibilité intra- et inter-observateur parmi 15 critères cyto-morphologiques généraux en cytologie. Parmi ces critères, nous avons retrouvé que la présence d'une double population cellulaire et/ou de cellules malignes isolées étaient à 100% spécifiques de malignité et très reproductibles (kappa >0.9). Par ailleurs, quatre autres critères que sont la présence d'amas tridimensionnels, l'augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique, l'anisocaryose et le rehaussement des membranes nucléaires se sont révélés être également très prédictifs de malignité. L'association de 3 de ces 4 critères permet en effet d'affirmer la malignité avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 72%. Nos données sont pour la plupart concordantes avec celles observées sur brossage. Les critères que nous avons retenus seront testés sur une série de validation, par constitution d'une cohorte prospective, afin de valider leur valeur prédictive.

ETAT DE L'ART

I) RAPPELS ANATOMIQUES ET HISTOLOGIQUES

1) Les voies biliaires intra et extra-hépatiques

1.1 Anatomie

Les canaux (également dénommés « conduits ») biliaires collecteurs intrahépatiques fusionnent sous la plaque hilaire (au niveau de la convergence biliaire supérieure) pour former les canaux hépatiques droit et gauche, qui se rejoignent en un canal plus large appelé canal hépatique commun (**Figure 1**). Après avoir quitté le foie, ce dernier est rejoint par le canal cystique qui draine la vésicule biliaire. Le canal cholédoque ainsi formé rejoint le canal pancréatique (canal de Wirsung) avec lequel il s'abouche dans l'ampoule de Vater au niveau du 2ème duodénum. Les principaux canaux biliaires circulant en dehors du foie constituent collectivement les voies biliaires extra-hépatiques.

La vésicule biliaire et le conduit cystique constituent la voie biliaire accessoire. La vésicule mesure 8 à 10 cm de long et 3 à 4 cm de diamètre. Elle comporte un fond, un corps et un collet qui se poursuit par le canal cystique. Ce dernier, muni de valvules, a un calibre d'1 à 2 mm. Avec le canal hépatique, il constitue la convergence biliaire inférieure, origine du canal cholédoque.

Source : Gray's Anatomie pour les étudiants, Richard L. Drake (traduit de Drake, Vogl, Mitchell, Gray's Anatomy for Students, 2-ed, 978044306952). Elsevier Masson, 2· édition, 2011. Figure 4.102.

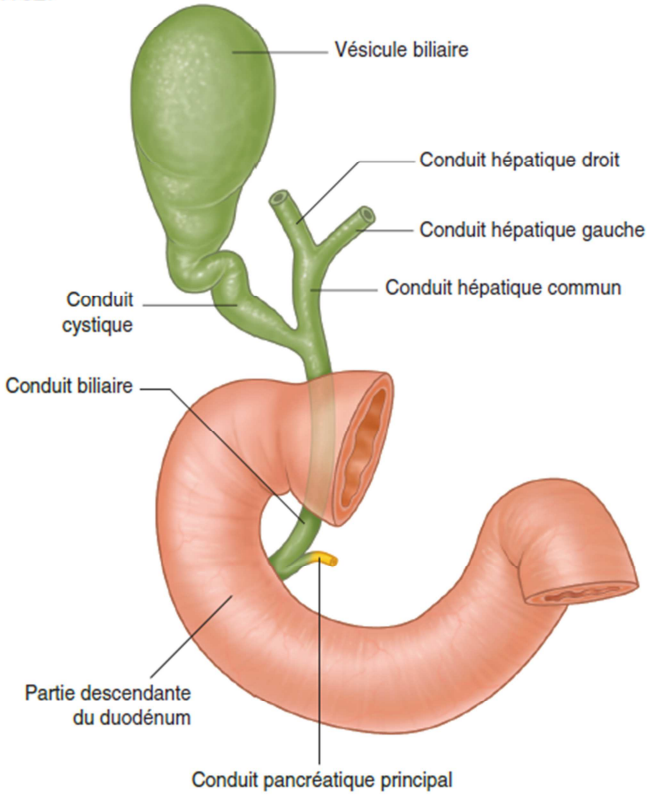


Figure 1 : Voies biliaires extra hépatiques.

1.2 Rapports

La convergence biliaire supérieure est située au-dessus de la bifurcation de l'artère hépatique propre, dont la branche droite est le plus souvent en arrière de la voie biliaire. Plus bas, la voie biliaire est parallèle et à droite de l'artère hépatique puis s'en éloigne. Le canal hépatique descend en avant et sur le bord droit de la veine porte, sur le bord libre du petit omentum, puis il s'abouche en canon de fusil avec le canal cystique immédiatement au-dessus du premier segment du duodénum. Le canal cholédoque chemine ensuite en arrière du duodénum puis du pancréas, au-devant du confluent portal et il s'enfouit progressivement dans le parenchyme pancréatique qu'il déprime en une gouttière pour rejoindre le canal pancréatique principal, au niveau de la papille majeure (située à la partie médiale de la deuxième portion du duodénum) par l'intermédiaire de l'ampoule bilio-pancréatique (ampoule de Vater). La vésicule biliaire est fixée à la face inférieure du foie au niveau de la fosse cystique (dépourvue de péritoine). Elle est en rapport en dedans avec la voie biliaire principale et en bas avec l'angle colique droit et le *genu superius*.

1.3 Vascularisation

La vascularisation des voies biliaires dépend exclusivement du réseau artériel hépatique. Des collatéralités artérielles de suppléance peuvent se développer en cas d'obstruction de l'artère hépatique : depuis l'artère controlatérale par la plaque hilaire ou par les ligaments coronaire et triangulaire (à partir des artères phréniques). Le drainage veineux se fait dans le système porte. Les ganglions lymphatiques sont communs avec ceux du foie. L'artère cystique naît de l'artère hépatique propre ou de sa branche droite. On décrit un ganglion lymphatique du collet de la vésicule.

1.4 Histologie

La vésicule biliaire est un sac musculaire dont la paroi présente de nombreux replis, bordés par un épithélium cylindrique simple constitué de cellules présentant un noyau en position basale et de nombreuses microvillosités courtes apicales (**Figures 2A et 2B**). Ces cellules de revêtement concentrent la bile 5 à 10 fois par un processus actif. La sous-muqueuse, relativement lâche, est riche en fibres élastiques et en vaisseaux sanguins lymphatiques dans lesquels se draine l'eau résorbée au cours de la phase de concentration. Les fibres de la couche musculaire sont disposées de manière longitudinale, transverse et oblique, sans former toutefois de couches distinctes. Plus extérieurement, on observe une épaisse couche adventitielle (séreuse) dans laquelle cheminent les gros vaisseaux sanguins et lymphatiques. Au niveau du collet de la vésicule, tout comme dans les voies biliaires extra-hépatiques, on trouve des glandes muqueuses dans la sous-muqueuse dont le mucus pourrait constituer un film superficiel protecteur pour les voies biliaires. La paroi du canal cystique est constituée d'un plissement recouvert de muqueuse enroulé en spirale, appelé valvule spiralée de Heister.

Les voies biliaires extra-hépatiques présentent une structure histologique superposable à celle de la vésicule biliaire, avec des fibres musculaires plus développées au niveau de l'ampoule de Vater, formant le sphincter d'Oddi.

Figure 2A : Vésicule biliaire normale, coupe histologique colorée à l'HES d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

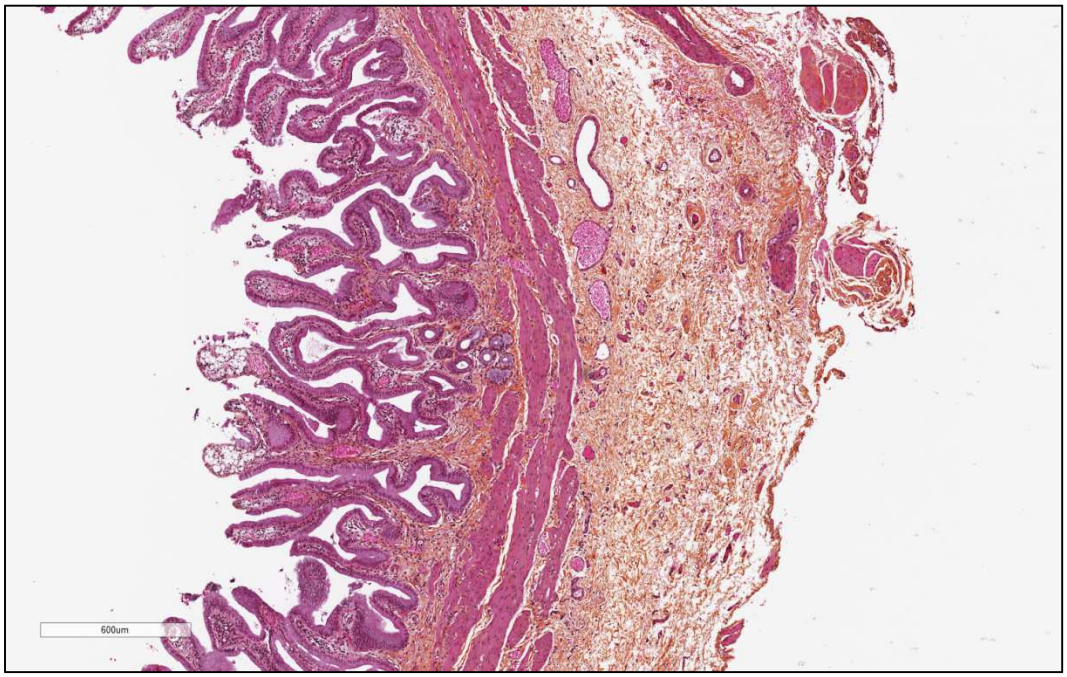


Figure 2B : Vésicule biliaire normale, coupe histologique colorée à l'HES d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

2) Le pancréas

2.1 Anatomie

Le pancréas est situé dans la partie postérieure de la cavité abdominale, en avant du rachis et des organes rétro-péritonéaux. Dans un plan frontal, son axe est oblique en haut et à gauche. Dans un plan horizontal, le pancréas est à concavité postérieure, plaqué sur la saillie des corps vertébraux des deux premières vertèbres lombaires. Aplati d'avant en arrière, il a une épaisseur de 2 cm. Il mesure 20 cm de long, 5 cm de haut au niveau de la tête et pèse 60 à 80 grammes.

On décrit au pancréas quatre parties, de droite à gauche (**Figure 3**):

- la tête, enchâssée dans le cadre duodénal (de D1 à D3), prolongée vers la gauche dans sa moitié inférieure, en arrière de la veine mésentérique supérieure, par le processus uncinatus (crochet ou petit pancréas), près du bord droit de l'artère mésentérique supérieure. En arrière, la tête est croisée de haut en bas par le conduit biliaire principal (cholédoque), qui va la pénétrer pour rejoindre l'ampoule bilio-pancréatique sur la face interne du deuxième duodénum.

- l'isthme ou col pancréatique, situé en avant de la veine porte, de la veine mésentérique supérieure et de l'aorte.

- le corps, situé en arrière de la face postérieure de l'antre gastrique dont la face postérieure est marquée par l'empreinte de la veine splénique.

- la queue, séparée du corps par une échancrure, dont le bord supérieur est le siège du passage d'arrière en avant des vaisseaux spléniques. Elle est plus ou moins mobile, située entre les deux feuillets du ligament pancréato-splénique.

Le pancréas comporte deux conduits excréteurs de 2 à 4 millimètres de diamètre (**Figure 4**) :

- le canal pancréatique principal, ou canal de Wirsung. Il naît dans la queue, parcourt le corps et l'isthme suivant l'axe de la glande, puis se coude en bas et en arrière en pénétrant dans la tête. Il s'abouche avec le conduit cholédoque dans l'ampoule bilio-pancréatique, qui s'ouvre dans la paroi interne de la deuxième portion du duodénum (papille duodénale majeure). Ce canal draine la majorité de la glande.

- le canal pancréatique accessoire, ou canal de Santorini. Il naît au niveau de la coudure du canal principal et traverse horizontalement la partie supérieure de la tête en direction de la paroi interne de la deuxième portion du duodénum dans laquelle il s'abouche au niveau de la papille duodénale mineure, située 3 cm au-dessus de la papille majeure. À son origine, il est généralement anastomosé au canal principal en constituant un affluent. Il draine la portion supérieure de la tête.

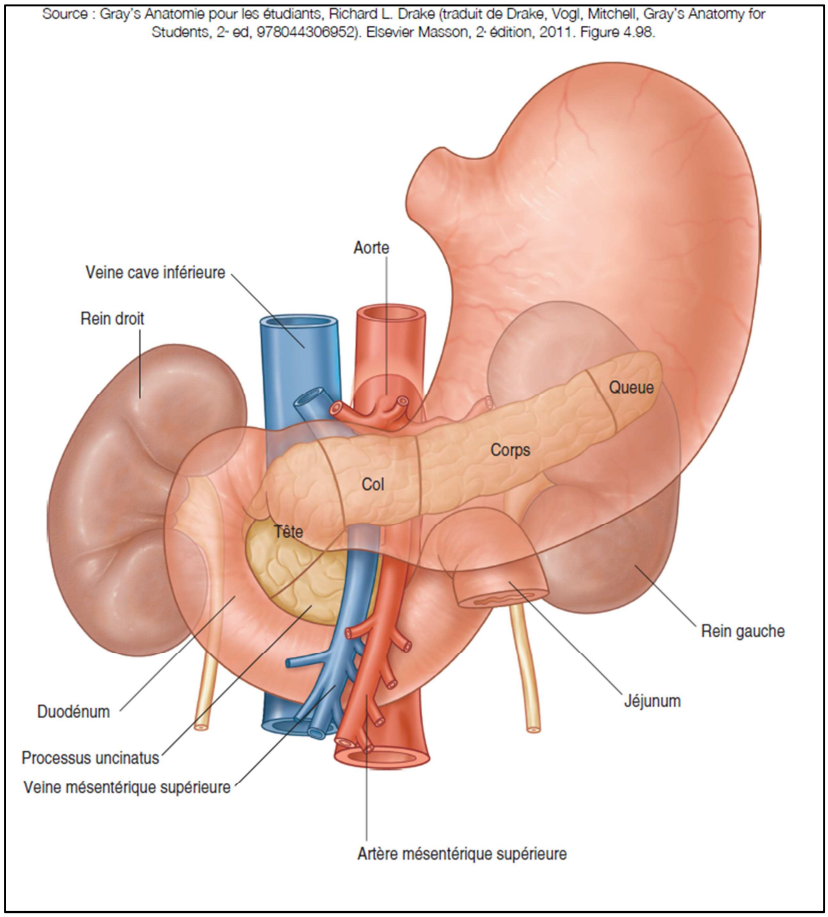


Figure 3 : Le pancréas et sa localisation.

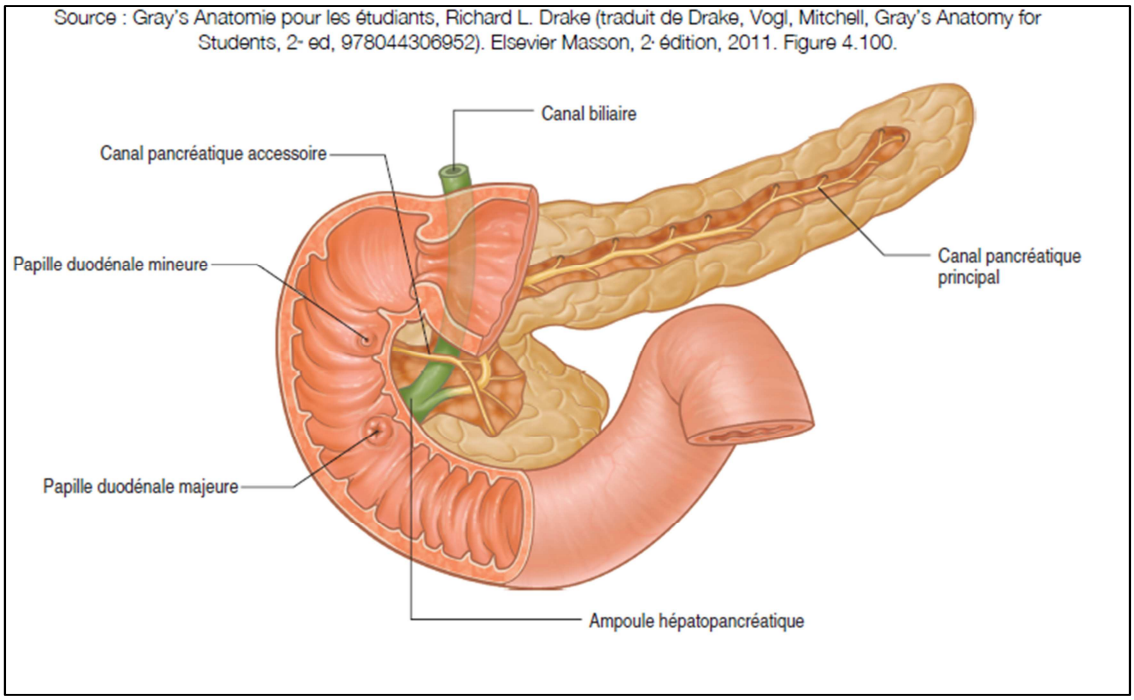


Figure 4 : Système canalaire du pancréas.

2.2 Vascularisation

La tête du pancréas est vascularisée par deux arcades duodéno-pancréatiques artérielles antérieure et postérieure qui sont des anastomoses entre les branches du tronc cœliaque (artères pancréatico-duodénales supérieures, branches de l'artère gastro-duodénale) et mésentérique supérieur (artère pancréatico-duodénale inférieure). La vascularisation du corps et de la queue est assurée principalement par des rameaux de l'artère splénique qui s'anastomosent en une arcade au niveau du bord inférieur, et par des rameaux issus de l'artère mésentérique inférieure. Les veines, satellites des artères, se drainent dans le système porte.

Les trois territoires lymphatiques (hépatique, mésentérique supérieur et splénique) aboutissent aux ganglions lymphatiques juxta-aortiques.

2.3 Innervation

L'innervation du pancréas provient du plexus solaire, également appelé plexus cœliaque, composé:

- des ganglions cœliaques ou semi-lunaires de part et d'autre de l'origine du tronc cœliaque.
- des ganglions mésentériques supérieurs de part et d'autre de l'origine de l'artère mésentérique supérieure.
- des ganglions aortico-rénaux, en avant de l'origine des artères rénales.

2.4 Histologie

Le pancréas est une glande développée embryologiquement à partir de l'entoblaste de l'intestin primitif dès la 5ème semaine de développement.

C'est un organe plein, lobulé, de couleur jaune rosée, entouré d'une fine capsule collagène donnant naissance à de fins septa qui s'enfoncent entre les lobules.

La composante exocrine du pancréas est constituée d'acini sécrétoires étroitement adossés les uns aux autres (**Figures 5A à 5E**). Chaque acinus est constitué d'amas irrégulier de cellules sécrétoires pyramidales dont les faces apicales cernent une minuscule lumière centrale correspondant à l'extrémité terminale du système canalaire. Les cellules acinaires présentent un cytoplasme basophile au pôle basal (car riche en réticulum endoplasmique rugueux) et plus éosinophile au pôle apical, rempli de granules sécrétoires contenant des pro-enzymes. Le centre des acini contient fréquemment un ou plusieurs noyaux de cellules centro-acineuses. Les acini adjacents sont séparés par un tissu conjonctif discret, contenant de nombreux capillaires, souvent bien visualisé sur les coupes histologiques en raison des artéfacts dus à la fixation formolée. Entre les acini, on retrouve des canaux intercalaires, bordés de cellules épithéliales cubiques, ayant pour fonction la sécrétion d'eau et d'ions bicarbonates dans le liquide pancréatique. Ces canaux intercalaires se drainent ensuite dans des canaux plus volumineux : les canaux intra-lobulaires puis les canaux inter-lobulaires qui cheminent dans les septas conjonctifs de la glande. Au fur et à mesure que leur diamètre

augmente, l'épithélium tapissant ces canaux se stratifie et l'épaisseur de la couche de tissu conjonctif collagène s'accroît. La paroi du canal pancréatique principal contient également du muscle lisse.

L'épithélium embryonnaire des canaux pancréatiques est constitué de cellules potentiellement exocrines et endocrines. Au cours du développement, les cellules endocrines s'éloignent du système canalaire et se regroupent autour de capillaires pour former des amas isolés de taille variable, dispersés dans le tissu exocrine, appelés ilôts de Langerhans, plus nombreux au niveau de la queue du pancréas.

Ces ilôts sont constitués de groupes de cellules (comportant jusqu'à 3000 cellules), soutenues par un fin réseau collagène contenant de nombreux capillaires fenêtrés. Chaque ilôt est entouré d'une délicate capsule. Les cellules endocrines sont petites, monomorphes, au cytoplasme pâle granulaire et au noyau dont la chromatine est fine. Elles sont chacune responsable de la sécrétion d'un type d'hormone, mais ne sont pas distinguables sur une coloration standard à l'Hématoxyline Eosine Saphran (HES) : il est nécessaire d'avoir recours à des techniques d'immunohistochimie pour les identifier. Classiquement, les cellules sécrétant le glucagon, l'insuline et la somatostatine ont été dénommées respectivement cellules alpha (25% de l'ilôt), bêta (60% de l'ilôt) et delta.

Une proportion variable d'adipocytes est présente, corrélée à l'âge du sujet du fait de l'involution adipeuse de la glande avec l'âge.

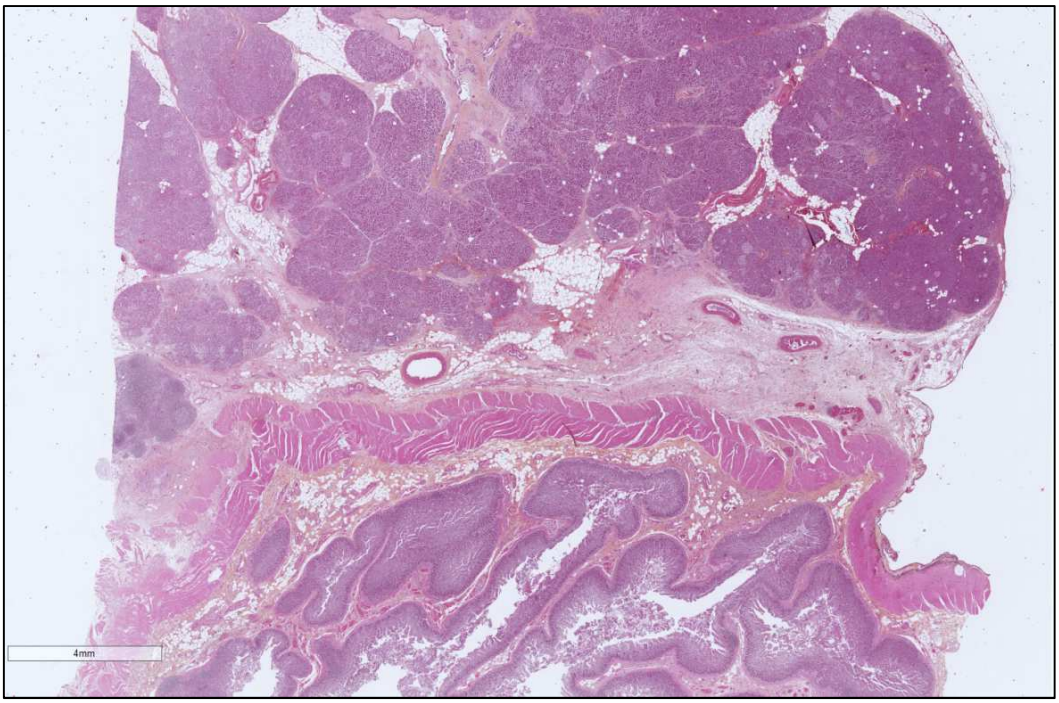


Figure 5A : Pancréas normal, coupe histologique colorée à l'HES d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.
Cette photo permet d'apprécier l'architecture lobulée de la glande (en haut), ainsi que sa topographie en regard du duodénum (en bas).

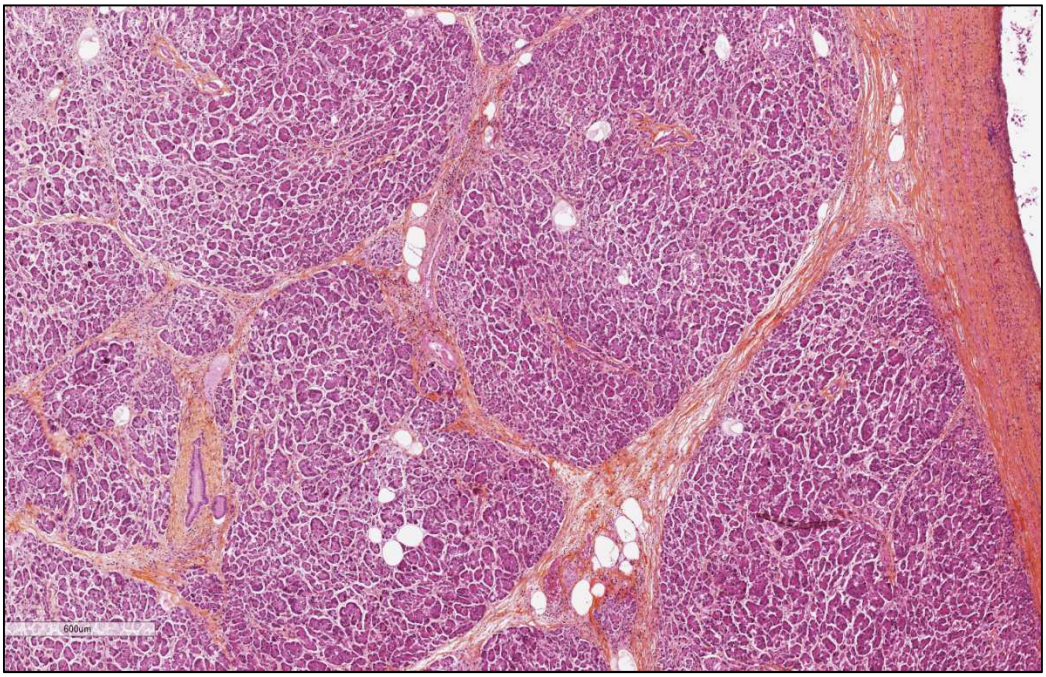


Figure 5B : Pancréas exocrine, coupe histologique colorée à l'HES d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.
On observe les lobules d'acini, séparés par des travées fibreuses, ainsi que quelques adipocytes.

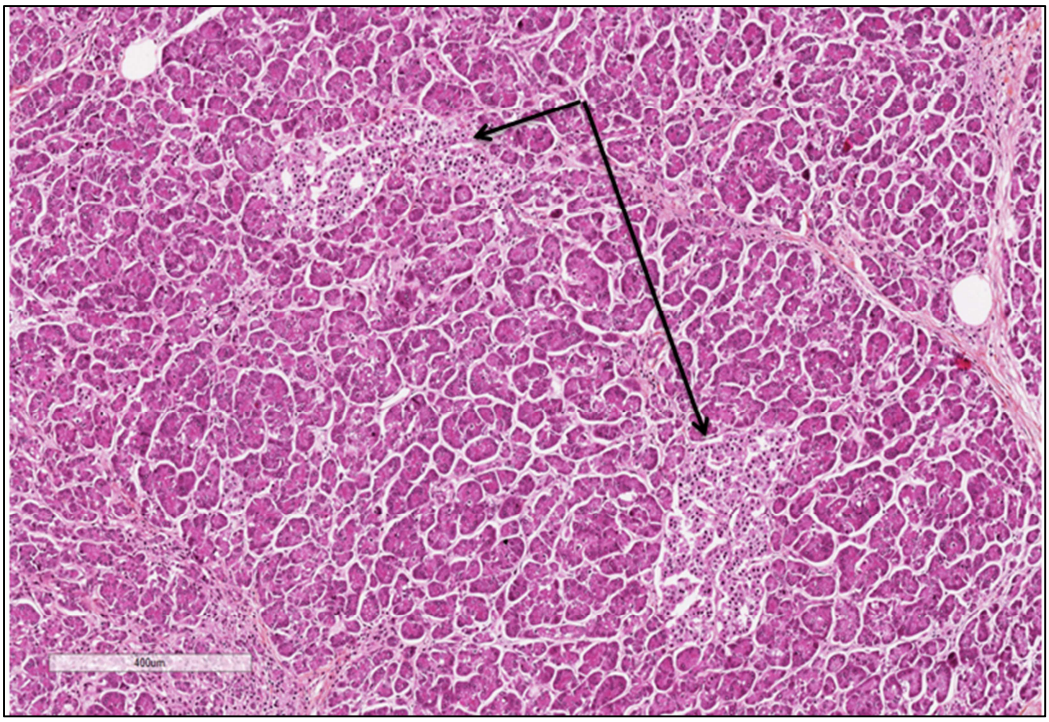


Figure 5C : Pancréas endocrine, coupe histologique colorée à l'HES d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.
On visualise les ilôts de Langerhans (flèches noires) parsemant la glande, entourés d'acini exocrines plus éosinophiles.

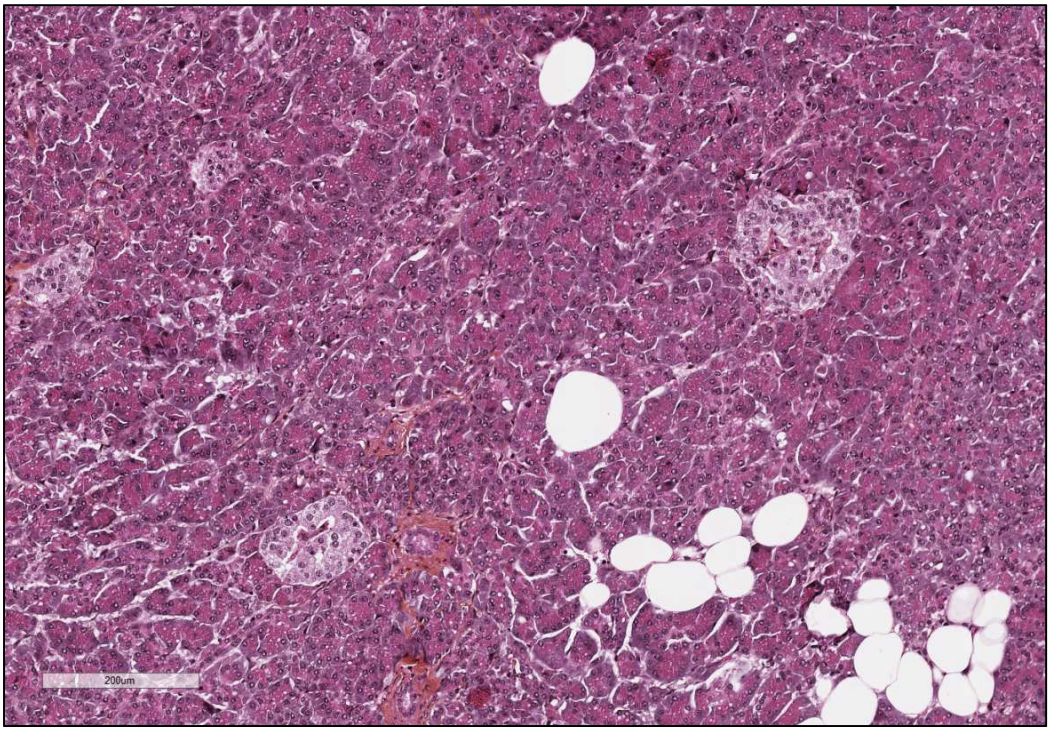


Figure 5D : Pancréas endocrine, coupe histologique colorée à l'HES d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.
Cette photo permet de visualiser les ilôts de Langerhans, les acini exocrines et quelques adipocytes.

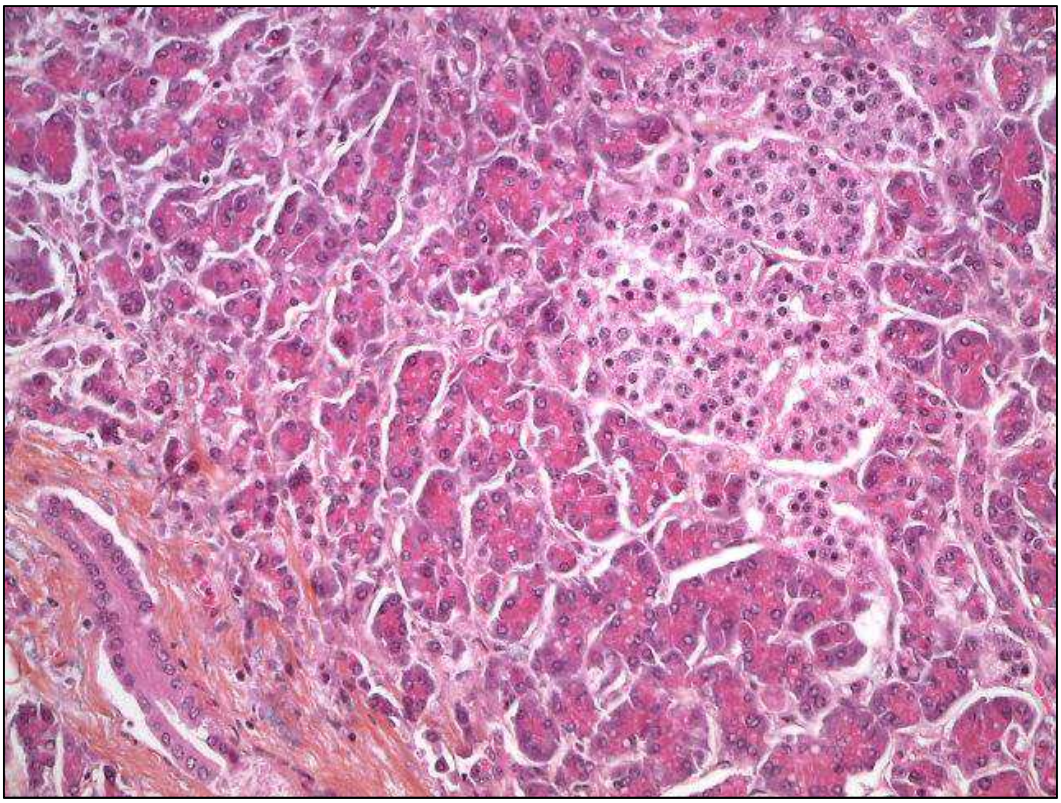


Figure 5E : Pancréas endocrine et exocrine, coupe histologique colorée à l'HES à l'objectif x 20 d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes. On repère en haut à droite un ilôt de Langerhans à plus fort grossissement et en bas à gauche un canal excréteur intra-lobulaire.

II) RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

1) La bile

La bile, du grec « chole » est un fluide jaune-verdâtre sécrété par le foie en continu, à hauteur de 0,5 à 1L/jour et circulant dans les canaux biliaires. Sécrétée par les hépatocytes, elle progresse de façon centrifuge, est drainée par des canalicules et converge vers les canaux biliaires, de plus en plus larges, jusqu'au duodénum. Dans les canalicules et canaux, se produit une sécrétion supplémentaire d'eau et d'électrolytes (Na+ et HCO3-) par les cellules épithéliales.

La bile possède un pH basique (7,6 à 8,6) et se compose d'eau (97,5%) ; de sels biliaires (1,1%) : composés stéroïdes amphiphiles synthétisés à partir du cholestérol par les hépatocytes et réabsorbés au niveau de l'intestin grêle et du côlon ; de bilirubine (0,04%) : pigment jaune provenant de la dégradation de l'hème, transportée dans le sang par l'albumine ; de cholestérol (0,1%) ; de phospholipides (0,04%) et d'électrolytes (Na+, K+, Ca2+, HCO3-, Cl-).

Elle a pour fonctions la digestion des lipides (rôle tensioactif des sels biliaires), l'élimination des déchets (bilirubine, cholestérol…) et le contrôle du pH duodénal.

Chez l'homme, la vésicule biliaire a une capacité d'environ 100mL. Elle est pleine à jeun et se vide en périodes per et postprandiale. La présence de lipides dans le duodénum stimule la sécrétion de l'hormone cholécystokinine-pancréozymine (CCK) par les cellules endocrines de la muqueuse duodénale, provoquant la contraction de la vésicule biliaire et la propulsion de bile dans le duodénum.

Le débit de la bile et du liquide pancréatique dans le duodénum est contrôlé par un complexe musculaire lisse : le sphincter d'Oddi. Les constituants de cette structure incluent le sphincter cholédocien à l'extrémité distale du canal cholédoque, le sphincter pancréatique à l'extrémité du canal pancréatique et un réseau de fibres musculaires autour de l'ampoule de Vater. Cette disposition contrôle le débit de la bile et du liquide pancréatique dans le duodénum, tout en prévenant leur reflux dans l'un ou l'autre canal. Lorsque le sphincter cholédocien est fermé, la bile située dans le canal hépatique commun est détournée vers la vésicule biliaire où elle est stockée et concentrée.

La sécrétion biliaire est régulée par différents facteurs:

- nerveux (nerf pneumogastrique qui augmente l'excrétion biliaire, alors que la stimulation splanchnique la diminue).
- humoraux (gastrine-sécrétine-CCK stimulent sa sécrétion alors que les œstrogènes l'inhibent).
- mécaniques (pression sécrétoire du foie, force de contraction vésiculaire, résistance du sphincter d'Oddi).

2) Le pancréas

Le pancréas est un organe ayant la particularité d'avoir une double fonction :

- **exocrine** : représentant la majorité de la glande, elle est responsable de la sécrétion d'un liquide alcalin riche en enzymes protéolytiques et en ions bicarbonates. Ces sécrétions s'abouchent via le canal pancréatique (de Wirsung) au niveau de la papille duodénale, où elles ont pour fonctions de dégrader protéines, hydrates de carbone, lipides, acides nucléiques selon le processus de digestion luminale. Elles ont un pH basique, permettant de neutraliser l'acidité des sécrétions gastriques auxquelles elles se mélangent. Une enzyme sécrétée par la muqueuse duodénale, l'entérokinase induit la production de trypsine et de chymotrypsine, ce qui empêche l'autodigestion du pancréas. La sécrétion des enzymes pancréatiques est modulée par des facteurs nerveux et hormonaux, tels que la sécrétine et la CCK produites par les cellules neuro-endocrines duodénales, mais également la gastrine sécrétée par les cellules endocrines de la muqueuse pylorique.
- **endocrine** : les principaux produits de sécrétion du pancréas endocrine sont l'insuline et le glucagon, hormones polypeptidiques jouant un rôle fondamental dans le métabolisme des hydrates de carbone. L'insuline stimule l'incorporation du glucose par la plupart des cellules, en particulier au niveau du foie, du muscle squelettique, du tissu adipeux, ce qui abaisse la glycémie. Le glucagon a les effets inverses de l'insuline. Par ailleurs, ces hormones exercent aussi différents effets sur le métabolisme énergétique, la croissance et le développement. Il existe également d'autres cellules qui produisent la somatostatine (exerçant divers effets sur la fonction gastro-intestinale et inhibant la sécrétion d'insuline et de glucagon), le peptide intestinal vaso-actif (VIP) et le polypeptide pancréatique. Enfin, d'autres cellules appelées entérochromaffines paraissent sécréter plusieurs peptides différents, comme la motiline, la sérotonine et la substance P.

III) PATHOLOGIE TUMORALE DES VOIES BILIAIRES EXTRA-HEPATIQUES ET DU PANCREAS

Les pathologies des voies biliaires extra-hépatiques et du pancréas se traduisent le plus souvent par une sténose. Les sténoses de la voie biliaire principale peuvent avoir différentes origines (inflammatoire, tumorale, ischémique, traumatique…), mais il faudra toujours éliminer une sténose tumorale.

En cas de sténose distale, il s'agira le plus souvent d'un adénocarcinome de la tête du pancréas localement avancé, alors qu'en cas de sténose proximale, il faudra prioritairement penser au cholangiocarcinome extra-hépatique.

1) Carcinome des voies biliaires extra-hépatiques et de la vésicule biliaire

1.1 Epidémiologie

La pathologie tumorale des voies biliaires est principalement représentée par les cholangiocarcinomes (environ un tiers des cancers biliaires) et les adénocarcinomes de la vésicule biliaire.

Les cholangiocarcinomes sont classés selon leur localisation en :

- intra-hépatiques (« périphériques », représentant 5 à 10% des cholangiocarcinomes, situés au-delà de la 2ème division des voies biliaires intra-hépatiques)
- extra-hépatiques proximaux (péri-hilaires ou tumeurs de Klatskin, représentant 60 à 70% des cholangiocarcinomes)
- extra-hépatiques distaux (représentant 20 à 30% des cholangiocarcinomes, localisés au canal cholédoque)

On note que pour les tumeurs péri-hilaires, la classification de Bismuth-Corlette (6) peut être utilisée (**Tableau 1**) mais n'est pas toujours utile car elle n'évalue pas l'envahissement vasculaire.

Tableau 1 : Classification de Bismuth-Corlette (tumeurs péri-hilaires), issue du Thésaurus National de Cancérologie Digestive 2014 (4)

Type	Extension tumorale
I	Canal hépatique commun
II	Bifurcation du canal hépatique commun
IIIa	Canal hépatique droit
IIIb	Canal hépatique gauche
IV	Canaux hépatiques droit et gauche

Le cholangiocarcinome est une tumeur rare, survenant chez des patients âgés, avec une légère prédominance masculine. L'incidence est de 1,3 pour 100 000, en France (3).

Les facteurs de risque connus sont la cholangite sclérosante primitive, les lithiases intrahépatiques, les infections parasitaires des voies biliaires en Asie (*C.sinensis*, *O.viverrini*…), les malformations biliaires (Maladie de Caroli, kyste du cholédoque…) et la cirrhose notamment d'origine virale pour les cholangiocarcinomes intra-hépatiques.

Le carcinome de la vésicule biliaire est très rare dans les pays développés (0.16% des cancers chez l'homme aux USA). Il affecte des patients âgés (60-70 ans), avec comme facteurs de risque connus les lithiases vésiculaires, la « vésicule porcelaine » (calcification diffuse de la paroi vésiculaire) ou un terrain génétique prédisposant (polypose adénomateuse familiale).

1.2 Clinique et biologie

Cliniquement, il s'agit de tumeurs demeurant longtemps pauci symptomatiques. Les symptômes, peu spécifiques, peuvent être une altération de l'état général, des douleurs, un ictère ou une angiocholite pour les cholangiocarcinomes. Le carcinome de la vésicule biliaire pourra se manifester par des douleurs de l'hypochondre droit attribuées à une cholécystite.

Sur le plan biologique, une élévation du carbonate antigène (CA) 19.9, de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) et du CA 125 peuvent être retrouvées. Tous trois peuvent être élevés au cours des obstructions biliaires bénignes. Une élévation persistante après drainage biliaire est évocatrice d'un processus carcinomateux.

1.3 Explorations d'imageries pré-thérapeutiques

Un bilan d'imagerie est essentiel au diagnostic positif et différentiel, au bilan d'extension (envahissement hépatique, niveau d'obstruction des voies biliaires, extension vasculaire, ganglionnaire et métastatique) et à la planification du traitement.

L'examen de référence est l'**imagerie par résonance magnétique** (IRM) avec injection et séquences de cholangiographie (**cholangio-IRM**). Sa sensibilité de détection est de 95% et elle permet une évaluation fiable de l'extension aux canaux biliaires dans 90% des cas. La cholangio-IRM permet par ailleurs de réaliser une cartographie biliaire si un drainage est envisagé.

La **tomodensitométrie** (TDM) **thoraco-abdomino-pelvienne** permet d'effectuer le bilan d'extension ganglionnaire et métastatique. Par ailleurs, elle peut remplacer l'IRM hépatique si celle-ci est non réalisable ou de qualité insuffisante.

D’autres examens peuvent être effectués mais ne doivent pas retarder la prise en charge thérapeutique : la tomographie par émission de positons (TEP) au 18F-FDG peut être utile avant une chirurgie complexe ; l’écho-endoscopie contribue au diagnostic et au bilan d'extension loco-régional des tumeurs extra-hépatiques et permet la ponction d'adénopathies et la cholangiographie directe (percutanée trans-hépatique ou rétrograde endoscopique) qui est réservée à des fins thérapeutiques ou de prélèvements tumoraux.

La **résécabilité** de la lésion doit être évaluée rapidement par une équipe médico-chirurgicale expérimentée chez tout patient jugé opérable, avant toute opacification ou drainage biliaire (l’inflammation ou l’infection biliaire induite pouvant gêner cette évaluation). Une volumétrie hépatique par TDM doit être effectuée avant hépatectomie majeure. La résécabilité ne pourra souvent être affirmée (ou infirmée) définitivement qu’au cours de l’exploration chirurgicale. La laparoscopie peut modifier l’indication chirurgicale, et notamment épargner un programme pré-hépatectomie lourd de drainage biliaire et d’embolisation portale.

La **preuve cytologique** (liquide et brossage biliaire) **ou histologique** de carcinome biliaire est parfois difficile à obtenir. Elle est indispensable avant l’instauration d’un traitement palliatif (tumeur non résécable) ou néo-adjuvant, mais peut être évitée dans la majorité des cas avant chirurgie à visée curative compte tenu du risque d'essaimage tumoral le long du trajet de ponction.

1.4 Anatomopathologie

Sur le plan histologique, le cholangiocarcinome est dans la plupart des cas (99%) un adénocarcinome de type biliaire (**Figures 6 et 7**), représenté par une prolifération d'architecture glandulaire, micropapillaire, en cordons ou parfois en cellules isolées. Les cellules tumorales sont cuboïdales, au cytoplasme pâle ou éosinophile contenant parfois une vacuole de mucosécrétion (colorée au Bleu Alcian), et aux atypies souvent marquées. Le stroma est caractéristique, d'aspect fibreux très dense, dit desmoplasique. On distingue les cholangiocarcinomes bien différenciés (architecture glandulaire >95%), moyennement différenciés (architecture glandulaire comprise entre 50 et 95%), et peu différenciés (architecture glandulaire <50%). L'extension tumorale doit être précisée en utilisant la classification pTNM (**Figures 8 et 9** : classification proposée par L'American Joint Committee on Cancer).

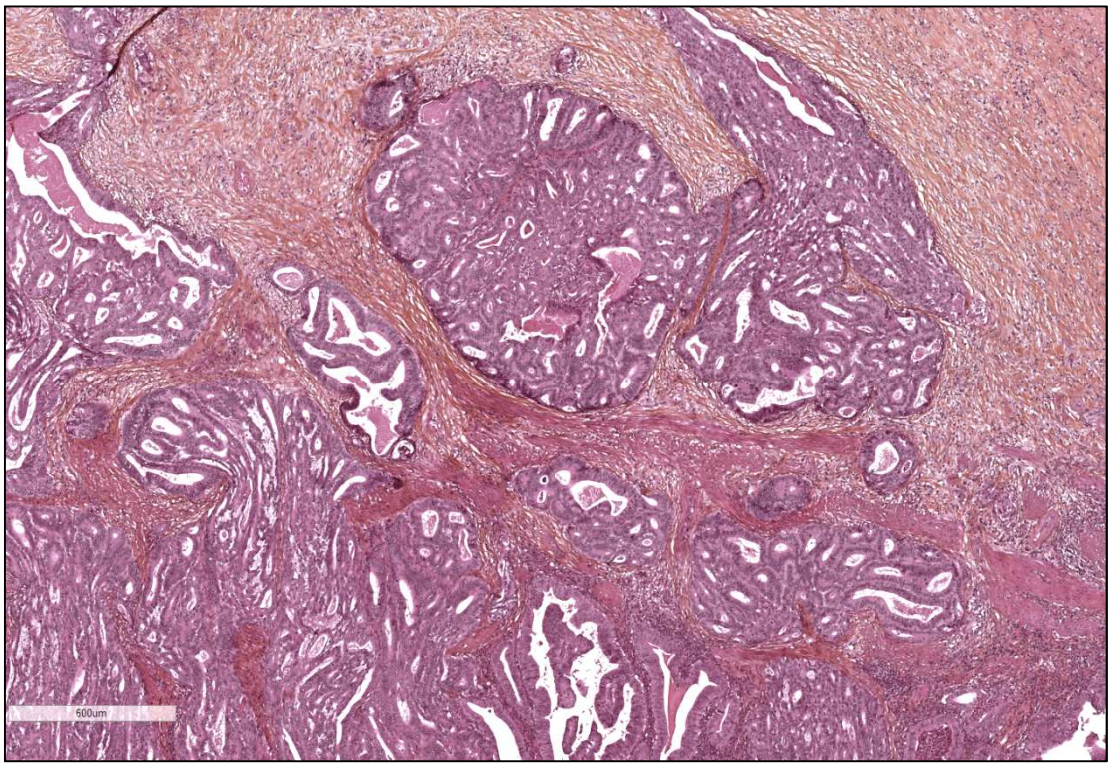


Figure 6 : Adénocarcinome bien à moyennement différencié de type bilio-pancréatique (coloration HES). Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

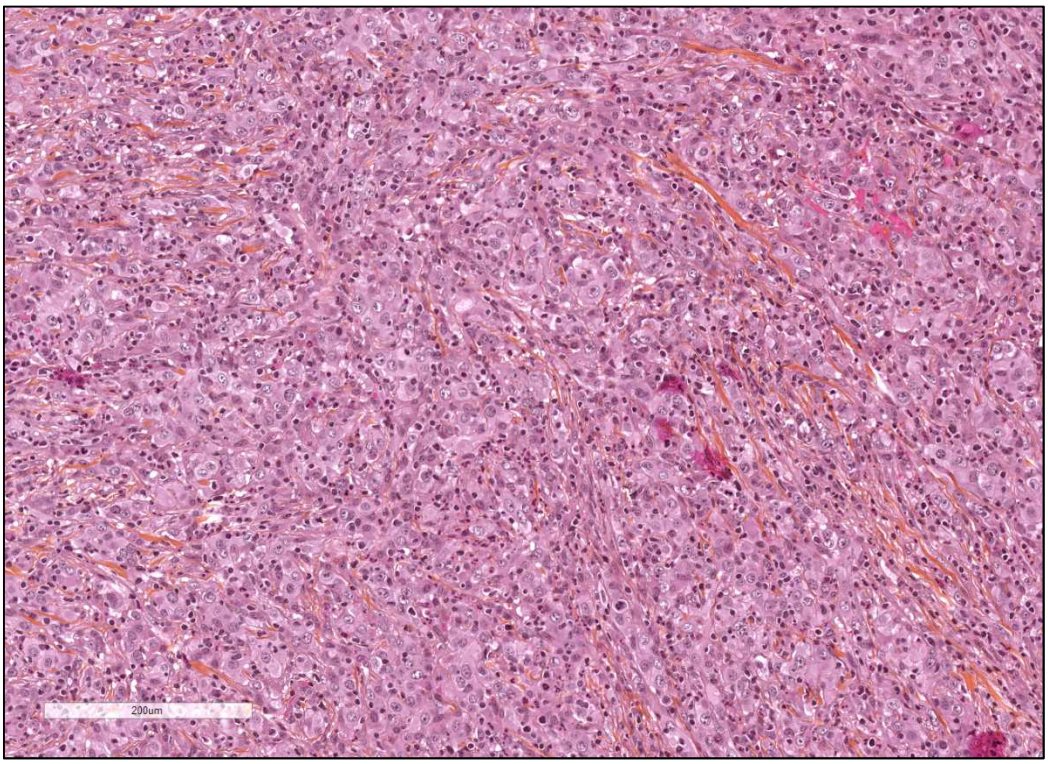


Figure 7: Métastase ganglionnaire de cholangiocarcinome peu différencié : travées de cellules tumorales sans différenciation glandulaire reconnaissable (coloration HES). Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

Les cellules tumorales ont un phénotype excréto-biliaire en immunohistochimie : elles expriment les Cytokératines 7 et 19.

Il faut noter que d'autres types histologiques existent mais ils sont rares : l'adénocarcinome de type intestinal et les carcinomes adénosquameux, épidermoïde, mucineux, à cellules indépendantes, à cellules claires…

Pour les tumeurs vésiculaires, la forme histologique la plus fréquente est l'adénocarcinome de type biliaire (avec expression immunohistochimique de CK7 et MUC1 par les cellules tumorales). Plus rarement, il peut être de type intestinal (cellules tumorales exprimant CDX2 et MUC2 en immunohistochimie) ou gastrique fovéolaire (cellules tumorales exprimant MUC5AC en immunohistochimie). L'extension tumorale doit être précisée en utilisant la classification pTNM (**Figure 10**: classification proposée par L'American Joint Committee on Cancer).

Tout comme pour le cholangiocarcinome, il existe de rares variantes histologiques: le carcinome adénosquameux (1 à 4% des carcinomes vésiculaires), le carcinosarcome, l'adénocarcinome à cellules claires, hépatoïdes, mucineux, à cellules indépendantes…

Figure 8 : Carcinomes péri-hilaire, Classification pTNM (8ème édition, AJCC 2017) (3)

- **T- Tumeur**:
  - **Tis:** Carcinome in situ (ex: IPN, BilIN)
  - **T1:** Tumeur limitée à la paroi de la voie biliaire, avec extension jusqu'à la couche musculaire ou au tissu fibreux
  - **T2a:** Tumeur avec extension au-delà de la paroi de la voie biliaire, dans le tissu adipeux péri-hilaire
  - **T2b:** Tumeur envahissant le parenchyme hépatique adjacent
  - **T3:** Tumeur envahissant une branche de la veine porte ou de l'artère hépatique
  - **T4:** Tumeur envahissant la veine porte (tronc commun) ou ses branches; ou l'artère hépatique commune; ou la 2eme branche de division biliaire avec envahissement de la branche portale ou artère hépatique contro-latérale
- **N – Ganglions régionaux**:
  - **N0:** Absence de métastases ganglionnaires régionales
  - **N1:** Présence de métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) dans 1 à 3 ganglions
  - **N2:** Présence de métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) dans plus de 4 ganglions

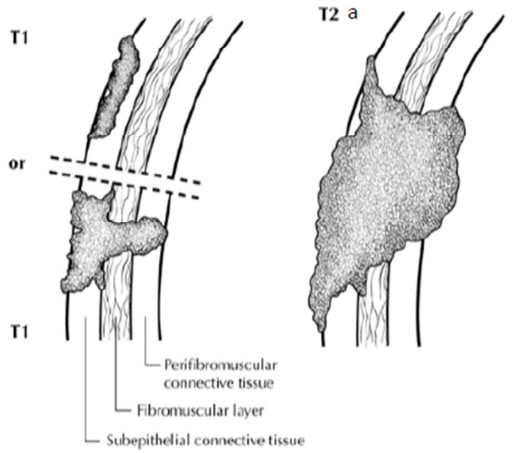
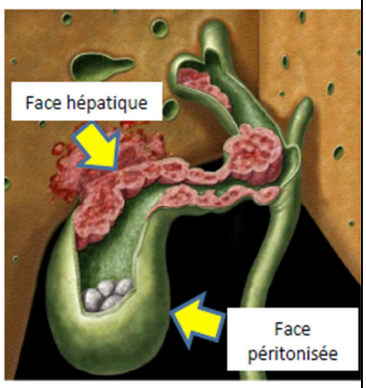


Figure 9 : Carcinomes de la voie biliaire distale, Classification pTNM (8ème édition, AJCC 2017) (3)

- **T- Tumeur**:
  - **Tis**: Carcinome in situ (ex: IPN, BilIN)
  - **T1**: Tumeur envahissant la paroi de la voie biliaire: profondeur d'infiltration <5mm
  - **T2**: Tumeur envahissant la paroi de la voie biliaire: 5mm ≤ profondeur d'infiltration ≤ 12mm
  - **T3**: Tumeur envahissant la paroi de la voie biliaire: profondeur d'infiltration >12mm
  - **T4**: Tumeur envahissant le tronc coeliaque, l'artère mésentérique supérieure et/ou l'artère hépatique commune
- **N – Ganglions régionaux**:
  - **N0**: Absence de métastases ganglionnaires régionales
  - **N1**: Présence de métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) dans 1 à 3 ganglions
  - **N2**: Présence de métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) dans plus de 4 ganglions

Figure 10 : Carcinomes de la vésicule biliaire, Classification pTNM (8ème édition, AJCC 2017) (3)

- **T- Tumeur**:
  - **Tis**: Carcinome in situ (ex: IPN, BilIN)
  - **T1**: Tumeur envahissant le chorion ou la musculeuse
    - **T1a**: Tumeur envahissant le **chorion**
    - **T1b**: Tumeur envahissant la **musculeuse**
  - **T2**: Tumeur envahissant le tissu adipeux péri-vésiculaire:
    - **T2a**: Tumeur envahissant le tissu adipeux péri-vésiculaire sur la **face péritonisée**
    - **T2b**: Tumeur envahissant le tissu adipeux péri-vésiculaire sur la **face hépatique**
  - **T3:** Tumeur **perforant la séreuse** (péritoine viscéral) et/ou envahissant le parenchyme hépatique et/ou autre organe ou structure adjacente (estomac, duodenum, colon, voies biliaires extra-hépatiques...)
  - **T4**: Tumeur envahissant le tronc de la veine porte ou l'artère hépatique ou envahissant >2 structures extra-hépatiques.
- **N – Ganglions régionaux**:
  - **N0**: Absence de métastases ganglionnaires régionales
  - **N1**: Présence de métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) dans 1 à 3 ganglions
  - **N2**: Présence de métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) dans plus de 4 ganglions



1.5 Prise en charge et pronostic

Principes généraux

Les carcinomes des voies biliaires ont, de manière générale, un mauvais pronostic avec un taux de survie globale à 5 ans d'environ 10% (3). La prise en charge, une fois l'ensemble du bilan d'extension réalisé, doit être discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire.

Si le patient est opérable et la tumeur résécable, la résection chirurgicale avec marges saines (R0), doit toujours être discutée. Toutefois, même après résection R0, la survie à 5 ans ne dépasse pas 5–10% en cas de cancer vésiculaire et 10–40% en cas de cholangiocarcinome.

L'envahissement microscopique des marges de résection (statut R1) (survie à 5 ans < 10%), l'envahissement ganglionnaire (survie à 5 ans < 5%) et l'envahissement vasculaire

sont de mauvais pronostic. L'exploration chirurgicale avec examen histologique extemporané de la ou des tranches de section biliaire est donc essentielle.

Les résections hépatiques majeures ou pancréatiques ont une morbi-mortalité très élevée, notamment du fait de l'âge souvent avancé des patients ou d'un état général altéré. Elles ne doivent être discutées et effectuées que par des équipes expérimentées.

En cas d'envahissement ganglionnaire, la survie à 5 ans est faible à nulle, notamment lorsque plus d'un à deux ganglions sont envahis (7,8). Le curage ganglionnaire doit comporter une résection étendue des ganglions du pédicule hépatique, des ganglions pancréatiques antérieurs et postérieurs ainsi qu'un pelage de l'artère hépatique jusqu'à sa naissance au niveau du tronc cœliaque. L'exérèse de la voie biliaire principale permet de faciliter le curage ganglionnaire du pédicule hépatique et est donc recommandée en cas de tumeur > T2.

Dans les cancers biliaires, il n'y a pas d'indication à une chimiothérapie, radiothérapie ou radio-chimiothérapie néo-adjuvante ou adjuvante. Un traitement néo-adjuvant est fréquemment impossible du fait de l'ictère et de l'altération de l'état général. Il n'y a pas non plus d'indication validée de transplantation hépatique.

La chimiothérapie ou la chimio-embolisation intra-artérielle hépatique est une approche logique, l'arbre biliaire étant majoritairement vascularisé par l'artère hépatique. Des taux de réponse encourageants ont été observés avec cependant des risques opératoires non négligeables (toxicité hépatique, occlusion de cathéter, risque important de progression tumorale extra-hépatique).

Particularités selon la topographie

Pour les cholangiocarcinomes intra-hépatiques, la résection R0 avec une marge de sécurité de 1 cm des segments hépatiques envahis est recommandée. Aucun curage ganglionnaire systématique n'est recommandé. La résection est contre-indiquée en cas d'envahissement ganglionnaire macroscopique.

Pour les cholangiocarcinomes du hile, la résection chirurgicale comprend au minimum la résection de la voie biliaire principale et de la convergence biliaire supérieure avec lymphadénectomie des ganglions régionaux. Pour des lésions étendues (de type II de Bismuth et plus), il faut associer une hépatectomie qui permet d'augmenter le pourcentage de marges R0 et la survie à 5 ans (9). La seule présence de ganglions suspects sur le bilan morphologique (dont on ignore le statut) ne doit pas représenter une contre-indication à la résection.

Pour les cholangiocarcinomes extra-hépatiques proximaux, la prise en charge rejoint celle des cholangiocarcinomes hilaires.

Pour les cholangiocarcinomes extra-hépatiques plus distaux, la chirurgie consiste en une résection de la voie biliaire principale pour les lésions du tiers moyen et en une duodéno-pancréatectomie céphalique pour les lésions du tiers inférieur. Un curage ganglionnaire pédiculaire sera systématiquement réalisé.

Les carcinomes de la vésicule biliaire Tis, T1a, T1b et T2 peuvent être découverts fortuitement sur pièce de cholécystectomie. Une laparoconversion est recommandée en cas de suspicion per-coelioscopique de cancer de la vésicule biliaire. Pour les cancers Tis et T1a, le taux d'envahissement ganglionnaire est de 0 à 5%, la cholécystectomie seule est donc recommandée, avec une survie à 5 ans de 85 à 100% (10). Pour les cancers T1b et T2, le taux d'envahissement ganglionnaire est de 15 à 60% (10,11,12), un curage ganglionnaire du pédicule est donc indiqué en plus de la chirurgie d'exérèse. Pour les tumeurs localement avancées (> T2) de la vésicule biliaire, une résection hépatique (bi-

segmentectomie IVb-V avec curage ganglionnaire), en plus de la cholécystectomie, est indiquée dont l'étendue est à discuter au cas par cas.

Traitement palliatif

En cas de tumeur non résécable et/ou patient inopérable, la survie médiane est de 9 à 15 mois. L'objectif premier du traitement palliatif doit être le maintien ou l'amélioration de la qualité de vie (ictère, prurit, douleur) et il ne doit pas être différé du seul fait de l'absence de confirmation histologique. Le drainage biliaire constitue la principale mesure thérapeutique palliative : il est indispensable en cas d'angiocholite, de prurit incontrôlé et si une bilirubinémie normale est requise avant chimiothérapie. La voie d'abord dépend du site et de l'extension tumorale : endoscopique dans les cholangiocarcinomes extra-hépatiques (percutanée si échec), endoscopique ou percutanée (selon les compétences locales) dans les cholangiocarcinomes péri-hilaires de type II à IV. Les prothèses métalliques, plus longtemps perméables, ont été démontrées par des essais randomisés plus efficaces et plus économiques que les prothèses plastiques en cas de survie présumée supérieure à 6 mois. Les prothèses métalliques hilaires sont à réserver strictement aux traitements palliatifs (chirurgie définitivement exclue). Le drainage externe percutané est la seule solution en cas d'échec ou d'impossibilité du drainage prothétique interne.

Chez les patients en bon état général, une chimiothérapie à base de Gemcitabine-Cisplatine est possible en cas de tumeur biliaire localement avancée. Il n'a pas été démontré de bénéfice de la radiothérapie ou de la curiethérapie dans ce contexte.

2) Adénocarcinome canalaire pancréatique

2.1 Epidémiologie

L'adénocarcinome canalaire du pancréas est la tumeur maligne pancréatique la plus fréquente : il représente 90% des tumeurs du pancréas et devrait être la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe en 2030 (13,14). Il constitue, quand il est de topographie céphalique, la cause la plus fréquente de sténose maligne des voies biliaires.
Le principal facteur de risque connu est le tabac. Il existerait également un rôle de l'obésité (syndrome métabolique) et de l'inflammation chronique (pancréatites). Enfin, des formes familiales sont reconnues avec des mutations prédisposantes (BRCA1 et 2, syndrome de Lynch…).
Il siège au niveau de la tête du pancréas dans 75% des cas (4), et reste longtemps asymptomatique.
L'extension se fait de trois manières :

- loco-régionale: par envahissement de la voie biliaire principale, du tronc porte puis de l'estomac, du duodénum et du méso-côlon.
- lymphatique: péri-pancréatique, hépatique, cœliaque et mésentérique supérieure.
- métastatique, notamment au niveau du foie, du péritoine, des poumons ou de l'os.

2.2 Clinique et biologie

Ce n'est qu'à un stade tardif qu'apparaissent les signes cliniques, qui varient selon la localisation de la lésion. Dans le cadre d'un cancer de la tête on retrouvera : un ictère « nu » progressif, sans rémission, accompagné de prurit (qui précède parfois l'ictère), un amaigrissement associé à une altération de l'état général, une volumineuse vésicule palpable et une hépatomégalie. Dans le cadre d'un cancer du corps, la symptomatologie sera principalement représentée par des douleurs intenses de type solaire, épigastriques,

transfixantes soulagées par une position antalgique en « chien de fusil », évoluant par crises et accompagnées d'un amaigrissement.
Sur le plan biologique, il pourra être retrouvé une cholestase, une ascension des marqueurs tumoraux digestifs (CA 19.9 ou ACE) qu'il faudra doser en dehors d'un contexte de cholestase.

2.3 Explorations d'imageries pré-thérapeutiques

L'échographie abdominale est peu performante pour les tumeurs pancréatiques : elle est très sensible pour juger de la dilatation et de la hauteur de la sténose mais elle est en revanche peu efficace pour en déterminer la nature. Le diagnostic radiologique repose donc sur le scanner spiralé avec injection ou l'écho-endoscopie.

Le **scanner spiralé** doit être préféré en première intention à l'écho-endoscopie car il n'est pas invasif et permet de mieux explorer la totalité de l'abdomen (en particulier le foie) à la recherche de métastases. Sa sensibilité est de 90 % pour le diagnostic de cancer du pancréas. Cependant, 20 à 30 % des cancers du pancréas de petite taille (< 15-20 mm) sont méconnus par cet examen. Dans ce cas, une écho-endoscopie doit alors être réalisée pour éliminer de manière quasi-certaine le diagnostic de cancer pancréatique.

L'**écho-endoscopie** étudie la glande pancréatique en deux temps : l'étude de la tête est obtenue par positionnement de l'endoscope au sein du duodénum, alors que l'étude du pancréas gauche (queue, corps) s'effectue par voie trans-gastrique. Elle permet d'évaluer la taille de la lésion et d'estimer sa résécabilité (envahissement vasculaire, taille de la dilatation du canal pancréatique et du cholédoque, extension pariétale et ganglionnaire) avec des résultats très proches de ceux fournis par l'imagerie conventionnelle. Sa sensibilité diagnostique est de 90%, indépendamment de la taille tumorale (15,16,17). Elle permet également de réaliser une ponction à l'aiguille fine orientée sur la masse pancréatique ou, le cas échéant, sur une localisation ganglionnaire.

En l'absence de masse évidente il existe un intérêt de la **bili-IRM** en première intention. Si la sténose biliaire isolée est confirmée à la bili-IRM, une exploration endoscopique pour diagnostic histologique et traitement de l'ictère est indiquée.

Enfin, en cas de confirmation d'une tumeur pancréatique, un bilan d'extension doit être réalisé à l'aide d'un **scanner thoraco-abdomino-pelvien** en coupes fines.

Les **biopsies** doivent être réalisées sur le site tumoral le plus facile d'accès (pancréas ou foie le plus souvent) et en privilégiant, pour le pancréas, la voie écho-endoscopique à l'abord trans-pariétal sous contrôle tomodensitométrique (18,19). L'obtention d'une preuve histologique est indiquée dans trois situations (4):

- doute diagnostique avec une lésion bénigne (par exemple : apparition d'un nodule dans une pancréatite chronique).
- tumeur non résécable mais sans métastase facilement accessible par voie trans-pariétale, pour avoir une preuve histologique avant de débuter le traitement médical.
- tumeur potentiellement résécable si un traitement néo-adjuvant est envisagé.

2.4 Anatomopathologie

Macroscopiquement sur pièce de pancréatectomie en cas de chirurgie d'exérèse, l'adénocarcinome pancréatique se présente comme un nodule blanchâtre, induré, mal limité, avec une dilatation des canaux bilio-pancréatiques en amont.

L'analyse histologique objectivera un adénocarcinome bien, moyennement ou peu différencié selon le nombre de structures glandulaires (>85%, 85-50% et <50%, respectivement) (**Figures 11A à 11C**). Dans les adénocarcinomes bien différenciés, les structures glandulaires, aux contours anguleux, sont bordées d'un épithélium de type canalaire et leur nature carcinomateuse n'est pas toujours évidente. Les adénocarcinomes moyennement différenciés peuvent présenter une architecture cribriforme, papillaire ou micro-papillaire. Les cellules tumorales sont cubiques, aux cytoplasmes éosinophiles et présentent des atypies cyto-nucléaires modérées avec des noyaux arrondis et des nucléoles

plus ou moins proéminents. Les adénocarcinomes peu différenciés sont plus hétérogènes, avec une architecture solide ou cribriforme et des cellules isolées très pléomorphes (voire des cellules géantes multinucléées), avec de nombreuses figures de mitoses. La particularité de l'adénocarcinome canalaire pancréatique est la présence d'un stroma fibro-collagène abondant et dense accompagnant les structures tumorales, appelé stroma desmoplasique. Les engainements péri-nerveux sont fréquents et des emboles carcinomateux intra-vasculaires doivent également être recherchés. Un système de grading basé sur la différenciation glandulaire, la production de mucine, l'activité mitotique et le degré d'atypies nucléaires permet d'identifier trois grades pour les adénocarcinomes pancréatiques, corrélés chacun à un pronostic différent.

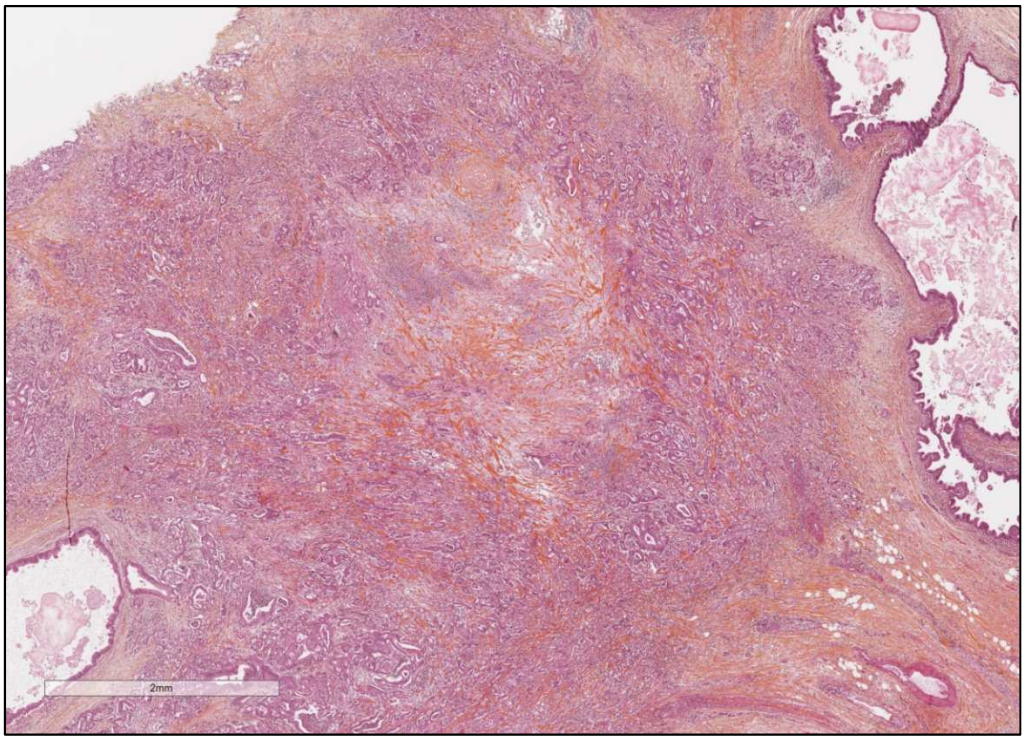


Figure 11A : Adénocarcinome canalaire pancréatique : prolifération de structures glandulaires au sein d'un dense stroma fibreux (coloration HES). Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

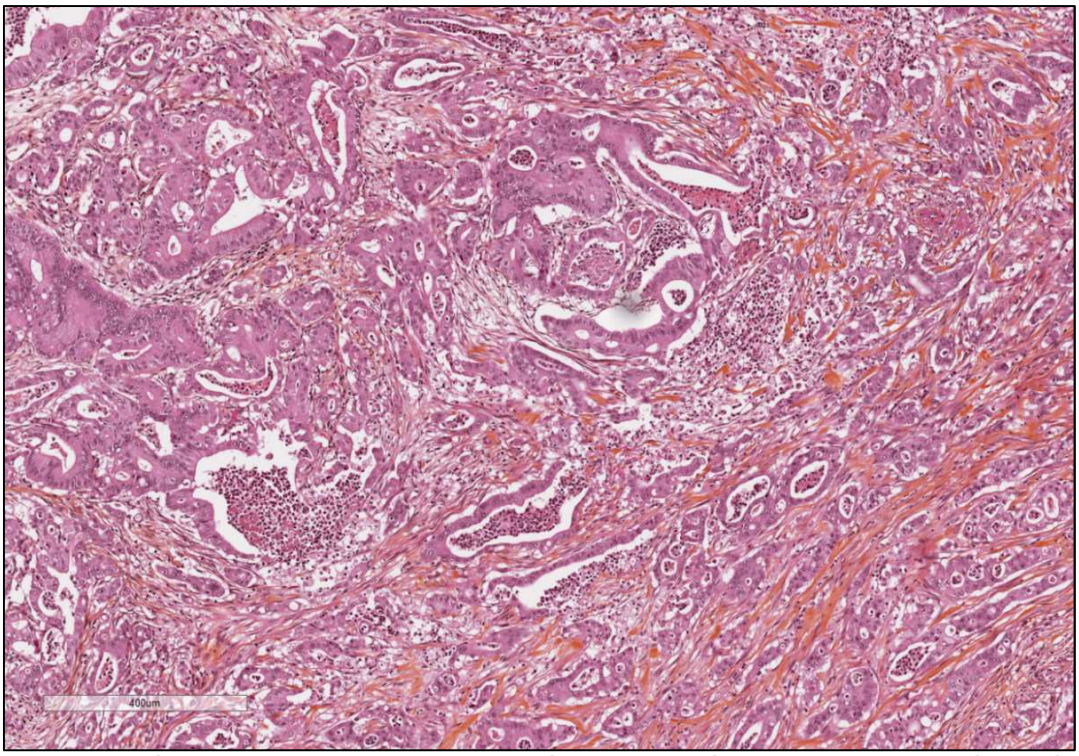


Figure 11B : Adénocarcinome canalaire pancréatique bien à moyennement différencié, fait de structures glandulaires renfermant de nombreux polynucléaires neutrophiles (coloration HES). Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

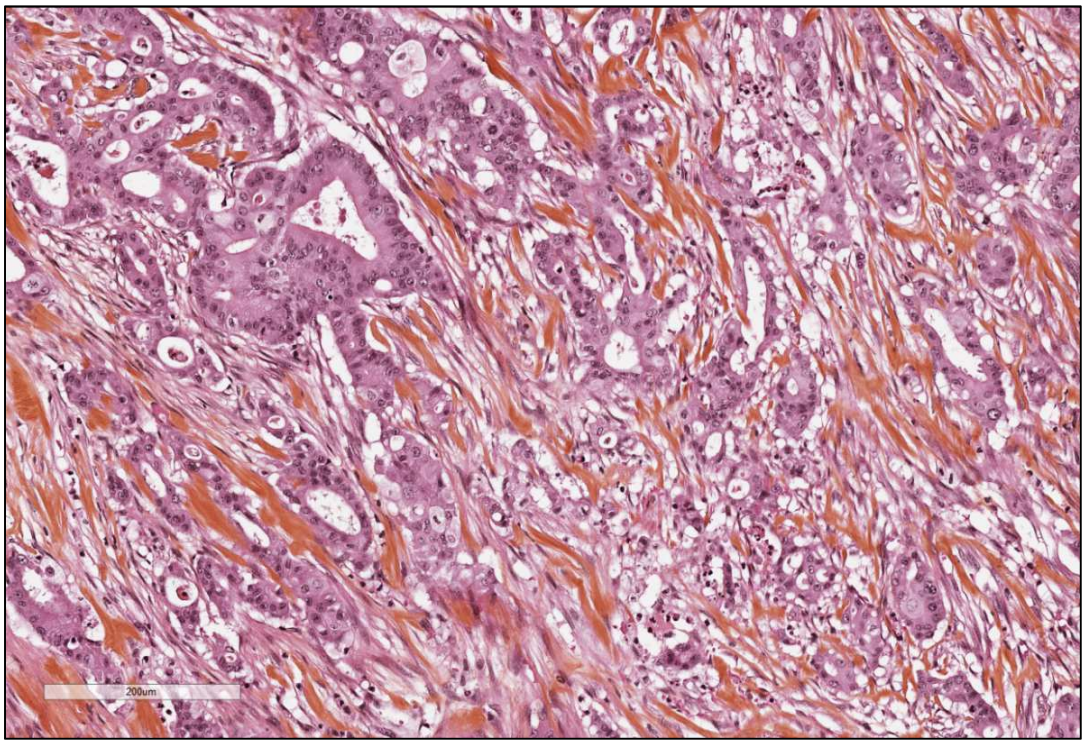


Figure 11C : Adénocarcinome canalaire pancréatique bien à moyennement différencié. Cellules tumorales cubiques éosinophiles au contact d'un stroma fibro-collagène dense orangeophile (coloration HES). Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

L'extension tumorale doit être précisée en utilisant la classification pTNM (voir ci-dessous : classification proposée par L'American Joint Committee on Cancer).

Il existe d'autres types histologiques de tumeurs pancréatiques, plus rares, tels que les carcinomes adénosquameux, colloïde muqueux, à cellules indépendantes, à cellules géantes ostéoclastiques-like, pléomorphe… Une variante importante à connaître est l'adénocarcinome à cellules claires, qui pose le problème de diagnostic différentiel avec une métastase de carcinome rénal à cellules claires.

Adénocarcinome pancréatique, Classification pTNM (8ème édition, AJCC 2017)

Catégorie T (**Taille de la tumeur, mesurée dans sa plus grande dimension)**

Tis Carcinome in situ (PanIN-III)

T1 Tumeur ≤ 2 cm

T1a Tumeur ≤ 0,5 cm

T1b Tumeur > 0,5 cm et ≤ 1 cm

T1c Tumeur > 1 cm et ≤ 2 cm

T2 Tumeur > 2 et ≤ 4 cm

T3 Tumeur > 4 cm

T4 Tumeur envahissant l'axe cœliaque l'artère mésentérique supérieure et/ou à l'artère hépatique commune

Catégorie N

Nx Les adénopathies régionales ne peuvent être évaluées

N0 Absence de métastase ganglionnaire régionale (examen d'au moins 12 ganglions lymphatiques)

N1 1 à 3 ganglions régionaux métastatiques

N2 ≥ 4 ganglions régionaux métastatiques

Catégorie M

M0 Absence de métastase à distance

M1 Présence de métastase(s) à distance, y compris atteinte des ganglions interaortocaves

2.5 Prise en charge et pronostic

Les adénocarcinomes pancréatiques sont des tumeurs de mauvais pronostic, avec un taux de survie globale d'environ 7% à 5 ans (3).

Les possibilités thérapeutiques doivent être discutées en réunion de concertation pluridisciplinaire, en connaissance du bilan d'extension, de la résécabilité de la lésion et de l'état général du patient (performance status, comorbidités, état nutritionnel).

Il existe deux contre-indications opératoires :

- une probabilité de mortalité post-opératoire supérieure à 10 %.
- la présence de métastases viscérales ou de carcinose péritonéale, compte tenu d'une probabilité de survie médiane de 3 à 6 mois.

Les extensions locorégionales, vasculaires ou ganglionnaires à distance, constituent les 3 éléments principaux à prendre en compte pour la résécabilité. Toutes les extensions vasculaires ne sont pas synonymes de non résécabilité : l'artère splénique, la veine mésentérique supérieure, ou la veine porte peuvent parfois être réséquées au cours d'une duodéno-pancréatectomie céphalique. En revanche, un envahissement de l'artère mésentérique supérieure, de l'artère hépatique ou du tronc cœliaque contre-indique formellement une résection. Il en est de même pour un envahissement de la veine mésentérique supérieure ou de la veine porte s'il intéresse plus de la moitié de l'axe veineux. L'extension métastatique des ganglions de la loge pancréatique (à proximité de la tumeur), bien qu'étant un facteur de mauvais pronostic indépendant sur les études de survie (taux de survie à 5 ans de l'ordre de 5%) (20), n'est pas un critère de non résécabilité à visée curative. En revanche, un envahissement ganglionnaire à distance documenté (hile hépatique, racine du mésentère, rétro-péritonéal ou inter-aortico-cave) est un critère de non résécabilité à visée curative car il équivaut en terme pronostique à une situation métastatique.

La résection chirurgicale de la tumeur avec des marges saines (R0) est le seul traitement à visée curative mais elle n'est réalisée que chez 20% des malades.

Pour les cancers de la tête du pancréas, la duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC) est l'intervention de référence. Un curage ganglionnaire, emportant au moins 15 ganglions lymphatiques et une résection de la lame rétro-porte mettant à nu le bord droit de l'artère mésentérique supérieure doivent être réalisés.

Les adénocarcinomes du corps ou de la queue du pancréas sont traités par spléno-pancréatectomie gauche (SPG) avec un curage ganglionnaire associé comportant au moins 15 à 20 ganglions lymphatiques.

Les indications de pancréatectomie totale sont très rares. Elle est réservée aux tumeurs intra-canalaires papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP) diffuses dégénérées ou à une nouvelle tumeur (ou plus rarement une récidive loco-régionale unique) localisée au pancréas restant.

Un traitement adjuvant est indiqué chez tous les patients opérés en mesure de pouvoir le débuter dans les 3 mois suivant la chirurgie, quel que soit le stade pTNM. Cependant, la morbidité élevée de l'intervention retarde souvent la mise en route du traitement adjuvant. Le traitement adjuvant de référence est une chimiothérapie pendant 6 mois par FOLFIRINOX modifié ou Gemcitabine-5-FU ou Gemcitabine-Capécitabine, à discuter au cas par cas. En cas de marge positive (résection R1 ou R2), une association radio-chimiothérapie adjuvantes sont discutées.

Le drainage biliaire (mise en place d'une prothèse métallique au cours d'une cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique) avant chirurgie peut être discuté en cas d'angiocholite, d'un taux de bilirubine > 250 µmol/L ou si un traitement néo-adjuvant est envisagé ou la chirurgie retardée.

Les cancers non résécables de la tête du pancréas font discuter le choix du traitement palliatif. Le traitement de référence des adénocarcinomes pancréatiques localement avancés est la chimiothérapie d'induction à base de Gemcitabine. Ce traitement doit être réservé aux

patients en bon état général (PS 0 ou 1) sans pathologie coronarienne et ayant un taux de bilirubine normal ou subnormal (< 1,5 fois la normale).

Les prothèses biliaires et duodénales sont une bonne alternative à la chirurgie palliative.

Si le patient est âgé ou en mauvais état général (PS 3-4), une prise en charge symptomatique seule est indiquée.

IV) L'EXPLORATION D'UNE STENOSE DES VOIES BILIAIRES

1) Technique de la Cholangio-Pancréatographie Rétrograde Endoscopique (CPRE)

En cas de sténose des voies biliaires, la CPRE est un examen de référence pour l'exploration diagnostique mais également le traitement de la sténose.

Cet examen s'effectue sous anesthésie générale sur une table de radiographie à l'aide d'un duodénoscope à vision latérale inséré jusqu'au deuxième duodénum, en regard de la papille. Un fil guide est mis en place dans le tractus biliaire, et une opacification de l'arbre biliaire peut alors être réalisée pour confirmer ou non l'existence d'une sténose biliaire et apporter une orientation sur sa nature: une sténose anfractueuse et irrégulière sera suspecte, alors qu'une sténose régulière et harmonieuse sera plutôt rassurante. L'opacification permet également de mesurer l'épaisseur de la sténose, qui déterminera s'il est possible de réaliser des biopsies. En cas de papille vierge, une sphinctérotomie pourra ensuite être réalisée, permettant l'introduction d'une brosse cytologique jetable glissée sur le guide en place à travers la sténose. La bosse est poussée jusqu'au pôle proximal de la sténose et une dizaine de mouvements de va-et-vient sont réalisés. Depuis 2018, la brosse est immédiatement immergée dans la solution PreservCyt® et acheminée au laboratoire de Pathologie (avant cette date, la brosse était étalée sur lame au préalable). 3 à 10 millilitres de bile sont recueillis au-dessus de la sténose dans un tube sec stérile par aspiration en utilisant l'un des canaux du sphinctérotome ou le cathéter de la brosse cytologique (**Figure 12**).

L'endoscopiste prélève 2 échantillons de bile: un avant et un après le brossage. Chez les patients présentant des sténoses très serrées, la dilatation de la sténose est possible, à l'aide d'un ballon hydraulique après recueil des échantillons cytologiques. La procédure se termine, selon le contexte clinique, par le traitement symptomatique de la sténose qu'est la mise en place d'une prothèse (plastique ou métallique non couverte). Cette prothèse est provisoire, car il faudra attendre l'obtention du diagnostic étiologique de la sténose pour

définir la prise en charge ultérieure (chirurgicale ou endoscopique et dans ce cas le type de prothèse à mettre en place).

Les complications possibles de la CPRE sont la survenue d'une pancréatite aiguë (3,5%), d'angiocholite, de cholecystite, d'hémorragie (1%) ou de perforation (0,1 à 0,6%).

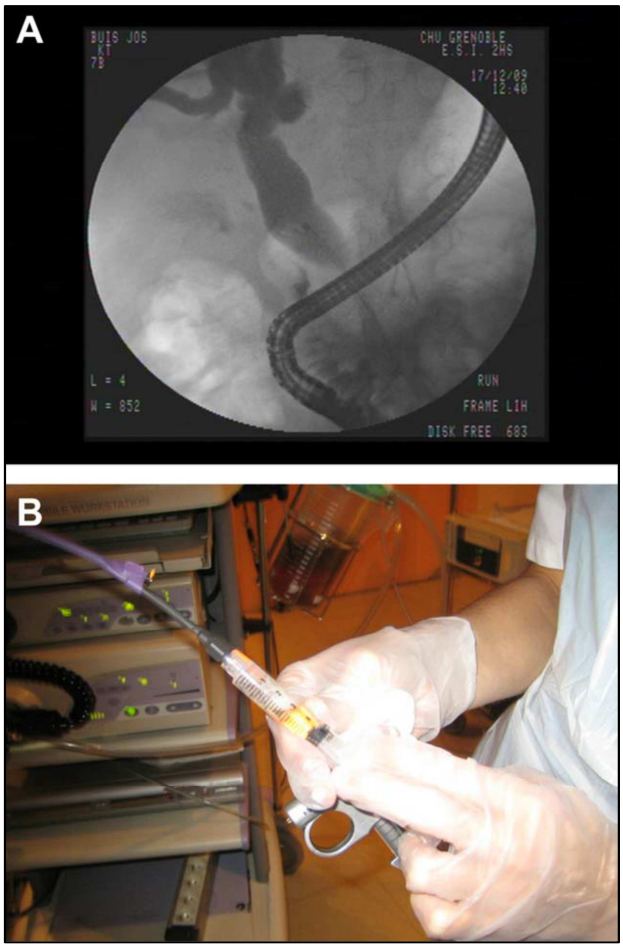


Figure 12 : Techniques de prélèvements biliaires au cours de la CPRE, photos prises par Dr P-Y Eyraud en salle d'endoscopie du CHU Grenoble Alpes.

D’autres méthodes d’exploration des voies biliaires de seconde intention existent. Elles nécessitent la réalisation d’une CPRE avec cathétérisme biliaire sélectif au préalable. Il s’agit de :

- La **cholangioscopie**, au cours de laquelle l’endoscope est introduit dans les voies biliaires et des biopsies dirigées sont réalisées. Cet examen n’est pas réalisé en pratique courante au CHU Grenoble Alpes.
- L’**endo-microscopie confocale**, consistant à injecter de la fluorescéine intra-veineuse au patient et à réaliser un examen du tissu au laser. Il s’agit d’une méthode coûteuse.
- Les **minisondes endocanalaires d’échographie**.

2) Technique cytologique

Les prélèvements biliaires réalisés au cours de la CPRE sont placés dans des tubes secs stériles et acheminés le plus rapidement possible au laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, conservés dans de la glace puis au réfrigérateur à -4°C. Les prélèvements de bile sont ensuite centrifugés à 2000 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot est recueilli après retrait du surnageant, et étalé sur 4 lames pour examen cytologique de la bile avant brossage et 4 lames pour la bile après brossage.

Comme elles sont complémentaires en cytopathologie, les deux colorations May-Grünwald Giemsa (MGG) et Papanicolaou sont utilisées. En effet, la coloration Papanicolaou permet de mieux apprécier les détails nucléaires, alors que la coloration MGG est plutôt utile pour évaluer le fond, la cellularité, la disposition des cellules, qui apparaissent plus volumineuses du fait du séchage à l'air. Sur les 4 lames de bile avant brossage, 2 sont séchées à l'air et colorées au MGG et les 2 autres sont fixées à l'aide d'un fixateur en spray composé de 50% d'acétone et 50% d'alcool, puis colorées au Papanicolaou. Il en est de même pour les 4 lames de bile après brossage. Au final, le cytopathologiste examine 8 lames de bile : 4 lames avant et 4 lames après brossage. Depuis 2018, les prélèvements de bile avant et après brossage ont été réunis et deux lames sont réalisées (une colorée au MGG et une au Papanicolaou). Le culot résiduel est ensuite inclus en paraffine pour réaliser un cytobloc et une lame colorée à l'Hématoxyline Eosine Safran (HES). Ce cytobloc permet d'effectuer des techniques complémentaires (notamment immunohistochimiques) si nécessaire. La brosse était jusqu'en 2018 étalée sur lame en salle d'endoscopie. Depuis 2018, il n'y a plus d'étalement de la brosse en salle d'endoscopie, cette dernière est directement coupée et plongée dans le Cytolyt®, afin de lyser les hématies puis dans le Preservcyt®. L'ensemble est agité à l'aide d'un Vortex pour détacher les cellules de la brosse, puis cette dernière est jetée et le prélèvement est centrifugé à 2000 tours par minute pendant 10 minutes. Une fois la centrifugation effectuée, un étalement de type monocouche est réalisé (décantation à travers un filtre pour recueillir les cellules), et la lame obtenue est colorée au Papanicolaou.

V) DEMARCHE DIAGNOSTIQUE EN CYTOPATHOLOGIE PANCREATO-BILIAIRE

1) Diagnostic cytopathologique des adénocarcinomes pancréato-biliaires

Afin de proposer un diagnostic cytologique le plus juste possible, il convient de rechercher sur les prélèvements de bile un certain nombre de critères morphologiques, en ayant toujours pris connaissance des renseignements cliniques au préalable (notamment la présence ou non d'une prothèse en place ou d'une pathologie inflammatoire chronique telle que la cholangite sclérosante primitive). Il faudra apporter au clinicien une réponse rapide (semi-urgente), car il s'agit de patients pour lesquels l'instauration du traitement ne doit pas être retardée.

Il est important de garder en mémoire que les adénocarcinomes pancréatiques peuvent être très bien différenciés, ce qui pose un problème de diagnostic différentiel avec les atypies non malignes (risque de faux positif). De plus, ils possèdent souvent un stroma desmoplasique dense responsable d'une faible desquamation des cellules tumorales dans la bile et donc de prélèvements peu cellulaires (risque de faux négatif).

De ce fait, l'aspect du fond conditionne l'analyse : alors qu'un fond sale pourra gêner la lecture et la visualisation des massifs épithéliaux, la présence d'un fond inflammatoire et/ou nécrotique pourra expliquer des modifications cellulaires à distinguer de cellules malignes, telles que des atypies réactionnelles, des aspects dégénératifs ou dystrophiques.

On peut repérer des massifs d'épithélium canalaire normal, sous forme de placards de cellules cubiques s'agençant en « nids d'abeille » avec parfois des organisations palissadiques périphériques (**Figure 13**). Les cellules présentent un rapport nucléo-cytoplasmique conservé avec une chromatine fine et régulière. On pourra également observer des cellules gastriques (cellules fovéolaires mucosécrétantes) ou duodénales (entérocytes cylindriques avec bordure en brosse apicale ou cellules caliciformes) (**Figure 14**). L'épithélium canalaire peut être d'aspect dégénératif avec des noyaux hyperchromatiques et des condensations arrondies intra-cytoplasmiques. Dans le cadre

d'étalements provenant de cytoponctions pancréatiques, la présence de cellules acineuses pancréatiques (cellules au petit noyau dense et au cytoplasme pâle, agencées en amas tridimensionnels) ou de cellules mésothéliales (cellules polygonales aux noyaux ronds ou ovalaire et aux cadres cytoplasmiques nets) est également décrite.

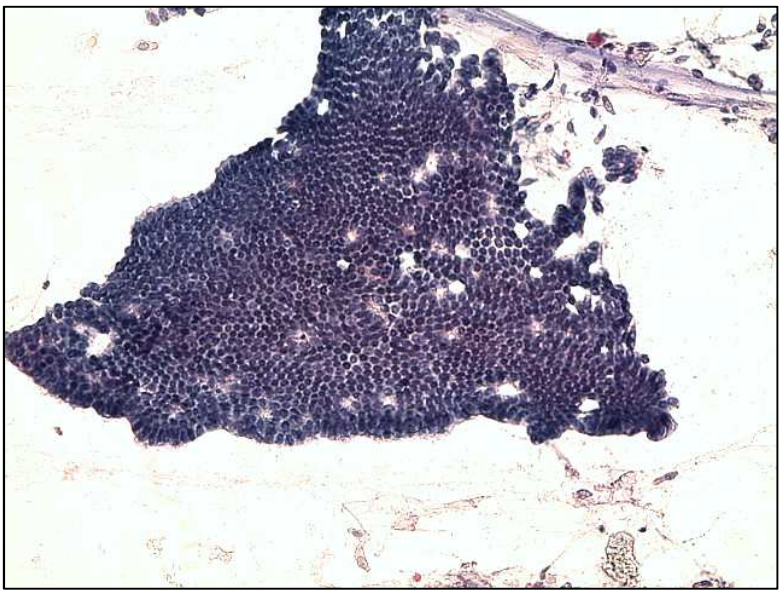


Figure 13: Illustration d'un placard d'épithélium canalaire normal, coloration Papanicolaou x 20. Noter l'agencement palissadique des noyaux en bordure du massif et la présence de lumières au sein de ce lambeau, à ne pas confondre avec les acini à rechercher dans les massifs malins. Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

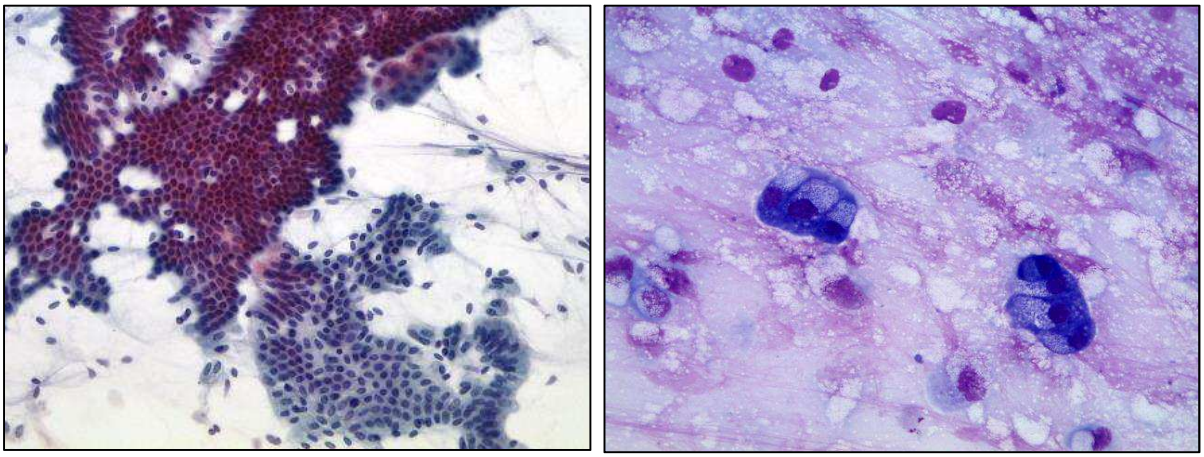


Figure 14 : Epithélium de type gastrique (**à gauche** : coexistence d'un épithélium fovéolaire (en bas) et biliaire (en haut), coloration Papanicolaou x 20 et **à droite** : cellules fovéolaires mucosécrétantes, coloration MGG x 40). Photos de cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

Lorsque l'épithélium canalaire subit une agression, des modifications de nature réactionnelle peuvent s'observer et être interprétées comme des atypies. C'est le cas notamment dans les contextes de prothèse en place ou de cholangite sclérosante primitive. Dans ces cas, quelques irrégularités des contours nucléaires et des anomalies de répartition de la chromatine peuvent apparaître (**Figures 15A à 15D**). Il s'agira le plus souvent d'un continuum, au sein d'un même massif, entre des cellules d'aspect normal et des cellules plus atypiques.

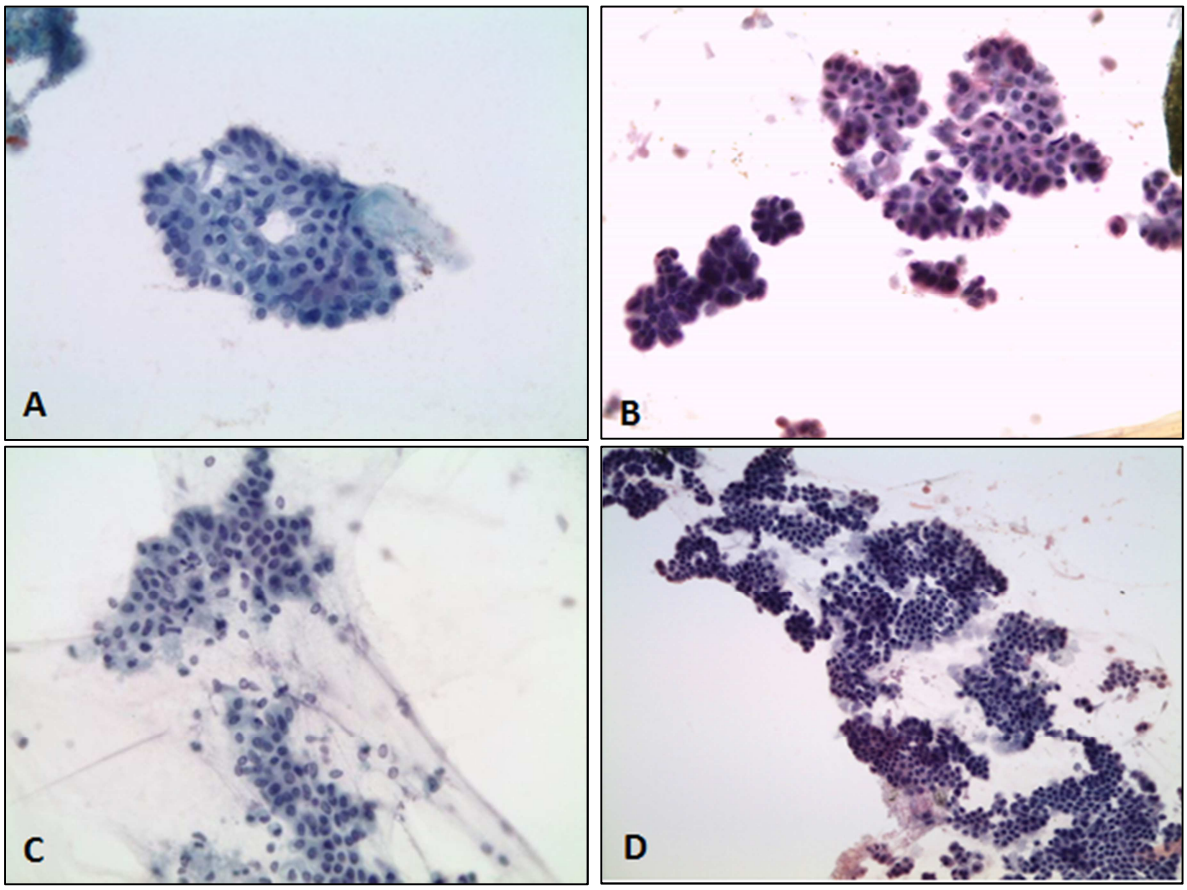


Figure 15 : Exemples de modifications de l'épithélium canalaire classées en atypies. Photos de cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.
A : irrégularités des contours nucléaires et discrète désorganisation, coloration Papanicolaou x 40.
B : noyaux hyperchromatiques irréguliers, coloration Papanicolaou x 40.
C : contours nucléaires irréguliers, coloration Papanicolaou x 40.
D : prélèvement richement cellulaire avec des modifications au sein de mêmes massifs (spectre morphologique), coloration Papanicolaou x 20.

On s'attachera ensuite à rechercher des critères orientant vers la malignité (**Tableau 2**), que sont :

- la présence de deux populations cellulaires distinctes, par opposition aux variations de morphologie au sein du même massif qui peuvent s'observer dans les cas d'atypies non malignes (**Figure 15D**). La présence de cellules métaplasiques ou de cellules non épithéliales (macrophages, cellules inflammatoires…) ne doit pas entrer en compte dans la définition de ce critère.

- une désorganisation cellulaire qui pourra se traduire par des chevauchements nucléaires, une disposition des cellules autour de lumières (acini), des amas tridimensionnels ou bien des cellules tumorales isolées.

- une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique au-delà de 0.5 (**Figure 16**).

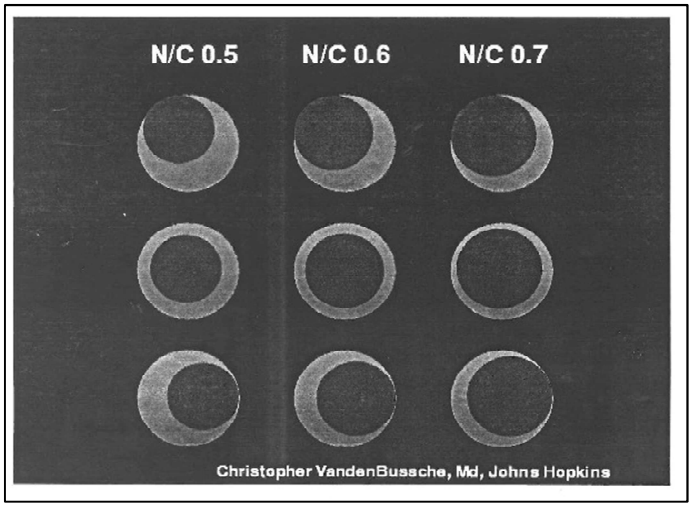


Figure 16 : Aide pour l'évaluation du rapport nucléo-cytoplasmique proposée par Christopher VandenBussche, MD, Johns Hopkins

- une anisonucléose, définie par une différence de taille d'au moins 1 pour 4 des noyaux des cellules au sein d'un massif.

- des irrégularités et/ou un rehaussement des membranes nucléaires. Les contours nucléaires apparaissent alors anguleux, avec des aspects « boursoufflés » et des incisures.

Il faut noter que de discrètes irrégularités peuvent s'observer dans l'épithélium canalaire normal, mais elles sont moins prononcées.

- un cytoplasme (micro)vacuolisé refoulant le noyau en périphérie.

- un rehaussement « en cadre » des membranes cytoplasmiques.

- des anomalies de répartition chromatinienne telles que des clarifications, un aspect grossier motté, un hyperchromatisme (en comparaison à la chromatine des cellules de l'épithélium canalaire normal) et la présence ou non d'un nucléole proéminent (visible dès l'objectif x 20).

Des images de cytophagie (visualisation d'une cellule tumorale à l'intérieur d'une autre), bien que plus rarement rencontrées, seront très évocatrices d'un processus malin.

Enfin, la visualisation de cellules géantes plurinucléées « ostéoclastic-like » (**Figure 17**) ou de mitoses (**Figure 18**) sont également de bons arguments en faveur de la malignité, mais leur mise en évidence est très rare (2 cas sur 69 pour les mitoses et 1 cas sur 69 pour les cellules géantes dans notre série) et ne sera pas étudiée ici.

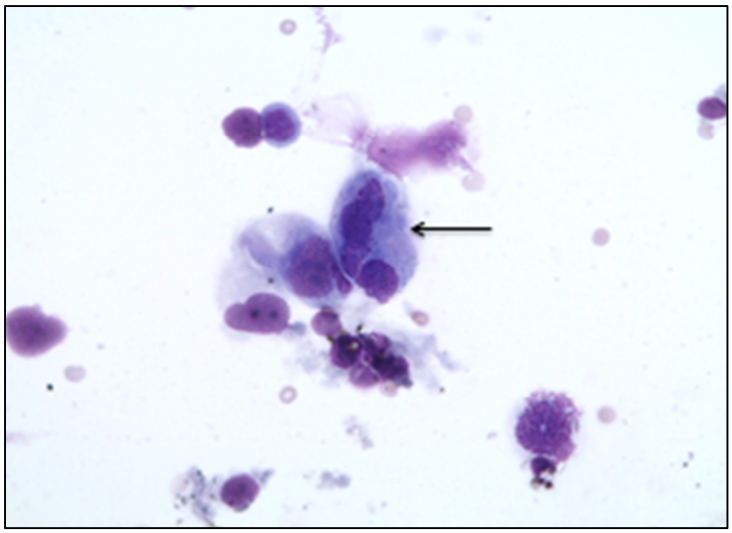


Figure 17: Illustration d'un cas de notre série d'adénocarcinome pancréatique avec cellules géantes « ostéoclastic-like », coloration MGG x 40. Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

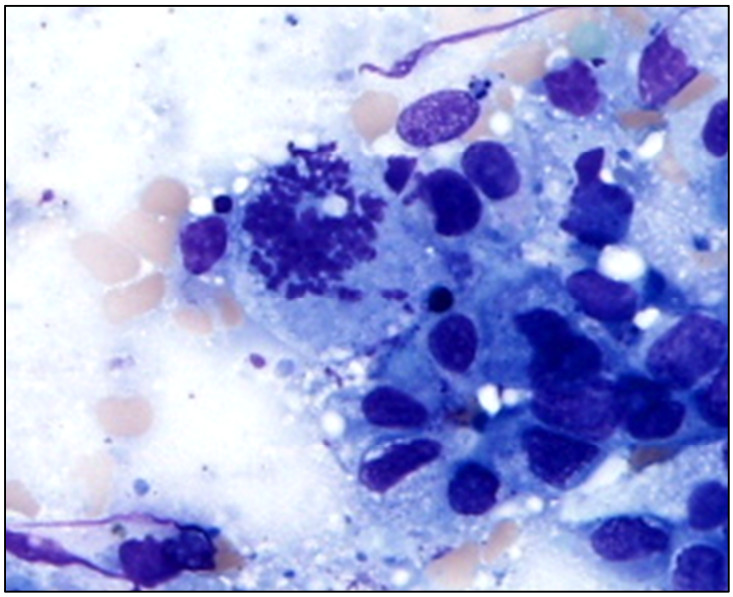


Figure 18 : Illustration d'une mitose, coloration MGG x 40. Photo d'un cas du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Grenoble Alpes.

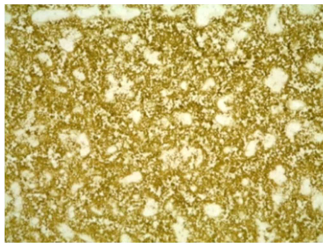
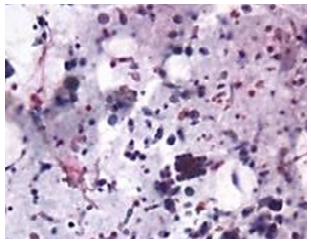
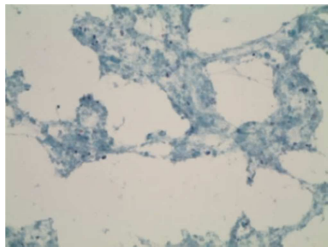
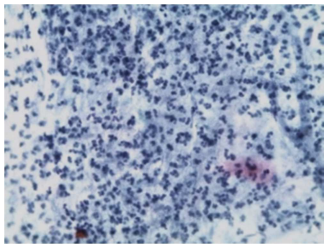
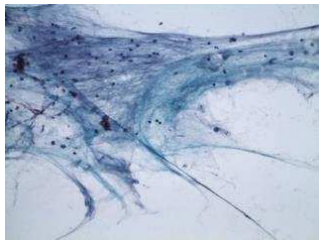
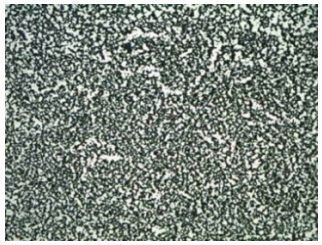
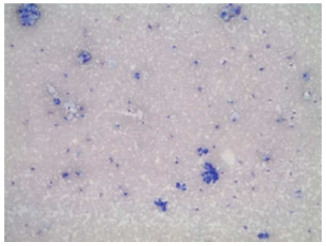
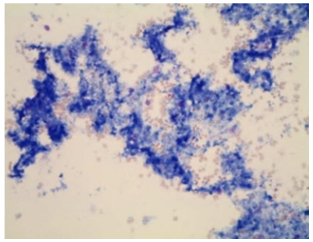
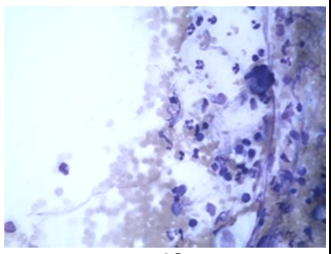
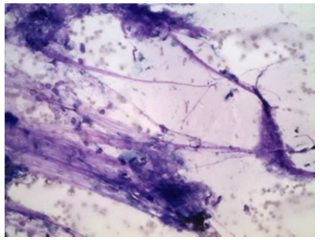
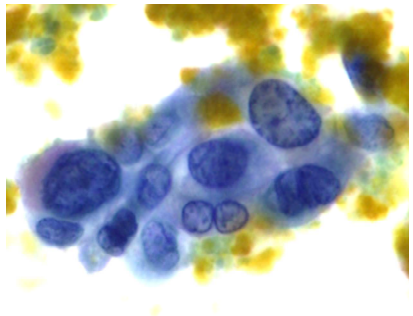
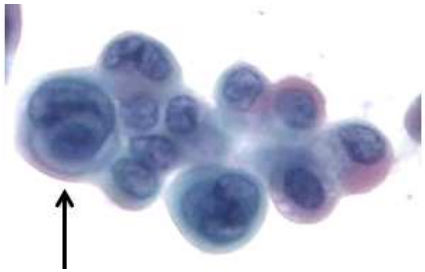
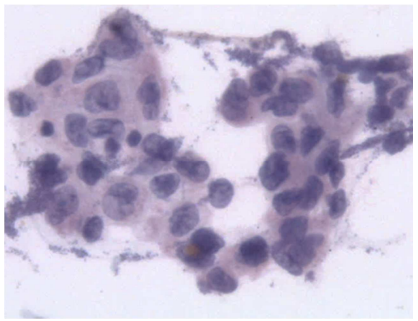
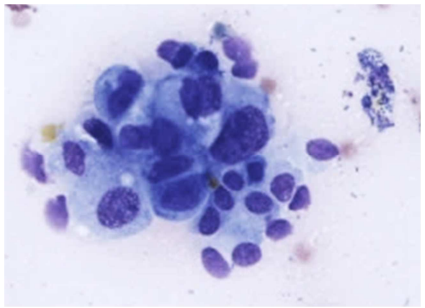
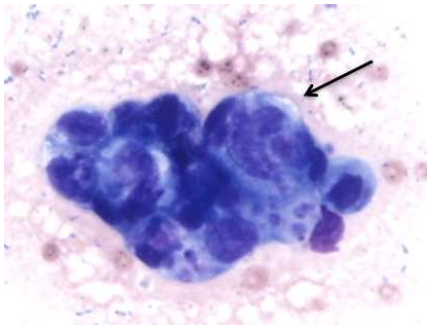
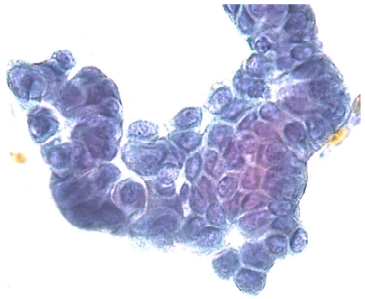
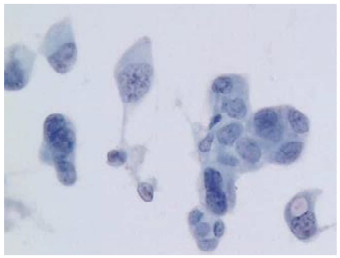
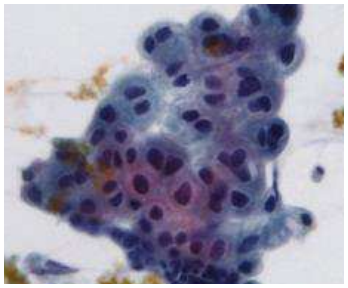
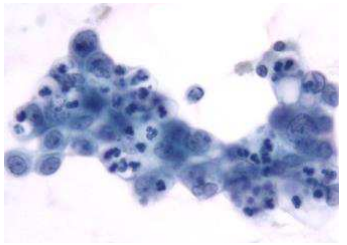
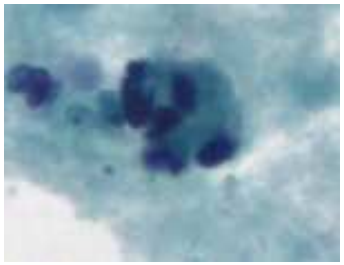
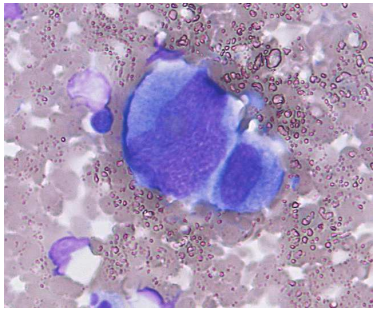
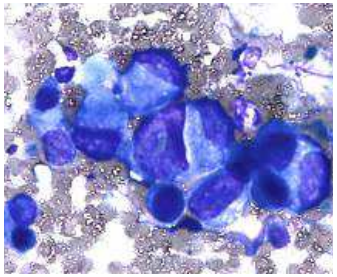
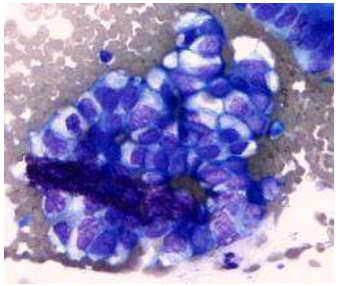
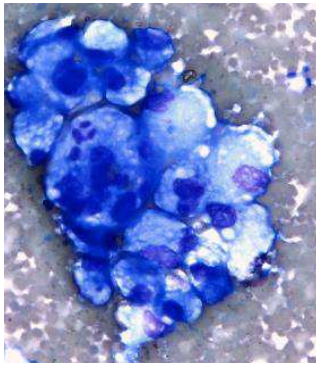
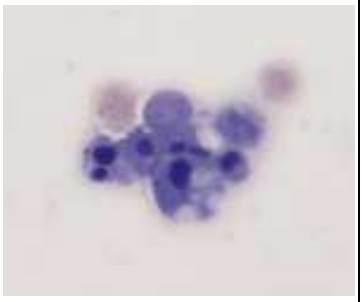
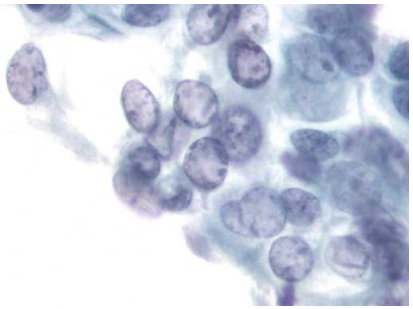
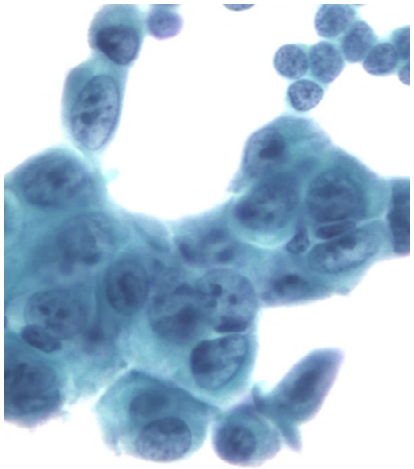
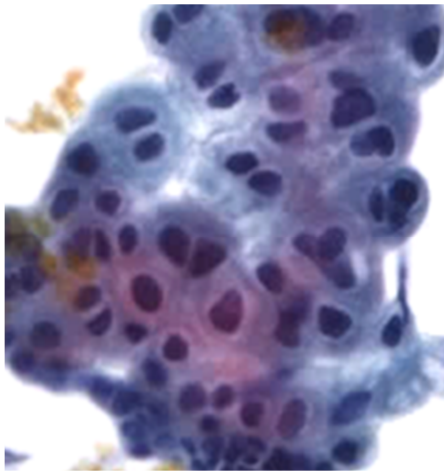
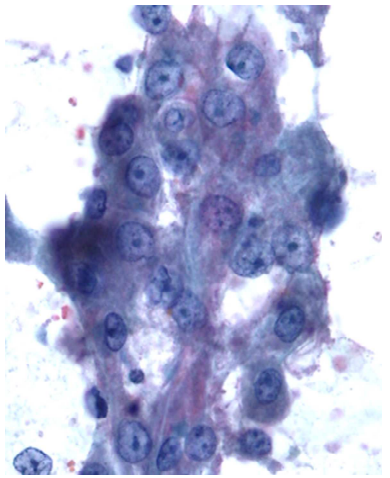
FOND	Riche en pigments	Hémorragique	Nécrotique	Inflammatoire	Mucus
PAPANICOLAOU	 x 5	 x 20	 x 20	 x 40	 x 40
MGG	 x 5	 x 5	 x 20	 x 40	 x 40

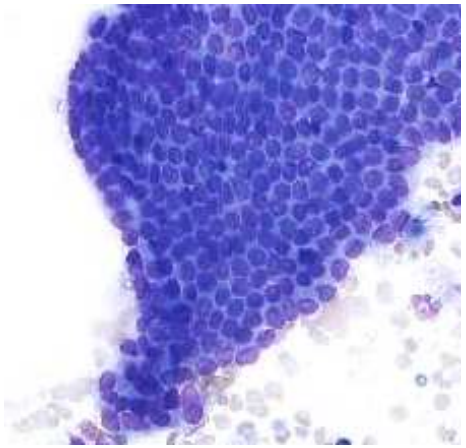
Tableau 2 : Illustration des critères cyto-morphologiques étudiés :

CRITERES NUCLEO-CYTOPLASMIQUES	Anisocaryose	Cytophagie	Contours nucléaires irréguliers	Réhaussement des membranes nucléaires
PAPANICOLAOU	 x 63	 x 63	 x 63	x 63
MGG	 x 40	 x 63	x 40	

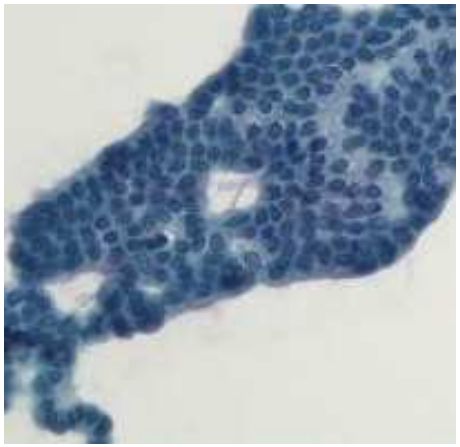
CRITERES NUCLEO-CYTOPLASMIQUES	Rapport nucléo-cytoplasmique > 0.5	Noyaux déjetés	Rehaussement des membranes cytoplasmiques	Inflammation au sein des massifs épithéliaux	Cellules dégénératives
PAPANICOLAOU	 x 40	 x 40	 x 40	 x 63	 x 40
MGG	 x 40	 x 40	 x 40	 x 40	 x 63

DETAILS NUCLEAIRES	Chromatine clarifiée	Chromatine mottée	Hyperchromatisme	Nucléole proéminent
PAPANICOLAOU	 x 40	 x 40	 x 40	 x 40

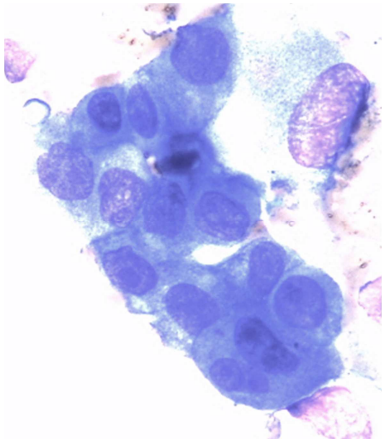
Les détails nucléaires ont été définis sur la coloration Papanicolaou. Ils doivent toujours être comparés aux lambeaux normaux :



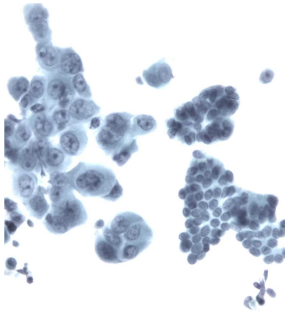
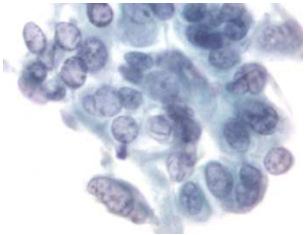
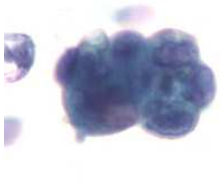
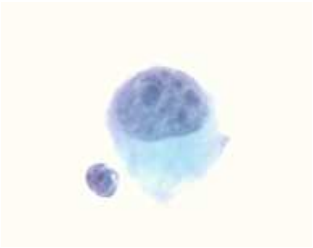
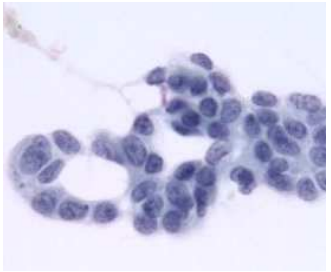
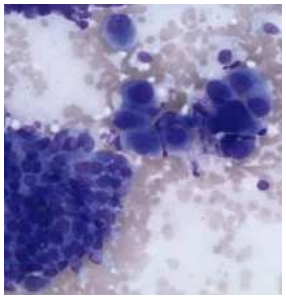
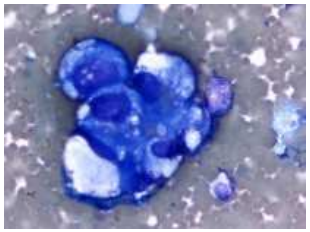
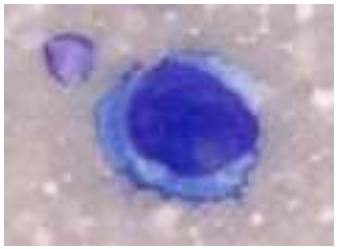
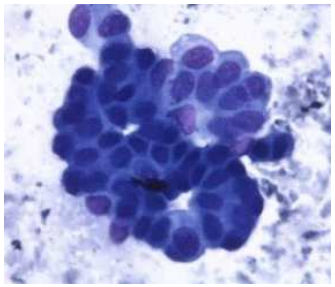
MGG x20



Papanicolaou x 20



Nucléoles au MGG x 40

AGENCEMENT	Double population cellulaire	Chevauchement nucléaire	Amas tridimensionnels	Cellules isolées malignes	Acini
PAPANICOLAOU	 x 40	 x 40	 x 40	 x 40	 x 63
MGG	 x 40	x 40	 x 40	 x 40	 x 63

Bien que la ponction pancréatique reste de nos jours le gold standard, l'examen cytologique du brossage et de la bile avant et après brossage permet d'avoir une bonne approche diagnostique de l'étiologie de la sténose. En effet, dans la littérature, l'examen cytologique d'aspiration de bile seule a une sensibilité assez faible pour la détection des lésions malignes (6 à 32%) (21), mais il a été démontré lors de plusieurs études anatomo-cliniques réalisées au CHU Grenoble Alpes qu'en cas de sténose biliaire, cette sensibilité est considérablement augmentée en cas de « triple association » (brossage + bile avant brossage + bile après brossage) (24,25). Ces prélèvements sont assez accessibles, quand le patient peut bénéficier d'une CPRE d'autant plus si cette dernière est effectuée à visée thérapeutique.

2) Nomenclature de la *Papanicolaou Society of Cytopathology* (2014)

Récemment, la *Papanicolaou Society of Cytopathology* a proposé une terminologie standardisée pour les prélèvements bilio-pancréatiques (22), visant à améliorer la reproductibilité diagnostique et la compréhension entre le clinicien et le pathologiste, afin de proposer une thérapeutique adaptée à chacune des classes diagnostiques.

Les 6 catégories proposées associées à un pronostic et une prise en charge spécifiques et validées pour la ponction pancréatique sont les suivantes :

Catégorie I, Non diagnostique: prélèvement ne permettant pas d'établir un diagnostic ou n'apportant pas d'information utile sur la lésion échantillonnée. Ce résultat engendre en général la répétition de l'examen. Il peut s'agir d'une contamination digestive ou d'un prélèvement acellulaire dans le cas d'une masse pancréatique. Cependant, tous les prélèvements acellulaires ne sont pas à classer en catégorie I : en effet, une lésion kystique mucineuse de bas grade, si les examens radiologiques et biologiques sont concordants, peut se présenter sous forme d'un prélèvement acellulaire riche en mucus.

Catégorie II, Négative (pour la malignité): prélèvement contenant le matériel adéquat pour définir la lésion repérée en imagerie: absence de malignité ou d'élément atypique sur l'échantillon examiné (implique que l'échantillon est assez cellulaire et qu'aucune atypie n'est observée sur les lames examinées). Cette réponse conduit à l'arrêt des investigations diagnostiques.

Catégorie III, Atypique : cellules présentant des caractéristiques cyto-nucléaires et/ou des critères architecturaux anormaux, qui ne sont pas réactionnels, mais insuffisants pour les classer en tumoral ou suspect. Les aspects sont insuffisants pour caractériser la lésion observée en imagerie. Il faudra intégrer à l'interprétation des étalements la notion d'une prothèse biliaire et/ou de migration lithiasique. C'est dans cette catégorie que s'intègrent les lésions de bas grade correspondant aux dysplasies légères et modérées (BilIN1 et 2), dont

les critères cytologiques ne sont pas bien établis. Un suivi (clinique et imagerie) voire un renouvellement des investigations sont nécessaires pour ces cas.

Catégorie IV, Tumoral:

A: Bénin

Présence de matériel de bonne cellularité et représentatif de la lésion, avec ou sans contexte clinico-biologique et radiologique, permettant le diagnostic de tumeur bénigne. Cette catégorie concerne principalement le cystadénome séreux, le tératome kystique, le ganglioneurome et le schwannome.

B: Autres

Il peut s'agir de :

-lésions précurseurs, telles que les néoplasies intra-épithéliales biliaires de haut grade (BilIN3), les tumeurs papillaires intra-ductales des voies biliaires (IPN-B), les tumeurs intra-canalaires papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP des canaux principaux, secondaires ou mixtes), les tumeur kystiques mucineuses avec dysplasie de bas/intermédiaire ou haut grade, les tumeurs stromales gastro-intestinales.

-tumeurs de bas grade, comme les tumeurs neuroendocrines bien différenciées ou les tumeurs solides pseudo-papillaires.

Catégorie V, Suspect (de malignité) : présence de quelques aspects malins (adénocarcinomateux principalement), mais en nombre insuffisant pour porter formellement le diagnostic. Les aspects cytologiques sont fortement évocateurs de malignité, mais quantitativement ou qualitativement insuffisants pour conclure au diagnostic, ou le prélèvement est trop exigu pour effectuer des tests immunohistochimiques permettant d'aboutir au diagnostic final. Les critères morphologiques doivent être suffisamment atypiques, de sorte que la malignité soit plus probable que la bénignité, d'autant plus que cette réponse sera le plus souvent considérée par le clinicien comme une catégorie VI.

Catégorie VI, Positif (malin) : présence de caractéristiques morphologiques formelles de malignité incluant l'adénocarcinome pancréatique et ses variantes, le cholangiocarcinome, le carcinome à cellules acinaires, les carcinomes neuroendocrines de haut grade (à petites et grandes cellules), le pancréatoblastome, les lymphomes, les sarcomes et les métastases pancréatiques. Si les critères cyto-nucléaires sont typiques, un seul amas suffit au diagnostic de malignité. Dans cette catégorie, la cytologie pancréatique est très spécifique (90-95%).

Cette terminologie a été initialement établie sur ponction pancréatique et est extrapolée en routine pour les prélèvements biliaires au sens large (brossage biliaire et aspiration de bile) (23). Cependant, son application peut s'avérer difficile pour la cytologie biliaire pure, certaines catégories n'étant pas tout à fait adaptées : c'est le cas par exemple de la catégorie IV qui ne s'utilise pas pour la cytologie biliaire car les diagnostics correspondant à cette catégorie ne sont pas accessibles par la bile (tumeurs bénignes ne desquamant pas dans la papille duodénale).

De plus, il a été démontré lors d'études grenobloises (24) que de nombreux cas (55%) d'atypies jugées réactionnelles (catégorie III) se sont révélés malins lors d'un contrôle ou du suivi. A l'inverse, 25% de cas classés en atypies suspectes de malignité (catégorie V) se sont révélés bénins au cours du suivi ou d'un contrôle ultérieur. Cela a amené l'équipe grenobloise à préconiser de rassembler les catégories III et V en une seule catégorie « atypique », et de demander au clinicien un contrôle pour ces cas (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Proposition d'adaptation à la bile de la nomenclature de la *Papanicolaou Society of Cytopathology* 2014

Catégorie I	**Non diagnostique** Prélèvement ne permettant pas de répondre à la question posée, dans les situations suivantes : - prélèvement acellulaire en cas de masse visible en imagerie - contaminé - présentant des artéfacts (technique, coloration…) gênant son interprétation
Catégorie II	**Négatif (pour la malignité)** Présence de lambeaux d'épithélium normal dépourvu d'atypie. L'épithélium normal se compose de cellules régulièrement disposées, de petite taille, cohésives, centrées par un noyau rond et régulier, au rapport nucléo-cytoplasmique bas. Les noyaux sont équidistants entre eux, à chromatine fine, régulière, sans nucléole individualisable et avec une membrane indiscernable. Ils peuvent avoir une disposition palissadique périphérique et l'épithélium canalaire peut être en métaplasie gastrique.
Catégories III et V	**Atypies** Présence de critères suspects mais en nombre insuffisant pour affirmer formellement la malignité. Il pourra s'agir d'une légère anisonucléose, de noyaux aux contours irréguliers, d'une membrane nucléaire rehaussée, de la présence d'un petit nucléole, de chevauchements nucléaires focaux ou d'une légère augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique. Un continuum est possible entre l'épithélium normal et atypique sans atteindre les caractéristiques de malignité. Cliniquement, ces aspects peuvent correspondre à une lithiase cholédocienne, une pancréatite aigüe ou chronique, une cholangite sclérosante primitive, un prélèvement avec prothèse endo-canalaire ou après ablation de prothèse mais également à un adénocarcinome bien différencié (5 à 12 % des cas), d'où la nécessité de **demander un contrôle** afin de ne pas méconnaître ce diagnostic (25).
Catégorie VI	**Positif (pour la malignité)** Présence de critères suffisants pour affirmer la malignité. Cette catégorie concerne les tumeurs primitives (au premier rang desquelles l'adénocarcinome canalaire de la tête du pancréas et le cholangiocarcinome) et secondaires.

3) Apports de l’immunohistochimie

Depuis 2018, au CHU Grenoble Alpes, une inclusion en paraffine du culot résiduel obtenu après centrifugation des prélèvements d’aspiration biliaire est systématiquement effectuée, afin de réaliser un cytobloc.

Le cytobloc peut s’avérer utile, notamment en cas d’atypies suspectes de malignité ou de prélèvement peu informatif au niveau des étalements cytologiques. Il permet alors de préciser le diagnostic sans avoir à reprélever le patient. Certains marqueurs immunohistochimiques peuvent en effet aider le pathologiste à statuer sur la malignité en cas d’atypies morphologiquement douteuses. Les marqueurs immunohistochimiques utiles dans ce contexte sont principalement (26, 27, 28):

- **S100P** dont l’expression est cytoplasmique et nucléaire dans les lésions pré-néoplasiques et malignes de l’arbre bilio-pancréatique contrairement à l’épithélium normal ;
- **Claudin18** dont l’expression est membranaire et cytoplasmique au niveau des cellules adénocarcinomateuses et non dans l’épithélium canalaire normal ;
- **Maspin** d’expression nucléaire dans l’épithélium canalaire normal et cytoplasmique ajouté dans l’adénocarcinome ;
- **CD10** d’expression apicale continue dans l’épithélium normal ou réactionnel et perdu dans l’adénocarcinome ;
- **MUC1** et **p53**, dont l’expression (cytoplasmique et nucléaire, respectivement) orientera également vers l’adénocarcinome.

De plus, on sait aujourd’hui que les cholangiocarcinomes intra-hépatiques et hépato-cholangiocarcinomes (dérivés de cellules hépatiques progénitrices) ont un profil immunohistochimique différent des cholangiocarcinomes extra-hépatiques (dérivés des cholangiocytes cubiques mucipares) et adénocarcinomes pancréatiques. Le groupe des cholangiocarcinomes extra-hépatiques/hilaires et adénocarcinomes pancréatiques exprime

S100P et MUC5AC mais n'exprime pas CD56, contrairement aux cholangiocarcinomes intra-hépatiques. L'aide de l'immunohistochimie peut donc s'avérer utile pour faire la distinction entre ces entités car cela conduira à une prise en charge différente.

Selon le contexte clinique, des examens immunohistochimiques pourront également être réalisés afin d'éliminer une localisation métastatique (en particulier de carcinome rénal à cellules claires).

Enfin, le cytobloc permet, lorsqu'il est assez cellulaire, de mettre en évidence une instabilité des microsatellites et donc de dépister les formes familiales, par la recherche de la perte d'expression immunohistochimique des protéines PMS2, MLH1, MSH2, MSH6. Cette recherche conditionnera la prise en charge ultérieure du patient et de sa famille, tout en s'affranchissant d'un nouveau prélèvement invasif.

L'utilisation de l'immunohistochimie améliore significativement la sensibilité diagnostique des adénocarcinomes bilio-pancréatiques, cette dernière passant de 63% à 89-97% (26). Cependant, son coût ne doit pas être négligé et elle ne doit pas être utilisée de façon systématique en pratique courante, d'autant plus que le cytobloc de bile n'est pas toujours réalisable en cas de faible cellularité et que l'expression des marqueurs immunohistochimiques peut être focale. Cette aide ne doit pas primer sur la morphologie et ne doit pas faire remettre en cause le diagnostic en cas de discordance avec l'étalement cytologique.

Il est donc important de reconnaître des critères cyto-morphologiques de malignité solides, auxquels se fier pour établir un diagnostic le plus juste possible.

4) Techniques moléculaires

Elles représentent une aide émergente pour améliorer la sensibilité diagnostique, mais restent de seconde intention.

La technique la plus utilisée est la recherche des mutations de *RAS* en complément du brossage. On recherchera en premier lieu les mutations des codons 12 et 13 (exon 2) du gène *KRAS* par PCR. En cas de négativité, d'autres mutations de *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* pourront être recherchées. La mise en évidence d'une mutation, en cas d'absence de diagnostic de malignité sur l'examen cytopathologique, conduira à renouveler les investigations.

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) à la recherche d'une aneusomie est également une technique complémentaire à l'étude. Elle permettrait de doubler la sensibilité de détection des carcinomes pour les prélèvements biliaires (29). Les anomalies les plus fréquemment retrouvées dans les adénocarcinomes des voies biliaires sont : une amplification des chromosomes 3, 7, 17 et une délétion homozygote 9p21 (codant pour la protéine p16).

VI) OBJECTIFS DE L'ETUDE

Nous savons que les sténoses malignes des voies biliaires, tardivement symptomatiques, sont le plus souvent dues à un adénocarcinome de la tête du pancréas localement évolué et plus rarement à un cholangiocarcinome extra-hépatique.

L'examen cytologique des étalements biliaires, quand ils sont assez cellulaires, est très informatif en association avec le brossage pour préciser l'étiologie de la sténose. Ils peuvent permettre de faire le diagnostic d'adénocarcinome, épargnant ainsi au patient un nouveau prélèvement, ce qui apporte un diagnostic rapide chez des patients dont le pronostic est globalement mauvais et qui doivent parfois bénéficier d'une chimiothérapie en semi-urgence. Cela permet également de s'affranchir du risque de complications (notamment l'hémorragie ou l'infection) d'une nouvelle procédure invasive.

Cependant, cela implique pour le pathologiste d'étudier ces prélèvements de façon rigoureuse, en recherchant des critères cyto-morphologiques fiables et reproductibles de malignité, qui seront parfois la seule preuve cytologique pré-thérapeutique. L'une des principales difficultés sur ces prélèvements est la distinction entre un adénocarcinome très bien différencié (catégorie VI) et les atypies (catégories III et V), d'autant plus que ces entités seront prises en charge différemment. De plus, la présence d'une prothèse en place, d'une pathologie inflammatoire de l'arbre biliaire (telle que la cholangite sclérosante primitive, connue pour être un facteur de risque de carcinome des voies biliaires) et l'expérience du pathologiste influent également sur l'interprétation des critères morphologiques observés.

Il est d'autant plus important de reconnaître les critères cytomorphologiques qui permettront d'avancer le diagnostic d'adénocarcinome que l'immunohistochimie et les techniques de biologie moléculaire, bien qu'émergentes, ne sont pas toujours réalisables, notamment en cas de faible cellularité.

La terminologie proposée par la *Papanicolaou Society of Cytopathology* en 2014 (22) a permis d'uniformiser les diagnostics en vue d'une prise en charge plus adaptée des patients. Cependant, toutes ces catégories ne peuvent pas s'appliquer à la cytologie biliaire, comme par exemple la catégorie IV correspondant à des tumeurs pancréatiques bénignes ou n'atteignant pas le duodénum pour lesquelles le diagnostic ne sera pas accessible par la bile.

Il nous a donc paru important de définir des critères cyto-morphologiques sensibles, spécifiques et reproductibles de malignité à reconnaître sur étalements de bile. Nous avons étudié les critères de malignité classiquement connus en cytopathologie et évalué leur reproductibilité inter et intra-observateur par une double lecture effectuée par deux lecteurs (l'un junior et l'autre « expérimenté ») en aveugle du diagnostic final, ainsi que leur association à la malignité.

A notre connaissance, seule une équipe japonaise s'est récemment intéressée à la définition de critères cyto-morphologiques de malignité sur la bile (30). L'originalité de notre travail est l'apport de la reproductibilité des critères testés. Nous espérons ainsi aider les pathologistes à appréhender ces prélèvements au quotidien et à reconnaître les critères importants à ne pas manquer, afin de permettre une prise en charge optimale des patients.

REFERENCES

1. WHO Classification of Digestive System Tumours, 5th Edition (2019).
2. Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather (2015).
3. Cours régionaux plateforme en ligne SIDES Anatomie et Cytologie Pathologiques (2018-2019).
4. Thesaurus national de cancérologie digestive (voies biliaires 2014 et pancréas 2018).
5. Enseignement Post-Universitaire de cytopathologie biliaire au CHU Grenoble Alpes, Dr M.Fior-Gozlan et Dr D.Giovannini.
6. Bismuth H, Corlette MB. Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. Surg Gynecol Obstet 1975;140:170-8.
7. Dixon E, Vollmer CM Jr, Sahajpal A, et al. An aggressive surgical approach leads to improved survival in patients with gallbladder cancer: a 12-year study at a North American Center. Ann Surg 2005;241:385-94.
8. Endo I, Shimada H, Tanabe M, et al. Prognostic significance of the number of positive lymph nodes in gallbladder cancer. J Gastrointest Surg 2006;10:999-1007.
9. Neuhaus P, Jonas S, Bechstein WO, Lohmann R, Radke C, Kling N, et al. Extended resections for hilar cholangiocarcinoma. Ann Surg 1999;230:808-19.
10. Yamaguchi K, Tsuneyoshi M. Subclinical gallbladder carcinoma. Am J Surg 1992;163:382–6.
11. Toyonaga T, Chijiiwa K, Nakano K, et al. Completion radical surgery after cholecystectomy for accidentally undiagnosed gallbladder carcinoma. World J Surg 2003;27:266-71.
12. Suzuki S, Yokoi Y, Kurachi K, et al. Appraisal of surgical treatment for pT2 gallbladder carcinomas. World J Surg 2004;28:160-5.
13. J. Ferlay, C. Partensky & F. Bray More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017, Acta Oncologica 2016, 55:9-10, 1158-1160.

14. L.Rahib et al. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States, Cancer Research June 2014 Volume 74, Issue 11.
15. Palazzo L, Roseau G, Gayet B, Vilgrain V, Belghiti J, Fékéte F, et al. Endoscopic ultrasonography in the diagnosis and staging of pancreatic adenocarcinoma. Results of a prospective study with comparison to ultrasonography and CT scan. Endoscopy 1993;25:143–50.
16. Rösch T, Lorenz R, Braig C, Feuerbach S, Siewert JR, Schusdziarra V, et al. Endoscopic ultrasound in pancreatic tumor diagnosis. Gastrointest Endosc 1991;37:347–52.
17. Tio TL, Tytgat GN, Cikot RJ, Houthoff HJ, Sars PR. Ampullopancreatic carcinoma: preoperative TNM classification with endosonography. Radiology 1990;175:455–61. doi:10.1148/radiology.175.2.2183284.
18. Brugge WR, DeWitt J, Klapman JB, Ashfaq R, Shidham V, Chhieng D, et al. Techniques for cytologic sampling of pancreatic and bile duct lesions: The Papanicolaou Society of Cytopathology Guidelines. CytoJournal 2014;11:9-14.
19. Okasha, H. H. et al. Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration versus Percutaneous Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration in Diagnosis of Focal Pancreatic Masses. Endosc Ultrasound, 2(4), 190-193 (2013).
20. Huguier M, Mason NP. Treatment of cancer of the exocrine pancreas. Am J Surg 1999;177:257–65.
21. Wakasa T et al. Brushing Cytology of the Biliary Tract: Bile Juice from the ERCP Sheath Tube Provides Cell-Rich Smear Samples. Acta Cytol 2014 ; 58(4) :398-405.
22. Pitman MB et al. Standardized Terminology and Nomenclature for Pancreatobiliary Cytology : The Papanicolaou Society of Cytopathology Guidelines. Diagnostic Cytopathology, 2014 ; Vol 42. N°4.
23. Hervieu V. Intégration des aspects du brossage biliaire à la nouvelle nomenclature ; bulletin de la Division Française de l'AIP n° 62- Décembre 2015.

24. Fior-Gozlan M ,Giovanni D, Monocentric study of bile aspiration associated with biliary brushing performed during Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography in 239 patients with symptomatic biliary stricture Cancer Cytopathol, 2016.
25. Roth GS al Performance of bile aspiration plus brushing to diagnose malignant biliary strictures during endoscopic retrograde cholangiopancreatography Endosc Int Open 2016;4, E997-1003.
26. Tokumitsu T. et al.Immunocytochemistry for Claudin-18 and Maspin in biliary brushing cytology increases the accuracy of diagnosing pancreatobiliary malignancies. Cytopathology. 2017 Apr;28(2):116-121.
27. Chen Lihong, Huang Kevin, Himmelfarb Eric A., Zhai Jing, Lai Jin-Ping, Lin Fan, Wang Hanlin L., Diagnostic Value of Maspin in Distinguishing Adenocarcinoma from Benign Biliary Epithelium on Endoscopic Bile Duct Biopsy, Human Pathology (2015), doi: 10.1016/j.humpath.2015.07.005.
28. Yoshiko Keira, Akira Takasawa, Masaki Murata et al. An immunohistochemical marker panel including claudin-18, maspin, and p53 improves diagnostic accuracy of bile duct neoplasms in surgical and presurgical biopsy specimens. Virchows Arch. DOI 10.1007/s00428-014-1705-4.
29. Fritcher EG, Kipp BR, Halling KC, et al. A multivariable model using advanced cytologic methods for the evaluation of indeterminate pancreatobiliary strictures. Gastroenterology. 2009;136:2180-2186.
30. Hayakawa C, Hoshikawa M, Imura J et al. Bile cytology: A new scoring system for improving diagnostic accuracy. Diagn Cytopathol. 2019 Jul;47(7):641-647. doi: 10.1002/dc.24076. Epub 2019 Feb 7.

ORIGINAL ARTICLE

BILE CYTOLOGY: IN SEARCH OF REPRODUCIBLE CYTOMORPHOLOGICAL CRITERIA FOR MALIGNANCY

Adeline Bailly[1,2], Anne McLeer[1,3], Arnaud Seigneurin[1,4], Pierre-Yves Eyraud[5], Michèle Fior-Gozlan[2], Nathalie Sturm[1,2], Diane Giovannini[1,2]

[1]Université Joseph Fourier, UFR Médecine et Pharmacie, F-38706 La Tronche, France

[2] Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Service d'Anatomie et Cytologie pathologiques, 38043 Grenoble, France

[3]Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Service d'Anatomie et de Cytologie pathologiques, Unité fonctionnelle de pathologie moléculaire, Pôle biologie, 38043 Grenoble cedex 9, France

[4] Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Unité de Qualitique et d'Evaluation Médicale, Pavillon Taillefer, 38043 Grenoble, France

[5]Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Service d'Hépato Gastroentérologie 38043 Grenoble, France

Correspondence to: dgiovannini@chu-grenoble.fr ; abailly2@chu-grenoble.fr

Word count: Abstract 280 words, text 4145 words

Number of references: 25

Number of tables and figures: 6 Tables, 2 Figures

List of abbreviations:

ERCP: Endoscopic Retrograde Cholangio-Pancreatography

MGG: May-Grünewald-Giemsa

N/C ratio: Nuclear to cytoplasmic ratio

CIs: Confidence intervals

ABSTRACT

Ductal adenocarcinoma of the pancreatic head and extrahepatic cholangiocarcinoma are the two most common causes of malignant stenosis of the bile ducts explored during Endoscopic Retrograde Cholangio-Pancreatography (ERCP). Several studies have focused on biliary brushing, but very few have studied the cytomorphological criteria of the bile fluid collected during the same endoscopic procedure. In addition, the latter were for smaller cohorts. This is why we carried out a monocentric retrospective study at the Grenoble Alpes University Hospital on 135 cases of informative biliary samples between 2009 and 2018, classified as benign (55 cases), atypical (11 cases) or malignant (69 cases). For benign and atypical cases, a follow-up of at least 5 years was required to ensure that there were no malignant events. For all malignant cases, histological evidence of diagnosis was obtained. A double reading was carried out by a pathologist resident and a more "experienced" pathologist in biliary cytology in order to determine intra- and inter-observer reproducibility among 15 general cyto-morphological criteria in cytology. Among these criteria, we found that the presence of a double cell population and/or isolated malignant cells were 100% specific for malignancy and highly reproducible (kappa >0.9). In addition, four other criteria, namely the presence of three-dimensional clusters, increased nucleo-cytoplasmic ratio (>0.5), anisocaryosis and nuclear membrane enhancement, were also found to be highly predictive of malignancy. The combination of 3 of these 4 criteria makes it possible to affirm malignancy with a 100% specificity and a 72%sensitivity. Our data are for the most part consistent with those observed on brushing. These criteria that we have highlighted will be tested on a validation series, by forming a prospective cohort, in order to validate their predictive value.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma of the biliary tract are the two most common causes of malignant bile duct strictures, whose incidence has increased in the last 30 years (1), with a global incidence rate of 7.7 to 11 and 1.4 to 2.1 per 100,000 person-years respectively (2). The clinical manifestation of these pathologies includes biliary stenosis, obstructive jaundice, abdominal pain, weight loss and general condition alteration.

Due to the lack of early symptoms, the diagnosis and management of these pathologies is often made at an advanced stage, leading to a poor prognosis with a 5-years overall survival of approximately 10%, despite recent progress in the treatment of advanced pancreatic cancer. Only 15 to 20% of patients are candidates for curative resection and even then, the 5-year survival rates range from 10–25% (3). Contributing to the difficulty in the diagnosis and management is the anatomic location of the pancreas (retroperitoneal location and being adjacent to hollow viscus, solid organs and major vessels). However, it is when the tumor is sufficiently evolved and has a favorable topography (head of the pancreas or distal stenosis of the extrahepatic bile ducts) that the tumor cells are able to desquamate in the bile, enabling a cytopathological diagnosis. If there is a suspicion of a malignant stenosis of the bile ducts, patients are likely to undergo ERCP (Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography) for diagnostic purposes and, if possible, therapy by the placement of a biliary prosthesis. It is the combination of the three sample collections (bile fluid before brushing, bile fluid after brushing and cells recovered from the brush) that best allows to assess the nature of the biliary stricture. The specificity of the cytological examination of these bile samples is remarkably high but reported sensitivities for the diagnosis of malignancy are low (4,5). As a result, cytological analysis of bile is a good way to specify the diagnosis of pancreatobiliary carcinoma, thus enabling early and appropriate management, without performing a new invasive procedure. However, the cytological examination of the bile is a challenge for the pathologist, who has to face difficulties such as poor cellularity, inflammation, stent-related atypia…

Numerous cytological criteria have been studied on biliary brush samples (6) but, to our knowledge, few studies have addressed the criteria for malignancy on bile aspiration samples, which are often less crushed and just as cellular as brush specimens. Our study aims to define the most sensitive, specific and reproducible cytomorphological criteria for malignancy in 135 cytological sampling of bile fluid in order to help pathologists to face this diagnostic challenge.

MATERIALS AND METHODS

Cases selection

Between January 1st, 2012 and December 31st, 2018, we selected 72 bile aspiration specimens obtained under ERCP at the Grenoble Alpes University Hospital, for which the diagnosis of adenocarcinoma was made on bile aspiration. Gold standard for inclusion was definitive surgical histology made on pancreatoduodenectomy specimens, pancreatic or biliary tract puncture or metastasis with a morphology consistent with a pancreatobiliary origin. These malignant cases corresponded to 36 men and 33 women, ranging from 28 to 90 years old, with pancreatic ductal adenocarcinoma (n=59), extrahepatic cholangiocarcinoma (n=10), adenosquamous carcinoma (n=1) or ampullary adenocarcinoma (n=2). We excluded 3 samples because of insufficient material for 2 patients and poor cellularity with bad preservation for the third.

In a second step, we draw a randomn sample of 69 supplementary cases classified as benign (58 samples) or atypical (11 samples), with (n=49) or without (n=20) a stent in place, between January 1st, 2009 and December 31st, 2013. All these cases showed no evidence of malignancy during a follow-up of at least 5 years, because they corresponded to secondary stenoses after surgery or lithiasic disease or in a context of primary sclerosing cholangitis (n=8). We had to exclude 3 cases because of bad preservation or acellular slides. Indeed, even if acellular cases can be regarded as benign, they did not allow us to evaluate our cytomorphological criteria, studied on epithelial clusters.

Collection of bile: intervention and technique

Patients underwent ERCP under general anesthesia on an X-ray table using a video side-viewing duodenoscope positioned in the second duodenum facing the papilla. A 0.035-inch-diameter guide-wire was introduced into the biliary tract and an injection of contrast medium (Telebrix; Guebert; France) was performed. The opacification objectified the presence of a

biliary stenosis and hinted towards the etiology of this stenosis. After biliary sphincterotomy, a disposable cytology brush protected by an 8-French size catheter was slipped over the guide-wire through the stenosis. Two brush devices were used: before 2017-2018, Rx Combocath (Boston Scientific, Marlborough, Mass) was used while since then the Fusion Cytology Brush (Cook Fusion, FS-CB-1.5-5) has been used. Cytology samples were collected before stenosis dilatation. Ten movements back and forth in the stricture were performed, and the brush was immediately smeared on 1 or 2 slides by a nurse and then fixed in a 50% ethanol-50% acetone solution. The brush was then shaken and immersed in PreservCyt® solution (Hologic France, Villepinte, France). Three to 10 mL of bile were collected before and after brushing in a sterile dry tube by aspiration, using one of the channels of the sphincterotome or the catheter of the cytology brush. The bile was specifically collected upstream of the stenosis, whereas the bile below was eliminated in the duodenum after sphincterotomy. Because the length of the guide-wire tract at the distal end of the device was 6 cm, the entrance hole of the guide wire had to be above the stenosis to optimize bile aspiration. If required, the procedure was completed by the installation of a temporary prosthesis pending the etiological diagnosis of stenosis.

Cytopathological technique

Bile aspiration specimens were cooled on ice and sent to the pathology laboratory as soon as possible to avoid degenerative changes. Bile was centrifuged (2,000 revolutions per minute for 10 minutes), and the deposit was smeared into slides. Because Papanicolaou and May-Grünewald-Giemsa (MGG) stains are complementary for diagnosis, among 4 bile spreading slides before brushing, 2 slides were stained with Papanicolaou after using a Merckofix fixing spray (Merck France, Calais, France) and 2 slides were air-dried and stained with MGG. The same procedure was performed for 4 bile slides after brushing. The slides containing the fixed brush-smearings were stained with Papanicolaou. The remaining cells affixed to the brush were collected in Preservcyt® by agitation of the brush and a slide was made with these cells using the monolayer technique and stained with Papanicolaou.

Cytologic examination

For the first assessment, each malignant case was first examined by a young pathologist, novice in biliary cytology then by a cytopathologist experienced in biliary cytology, both not blinded to the final diagnosis. The presence or absence of the 15 criteria figuring in Table 1 were studied, based on the *Papanicolaou Society of Cytopathology* fascicule (7) and prior studies (6,8). Between the two assessments, the pathologists involved in the study did a short training on images to agree on the definition of each criterion and produced reference charts from the cases examined. Then, the 66 benign or atypical samples were added to the series, all cases were randomized and examined, blinded to the final diagnosis, for the presence or absence of all the cytomorphological criteria figuring in Table 1.

Statistical analysis

Analyses were performed using version 3.6.0 of the R software. Once the first and second assessments were completed, interobserver and intraobserver reproducibilities were assessed with correction for chance agreement using the kappa of Cohen test (9) with 95% confidence intervals (CIs) for the k values. Generally, a k value of less than 0.4 implies poor agreement, 0.4-0.75 moderate agreement, and a value higher than 0.75 indicates good agreement. The addition of benign and atypical cases from the second assessment also allowed us to calculate the sensitivity, specificity of the criteria and their frequency in the malignant cases. The 95% CIs were calculated using the Wilson method, with a significance of the obtained results judged at the 5% level. Among the 8 criteria that we found the most sensitive, specific and reproducible, 4 criteria perfectly predicted malignancy with a 100% sensitivity or specificity. For the other 4 criteria, we performed a logistic regression to estimate Odds Ratio that quantified the strength of association of these criteria with malignancy. We defined points on each criterion according to the values of each Odd Ratio and a final score was computing by adding the points corresponding to each criteria. We thus

aimed to define a required cutoff score in order to be able to confirm the diagnosis of malignancy by computing sensitivity and specificity for each different cutoff considered.

RESULTS

In total, double assessment on malignant cases and a blinded assessment on randomized benign, atypical and malignant cases were performed. The kappa values for the interobserver and intraobserver reproducibilities of each criterion are reported in Tables 2 and 3. After the first assessment, we found a high interobserver agreement for bloody background, pigment-rich background, double-cell populations and anisonucleosis. All other criteria had moderate to low reproducibility. On the contrary, after the second assessment, a good agreement between the two observers was found for many additional criteria, such as nuclear overlapping, enhanced nuclear membrane, irregular nuclear shapped, 3-dimensional clusters, isolated malignant cells and increased N/C ratio and chromatin changes (including clarification, a coarse aspect and hyperchromasia). Intraobserver reproducibility between the two assessments for the novice observer was quite low for most criteria, except for bloody or pigment-rich background, double-cell populations, nuclear overlapping and irregular nuclear shapped, while the reproducibility values of the experienced observer have proved to be higher (Table 3). As shown in Tables 4 and 5, some malignancy criteria (including double-cell population and isolated malignant cells) were found only in malignant cases, with 100% specificity, while others were found in malignant cases but also in benign or atypical cases. Among the 4 most reproducible criteria not being 100% specific when assessed individually, the obtaining of a score higher than 16 allowed to affirm the diagnosis of malignancy with a 100% specificity and a 72% sensitivity (Table 6).

DISCUSSION

Pancreatic ductal adenocarcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma are the two most frequent causes of malignant biliary stenosis, which must be diagnosed as soon as possible because of a prognosis that remains pejorative, despite therapeutic advances. Initially, the aim of this study was to detach reproducible, sensitive and specific cytomorphological criteria of malignancy from a list of morphological criteria generally used in cytopathology. We found a good inter- and intra-observer reproducibility for some sensitive and specific malignancy criteria, such as double-cell populations, isolated malignant cells, 3-dimensionnal clusters, anisocaryosis, increased N/C ratio and enhanced nuclear membrane. The lower values of inter-observer reproducibility following the first assessment observed can be related to the large number of criteria studied, requiring a learning and familiarization time. With the results of the intra-observer reproducibility of the novice reader, they also testify to the place of the observer's experience in the interpretation of cases. Indeed, as other previous studies have shown, it is now accepted that many factors influence the interpretation of cytomorphological criteria, including the reader's experience and the quality of clinical information provided (8).The presence or absence of a stent in place or a chronic inflammatory disease of the biliary tree (such as primary sclerosing cholangitis) should also be known because they can lead to false positives. The quality of the available material, tumour differentiation and the techniques used (sampling, fixing, staining), varying from one centre to another, also influence the samples interpretation.

We then focused on the association of criteria, found to be the most reproducible, with malignancy. We have identified two 100% specific criteria for malignancy, illustrated in Figure 1: double-cell populations and isolated malignant cells. The visualization of isolated malignant cells is often mentioned by previous studies, especially in brushing (6,8,10), to be highly predictive of malignancy because it combines both the criterion of cellular discohesion and other nuclear criteria of malignancy. In accordance with our observations, this criterion is frequently found in malignant stenoses but Goyal et al. (10) found it in 17% of benign stented

cases, all in a clinical context of primary sclerosing cholangitis, supporting the fact that it is necessary to have a set of several architectural and nuclear criteria to affirm malignancy in these particular cases. The second criterion exclusive to malignancy is the presence of two contrasting cell populations: malignant clusters and benign flaps. It must be distinguished from a spectrum of cells with varying morphology within the same cluster that has been reported in cases with stent (6,11). Moreover, 4 other criteria (shown in Figure 2) seemed interesting because they were quite reproducible and specific for malignancy. The analysis showed that a score > 16 points allowed the diagnosis of malignancy to be reliably advanced with 100% specificity and 72% sensitivity. Among these criteria was a particular cell arrangement as 3-dimensional clusters, which we found in 80% of the malignant cases and one atypical stented case, but no benign case. Goyal et al. (10) found 3-dimensional clusters in all malignant cases including stents and in 8% of benign cases with stents. However, there are variations between studies (6,8,12,13) that could be explained by the well or poorly differentiated nature of the included adenocarcinomas, as well as the presence or absence of a stent. Not surprisingly, anisocaryosis is another good criterion for malignancy. However, it is necessary to agree on its definition: previous studies (8,14), just like us, proposed nuclear size variations of at least 4 times within a cell cluster, while others (10,11) have found these variations in some benign stented cases, and therefore recommended requiring a size variation of at least 6 times in the case of stents. In our case, a variation of 1 to 4 has never been found in benign cases and only in 2 atypical stented cases. As many authors have reported (6,8,14–16), increased nuclear to cytoplasmic ratio (> 0.5) is another essential criterion in favor of malignancy, even in cases of primary sclerosing cholangitis (17). In accordance with previous studies, this criterion was very sensitive, specific and reproducible. On the other hand, it is important to note that in our experience, some malignant cells do not show an elevation of the nuclear to cytoplasmic ratio in the strict sense, but an overall cytomegaly with other nuclear features of malignancy. The fourth, less frequently cited criterion is the enhancement of the nuclear membrane, which was quite specific and reproducible for malignancy. This criterion was found in only 2 nonmalignant cases (3%),

which turned out to be atypical classified cases with a stent in place. It is also interesting to note that visualization of cell within-cell arrangement, as called cytophagy, is a criterion that can only be visualized in malignant cases, what was found in this series, in accordance with Barr Fritcher EG et al. (8). However, we did not highlight this criterion, because it was too rarely observed in malignant cases and difficult to recognize for a novice observer, which explains low sensitivity and inter-observer reproducibility.

Among the other general criteria evaluated, some, well known to cytopathologists, were also very frequently associated with malignancy. This is the case of nuclear criteria such as chromatin changes (clarifications, a coarse aspect or hyperchromasia), frequently found in adenocarcinomas as well, with a very high sensitivity. The lowest specificity recovered in this study can be explained by the fact that chromatin changes are also found in the benign cases with stent in place: indeed, Goyal et al. (10) found a coarse aspect of the chromatin in 8% of their benign stented cases and we found chromatin abnormalities (including clarifications, a coarse or hyperchromatic appearance) in 24% of benign cases (10 benign and 6 atypical cases), 15 of which having a stent in place. Another characteristic of malignant cells is the loss of polarity, which has been described many times before as “loss of honeycombing” (16,18,19) and can result in nuclear overlapping. As previous studies have found (6,18,20) this criterion is highly reproducible and sensitive in our experience. However, he is not always specific to malignancy (we found it in 10% of benign cases) and pathologists should not misunderstand with some nuclear disorientations that can be observed classically in benign cases. Irregular nuclear shapped is one of the most sensitive and reproducible feature. However, in accordance with what found Barr Fritcher EG et al. (8), some nuclear irregularities less pronounced could be observed in benign clusters in accordance with the present study in which they were found in 38% of benign or atypical cases explaining the weaker specificity. As this study concerned only adenocarcinomas, tumor cells with vacuolized cytoplasm pushing the nucleus to the periphery were frequently found in

malignant cases. This criterion was very sensitive but less specific because a nucleus discharge can be seen in other cells, such as macrophages.

Among the least informative criteria studied, acini-forming lights had low reproducibility: indeed, this criterion must be clearly specified because the benign flaps can sketch out lights that will not be considered as acini at the risk of having false positives. Acini were found quite often in malignant cases of this study, perhaps due to the good differentiation of the selected adenocarcinomas. If there is a history of stenting or inflammatory disease of the biliary tree, it has been reported that the presence of prominent nucleoli may also be found and is not specific to malignancy (10,11), in accordance with our results, with nucleoli visible at 20 x objective lens in 29% of benign and atypical cases including 4 cases of primary sclerosing cholangitis and only 2 benign non-stented cases. Cell density has been studied here but is not necessarily correlated with malignancy unlike what Avadhani et al. (6) reported in the brushes. In reality, it is more the informative nature of the material examined than the amount of material that is important. High cellularity can even hinder diagnosis, as it has been shown that agreement between pathologists on diagnosis decreases when the cellularity of the sample increases (21).The main difficulty remains the low cell density for pancreatic adenocarcinomas, which can be explained by the desmoplastic stroma often accompanying this tumour or by an unfavourable topography (tumour embedded in the pancreas remotely from the channels or sitting in the body or tail of the pancreas) that could generates false negatives. The presence of inflammatory cells within epithelial clusters is a criterion found in both benign and malignant cases in this study. Avadhani et al. (6) found inflammation more frequently in micropapillary and undifferentiated adenocarcinomas, but also in benign cases with stents. In a recent study (22), some authors showed that the presence of systemic inflammation (increased white blood cell count) was correlated with an increased sensitivity of biliary brushing samples. To explain this, they proposed that systemic inflammation induces tissue fragility that promotes desquamation of cells in the bile or that tumor progression obstructing the bile ducts induces inflammation that signs a locally more

advanced tumor, more easily diagnosed. More generally, the appearance of the background is rarely discriminating, as is the detection of degenerative cells. In our experience, even necrosis is found in both benign and malignant cases, in accordance with previous studies (23). One of the reported works, carried out on 35 bile fluid samples, revealed an association between the bloody background and malignancy (16), what we have not highlighted here with a larger series. We have chosen not to study the presence of mitoses and giant osteoclastic-like cells, but these two features are also very specific for malignancy in the rare cases where they are found. Another criterion recently described by a Japanese team that seems interesting is irregular cluster margins, defined as presence of nuclei protruding from the cluster margins (20). This criterion can be integrated into our cell arrangement criteria (three-dimensional clusters and isolated cells), but it may be interesting to evaluate it in its own right.

In short, we have demonstrated that some criteria are very reproducible, sensitive and specific for malignancy on bile aspiration samples. These criteria sometimes overlap with those found in previous studies (6,8,10,15,16,18), but many of these studies were performed on brushing samples and few (16,19,20) on bile fluid samples. The originality of this work is to have demonstrated that these criteria were quite reproducible, even for a reader unfamiliar with biliary cytology samples.

One of the limitations of our study could be its monocentric nature. However, if the techniques of sampling, fixing and staining were indeed the same, the two observers involved in this work had not received the same initial training. It will also be interesting in the future to put into practice the use of these criteria on a prospective series of cases all coming from everyday life, with particular attention to cases classified as atypical (categories III and V of the *Papanicolaou Society of Cytopathology* (7)) which turned to be malignant, in order to clarify their predictive value of malignancy.

The advantage of examining bile fluid in these clinical contexts is that bile is easily accessible during ERCP, without having to perform a more invasive procedure such as a pancreatic puncture with the risk of morbidity it causes. The bile fluid is often quite cellular (especially after brushing, which allows the cells in the bile to flake off) and does not have crushing artifacts unlike brushing and it is interesting to recognize the important morphological criteria because contribution of complementary techniques such as immunohistochemistry and molecular biology are still second-line and do not solve all problems, especially in the case of low cellularity. However, the risk of pancreatitis caused by ERCP (about 4%) should not be overlooked, as well as the increasing importance of ultrasound endoscopy (particularly in cases of pancreatic tumours) during which time an increasingly efficient fine needle pancreatic biopsy is performed. It is so important to collect as much material as possible and to combine the tests in order to have the best chance of correctly sampling the lesion. Therefore, as our local studies have shown (24,25), the analysis of bile fluid should be combined with brushing cytology to increase diagnostic sensitivity by catching up on some malignancy criteria that would be seen on brushing and not on bile.

REFERENCES

1. Bouvier A-M, Remontet L, Jougla E, Launoy G, Grosclaude P, Buémi A, et al. Incidence of gastrointestinal cancers in France. Gastroenterol Clin Biol. oct 2004;28(10 Pt 1):877‑81.

2. Cowppli-Bony A, Colonna M, Ligier K, Jooste V, Defossez G, Monnereau A, et al. Épidémiologie descriptive des cancers en France métropolitaine : incidence, survie et prévalence. Bull Cancer (Paris). juill 2019;106(7‑8):617‑34.

3. Khokhar AS, Sher AF, Schattner M. Interventional endoscopy in the diagnosis and management of pancreatic adenocarcinoma. Chin Clin Oncol. déc 2017;6(6):63‑63.

4. Kurzawinski TR, Deery A, Dooley JS, Dick R, Hobbs KE, Davidson BR. A prospective study of biliary cytology in 100 patients with bile duct strictures. Hepatol Baltim Md. déc 1993;18(6):1399‑403.

5. Fogel EL, Sherman S. How to Improve the Accuracy of Diagnosis of Malignant Biliary Strictures. Endoscopy. nov 1999;31(9):758‑60.

6. Avadhani V, Hacihasanoglu E, Memis B, Pehlivanoglu B, Hanley KZ, Krishnamurti U, et al. Cytologic predictors of malignancy in bile duct brushings: a multi-reviewer analysis of 60 cases. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. 2017;30(9):1273‑86.

7. Pitman MB, Centeno BA, Ali SZ, Genevay M, Stelow E, Mino-Kenudson M, et al. Standardized terminology and nomenclature for pancreatobiliary cytology: the Papanicolaou Society of Cytopathology guidelines. Diagn Cytopathol. avr 2014;42(4):338‑50.

8. Barr Fritcher EG, Caudill JL, Blue JE, Djuric K, Feipel L, Maritim BK, et al. Identification of malignant cytologic criteria in pancreatobiliary brushings with corresponding positive fluorescence in situ hybridization results. Am J Clin Pathol. sept 2011;136(3):442‑9.

9. Cohen J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. Psychol Bull. oct 1968;70(4):213‑20.

10. Goyal A, Sharaiha RZ, Alperstein SA, Siddiqui MT. Cytologic diagnosis of adenocarcinoma on bile duct brushings in the presence of stent associated changes: A retrospective analysis. Diagn Cytopathol. oct 2018;46(10):826‑32.

11. Heath JE, Goicochea LB, Staats PN. Biliary stent-related alterations can be distinguished from adenocarcinoma on bile duct brushings using a limited number of cytologic features. J Am Soc Cytopathol. oct 2015;4(5):282‑9.

12. Kocjan G, Smith AN. Bile duct brushings cytology: potential pitfalls in diagnosis. Diagn Cytopathol. avr 1997;16(4):358‑63.

13. Siddiqui MT, Gokaslan ST, Saboorian MH, Carrick K, Ashfaq R. Comparison of ThinPrep and conventional smears in detecting carcinoma in bile duct brushings. Cancer. 25 août 2003;99(4):205‑10.

14. Cohen MB, Wittchow RJ, Johlin FC, Bottles K, Raab SS. Brush cytology of the extrahepatic biliary tract: comparison of cytologic features of adenocarcinoma and benign biliary strictures. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. juin 1995;8(5):498‑502.

15. Geramizadeh B, Moughali M, Shahim-Aein A, Memari S, Ghetmiri Z, Taghavi A, et al. False negative and false positive rates in common bile duct brushing cytology, a single center experience. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2018;11(4):296‑300.

16. Nakajima T, Tajima Y, Sugano I, Nagao K, Sakuma A, Koyama Y, et al. Multivariate statistical analysis of bile cytology. Acta Cytol. févr 1994;38(1):51‑5.

17. Furmanczyk PS, Grieco VS, Agoff SN. Biliary brush cytology and the detection of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: evaluation of specific cytomorphologic features and CA19-9 levels. Am J Clin Pathol. sept 2005;124(3):355‑60.

18. Renshaw AA, Madge R, Jiroutek M, Granter SR. Bile duct brushing cytology: statistical analysis of proposed diagnostic criteria. Am J Clin Pathol. nov 1998;110(5):635‑40.

19. Jin YH, Kim SH, Park CK. Diagnostic criteria for malignancy in bile cytology and its usefulness. J Korean Med Sci. déc 1999;14(6):643‑7.

20. Hayakawa C, Hoshikawa M, Imura J, Ueno T, Koike J. Bile cytology: A new scoring system for improving diagnostic accuracy. Diagn Cytopathol. juill 2019;47(7):641‑7.

21. Harewood GC, Baron TH, Stadheim LM, Kipp BR, Sebo TJ, Salomao DR. Prospective, blinded assessment of factors influencing the accuracy of biliary cytology interpretation. Am J Gastroenterol. août 2004;99(8):1464‑9.

22. Kobayashi M, Ryozawa S, Araki R, Nagata K, Tanisaka Y, Fujita A, et al. Investigation of Factors Affecting the Sensitivity of Bile Duct Brush Cytology. Intern Med Tokyo Jpn. 1 févr 2019;58(3):329‑35.

23. Govil H, Reddy V, Kluskens L, Treaba D, Massarani-Wafai R, Selvaggi S, et al. Brush cytology of the biliary tract: retrospective study of 278 cases with histopathologic correlation. Diagn Cytopathol. mai 2002;26(5):273‑7.

24. Roth GS, Bichard P, Fior-Gozlan M, Roth H, Auroux J, Risse O, et al. Performance of bile aspiration plus brushing to diagnose malignant biliary strictures during endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Endosc Int Open. sept 2016;4(9):E997‑1003.

25. Fior-Gozlan M, Giovannini D, Rabeyrin M, Mc Leer-Florin A, Laverrière M-H, Bichard P. Monocentric study of bile aspiration associated with biliary brushing performed during endoscopic retrograde cholangiopancreatography in 239 patients with symptomatic biliary stricture. Cancer Cytopathol. mai 2016;124(5):330‑9.

TABLES AND FIGURES

Categories	Criteria
Background	Pigment-rich Clean Bloody Necrotic Inflammatory Containing mucus
Presentation	Cell density (low, moderate to high) Double cell populations Nuclear overlapping 3-dimensional clusters Acinar arrangements Isolated malignant cells Cell-in-cell arrangement (cytophagy)
Nuclei	Anisonucleosis [1] Irregular shapped Enhanced nuclear membrane Increased nuclear to cytoplasmic ratio (> 0.5) Chromatin changes (clarification, a coarse aspect, hyperchromasia) Nucleoli [2]
Cytoplasm	Containing mucin vacuole Enhanced cytoplasmic membrane
Accompanying criteria	Inflammation within malignant clusters Degenerative cells

Table 1: Cytologic features studied. [1] Anisonucleosis defined by a size variation of at least 4 times within a cell cluster ; [2] Nucleoli : absence, visible at 20x and/or 63x objective lens. A nucleolus was considered prominent if it was visible at 20x objective lens.

Categories	Criteria	First reading	Second reading
Background	Pigment-rich	0.97 (0.91-1)	1 (1-1)
	Clean	0.54 (0.34 - 0.73)	0.88 (0.8-0.97)
	Bloody	0.84 (0.7-0.99)	0.95 (0.89-1)
	Necrotic	0.58 (0.24-0.91)	0.64 (0.4-0.88)
	Inflammatory	0.66 (0.45-0.86)	0.92 (0.84-1)
	Containing mucus	0.33 (0.15-0.5)	0.64 (0.49-0.79)
Presentation	Cell density	0.35 (0.19 - 0.52).	0.86 (0.79-0.94)
	Double cell populations	1 (1-1)	1 (1-1)
	Nuclear overlapping	0.39 (0.15-0.92)	1 (1-1)
	3-dimensional clusters	0.43 (0.26-0.61)	0.88 (0.79-0.96)
	Acinar arrangements	0.64 (0.46-0.82)	0.69 (0.57-0.81)
	Isolated malignant cells	0.68 (0.49-0.86)	0.95 (0.9-1)
	Cytophagy	0.12 (0.095-0.33)	0.3 (0.094- 0.51)
Nuclei	Anisonucleosis	0.90 (0,71-1)	1 (1-1)
	Irregular shapped	0.99 (0.93-1)	1 (1-1)
	Enhanced nuclear membrane	0.31 (0.12-0.5)	0.89 (0.81-0.98)
	Increased nuclear to cytoplasmic ratio (> 0.5)	0.67 (0.51 – 0.83)	0.99 (0.97-1)
	Clearing chromatin	0.74 (0.51-0.98)	0.96 (0.91-1)
	A coarse aspect of the chromatin	0.18 (0.007-0.35)	0.84 (0.75-0.94)
	Hyperchromasia	0.54 (0.36-0.72)	0.92 (0.82- 1)
	Nucleoli	0.18 (0.007-0.35)	0.84 (0.75-0.94)
Cytoplasm	Containing mucin vacuole	0.54 (0.36-0.72)	0.92 (0.82- 1)
	Enhanced cytoplasmic membrane	0.63 (0.48 - 0.79)	0.73 (0.64-0.83)
Accompanying criteria	Inflammation within malignant clusters	0.31 (0.19-0.8)	0.97 (0.92-1)
	Degenerative cells	0.25 (0.05-0.44)	0,94 (0.88- 1)

Table 2: kappa values (CIs95%) for interobserver reproducibility.

Categories	Criteria	Reader 1	Reader 2
Background	Pigment-rich	0,97 (0.90-0.99)	1 (0.95-1)
	Clean	0,60 (0.48-0.71)	0,88 (0.78-0.94)
	Bloody	0,84 (0.74-0.91)	1 (0.95-1)
	Necrotic	0,45 (0.34-0.57)	0,91 (0.82-0.96)
	Inflammatory	0,76 (0.65-0.85)	0,92 (0.83-0.96)
	Containing mucus	0,23 (0.15-0.34)	0,53 (0.41-0.64)
Presentation	Cell density	0,34 (0.24-0.46)	0,73 (0.62-0.82)
	Double cell populations	1 (0.95-1)	0,99 (0.93-1)
	Nuclear overlapping	0,97 (0.90-0.99)	0,65 (0.53-0.75)
	3-dimensional clusters	0,20 (0.12-0.31)	0,21 (0.13-0.32)
	Acinar arrangements	0,44 (0.33-0.56)	0,24 (0.15-0.35)
	Isolated malignant cells	0,47 (0.36-0.59)	0,38 (0.27-0.50)
	Cytophagy	0,32 (0.22-0.44)	0,46 (0.35-0.58)
Nuclei	Anisonucleosis	0,51 (0.40-0.62)	0,58 (0.46-0.69)
	Irregular shapped	1 (0.95-1)	0,99 (0.93-1)
	Enhanced nuclear membrane	0,23 (0.15-0.34)	0,60 (0.48-0.71)
	Increased nuclear to cytoplasmic ratio (> 0.5)	0,52 (0.40-0.63)	0,76 (0.65-0.86)
	Clearing chromatin	0,49 (0.38-0.61)	0,77 (0.66-0.85)
	A coarse aspect of the chromatin	0,15 (0.08-0.25)	0,57 (0.45-0.68)
	Hyperchromasia	0,49 (0.38-0.61)	0,74 (0.63-0.83)
	Nucleoli	0,62 (0.50-0.73)	0,58 (0.46-0.69)
Cytoplasm	Containing mucin vacuole	0,02 (0,004-0,08)	0,94 (0.86-0.98)
	Enhanced cytoplasmic membrane	0,22 (0.14-0.33)	0,68 (0.56-0.78)
Accompanying criteria	Inflammation within malignant clusters	0,55 (0.43-0.66)	0,64 (0.52-0.74)
	Degenerative cells	0,25 (0.16-0.36)	0,39 (0.28-0.51)

Table 3: kappa values (CIs95%) for intraobserver reproducibility (novice: reader 1, referent: reader 2).

Criteria	Malignant (n=69)	Atypical (n=11)	Benign (n=55)
High cell density	n=34 (5%)	n=4 (36%)	n=18 (33%)
Double-cell populations	n=69 (100%)	n=0	n=0
Nuclear overlapping	n=67 (97%)	n=5 (45%)	n=5 (9%)
3-dimensional clusters	n=55 (80%)	n=1 (9%)	n=0
Acinar arrangements	n=59 (86%)	n=0 (0%)	n=1 (2%)
Isolated malignant cells	n=61 (88%)	n=0	n=0
Cytophagy	n=24 (35%)	n=0	n=0
Anisocaryosis	n=62 (90%)	n=2 (18%)	n=0
Irregular nuclear shapped	n=69 (100%)	n=7 (64%)	n=16 (29%)
Enhanced nuclear membrane	n=41 (59%)	n=2 (18%)	n=0
N/C ratio > 0.5	n=68 (98%)	n=5 (45%)	n=2 (4%)
Chromatin changes	n=69 (100%)	n=6 (54%)	n=10 (18%)
Prominent nucleoli	n=55 (80%)	n=5 (45%)	n=11 (20%)
Cytoplasmic mucin vacuole	n=69 (100%)	n=5 (45%)	n=16 (29%)
Enhanced cytoplasmic membrane	n=34 (49%)	n=5 (45%)	n=14 (25%)
Inflammation within the epithelial clusters	n=25 (36%)	n=3 (27%)	n=6 (1%)

Table 4: Distribution of the main criteria according to the cases.

Criteria	Sensitivity (CIs95%)	Specificity (CIs95%)
Moderate to high cell density	84% (77-89%)	30% (23-38%)
Double-cell populations	100% (97-100%)	100% (97-100%)
Nuclear overlapping	97% (93-99%)	79% (71-85%)
3-dimensionnal clusters	79% (71-85%)	98% (94-99%)
Acinar arrangements	85% (78-90%)	98% (94-99%)
Isolated malignant cells	88% (81-92%)	100% (97-100%)
Cytophagy	35% (27-43%)	100% (97-100%)
Anisocaryosis	89% (82-93%)	97% (92-99%)
Irregular nuclear shapped	100% (97-100%)	62% (54-70%)
Enhanced nuclear membrane	59% (51-67%)	97% (93-99%)
N/C ratio >0.5	98% (94-99%)	89% (83-93%)
Chromatin changes	100% (97-100%)	75% (67-81%)
Prominent nucleoli	94% (89-97%)	56% (48-64%)
Cytoplasmic mucin vacuole	100% (97-100%)	68% (60-75%)
Enhanced cytoplasmic membrane	49% (41-57%)	71% (63-78%)

Table 5: Sensitivity and specificity of the main malignancy criteria used.

Criteria	Odds Ratio	Score
3-dimensionnal clusters	5.54 (3.48 – 7.60)	6
Anisocaryosis	5.65 (4.04 – 7.26)	6
Increased N/C ratio (>0.5)	6.35 (4.23 – 8.48)	6
Enhanced nuclear membrane	3.85 (2.36 – 5.33)	4

	diagnostic		
crit2t	0	1	Total
0	58	0	58
6	5	3	8
10	1	0	1
12	1	7	8
16	1	9	10
18	0	18	18
22	0	32	32
Total	66	69	135

Score	Sensitivity	Specificity
> 6	96%	95%
> 10	96%	97%
> 12	86%	98%
> 16	72%	100%

Table 6: Logistic regression analysis and diagnostic results when changing the cutoff value.

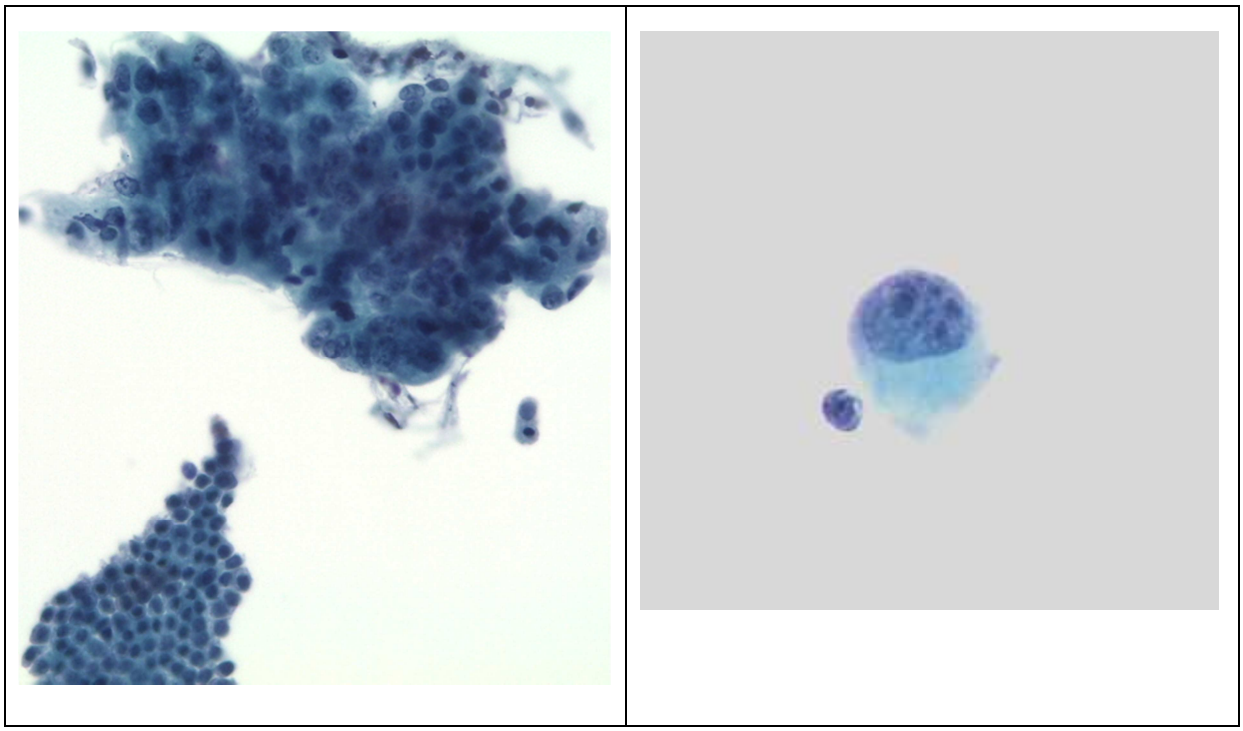


Figure 1: Illustration of the two exclusive malignancy criteria: on the left, the double cell population and on the right, the isolated malignant cells, Papanicolaou x 40.

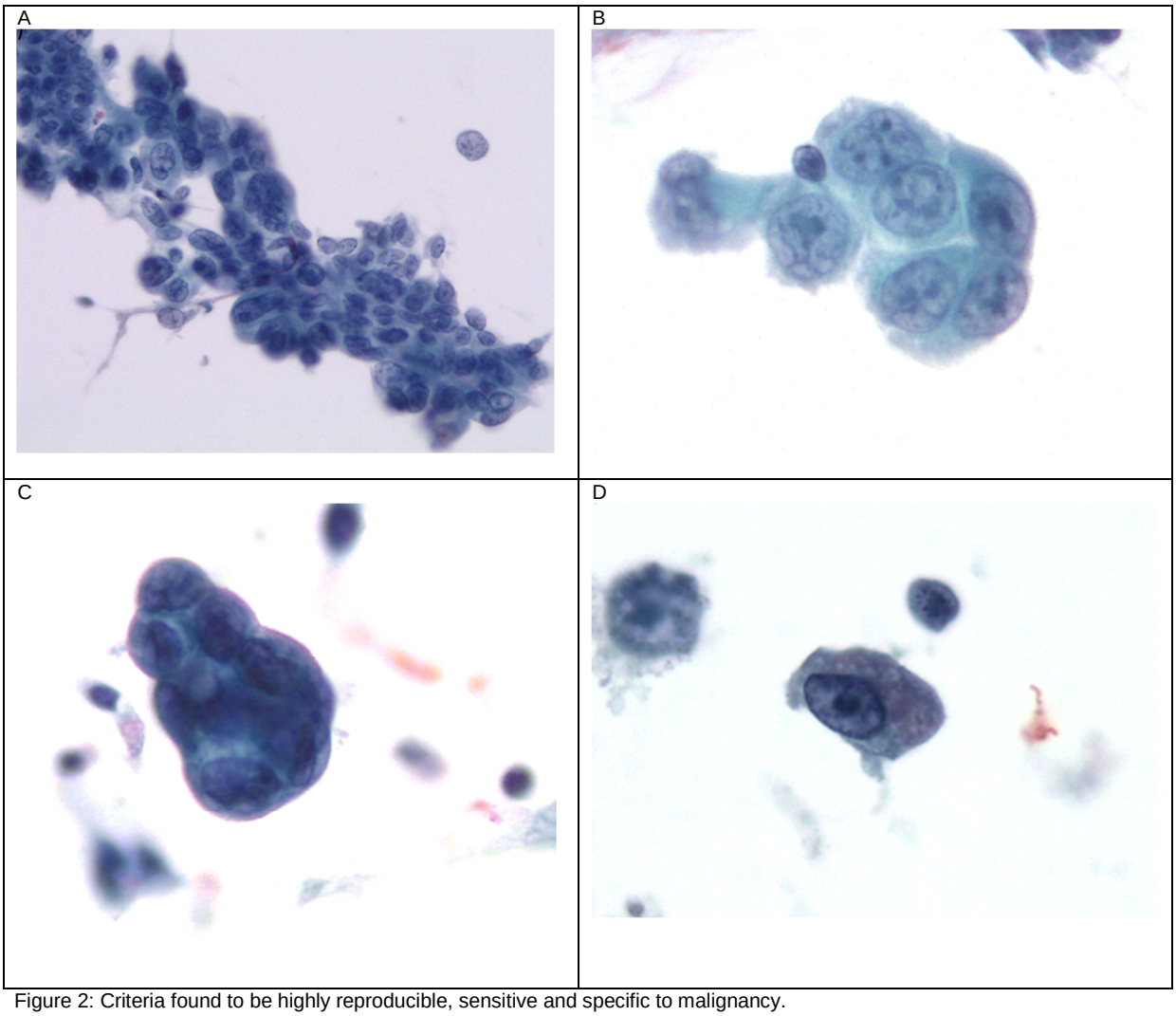


Figure 2: Criteria found to be highly reproducible, sensitive and specific to malignancy.
A: Anisocaryosis in a malignant cluster, Papanicolaou x 40
B: Increased nuclear to cytoplasmic ratio, Papanicolaou x 40
C: Disorganization of tumor cells arranged in 3-dimensionnal cluster, Papanicolaou x 40
D: Enhanced nuclear membrane associated here with a prominent nucleolus, Papanicolaou x 63

CONCLUSION

THÈSE SOUTENUE PAR : Adeline BAILLY

TITRE : ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE ET MISE AU POINT DES CRITERES CYTOLOGIQUES MORPHOLOGIQUES D'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE ET DE CHOLANGIOCARCINOME EXTRA-HEPATIQUE SUR ETALEMENTS DE LIQUIDE BILIAIRE

CONCLUSION :

L'adénocarcinome de la tête du pancréas et le cholangiocarcinome extra-hépatique représentent les deux causes les plus fréquentes de sténose maligne des voies biliaires explorées lors de la Cholangio-Pancréatographie Rétrograde Endoscopique (CPRE). Au cours de cet examen, un recueil de bile avant et après le brossage est aisé à effectuer et peut se révéler informatif sur la nature de la sténose. Si le diagnostic de malignité est posé sur ces prélèvements biliaires, le patient pourra être pris en charge sans avoir à subir une seconde procédure invasive à visée diagnostique. La cytologie biliaire a donc une place très importante dans ces contextes, néanmoins, comme tout examen cytologique, il doit reposer sur des critères cytomorphologiques solides car il ne peut reposer sur des critères architecturaux d'invasion comme c'est le cas de l'histologie. Nous avons montré que certains critères de malignité sont très reproductibles, sensibles et spécifiques de malignité, tels que la présence d'une double population cellulaire distincte, de cellules isolées malignes, d'amas tridimensionnels, d'une anisocaryose, d'un réhaussement des membranes nucléaires, d'une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique ou d'anomalies de répartition de la chromatine. Dans tous les cas, il faudra toujours intégrer ces données au contexte clinique (notamment à la présence d'une prothèse en place ou d'une cholangite sclérosante primitive qui sont sources de faux positifs), et collecter un maximum de matériel possible en combinant la cytologie de la bile avant et après brossage à l'examen cytologique du brossage voire de la ponction pancréatique pour augmenter la sensibilité de détection des lésions malignes.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 27/09/19

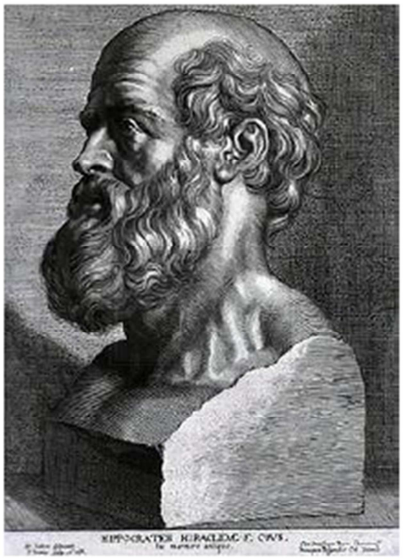
LE DOYEN

Pour le Président
et par délégation
Le Doyen de Médecine
Pr. Patrice MORAND

Pr. Patrice MORAND

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Pr. Nathalie STURM



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maitres 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.