



UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2016

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Etude comparative de deux méthodes d'évaluation du compte mitotique
et de l'analyse du Ki 67 dans l'élaboration du grade des
tumeurs/carcinomes neuroendocrines du pancréas : reproductibilité
inter-observateur, concordance et valeur pronostique**

Présentée et soutenue publiquement le 13 mai 2016 à 18 heures
Au Pôle Formation

Par Laurine Scherman

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Sébastien Aubert

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Bruno Carnaille

Madame le Docteur Christine Do Cao

Directeur de Thèse :

Madame le Professeur Emmanuelle Leteurtre

Travail de l'institut de pathologie du CHRU de Lille

AVERTISSEMENT

La faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : Celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CNEp	Carcinome neuroendocrine du pancréas
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
HES	Hématéine Eosine Safran
HPF	High Power Field
IM	Indice mitotique
IP	Indice de prolifération
K1	Méthode 1 de compte du Ki 67
K1OP1	Méthode 1 de compte du Ki 67 par l'opérateur 1
K1OP2	Méthode 1 de compte du Ki 67 par l'opérateur 2
K2	Méthode 2 de compte du Ki 67
M1	Méthode 1 de compte mitotique
M1OP1	Méthode 1 de compte mitotique par l'opérateur 1
M1OP2	Méthode 1 de compte mitotique par l'opérateur 2
M2	Méthode 2 de compte mitotique
M2OP1	Méthode 2 de compte mitotique par l'opérateur 1
M2OP2	Méthode 2 de compte mitotique par l'opérateur 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
TNEp	Tumeur neuroendocrine du pancréas
UICC	International Union Against Cancer
VHL	Von Hippel Lindau

Table des matières

Résumé	14
Introduction	15
I. Définition	15
II. Epidémiologie	16
III. Caractéristiques cliniques	17
A. Les TNE/CNEp fonctionnels	18
B. Les TNE/CNEp non fonctionnels	20
IV. Pronostic.....	21
V. TNE/CNEp : Diagnostic.....	22
A. Macroscopie	22
B. Microscopie	22
C. Immunohistochimie.....	25
D. Facteurs pronostiques	27
VI. Prise en charge thérapeutique	34
A. Formes bien différenciées	34
B. Formes peu différenciées	36
VII. Objectifs de l'étude	37
A. Objectif principal.....	37
B. Intérêt de l'étude.....	38
Matériels et méthodes	42
I. Sélection des cas	42
II. Evaluation du grade tumoral.....	43
A. L'indice mitotique	43
B. L'indice de prolifération par l'évaluation immunohistochimique du Ki 67	44
III. Etude statistique	48
Résultats	50
I. Caractéristiques clinico-pathologiques de la population étudiée	50
II. Evaluation de l'indice mitotique (IM)	52
A. Reproductibilité inter-observateur.....	52
B. Concordance entre la méthode M1 et la méthode M2.....	55

C.	Concordance entre les méthodes de compte mitotique et la méthode K2 de compte du Ki67.....	58
D.	Courbes de survie sans récurrence.....	62
III.	Evaluation de l'indice de prolifération (IP) par le Ki67 par compte manuel au microscope (K1).....	65
A.	Reproductibilité inter-observateur.....	65
B.	Concordance entre les méthodes K1 et K2.....	66
C.	Courbes de survie sans récurrence.....	68
Discussion		69
I.	Evaluation des deux méthodes de compte mitotique.....	69
A.	Reproductibilité inter-observateur.....	69
B.	Concordance entre les méthodes M1 et M2.....	70
C.	Concordance entre les méthodes de compte mitotique et la méthode K2.....	71
D.	Courbes de survie sans récurrence.....	74
II.	Evaluation de la méthode d'analyse de l'IP par compte manuel au microscope (K1)	76
Conclusion.....		78
Références bibliographiques.....		80

RESUME

Contexte : Les tumeurs/carcinomes neuroendocrine du pancréas (TNE/CNEp) sont des pathologies rares dont l'incidence est en augmentation et dont le pronostic est variable. Leur potentiel de malignité est aujourd'hui évalué par leur capacité proliférative. L'objectif est de comparer deux méthodes de compte mitotique et une méthode de compte manuel du Ki67 dans la détermination du grade des TNE/CNEp en établissant leur reproductibilité inter-observateur, leur concordance et leur valeur pronostique et en les comparant à la méthode « gold standard » de compte du Ki67 sur photo imprimée.

Méthode : Le compte mitotique sur 42 tumeurs primitives du pancréas a été effectué selon deux méthodes et l'indice de prolifération par le Ki67 a été évalué par compte manuel au microscope et sur photo imprimée après numérisation. Les techniques ont été chronométrées. Les concordances ont été analysées selon le coefficient de Spearman et le test du Fisher exact et la reproductibilité inter-observateur selon le kappa pondéré. Les courbes de survie sans récurrence, analysées par le test du Log-Rank, étaient effectuées en fonction du grade par les 2 méthodes de compte mitotique et de compte du Ki67.

Résultats : Les deux méthodes de compte mitotique (M1 et M2) qui nécessitent en moyenne une analyse de 15 minutes, sont reproductibles en inter-observateur (kappa pondéré à 0,83 [0,67 ; 0,99] pour M1; 0,63 [0,42 ; 0,84] pour M2). Elles sont concordantes entre elles ($p = 0,98$; $p < 0,0001$) et avec la méthode d'analyse du Ki67 sur photo imprimée ($p = 0,72$; $p < 0,0001$). Seulement l'une des méthodes est corrélée au taux de survie sans récurrence ($p = 0,0038$ pour M1; $p = 0,1046$ pour M2). La méthode de compte manuel du Ki67, qui nécessite en moyenne une analyse de 12 minutes, est reproductible (kappa pondéré à 0,90 (0,79 ; 1)), concordante avec la méthode d'analyse sur photo imprimée ($p = 0,90$; $p < 0,0001$) et corrélée est au taux de survie sans récurrence ($p = 0,0100$). En comparant avec le gold standard, les discordances entre les grades sont moins importantes avec la méthode de compte du Ki67 qu'avec celles de compte mitotique.

Conclusion : Ces méthodes d'analyse de l'indice mitotique et de l'indice de prolifération par le Ki67 sont fiables dans l'élaboration du grade des TNE/CNEp. L'analyse du Ki67 sur compte au microscope est supérieure au compte mitotique en termes de reproductibilité, concordance, de valeur pronostique et est moins longue à effectuer. L'analyse seule de l'IP selon la méthode de compte manuel au microscope se justifie.

INTRODUCTION

I. Définition

Les tumeurs/carcinomes neuroendocrines du pancréas (TNE/CNEp) sont constitués de cellules épithéliales pancréatiques présentant une différenciation phénotypique et ultrastructurale neuro-endocrine. Il a été récemment acté que toutes les TNE/CNEp ont un potentiel de malignité (1). Ce terme inclut les tumeurs neuroendocrines du pancréas (TNEp) et les carcinomes neuroendocrines du pancréas (CNEp) selon l'ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) et l'OMS (organisation mondiale de la santé) 2010.

Les TNEp sont bien différenciées, de grade 1-2 et ont un potentiel de malignité plus faible que les CNEp, qui sont peu différenciés, de grade 3 et qui ont un fort potentiel de malignité.

II. Epidémiologie

Les tumeurs et carcinomes neuroendocrines du tube digestif sont les tumeurs neuroendocrines les plus fréquentes dont elles représentent 70% des cas (2)(3). Dans la base de données des Etats-Unis (SEER, Surveillance Epidemiology and End Results), qui a été colligée entre 1973 et 2007, les TNE/CNEp représentent 7% de toutes les tumeurs neuroendocrines (4) et 1-2% des tumeurs pancréatiques diagnostiquées (5)(6). Les CNEp représentent moins de 1% des carcinomes pancréatiques et 2-3% des TNE/CNEp (7).

L'incidence des TNE/CNEp dans la population générale est estimée à 2 à 5 nouveaux cas par an pour 100000 personnes (8).

Des données épidémiologiques provenant de plusieurs pays européens, des Etats-Unis et du Japon suggèrent que l'incidence réelle des TNE/CNEp a été sous-estimée et que leur incidence et leur prévalence sont en augmentation rapide au cours des dernières décennies (9)(10)(11)(12)(13). En effet, certaines études effectuées en Europe ont montré une augmentation du taux d'incidence annuelle de 0,1 à 0,3 (14)(10)(15). Aux Etats-Unis, les études effectuées sur la base de données SEER montrent des résultats comparables avec une augmentation du taux d'incidence annuelle de 0,17 à 0,43 (4).

Les raisons de ces augmentations remarquables ne sont pas encore clairement établies. Ce phénomène s'explique par l'amélioration des techniques d'imageries et d'autres techniques diagnostiques, comme les explorations endoscopiques digestives, qui sont plus sensibles et feraient découvrir fortuitement des tumeurs de petite taille (16)(17).

Cela s'explique aussi par une réelle augmentation d'incidence des TNE/CNEp du fait d'autres facteurs qui ne sont pas aujourd'hui clairement définis.

III. Caractéristiques cliniques

Les TNE/CNEp surviennent à tout âge, majoritairement chez l'adulte de 30 à 60 ans, avec un âge moyen de 50 ans, aussi bien chez la femme que chez l'homme. Les enfants sont rarement atteints. Ils surviennent partout au sein du pancréas.

Dans certains cas, ils entrent dans le cadre de maladies génétiques telles que les néoplasies endocriniennes multiples de type 1 (NEM1), la neurofibromatose de type 1 (NF1) ou encore la maladie de Von Hippel Lindau (VHL). Dans ces cas, ils surviennent en général chez le patient jeune.

Les TNE/CNEp sont parfois associés à des syndromes cliniques spécifiques causés par une hypersécrétion tumorale d'hormones entéro-pancréatiques (insuline, glucagon, somatostatine, gastrine, peptide intestinal vaso-actif (VIP) ect.) et sont alors appelées tumeurs neuroendocrines fonctionnelles.

Ce groupe comprend les insulinomes, qui sont les plus communs et représentent 42% des tumeurs neuroendocrine fonctionnelles, les glucagonomes, les somatostatинomes, les gastrinomes et les VIPomes.

A. Les TNE/CNEp fonctionnels

1. Les insulinomes

Les insulinomes sont les plus fréquents avec une incidence annuelle à 1 par million d'habitants. Ils se présentent le plus souvent sous la forme d'une tumeur unique, de petite taille (< 1cm) et quasiment toujours au sein du pancréas.

Les symptômes cliniques se traduisent le plus souvent par la répétition de malaises hypoglycémiques à jeun, une fatigue, des sueurs ainsi qu'une prise de poids.

Lors de l'épreuve de jeûne, l'association d'une hypoglycémie organique et d'une élévation inappropriée du taux d'insuline et/ou de la proinsuline est pathognomonique. La grande majorité des insulinomes a un très faible potentiel de malignité. Le pourcentage d'insulinomes présentant des signes d'agressivité est faible et représente en moyenne 8% des insulinomes diagnostiqués (18).

2. Les gastrinomes

Ces tumeurs, uniques lorsqu'elles sont sporadiques, sont souvent multiples lorsqu'elles sont d'origine génétique, entrant dans le cadre d'une NEM1. Elles se développent le plus souvent au sein du duodénum mais peuvent être observées dans le pancréas.

Les symptômes se traduisent par des douleurs abdominales par ulcères peptiques, multiples et récidivant, des diarrhées, et un reflux oesophagien secondaire à l'hypersécrétion de gastrine entrant dans le cadre du syndrome de Zollinger-Ellison.

30% de ces tumeurs développent des métastases hépatiques (19). Une concentration plasmatique élevée en gastrine est une aide pour le diagnostic.

3. Les glucagonomes

Ces tumeurs, de plus mauvais pronostic, sont le plus souvent uniques et de grande taille. Elles se développent le plus souvent dans le pancréas. Cliniquement elles se traduisent par la présence d'une hyperglycémie et d'une perte de poids. Des atteintes cutanées peuvent être observées telles que l'érythème nécrolytique migratoire.

Une concentration plasmatique élevée en glucagon est une aide pour le diagnostic.

4. Les VIPomes

Ces tumeurs sont le plus souvent uniques et se présentent à un stade métastatique dans la majorité des cas. Elles sont localisées dans le pancréas dans la grande majorité des cas. Cliniquement elles se traduisent par des diarrhées profuses et aqueuses.

L'élévation plasmatique du VIP est une aide pour le diagnostic.

5. Les somatostatинomes

Souvent uniques, ces tumeurs se développent aussi bien dans le pancréas que dans le duodénum. Les symptômes cliniques sont inconstants mais lorsqu'ils sont présents, se traduisent par des diarrhées, une perte de poids ou un diabète et la constitution de lithiases des voies biliaires.

La mise en évidence d'une augmentation de la concentration plasmatique de la somatostatine est une aide pour le diagnostic.

B. Les TNE/CNEp non fonctionnels

Les tumeurs neuroendocrines non fonctionnelles représentent 30 à 40% des TNEp (18). Elles ne sont pas associées à un syndrome clinique particulier mais s'accompagne parfois d'une hypersécrétion hormonale non symptomatique comme la chromogranine A, dont le dosage est une aide au diagnostic. Elles peuvent être symptomatiques lorsque leur taille devient importante, lorsqu'elles envahissent les tissus sains adjacents ou lors de l'apparition de métastases à distance. Dans 15% des cas, elles sont diagnostiquées de façon fortuite.

Les CNEp sont souvent diagnostiqués suite à la découverte de métastases symptomatiques. Les tumeurs primitives localisées peuvent occasionner une douleur et/ou un ictère. Ils surviennent généralement chez les patients âgés de plus de 40 ans (18).

IV. Pronostic

Tous les TNE/CNEp ont un potentiel de malignité (1) excepté le microadénome neuroendocrine qui est une entité particulière et qui est considéré comme bénin. Parmi ces TNE/CNEp, la survie à 5 ans est meilleure pour les TNE/CNEp fonctionnels (20)(21).

Tout grade confondu, la médiane globale de survie chez les patients présentant un TNE/CNEp non fonctionnel est de 38 mois. Elle est de 23 mois pour ceux qui présentent des métastases à distance et de 124 mois pour ceux ayant une tumeur localisée (20).

Quelques études récentes portant sur de longues périodes de suivi de patients ont montré que même les TNEp de petite taille, découvertes de manière fortuite, développent des métastases ou récidivent dans 7 à 15% des cas.

Les TNEp de grade 1 ont un taux de survie estimé à 95% à 5 ans.

Les TNEp de grade 2 ont une survie médiane de 63 mois et un taux de survie estimé à 61% à 5 ans (22).

Le pronostic des CNEp de grade 3 est plus ambivalent du fait de la présence de deux sous types aujourd'hui clairement établis : les CNEp de grade 3 peu différenciés et les CNEp de grade 3 bien différenciés.

Les CNEp bien différenciés de grade 3 ont un moins bon pronostic que les TNEp de grade 2 avec une survie médiane à 32 mois et un taux de survie à 5 ans de 22% et un meilleur pronostic que les véritables CNEp peu différenciés de grade 3 avec une survie médiane à 15 mois et un taux de survie à 5 ans de 17% (22)(23)(24).

Les facteurs pronostiques les plus pertinents aujourd'hui recensés sont le grade, la taille et la différenciation tumorale, un âge supérieur à 40 ans, des marges chirurgicales positives et la présence d'une angioinvasion (25).

V. TNE/CNEp : Diagnostic

Sur pièces opératoires, biopsies ou microbiopsies par aspiration à l'aiguille fine, le diagnostic anatomopathologique des TNE/CNEp est standardisé et s'effectue sur la base d'une analyse macroscopique, microscopique et immunohistochimique (26).

A. Macroscopie

Leur taille varie en moyenne de 1 à 5 cm. Les insulinomes sont généralement de petite taille. Les tumeurs neuroendocrines non fonctionnelles mesurent souvent plus de 2 cm au moment du diagnostic.

Les TNE/CNEp sont souvent bien circonscrits, en masse solide, rarement pseudo-kystiques, parfois multinodulaires avec des septas fibreux. Ils sont de couleur blanche, jaune ou marron. Leur consistance est variable. Ils sont parfois encapsulés ou au contraire étendus au tissu pancréatique adjacent. De la nécrose est parfois observée et représente un facteur pronostique péjoratif.

B. Microscopie

1. Les TNEp bien différenciées

Les cellules s'organisent en travées, en plages solides, en acini ou en nids de plus ou moins grande taille.

Le stroma tumoral varie considérablement d'une tumeur à l'autre. Certaines tumeurs prennent un aspect densément cellulaire, avec peu de stroma. D'autres contiennent un stroma hyalin étendu, ou amyloïde.

Elles sont constituées de cellules au noyau rond ou ovale, uniforme et contenant parfois un ou plusieurs petits nucléoles. La chromatine est granuleuse, avec un aspect typique en « poivre et sel ». L'aspect du cytoplasme varie également d'une tumeur à l'autre avec parfois une hétérogénéité intra-tumorale. Certaines cellules présentent un cytoplasme abondant, éosinophile, typique des TNEp (figure 1) alors que d'autres ont un cytoplasme d'aspect oncocyttaire ou clair.

L'aspect microscopique ne permet pas d'évaluer la capacité de sécrétion hormonale des TNEp.

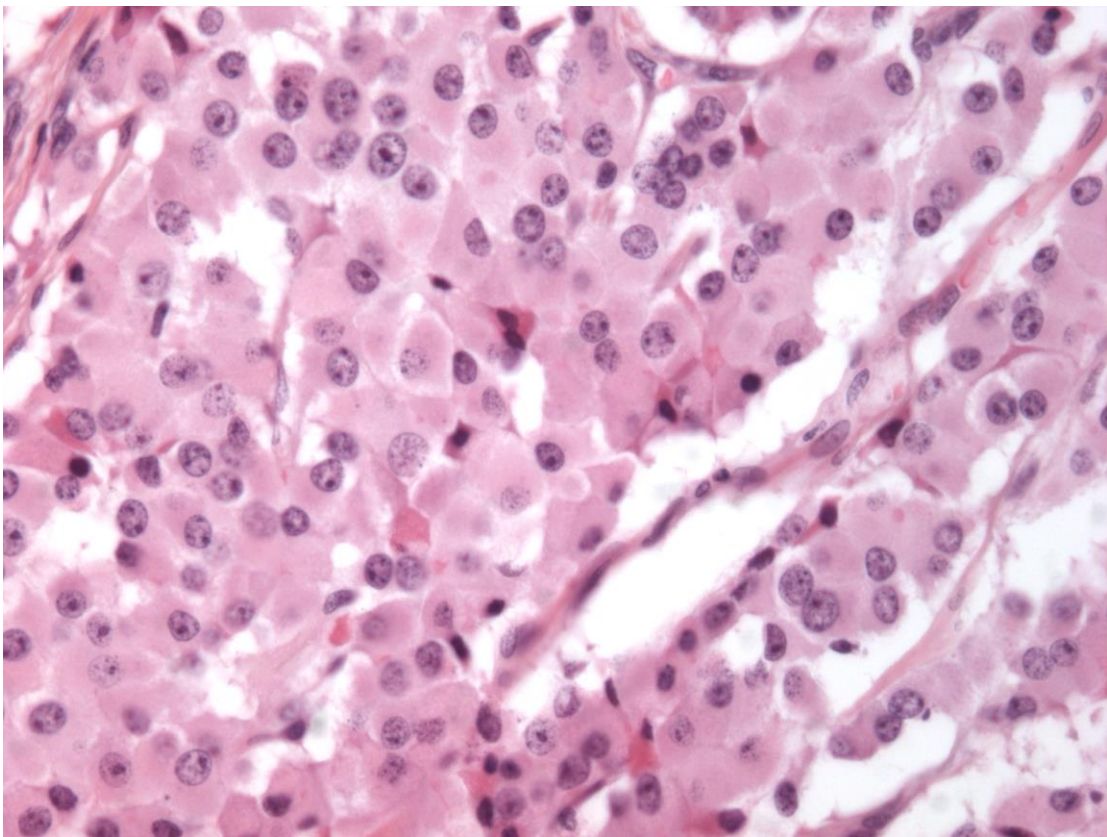


Figure 1 TNEp bien différenciée : noyaux régulier avec chromatine en « poivre et sel », cytoplasme abondant éosinophile ; HES x 40

2. Les CNEp peu différenciés

Les CNEp sont plus rares. Ils sont parfois à petites cellules mais sont plus majoritairement à grandes cellules. Morphologiquement, leurs cellules s'organisent en plages solides ou parfois en travées.

Les CNEp à grandes cellules sont constitués de cellules au rapport nucléocytoplasmique augmenté. Les noyaux sont hyperchromatiques et pléomorphes (figure 2) avec de gros nucléoles. De la nécrose est fréquemment retrouvée.

Les CNEp à petites cellules, plus fréquemment diagnostiqués dans le poumon, sont constitués de cellules de petite taille, rondes ou fusiformes, au rapport nucléocytoplasmique élevé. Les noyaux sont hyperchromatiques, avec des nucléoles absents ou à peine visibles.

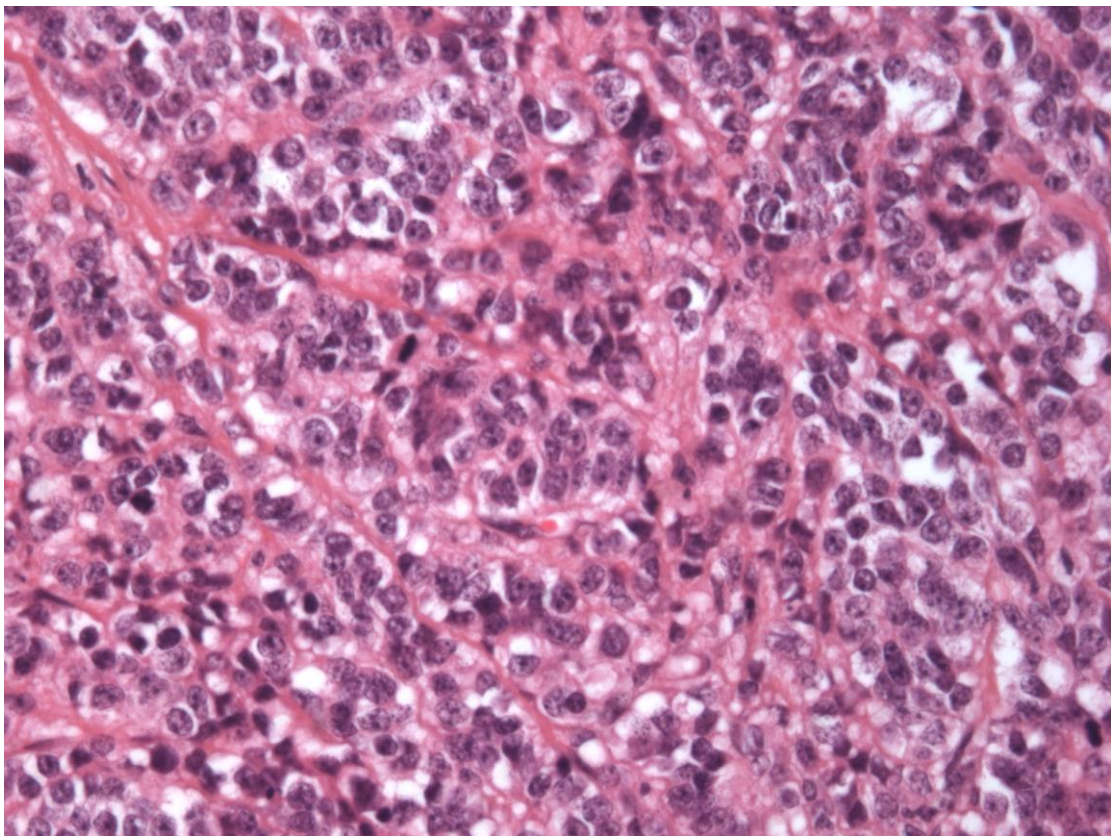


Figure 2 CNEp peu différencié : noyaux irrégulier, anisocaryotique avec gros nucléoles, cytoplasme peu abondant ; HES X 40

C. Immunohistochimie

Une fois le diagnostic de TNE/CNEp suspecté sur la morphologie, il est recommandé de confirmer le diagnostic par la positivité immunohistochimique des anticorps anti-synaptophysine et anti-chromogranine A (26).

La chromogranine A est une glycoprotéine composant la matrice des granules sécrétoires neuroendocrines (figure 3). Elle est très spécifique de la différenciation neuroendocrine mais présente, contrairement à la synaptophysine, une expression plus hétérogène et variable au sein du cytoplasme des cellules tumorales. Son expression est moins intense voire négative au sein des insulinomes, des TNE bien différenciées du rectum ou au sein des CNEp peu différenciés.

La synaptophysine est une protéine cytoplasmique présente dans toutes les cellules neuroendocrines, diffusément exprimée au sein de leur cytoplasme (figure 4). C'est le marqueur le plus sensible de différenciation neuroendocrine. En revanche c'est un marqueur moins spécifique que la chromogranine A, pouvant être exprimée dans d'autres tumeurs telles que les tumeurs épithéliales.

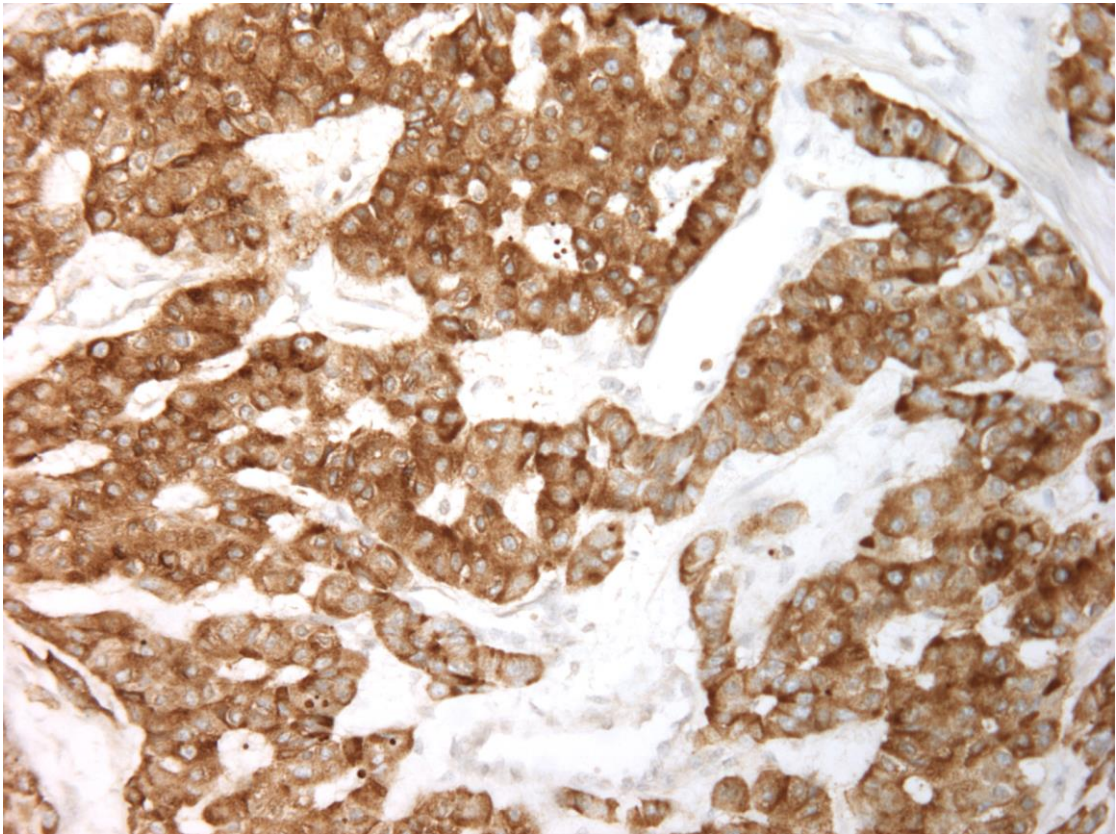


Figure 3 Etude ImmunoHistoChimique par l'anticorps anti-chromogranine : marquage intense, granulaire et cytoplasmique ; X 40

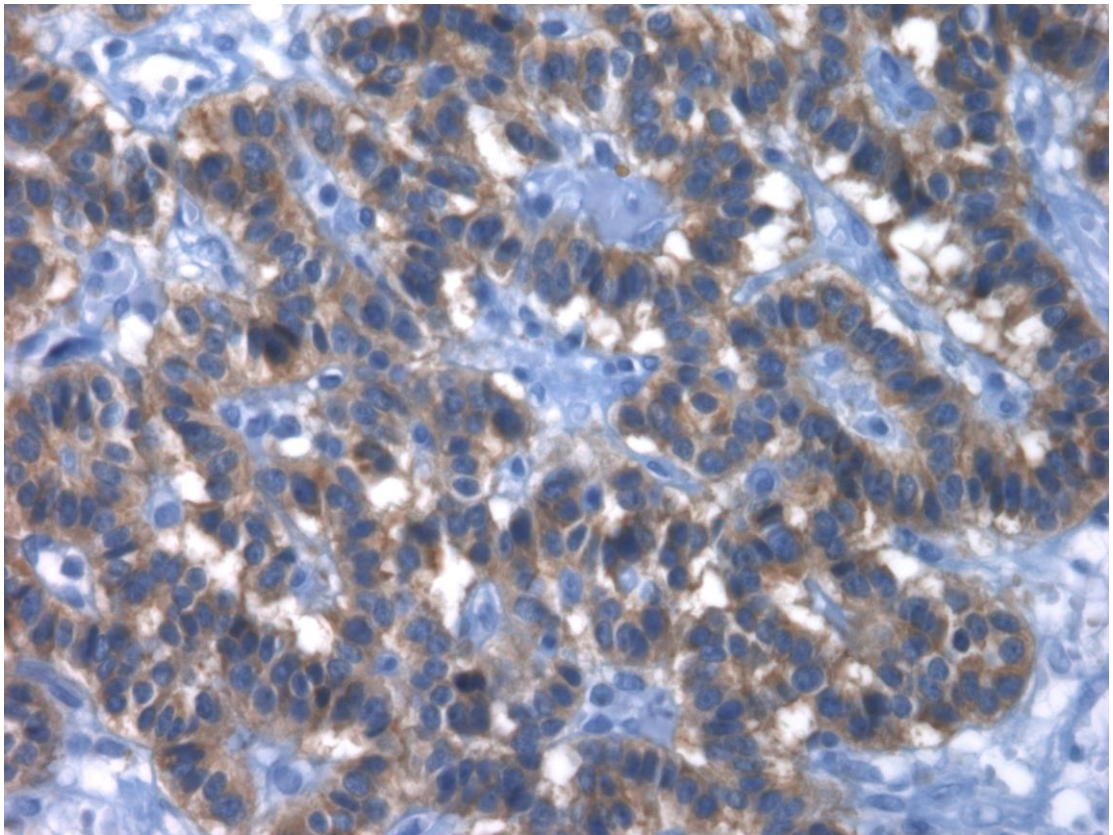


Figure 4 Etude ImmunoHistoChimique par l'anticorps anti-synaptophysine : marquage d'intensité modérée et cytoplasmique ; X 40

D. Facteurs pronostiques

1. Les stades

Selon l'OMS 2010, les TNE/CNEp sont classés en fonction de leur stade indépendamment du grade. Il existe aujourd'hui deux classifications pour déterminer le stade des TNE/CNEp (Figure 5) :

- La classification TNM proposée par l'AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer) depuis 2010 est basée sur la classification TNM (« tumor, node, metastasis ») utilisée pour l'adénocarcinome ductal du pancréas (27)(28). Sa pertinence a déjà été validée par quelques études et son utilisation est recommandée par l'OMS 2010.

Cependant, cette classification est controversée notamment pour sa définition du pT3 qui correspond à l'envahissement des tissus péri-pancréatiques. Cette définition ne correspond pas au mode d'infiltration des CNEp (29)(30)(31) et n'est donc pas appropriée pour les CNEp de haut grade.

- La classification TNM proposée par l'ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) depuis 2006, est validée par de multiples études (32)(33)(34) et diffère de celle proposée par l'UICC dans la définition du stade pT3 qui est corrélée à la taille tumorale (35)(36) et non à l'envahissement péri-pancréatique.

pT stade	TNM AJCC/UICC (2010)	TNM ENETS (2006)
pT1	Limité au pancréas, <2cm	Limité au pancréas, <2cm
pT2	Limité au pancréas, >2cm	Limité au pancréas, 2-4cm
pT3	Etendu au-delà du pancréas, sans atteinte des gros vaisseaux	Limité au pancréas, > 4cm
pT4	Etendu au-delà du pancréas avec atteinte des gros vaisseaux	Etendu au-delà du pancréas

Figure 5 Classifications TNM des TNE/CNEp : ENETS (2006) à droite et AJCC/UICC (2010) à gauche.

Il existe donc, à ce jour, deux systèmes parallèles de détermination du stade des TNE/CNEp. Selon l'OMS 2010, le stade de la maladie doit être exprimé par la classification TNM de l'UICC 2010.

2. Les grades

L'établissement du grade est essentiel à l'évaluation du risque évolutif des TNE/CNEp et repose sur la détermination de leur capacité proliférative. Cette notion a été préalablement décrite par l'ENETS en 2006 et son usage a été généralisé par l'OMS en 2010. Le grade histologique des TNE/CNEp résulte de l'utilisation de l'indice mitotique (IM) et/ou de l'indice de prolifération (IP) évalué par l'analyse du Ki67. Associé à la différenciation cellulaire, ce système de grade a une valeur prédictive. Il est corrélé au risque de récurrence et au devenir du patient (32)(33)(34).

a. L'indice Mitotique

La division cellulaire est un processus constitué de différentes phases : G0 (phase de repos), G1 (« first GAP phase »), S (phase de synthèse), G2 (« seconde GAP phase ») et M (phase de mitose). Les cellules en phase de mitose sont visualisées au microscope grâce à leurs caractéristiques morphologiques.

Avec la coloration par l'Hématéine-Eosine, les mitoses se définissent par un hyperchromatisme et l'absence de membrane nucléaire. Cet hyperchromatisme est constitué de matériel nucléaire chromosomique. Il se présente soit en un spot unique (métaphase), soit en une ligne centrale (métaphase / anaphase), soit en deux spots séparés et opposés (télophase) (Figure 6).

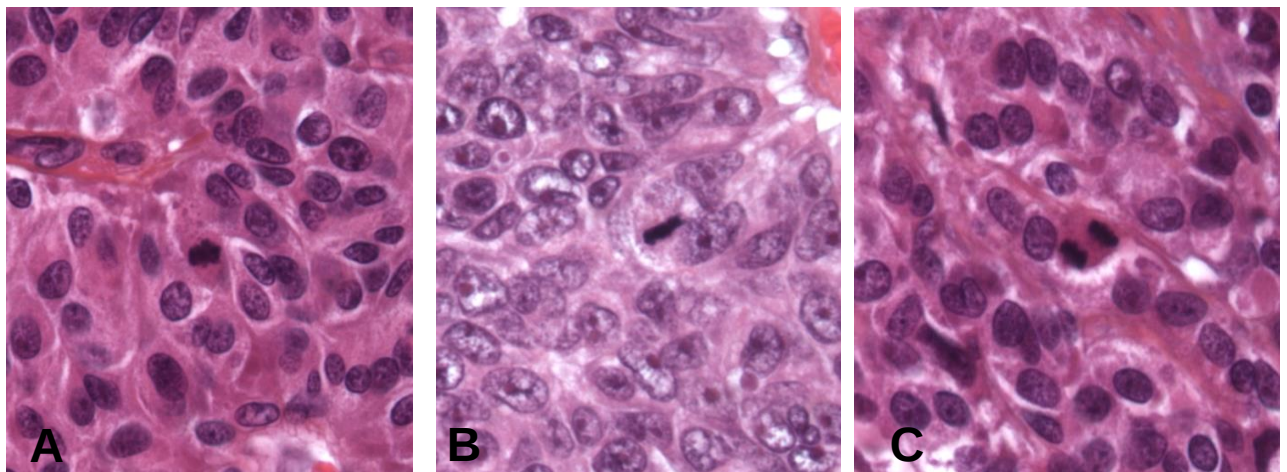


Figure 6 : A : mitoses en prophase (spot unique), B : métaphase (deux spots opposés), C : télophase (ligne centrale), HES x 40.

Il est clairement défini par l'ENETS que l'indice mitotique doit être déterminé par un compte de mitose sur au moins 40 champs au fort grossissement (HPF) et que le résultat doit être reporté en nombre de mitoses par 2mm^2 (Figure 8) :

- Les TNE/CNEp de grade 1 présentent moins de 2 mitoses par 2mm^2 .
- Les TNE/CNEp de grade 2 présentent entre 2 et 20 mitoses par 2mm^2 .
- Les TNE/CNEp de grade 3 présentent plus de 20 mitoses par 2mm^2 .

Ce compte est effectué sur des lames colorées préalablement par la coloration à l'hématoxyline-Eosine-Safran (HES), au sein des zones les plus mitotiques après un screening global de la lame au plus faible grossissement.

b. Ki67

L'antigène Ki67 est une protéine nucléaire exprimée dans toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2 et Mitose) mais absente dans les cellules au repos (G0). La présence de l'antigène Ki67, strictement associée au cycle cellulaire, est limitée au noyau. La détermination de l'indice de prolifération (IP) s'effectue par technique immunohistochimique avec l'anticorps anti-Ki67.

Le pourcentage de cellules tumorales marquées, c'est à dire présentant un marquage nucléolaire ou nucléaire diffus, de faible à forte intensité, est déterminé sur un échantillon d'au moins 2000 cellules au fort grossissement au sein des zones de plus forte densité en cellules marquées (« hot spot ») (Figure 7).

- Les TNE/CNEp de grade 1 présentent un IP inférieur à 3%.
- Les TNE/CNEp de grade 2 présentent un IP compris entre 3 et 20%.
- Les TNE/CNEp de grade 3 présentent un IP supérieur à 20%

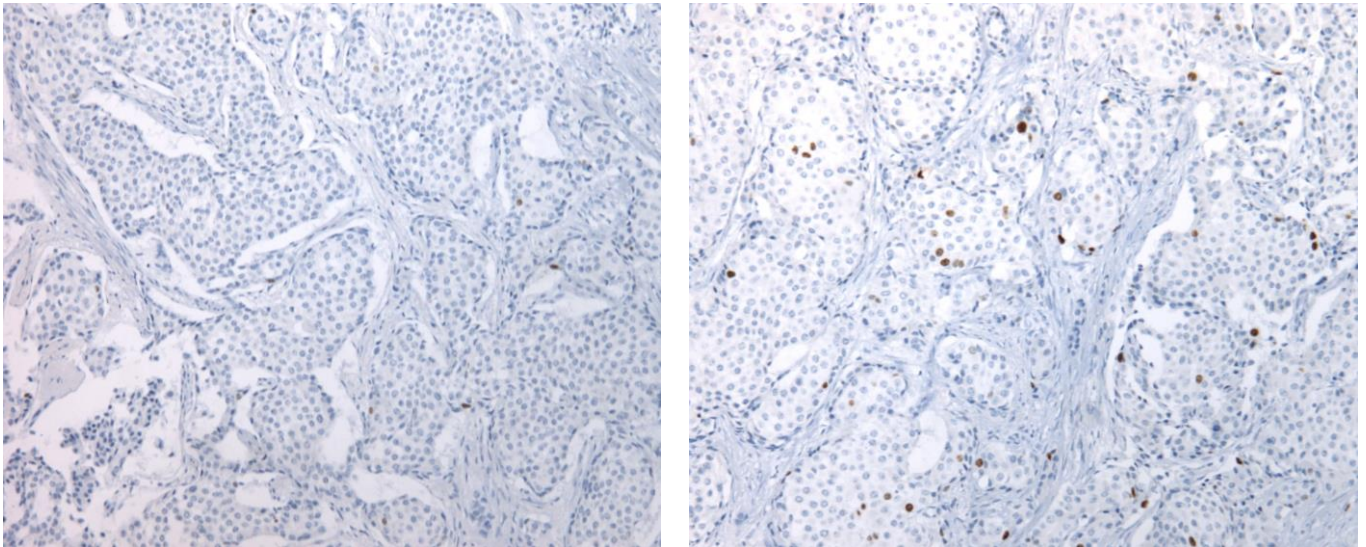


Figure 7 : « Hot spot » d'une TNEp bien différenciée, ImmunoHistoChimie par le Ki67, x 10.
A gauche : Zone faiblement marquée ; A droite : « hot spot » zone de plus forte densité de cellules marquées

Trois grades sont donc définis : Le grade 1 (G1), pour les tumeurs peu proliférantes, le grade 2 (G2) pour les tumeurs de capacité proliférante intermédiaire et le grade 3 (G3) pour les carcinomes fortement proliférants (Figure 8).

Différentes méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'IP :

- Evaluation globale au microscope ou « eye-balling » : il s'agit d'évaluer globalement le pourcentage de cellules marquées au sein des zones de « hot spot » sans effectuer de réel compte cellulaire.
- Evaluation par compte manuel au microscope : il s'agit d'évaluer le pourcentage de cellules marquées après un compte précis sur un total d'au moins 2000 cellules au fort grossissement au sein d'un « hot spot » au microscope.
- Evaluation par compte manuel sur image imprimée : Il s'agit, après numérisation de la lame sélectionnée et impression sur papier de l'image de la zone de « hot spot », d'évaluer sur papier le pourcentage de cellules marquées.

- Evaluation par compte automatisé : Il s'agit d'effectuer un compte de cellules marquées de façon automatisé grâce à un logiciel informatique analysant les images après numérisation des lames sélectionnées.

Grade	Indice mitotique (mitoses pour 2 mm ²)	Indice de prolifération Ki 67 (% de cellules marquées)
G1	< 2	< 3
G2	2 - 20	3 - 20
G3	> 20	> 20

Figure 8 : Etablissement du grade des TNE/CNEp selon l'ENETS 2006 et l'OMS 2010 ;
A gauche, l'indice mitotique ; A droite, l'indice de prolifération.

c. La différenciation

Ce facteur pronostique, initialement au premier plan, est maintenant utilisé en association au grade tumoral (18).

Les TNE/CNEp sont classés en deux catégories morphologiques : les TNEp bien différenciées et les CNEp peu différenciés.

Les TNEp bien différenciées sont constituées de cellules organisées architecturalement. Elles s'agencent en travées, en nids ou en glandes. Les cellules ont un cytoplasme abondant, et un noyau régulier avec une chromatine en « poivre et sel ». La grande majorité des TNEp bien différenciées est classée en grade 1 ou 2.

Les CNEp peu différenciés sont constitués de cellules se disposant le plus souvent en plages avec une perte de l'organisation architecturale. Pour les CNEp à grandes cellules, les cellules ont un rapport nucléo-cytoplasmique augmenté et un noyau irrégulier et nucléolé. Le cytoplasme est toujours visualisable. La totalité des CNEp peu différenciés est classée en grade 3.

Cependant alors que tous les CNEp peu différenciés sont de grade 3, toutes les TNEp bien différenciées, comme définies par l'OMS, ne sont pas réparties entre le grade 1 et le grade 2 mais certaines sont aussi de grade 3. Ce problème de classification est actuellement source de difficultés dans la prise en charge et la stratégie thérapeutique à adopter pour certains patients.

Ces tumeurs, bien différenciées, mais ayant un indice de prolifération supérieur à 20%, ont également, pour la grande majorité des cas, un indice de prolifération inférieur à 50%. Ces cas intermédiaires sont encore classés aujourd'hui comme des grade 3 et ont un pronostic qui est meilleur que celui des CNEp peu différenciés et moins bon que celui des TNEp de grade 2 (22).

Une étude récente définit les « vrais carcinomes neuroendocrines » par un indice de prolifération par le Ki 67 supérieur à 50% (24) et il est maintenant plus clairement établi que les CNEp de grade 3 devraient être séparé en deux sous-grades comprenant les tumeurs bien différenciées avec un Ki 67 supérieur à 20 % mais plutôt inférieur à 50% et les vrais CNEp peu différenciés qui ont le plus souvent un Ki67 très élevé, supérieur à 50%.

VI. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge des TNE/CNEp dépend de la différenciation, de la taille, de la localisation tumorale, du grade, du stade ainsi que des comorbidités du patient.

A. Formes bien différenciées

1. Formes localisées ou localement avancées

Qu'il s'agisse d'une TNEp ou d'un CNEp, pour les formes bien différenciées, non métastatiques et sporadiques, le traitement de référence est la chirurgie associée ou non à un curage ganglionnaire (25) suivi d'une surveillance scannographique régulière. L'amélioration de la survie des patients après résection chirurgicale a été démontrée (37) (38).

Même si les TNEp sont souvent indolentes, elles présentent toutes un potentiel de malignité et il a été montré qu'elles donnent des métastases ganglionnaires dans 30% des cas (39).

Cependant, en cas de TNEp non fonctionnelle de découverte fortuite et dont la taille est inférieure à 2cm, une abstention thérapeutique associée à un suivi rapproché est proposée mais cette attitude thérapeutique est aujourd'hui débattue.

2. Formes métastatiques

Pour les cas particuliers avec métastases hépatiques, la prise en charge consiste en l'exérèse de la tumeur primitive et, si cela est possible, un traitement locorégional des métastases.

Une prise en charge sera effectuée en cas de lésion de grade 1 ou 2, en l'absence de métastases ganglionnaires ou extra-abdominales non résécables et en l'absence de carcinose. En fonction du nombre de métastases, le geste chirurgical consiste soit en une simple énucléation, en une résection segmentaire hépatique ou en une hépatectomie totale avec greffe. Un complément par d'autres techniques de destruction tumorale peut être réalisé (radiofréquence, radiothérapie vectorisée interne, chimioembolisation ...).

Ce traitement, lorsqu'il est possible dans une population sélectionnée, donne un taux de survie à 5 ans de 60 à 80%, comparé à 30% en l'absence de chirurgie (40)

En cas de TNEp avec métastases non résécables, d'autres thérapeutiques sont proposées :

- Les traitements antiprolifératifs tels que les analogues de la somatostatine (octréotide ou lanréotide) et l'interferon-alpha associés à une surveillance en cas de métastases non progressives et non symptomatiques et en l'absence de métastases osseuses.
- les chimiothérapies combinant streptozotocine et la doxorubicine ou le 5-FU en première ligne pour les métastases évolutives ou symptomatiques et/ou présence de métastases osseuses.
- Les thérapies ciblées (évérolimus, sunitinib) sont indiquées en première ou deuxième ligne au cas par cas.

B. Formes peu différenciées

Le traitement des CNEp peu différenciés, métastatiques, de grade 3 sera discuté au cas par cas. La chirurgie est très rarement proposée, uniquement si elle paraît curative ou en l'absence de métastases ganglionnaires. Dans les cas contraires, la chimiothérapie possiblement associée à la radiothérapie est le traitement de première intention (41). En première ligne, les chimiothérapies systémiques combinant de l'etoposide et du cisplatine sont indiquées. En deuxième intention, les protocoles de chimiothérapie Folfox ou Folfiri sont proposés.

Il existe une particularité pour la prise en charge des CNEp bien différenciés qui n'est pas encore bien établie. Elle doit être discutée au cas par cas et se baser sur la clinique. La prise en charge peut être la même que celle des TNEp de grade 1-2 ou au contraire être identique à celles des CNEp de grade 3 peu différenciés.

VII. Objectifs de l'étude

A. Objectif principal

Notre étude est rétrospective, monocentrique et a été réalisée en double aveugle.

L'objectif principal est de comparer deux méthodes de compte mitotique (M1 et M2) dans la détermination du grade des TNE/CNEp en établissant leur reproductibilité inter-observateur, leur concordance et leur valeur pronostique. Ces méthodes seront chacune comparées à la méthode « gold standard » d'évaluation de l'indice de prolifération par compte manuel du Ki67 sur photo imprimée (K2).

L'objectif secondaire est d'établir la reproductibilité inter-observateur de la méthode d'évaluation de l'indice de prolifération par compte manuel au microscope (K1), établir sa concordance avec la méthode « gold standard » d'évaluation de l'indice de prolifération par compte manuel sur photo imprimée (K2) et établir sa valeur pronostique.

B. Intérêt de l'étude

Les TNE/CNEp sont des pathologies rares dont l'incidence et la prévalence sont en augmentation constante. Ces tumeurs sont associées à un pronostic variable avec une survie allant de 6 mois à 20 ans (20).

La prise en charge thérapeutique de ces lésions est de plus en plus diversifiée (42) et l'établissement de marqueurs pronostiques fiables et reproductibles est devenu primordial afin d'orienter la prise en charge thérapeutique.

Le potentiel de malignité des TNE/CNEp est aujourd'hui évalué par deux critères : la différenciation tumorale et la capacité proliférative ou grade.

Le grade histologique, basé sur le compte mitotique et/ou l'analyse du Ki67, est le facteur pronostique le plus pertinent, son utilisation est aujourd'hui recommandée au niveau international et il est devenu un élément incontournable dans la prise en charge efficace et adaptée des TNE/CNEp (43). Il a un intérêt pronostique pour la survie sans progression (44).

La mise en place de techniques précises, fiables et reproductibles est donc indispensable à son élaboration.

1. Compte mitotique

Il est défini par l'ENETS et l'OMS que l'indice mitotique doit être déterminé par un compte de mitoses sur au moins 40 champs à fort grossissement (HPF) et que le résultat doit être reporté en nombre de mitose par 2mm².

Il n'existe cependant pas de précision sur la technique à adopter pour effectuer ce compte. En pratique, les mitoses sont comptées sur 5 séquences de 2mm². Les

résultats devant être donnés pour 2mm², il existe deux possibilités de calcul de l'indice mitotique :

- Etablir la moyenne des résultats des séquences
- Ne retenir que la séquence la plus péjorative parmi les différentes séquences analysées

A l'institut de pathologie du CHRU de Lille, l'évaluation de l'indice mitotique est réalisée par compte de mitoses sur au moins 4 séquences de 2mm² au sein des zones les plus mitotiques. Le résultat est secondairement annoncé comme un nombre de mitoses par 2mm² après avoir effectué la moyenne de ces séquences.

L'objectif est donc de valider l'utilisation de cette technique en déterminant sa reproductibilité inter-observateur et sa performance pronostique. Elle sera comparée à la deuxième méthode d'évaluation de l'indice mitotique décrite précédemment.

Plusieurs études ont montré la supériorité de l'indice de prolifération par l'analyse du Ki67 par rapport à l'indice mitotique en terme de fiabilité pronostique et de précision (45)(46)(47)(48).

Parmi les différentes méthodes d'évaluation de l'indice de prolifération, celle par compte manuel sur photos imprimées ressort comme la plus fiable et la plus reproductible (49)(50). Il est donc intéressant de comparer les deux méthodes de compte mitotique à la méthode « gold standard » d'indice de prolifération en évaluant leur concordance et leur fiabilité pronostique.

2. Ki 67

Le Ki67 est l'un des marqueurs de prolifération cellulaire les plus utilisés ces vingt dernières années. Etant déjà largement utilisé comme facteur pronostique dans les tumeurs mammaires et les tumeurs gliales, l'élaboration de l'indice de prolifération par le Ki67 est devenue également une étape indispensable dans l'élaboration d'un compte rendu anatomopathologique des TNE/CNEp. Il est un facteur pronostique majeur dans l'évaluation du risque de récurrence et dans la survie globale des patients présentant un TNE/CNEp (51)(52)(53)(44)(54)(55). Certaines études ont également suggéré que sa valeur prédictive montre, pour les CNEp à haut pouvoir proliférant, une meilleure sensibilité aux chimiothérapies et, pour les TNEp à faible pouvoir proliférant, une meilleure réponse aux biothérapies (56).

L'utilisation du Ki67 est reconnue comme particulièrement utile dans les cas diagnostiques de TNE/CNEp sur biopsie ou cytologie, où les comptes mitotiques sont difficiles voire impossibles et il a été reconnu comme étant un indicateur pronostique significatif (57)(58)(59).

L'évaluation de l'indice de prolifération est importante pour la suite de la prise en charge et du suivi des patients (55)(60) et il est donc indispensable d'utiliser une méthode d'évaluation fiable et reproductible, spécialement pour les tumeurs se situant dans des zones charnières entre différents grades.

De nombreuses études ont permis de décrire et de comparer les différentes façons d'élaborer cet indice de prolifération et il existe encore de nombreux désaccords en ce qui concerne la méthode optimale (1).

La méthode de compte manuel au microscope sur au moins 2000 cellules, proposée par l'ENETS, a déjà été décrite et propose des résultats mitigés. Certaines études présentent cette technique comme difficilement faisable en pratique courante (61),

d'autre la définissent comme acceptable et devant être utilisée de façon standardisée (62)(63). L'estimation globale, sans compte au microscope ou méthode d'« eyeballing » ne semble pas être la méthode adéquate pour l'évaluation du grade qui nécessite, de par sa définition, un compte précis et non une estimation (62)(64).

La méthode ressortant comme la plus reproductible et fiable semble celle du compte manuel sur photo imprimée (49).

Cependant il semble que le plus important dans l'élaboration de cet indice ne serait pas le type de méthode utilisé mais d'être uniforme et précis selon le type de technique utilisée (65).

Au CHRU de Lille, la méthode utilisée pour l'élaboration de l'indice de prolifération, fidèle aux recommandations de l'ENETS, est celle du compte manuel au microscope. L'objectif secondaire de cette étude est donc de démontrer la validité de cette technique en termes de reproductibilité inter-observateur et de comparer ses résultats et sa valeur pronostique à ceux de la méthode par compte manuel sur photo imprimée, considérée comme le « gold standard ».

MATERIELS ET METHODES

I. Sélection des cas

42 patients présentant un ou plusieurs tumeurs/carcinomes neuroendocrines du pancréas diagnostiqués à l'institut de pathologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Lille durant la période de janvier 2005 à janvier 2014 ont été sélectionnés et inclus à l'aide du logiciel DIAMIC dans cette étude rétrospective et monocentrique.

Le diagnostic de ces tumeurs était effectué sur la base d'une analyse morphologique standard, et sur la positivité en analyse immunohistochimique des anticorps anti-chromogranine et/ou anti-synaptophysine.

Les critères d'exclusion étaient la présence d'une tumeur de taille inférieure ou égale à 1cm, et la présence concomitante d'un autre cancer évolutif.

Les données démographiques de chaque patient tel que le sexe et l'âge ont été répertoriées ainsi que la taille tumorale, la présence ou l'absence de nécrose, d'embole vasculaire et l'atteinte ou non des limites chirurgicales.

Le suivi du patient a été répertorié. La durée du suivi était calculée, en mois, du jour de l'intervention chirurgicale au jour de la récurrence, du décès du patient ou des dernières nouvelles. La récurrence était définie comme une évolution par rapport à l'état au jour de l'opération c'est à dire l'apparition de nouvelles métastases, l'augmentation de la taille des métastases connues ou d'une récurrence locale.

II. Evaluation du grade tumoral

Les grades de chaque tumeur, établis par l'indice mitotique et par l'indice de prolifération par le Ki67 étaient évalués en double aveugle par deux pathologistes différents.

Les pièces opératoires avaient été échantillonnées après fixation par le formol tamponné à 10% pendant 12 à 48 heures. Les prélèvements avaient été secondairement inclus en paraffine (bloc d'inclusion). Chaque bloc d'inclusion de tumeur avait été coupé à 4 μm au microtome manuel. Les coupes étaient secondairement étalées sur un film d'eau glycerinée-albuminée sur lame, puis placées sur plaque chauffante. Elles étaient ensuite colorées à l'Hématéine Eosine Safran (HES).

A. L'indice mitotique

Les lames correspondantes aux prélèvements tumoraux représentatifs de la lésion primitive, ont été désarchivées et analysées afin de déterminer les secteurs les plus mitotiques.

Le compte de mitoses était effectué sur les secteurs les plus mitotiques, sur 5 séquences de 7 HPF consécutifs (7HPF = 2mm^2 ; diamètre du champ = 0,62mm). Le temps passé pour cette analyse était chronométré pour les deux opérateurs.

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer le grade sur le compte mitotique :

- La première méthode (M1) consistait à effectuer une moyenne des résultats des comptes des 5 séquences de 7 HPF.

- La deuxième méthode (M2) consistait à ne retenir que la séquence de 7 HPF avec le compte de mitose le plus élevé.

Le résultat était donné sous forme d'un nombre de mitose pour 7HPF ou 2mm².

Les tumeurs dont le compte mitotique était inférieur à 2 mitoses pour 2mm² étaient classées en grade 1. Celles dont le compte mitotique était évalué entre 2 et 20 étaient classées en grade 2 et celles dont le compte mitotique était supérieur à 20 mitoses pour 2mm² étaient classées en grade 3.

B. L'indice de prolifération par l'évaluation immunohistochimique du Ki 67

1. ImmunoHistoChimie

L'étape d'immunohistochimie était réalisée par l'automate du service, de type : Benchmark XT (Ventana Roche). La technique a été menée pour les 42 patients lors d'un même cycle.

Une coupe tissulaire de 4 µm était réalisée à partir du bloc, inclus en paraffine, de tissu tumoral, représentatif de la lésion primitive de chaque patient, ainsi que d'un bloc de tissu appendiculaire, utilisé comme témoin externe.

Chacune de ces coupes (tumorale et appendiculaire) était étalée sur une lame silanée (DakoFlex) et séchée à l'étuve à 56°C pendant 12 heures. Les étapes de déparaffinage, de prétraitement, de blocage de l'activité peroxydase endogène, d'incubation, d'amplification et de révélation étaient automatisées pour l'anticorps

anti-Ki67 (clone Mib-1, dilution 1/50, Dako), permettant d'obtenir des résultats homogènes et d'éviter des erreurs de manipulation.

2. Evaluation de l'indice de prolifération (IP)

L'indice de prolifération a été déterminé selon deux méthodes :

- Evaluation par compte manuel au microscope
- Evaluation par compte manuel sur image imprimée

L'analyse par compte manuel au microscope était effectuée en double aveugle par deux pathologistes indépendants.

L'analyse par compte manuel sur image imprimée était effectuée en aveugle par un pathologiste.

a. Compte manuel au microscope (K1)

Les lames ont initialement été analysées au microscope au faible grossissement afin de déterminer le « Hot Spot », zone de plus forte densité de cellules marquées. Le pourcentage de cellules tumorales marquées, c'est à dire présentant un marquage nucléolaire ou nucléaire diffus de faible à forte intensité, était ensuite déterminé sur un échantillon d'au moins 2000 cellules au fort grossissement. Cette technique était chronométrée.

b. Compte manuel sur image imprimée (K2)

Cette méthode a été évaluée en simple aveugle par un opérateur.

Afin d'obtenir des images exploitables pour le comptage manuel, les lames immunomarquées par l'anticorps anti-Ki67 étaient scannées au grossissement x20 par le scanner de lame de l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille, de type iScan HT Ventana-Roche. Les images numérisées étaient ensuite exploitées via le logiciel Virtuoso fourni par la société Ventana-Roche.

Sur les images numérisées, pour chaque patient, une zone tumorale représentant au moins 2000 cellules tumorales et correspondant à la zone de plus forte densité en cellules marquées (« Hot Spot ») était délimitée grâce à l'outil « sélection de zone » du logiciel Virtuoso.

Sur cette zone, des clichés étaient effectués au grandissement X40 et les images obtenues étaient imprimées sur papier format A4, en couleur. La qualité était suffisante pour permettre une reconnaissance visuelle des cellules tumorales et des cellules non tumorales du stroma.

Seules les cellules tumorales étaient prises en compte. Les cellules tumorales étaient considérées comme positives dès la présence d'un marquage très faible du caryoplasme. Chaque cellule comptée, était cochée par des crayons feutres de couleur différente pour les cellules tumorales et les cellules non tumorales afin de ne pas les prendre en compte plusieurs fois par erreur (Figure 9).

Ce compte manuel était considéré dans notre étude comme la méthode « gold standard » à laquelle était comparée la méthode de compte manuel au microscope.

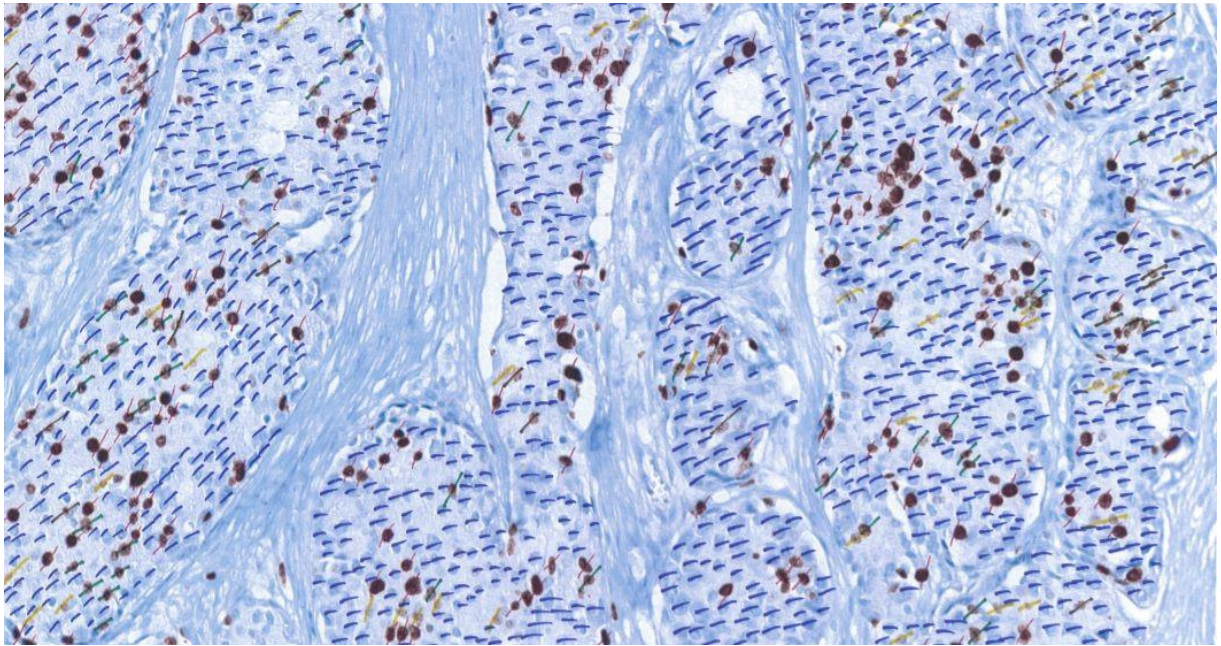


Figure 9 Compte manuel de l'indice de prolifération sur photo imprimée.

III. Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée par l'Unité de Biostatistiques du CHRU de Lille sur le logiciel SAS version 9.4 (Statistical Analysis System).

Les variables continues des caractéristiques cliniques étaient exprimées en moyenne, médiane, et intervalle interquartile. La normalité par le test du Shapiro-Wilk avait été vérifiée.

Concernant les variables qualitatives, elles étaient représentées par l'effectif et le pourcentage.

Pour déterminer la concordance entre les deux méthodes de compte mitotique, la méthode M1 de compte mitotique et la méthode K2 de compte du Ki 67, la méthode M2 de compte mitotique et la méthode K2 de compte du Ki 67 et entre les méthodes K1 et K2 de compte du Ki 67 selon les valeurs numériques, le coefficient de corrélation de Spearman a été analysé.

Pour l'évaluation de la concordance entre les méthodes de compte mitotique et la méthode K2, les moyennes des résultats obtenus entre les deux opérateurs pour les méthodes M1 et M2 étaient utilisées

Pour l'évaluation de la concordance entre la méthode K1 de compte du Ki 67 et la méthode K2, les moyennes des résultats obtenus entre les deux opérateurs pour la méthode K1 étaient utilisées.

Les comparaisons de fréquence entre les grades, items qualitatifs ont été analysées par le test du Khi-deux ou le test du Fisher exact.

La reproductibilité inter-observateur a été calculée au moyen de coefficient de concordance intra-classe. Les valeurs seuils de kappa pondérés sont les suivantes : <0.4 mauvais, entre 0.4 et 0.6 modéré, entre 0.6 et 0.75 bon et >0.75 excellent.

L'analyse de survie sans récurrence a été effectuée en appliquant le test du Log-Rank et en réalisant les courbes de Kaplan Meier.

Une p-value <0.05 était considérée comme statistiquement significative.

Pour l'élaboration de ces courbes de survie, les moyennes des résultats obtenus entre les deux opérateurs étaient utilisées.

RESULTATS

I. Caractéristiques clinico-pathologiques de la population étudiée

Parmi les 42 patients étudiés, 20 (48%) étaient des hommes et 22 (52%) étaient des femmes.

L'âge médian au moment du diagnostic de TNE/CNEp était de 55 ans avec des extrêmes allant de 18 à 85 ans. La taille tumorale médiane au diagnostic était de 3,5 cm avec des extrêmes allant de 1,5 à 14,5 cm. Au moment du diagnostic, 20 patients (48%) présentaient un envahissement ganglionnaire, 22 patients (52%) présentaient des embolies tumorales au sein des vaisseaux péri-tumoraux et 10 patients (24%) présentaient de la nécrose.

Onze patients (26%) présentaient des métastases synchrones à distance. Cinq patients (12%) présentaient un CNEp de morphologie peu différenciée à l'analyse anatomopathologique. Chez 10 patients (24%), les limites chirurgicales étaient atteintes à l'analyse anatomopathologique (résection R1).

Le tableau 1 illustre les principales caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des patients et des TNE/CNEp étudiés.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de la population étudiée

Caractéristique	Nombre (N=42)	%
Sexe	Femme : 22	52
	Homme : 20	48
Age (année) (médiane + écart type)	55 [48 ; 64]	
Taille tumorale (cm) au diagnostic (médiane + écart type)	3,5 [2,5 ; 5,5]	
Emboles vasculaires	22	52
nécrose	10	24
Métastases à distance synchrones	11	26
Métastases ganglionnaires synchrones	20	48
Envahissement des limites chirurgicales	10	24
Différenciation :		
- Bien différencié	37	88
- Peu différencié	5	12

II. Evaluation de l'indice mitotique (IM)

A. Reproductibilité inter-observateur

La moyenne de temps passé pour l'évaluation de l'indice mitotique par le premier opérateur était de 15 minutes par cas. Celle du deuxième opérateur était de 14 minutes par cas.

1. Méthode M1

La première méthode consistait à effectuer une moyenne des résultats des comptes des 5 séquences de 7 HPF.

Avec le compte du premier opérateur (M1OP1), 27 cas étaient classés de grade 1 avec une moyenne de mitose de 0,6 pour 2mm² et avec des extrêmes de 0 à 1,8 pour 2mm². Douze cas, dont 2 peu différenciés étaient classés de grade 2 avec une moyenne de mitose de 7,5 pour 2mm² et avec des extrêmes de 2,2 à 15 pour 2mm². Trois cas peu différenciés étaient classés de grade 3 avec une moyenne de mitose de 54 mitoses pour 2mm² et avec des extrêmes de 20,6 à 96,8 pour 2mm².

Avec le compte du deuxième opérateur (M1OP2), 28 cas étaient classés de grade 1 avec une moyenne de mitose de 0,3 pour 2mm² avec des extrêmes de 0 à 1,8 pour 2mm². Douze cas, dont 3 peu différenciés étaient classés de grade 2 avec une moyenne de mitose de 6,2 pour 2mm² et des extrêmes de 2,2 à 20 pour 2mm². Deux cas peu différenciés étaient classés en grade 3 avec une moyenne de mitose de 53,7 pour 2mm² et des extrêmes de 38,2 à 69,2 pour 2mm² (Tableau 2).

Un patient classé de grade 1 par l'opérateur 1 a été classé de grade 2 par l'opérateur 2. Deux patients classés de grade 2 par l'opérateur 1 ont été classés de grade 1 par l'opérateur 2. Un patient classé grade 3 par l'opérateur 1 a été classé de grade 2 par l'opérateur 2 (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats en grade des indices mitotiques évalués par les deux opérateurs par la méthode M1 (M1OP1 ; M1OP2)

M1OP1	M1OP2			
	G1 <2	G2 2-20	G3 >20	Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes
G1 ; <2	26	1	0	27 0,6 (0; 1,8)
G2 ; 2 - 20	2	10	0	12 7,5 (2,2; 15)
G3 ; >20	0	1	2	3 54 (20,6; 96,8)
Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes	28 0,3 (0 ; 1,8)	12 6,2 (2,2 ; 20)	2 53,7 (38,2 ; 69,2)	42

L'étude statistique effectuée sur les résultats sous forme brute, numérique, de l'analyse des indices mitotiques par la méthode M1 montre un taux de concordance entre les deux opérateurs à 0,94.

L'étude statistique effectuée sur les résultats sous forme de grade, montre un kappa pondéré à 0,83 [0,67 ; 0,99].

2. Méthode M2

La deuxième méthode consistait à ne retenir que la séquence de 7 HPF où le compte de mitose était le plus élevé.

Avec le compte du premier opérateur (M2OP1), 16 cas étaient classés de grade 1 avec une moyenne de mitose de 0,4 pour 2mm^2 et des extrêmes de 0 à 1 pour 2mm^2 . Vingt-trois cas, dont 2 peu différenciés, étaient classés de grade 2 avec une moyenne de mitose de 6,7 pour 2mm^2 et des extrêmes de 2 à 20 pour 2mm^2 . Trois cas peu différenciés étaient classés de grade 3 avec une moyenne de mitose de 69 mitoses pour 2mm^2 et des extrêmes de 34 à 120 pour 2mm^2 .

Avec le compte du deuxième opérateur (M2OP2), 24 cas étaient classés de grade 1 avec une moyenne de mitose de 0,4 pour 2mm^2 et des extrêmes de 0 à 1 pour 2mm^2 . Quinze cas dont 2 peu différenciés étaient classés de grade 2 avec une moyenne de mitose de 6,8 pour 2mm^2 et des extrêmes de 2 à 14 pour 2mm^2 . Trois cas peu différenciés étaient classés en grade 3 avec une moyenne de mitose de 52,7 pour 2mm^2 et des extrêmes de 24 à 87 pour 2mm^2 .

Un patient classé de grade 1 par l'opérateur 1 était classé de grade 2 par l'opérateur 2. Neuf patients de grade 2 par l'opérateur 1 étaient classés de grade 1 par l'opérateur 2 (Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats en grade des indices mitotiques évalués par les deux opérateurs par la méthode M2 (M2OP1 ; M2OP2).

M2OP1	M2OP2			
	G1 <2	G2 2-20	G3 >20	Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes
G1 ; <2	15	1	0	16 0,4 (0 ; 1)
G2 ; 2 - 20	9	14	0	23 6,7 (2 ; 20)
G3 ; >20	0	0	3	3 69 (34 ; 120)
Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes	24 0,4 (0 ; 1)	15 6,8 (2 ; 14)	3 52,7 (24 ; 87)	42

L'étude statistique effectuée sur les résultats sous forme brute, numérique, de l'analyse des indices mitotiques par la méthode M2 montre un taux de concordance entre les deux opérateurs à 0,94.

L'étude statistique effectuée sur les résultats sous forme de grade, montre un kappa pondéré à 0,63 [0,42 ; 0,84].

B. Concordance entre la méthode M1 et la méthode M2

1. Opérateur 1

Onze patients classés de grade 1 par la méthode M1 étaient de grade 2 par la méthode M2 (tableau 4)(Figure 10).

En valeur numérique, les résultats d'indice mitotique obtenus selon la méthode M1 sont concordants avec ceux obtenus selon la méthode M2 ($\rho = 0,98$; $p < 0,0001$).

En grade, les résultats d'indice mitotique obtenus selon la méthode M1 sont concordants avec ceux obtenus selon la méthode M2 ($p < 0,0001$).

Tableau 4 : Résultats en grade des indices mitotiques évalués selon les deux méthodes par l'opérateur 1 (M1OP1 ; M2OP1).

M1OP1	M2OP1			
	G1 <2	G2 2-20	G3 >20	Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes
G1 ; <2	16	11	0	27 0,6 (0 ; 1,8)
G2 ; 2 - 20	0	12	0	12 7,5 (2,2 ; 15)
G3 ; >20	0	0	3	3 54 (20,6 ; 96,8)
Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes	16 0,4 (0 ; 1)	23 6,7 (2 ; 20)	3 69 (34 ; 120)	42

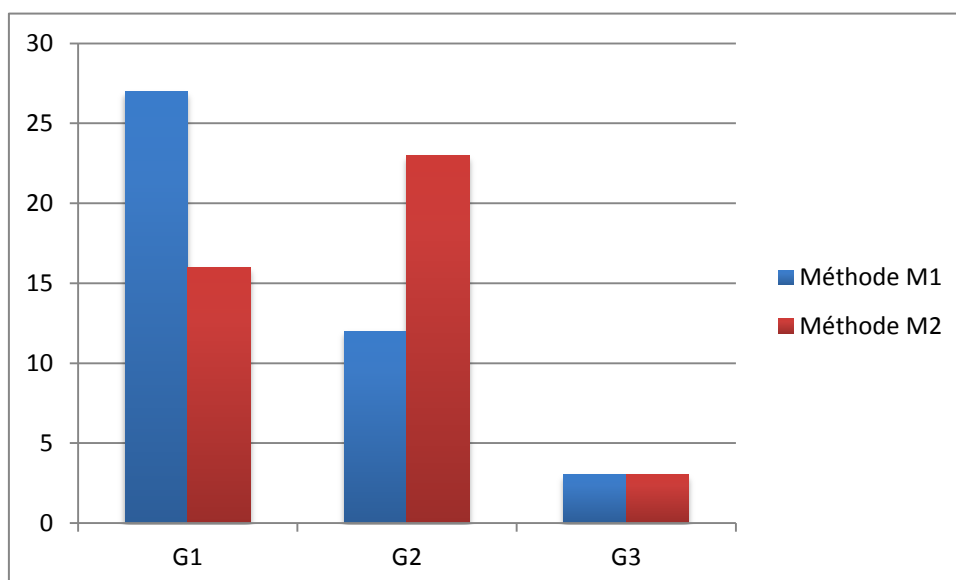


Figure 10 Concordance entre la méthode 1 (M1) et la méthode 2 (M2) de compte mitotique par l'opérateur 1

2. Opérateur 2

Quatre patients classés de grade 1 par la méthode M1 étaient de grade 2 par la méthode M2. Un patient classé de grade 2 par la méthode M1 était de grade 3 par la méthode M2 (tableau 5)(figure 11).

En valeur numérique, les résultats d'indice mitotique obtenus selon la méthode M1 sont concordants avec ceux obtenus selon la méthode M2 ($p = 0,99$; $p < 0,0001$).

En grade, les résultats d'indice mitotique obtenus selon la méthode M1 sont concordants avec ceux obtenus selon la méthode M2 ($p < 0,0001$).

Tableau 5 : Résultats en grade des indices mitotiques évalués selon les deux méthodes par l'opérateur 2 (M1OP2 ; M2OP2).

M1OP2	M2OP2			
	G1 <2	G2 2-20	G3 >20	Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes
G1 ; <2	24	4	0	28 0,3 (0 ; 1,8)
G2 ; 2 – 20	0	11	1	12 6,2 (2,2 ; 20)
G3 ; >20	0	0	2	2 53,7 (38,2 ; 69,2)
Total Nombre Moyenne (mitoses par 2mm ²) + extrêmes	24 0,4 (0 ; 1)	15 6,8 (2 ; 14)	3 52,7 (24 ; 87)	42

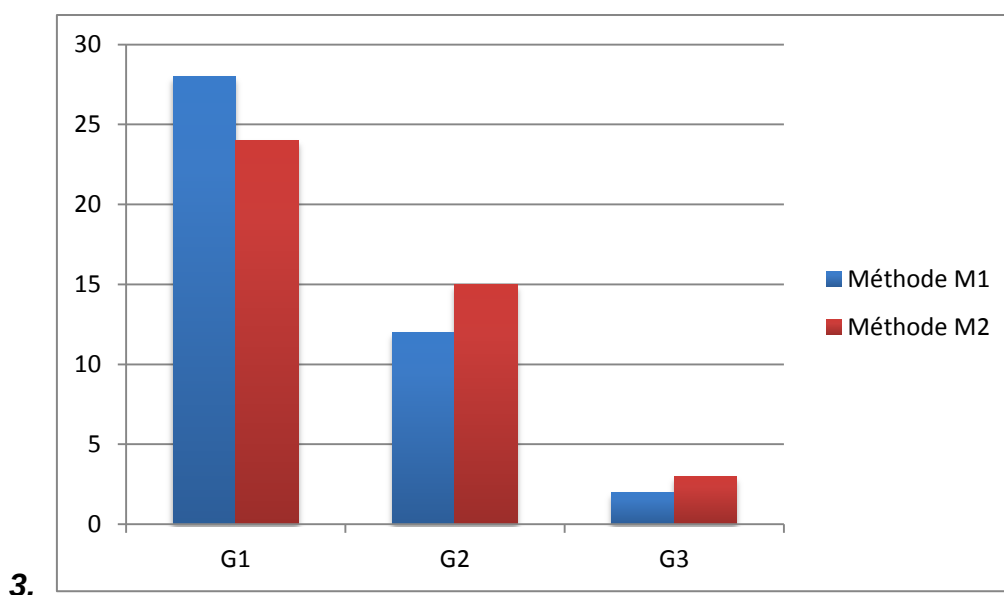


Figure 11 Concordance entre la méthode 1 (M1) et la méthode 2 (M2) de compte mitotique par l'opérateur 2.

C. Concordance entre les méthodes de compte mitotique et la méthode K2 de compte du Ki67

1. Méthode K2

Cette méthode n'a été évaluée que par un simple opérateur, en aveugle.

La moyenne de temps passé à la réalisation de cette méthode, en comprenant les étapes de scan des lames, de sélection des « hot spot », d'impression et de compte, était d'environ 45 minutes par cas.

Sur les 42 patients inclus, 21 (50%) étaient classés de grade 1 avec une moyenne de compte de 1,3% et des extrêmes de 0,1 et 2,9%, 15 (36%) étaient classés de grade 2 avec une moyenne de 9% et des extrêmes de 3,2% et 15,6% et 6 (14%) dont 5 peu différenciés étaient classés de grade 3 avec une moyenne de 44% et des extrêmes de 23,4% et 64%.

2. Concordance entre les méthodes M1 et K2

En valeur numérique, le compte mitotique obtenu selon la méthode M1 en moyenne des deux opérateurs sont concordants avec ceux obtenus par la méthode K2 ($p = 0,72$; $p < 0,0001$).

En grade, ces résultats sont concordants avec les résultats obtenus par compte selon la méthode K2 ($p < 0,0001$).

Sept cas classés de grade 1 selon la méthode M1 du compte de mitose étaient classés de grade 2 selon la méthode K2. Trois cas classés de grade 2 selon la méthode M1 étaient classés de grade 3 selon la méthode K2 (tableau 6)(figure 12).

Tableau 6 : Résultats en grade de la moyenne des indices mitotiques des deux opérateurs par la méthode M1 (M1OP1+2) et des indices de prolifération par la méthode K2

M1OP1 + 2		K2		
Nombre	G1 <3	G2 3-20	G3 >20	Total
G1 ; <2	21	7	0	28
G2 ; 2 – 20	0	8	3	11
G3 ; >20	0	0	3	3
Total	21	15	6	42

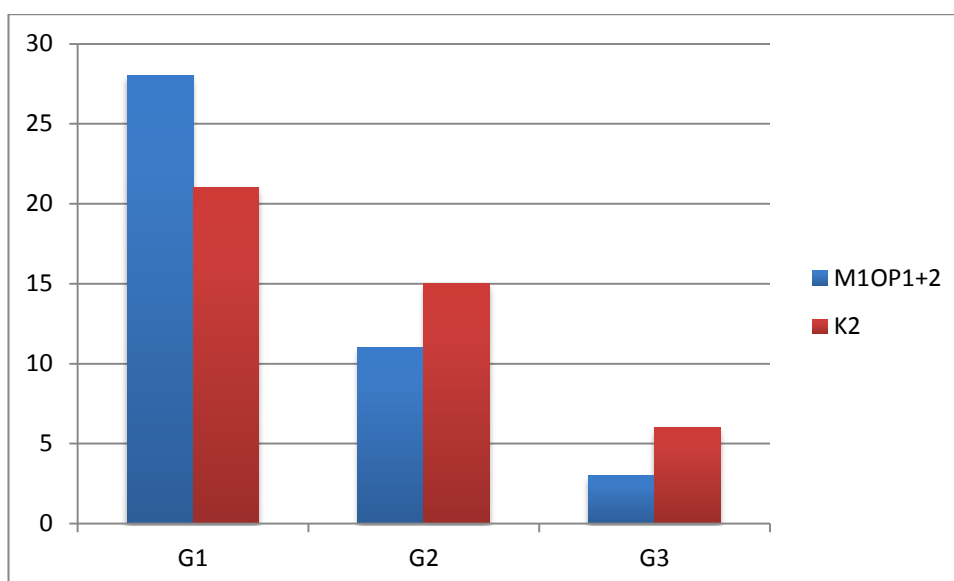


Figure 12 Concordance entre la méthode M1 de compte mitotique et la méthode K2 de compte du Ki67.

3. Concordance entre les méthodes M2 et K2

En valeur numérique, le compte mitotique obtenu selon la méthode M2 en moyenne des deux opérateurs sont concordants avec ceux obtenus par la méthode K2 ($\rho = 0,73$; $p < 0,0001$).

En grade, les résultats obtenus par compte mitotique selon la méthode M2 en moyenne des deux opérateurs sont également concordants avec les résultats obtenus par compte selon la K2 ($p < 0,0001$).

Quatre cas classés de grade 1 selon la méthode M2 du compte de mitose étaient classés de grade 2 selon la méthode K2. Quatre cas classés de grade 2 selon la méthode M2 étaient classés de grade 1 selon la méthode K2 et 3 cas classés de grade 2 selon la méthode M2 étaient classés de grade 3 selon la méthode K2 (tableau 7)(figure13).

Tableau 7 : Résultats en grade de la moyenne des indices mitotiques des deux opérateurs par la méthode M2 (M2OP1 + 2) et des indices de prolifération par la méthode K2

M2OP1 + 2		K2		
Nombre	G1 <3	G2 3-20	G3 >20	Total
G1 ; <2	17	4	0	21
G2 ; 2 - 20	4	11	3	18
G3 ; >20	0	0	3	3
Total	21	15	6	42

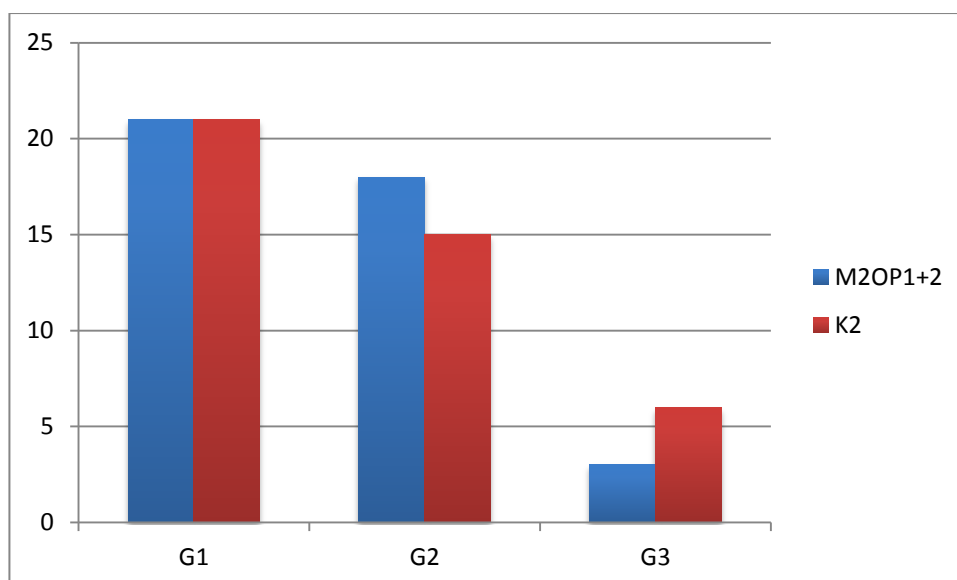


Figure 13 Concordance entre les résultats en grade de la moyenne des indices mitotiques des deux opérateurs par la méthode M2 (M2OP1+2) de compte mitotique et la méthode K2 de compte du Ki67.

D. Courbes de survie sans récidive

1. Méthode M1

Sur les 28 patients classés de grade 1 selon la méthode M1 de compte mitotique en moyenne des résultats obtenus par les deux opérateurs, 4 (14%) ont récidivé. La première récidive a été observée à 31 mois de délai.

Sur les 11 patients classés de grade 2, 8 (73%) ont récidivé. La première récidive a été observée à 9 mois de délai.

Sur les 3 patients classés de grade 3, un seul (33%) a récidivé à 8 mois de délai.

L'évaluation du grade par cette méthode est corrélée aux taux de survie sans récidive des patients ($p = 0.0038$), illustrée par la figure 14.

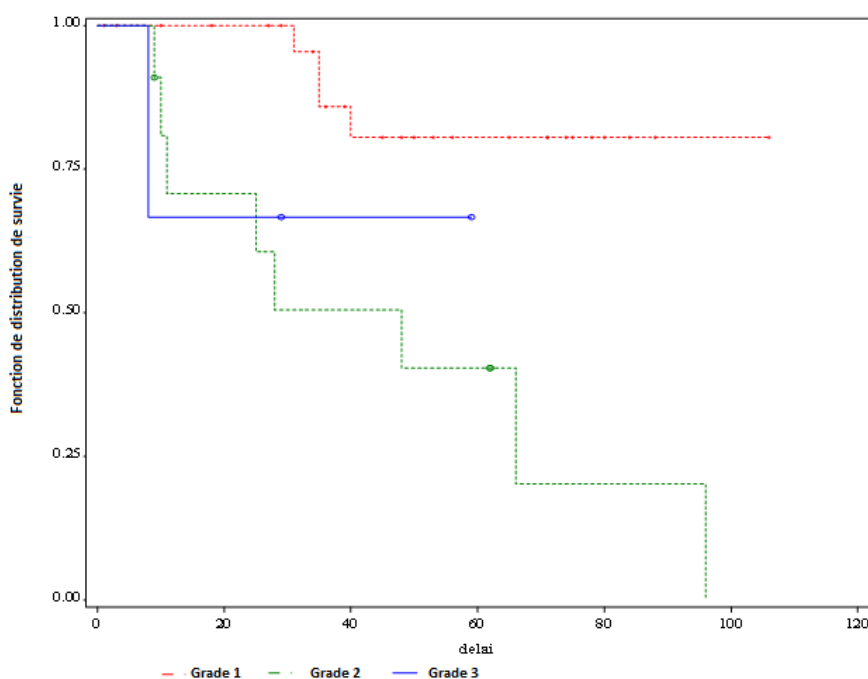


Figure 14 Courbe de survie sans récidive selon les grades évalués par la méthode M1 de compte mitotique.

2. Méthode M2

Sur les 21 patients classés de grade 1 selon la méthode M2 de compte mitotique, en moyenne des résultats obtenus par les deux opérateurs, 3 (14%) ont récidivé. La première récidive a été observée à 31 mois de délai.

Sur les 18 patients classés de grade 2, 9 (50%) ont récidivé. La première récidive a été observée à 9 mois de délai.

Sur les 3 patients classés de grade 3, un seul (33%) a récidivé à 8 mois de délai.

L'évaluation du grade par cette méthode n'est pas significativement corrélée aux taux de survie sans récidive des patients ($p = 0,1046$), illustrée par la figure 15.

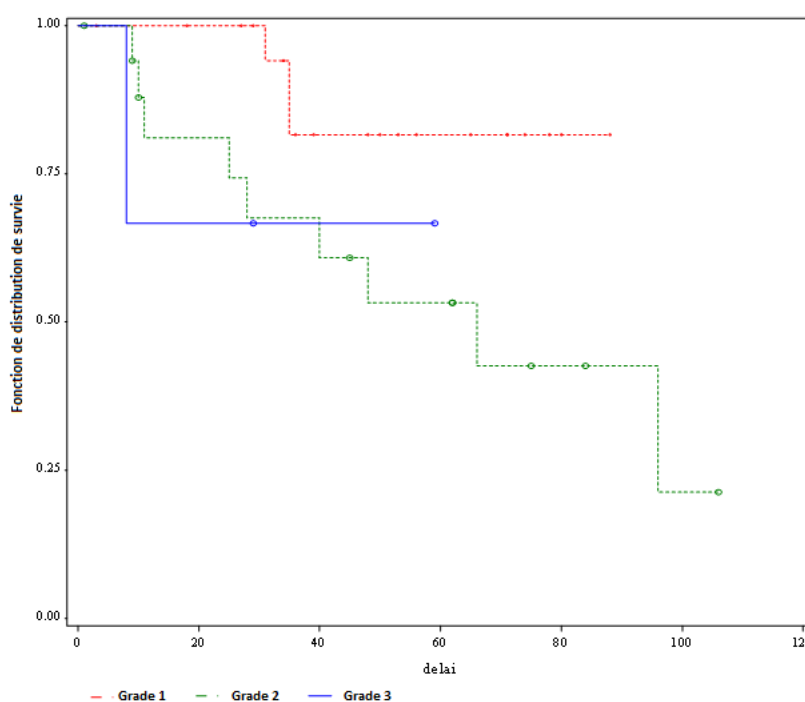


Figure 15 Courbe de survie sans récidive selon les grades évalués par la méthode M2 de compte mitotique.

3. Méthode K2

Sur les 21 patients classés de grade 1 selon la méthode K2 d'évaluation de l'IP, 3 (14%) ont récidivés. La première récurrence a été observée à 31 mois de délai.

Sur les 15 patients classés de grade 2, 6 (40%) ont récidivé. La première récurrence a été observée à 9 mois de délai.

Sur les 6 patients classés de grade 3, 4 (67%) ont récidivé. La première récurrence a été observée à 8 mois de délai.

L'évaluation du grade par cette méthode est corrélée aux taux de survie sans récurrence des patients ($p = 0.0009$), illustrée par la figure 16.

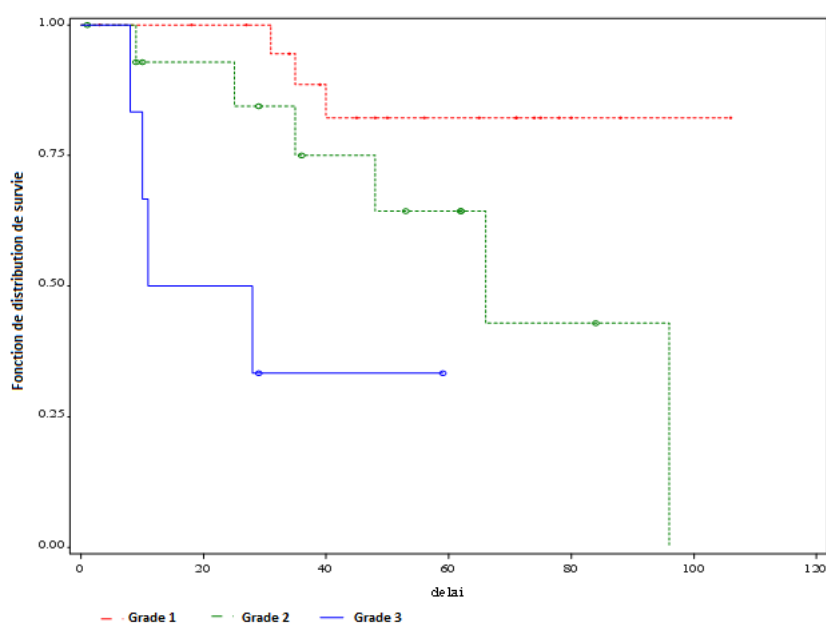


Figure 16 Courbe de survie sans récurrence selon les grades évalués par la méthode K2 de compte du Ki67.

III. Evaluation de l'indice de prolifération (IP) par le Ki67 par compte manuel au microscope (K1)

La moyenne de temps passé pour l'évaluation de l'IP par le premier opérateur était de 12 minutes par cas. Celle du deuxième opérateur était de 10 minutes par cas.

A. Reproductibilité inter-observateur

Avec le compte du premier opérateur (K1OP1), 24 cas (57 %) étaient classés de grade 1 avec une moyenne en pourcentage d'IP de 0,8 % et avec des extrêmes de 0,2 à 1,8 % pour au moins 2000 cellules. Douze cas (29 %) étaient classés de grade 2 avec une moyenne de mitose de 7,4 % et des extrêmes de 2,6 à 11,8 pour au moins 2000 cellules. Six cas (14 %) étaient classés de grade 3 avec une moyenne de mitose de 50 % et des extrêmes de 22 à 75 % pour au moins 2000 cellules.

Avec le compte du deuxième opérateur (K1OP2), 22 cas (52 %) étaient classés de grade 1 avec une moyenne en pourcentage d'IP de 0,9 et des extrêmes de 0,5 à 2 % pour au moins 2000 cellules. Quinze cas (36 %) étaient classés de grade 2 avec une moyenne de 8,3 et des extrêmes de 3,5 à 19 % pour au moins 2000 cellules. Cinq cas étaient classés en grade 3 avec une moyenne de 44,2 % et des extrêmes de 21 à 60 % pour au moins 2000 cellules (Tableau 8).

Deux patients classés de grade 1 par l'opérateur 1 ont été classés de grade 2 par l'opérateur 2. Un patient classé de grade 3 par l'opérateur 1 a été classé de grade 2 par l'opérateur 2 (Tableau 8).

Tableau 8: Résultat en grade des indices de prolifération évalués par la méthode K1 par les deux opérateurs (K1OP1 ; K1OP2).

K1OP1	K1OP2			
	G1 <3	G2 3-20	G3 >20	Total Nombre Moyenne (% de cellules marquées) + extrêmes
G1 ; <3	22	2	0	24 0,8 (0,2 ; 1,8)
G2 ; 3 - 20	0	12	0	12 7,4 (2,6 ; 11,8)
G3 ; >20	0	1	5	6 50 (22 ; 75)
Total Nombre Moyenne (% de cellules marquées) + extrêmes	22 0,9 (0,5 ; 2)	15 8,3 (3,5; 19)	5 44,2 (21 ; 60)	42

L'étude statistique effectuée sur les résultats sous forme brute, numérique de l'analyse des IP par la méthode K1 montre un taux de concordance entre les deux opérateurs à 0,95.

L'étude statistique effectuée sur les résultats sous forme de grade, montre un kappa pondéré à 0,90 [0,79 ; 1].

B. Concordance entre les méthodes K1 et K2

En valeur numérique, les moyennes des résultats des deux opérateurs obtenus par l'évaluation de l'IP selon la méthode K1 sont concordants avec ceux obtenus par la méthode K2 ($p = 0,90$; $p < 0,0001$).

En grade, les moyennes des résultats des deux opérateurs obtenus par l'évaluation de l'IP selon la méthode K1 sont concordantes avec les résultats obtenus par compte selon la méthode K2 ($p < 0,0001$).

Deux cas classés de grade 1 selon la méthode K1 étaient classés de grade 2 selon la méthode K2 d'évaluation du Ki 67. Un cas classé de grade 2 selon la méthode K1 était classé de grade 3 selon la méthode K2 (tableau 9)(figure17).

Tableau 9 : Résultats en grade de la moyenne des indices de prolifération des deux opérateurs par la méthode K1 (K1OP1 + 2) et des indices de prolifération par la méthode K2

K1OP1 + 2		K2		
Nombre	G1 <3	G2 3-20	G3 >20	Total
G1 ; <3	21	2	0	23
G2 ; 3 - 20	0	13	1	14
G3 ; >20	0	0	5	5
Total	21	15	6	42

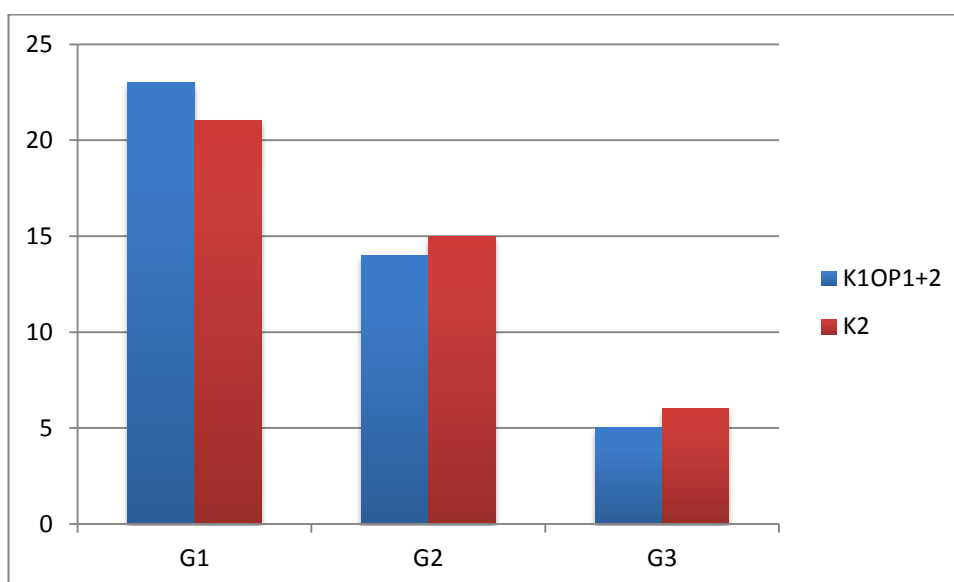


Figure 17 Concordance entre les résultats en grade de la moyenne des indices de prolifération des deux opérateurs par la méthode K1 (K1OP1+2) et la méthode K2 de compte du Ki67.

C. Courbes de survie sans récidive

1. Méthode K1

Sur les 23 patients classés de grade 1 par la méthode K1 d'évaluation de l'IP, 4 (17%) ont récidivé. La première récidive a été observée à 31 mois de délai.

Sur les 14 patients classés de grade 2, 6 (43%) ont récidivé. La première récidive a été observée à 9 mois de délai.

Sur les 5 patients classés de grade 3, 3 (40%) ont récidivé. La première récidive a été observée à 8 mois de délai.

L'évaluation du grade par cette méthode est corrélée aux taux de survie sans récidive des patients ($p = 0.0100$), illustrée par la figure 18.

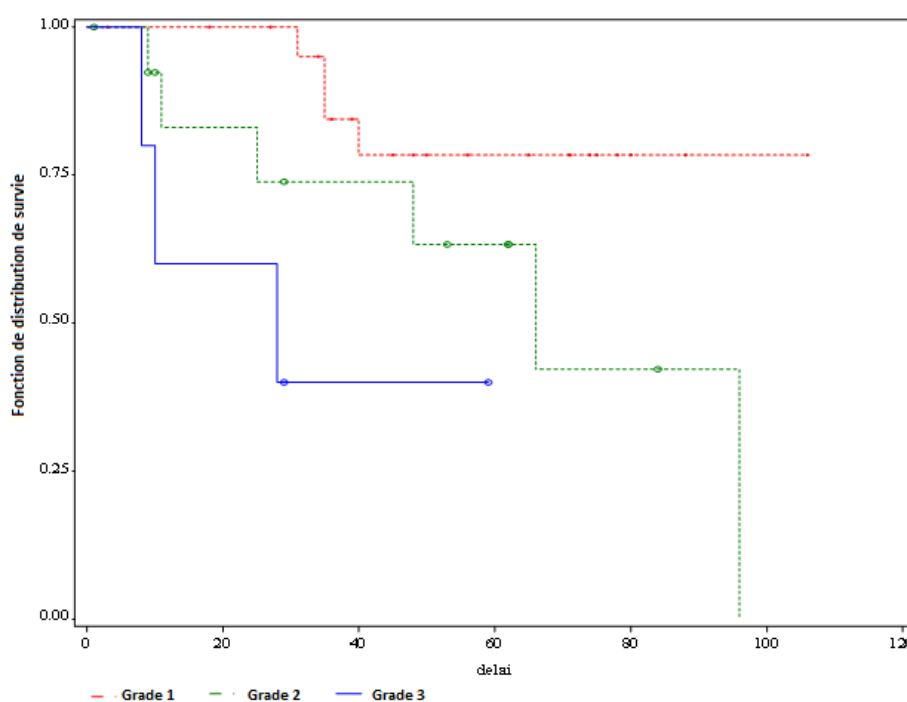


Figure 18 Courbe de survie sans récidive selon les grades évalués par la méthode K1 de compte du Ki 67.

DISCUSSION

I. Evaluation des deux méthodes de compte mitotique

L'objectif principal de cette étude était de comparer deux techniques de compte de mitose dans l'évaluation du grade des TNE/CNEp sur une série de 42 patients, inclus sur la période de janvier 2005 à janvier 2014 au CHRU de Lille.

A. Reproductibilité inter-observateur

Selon nos résultats, les deux méthodes de compte mitotique évaluées sont significativement reproductibles entre les deux opérateurs. Cependant même si la plupart des résultats sont similaires, en utilisant la méthode de grade de l'ENETS, par la méthode M1, 4 patients n'ont pas été classés dans la même catégorie de grade entre les deux opérateurs et par la méthode M2, 10 patients n'ont pas été classés dans la même catégorie de grade entre les deux opérateurs. Ces résultats sont en faveur d'une plus grande reproductibilité de la méthode M1 avec moins de discordances décrites et un kappa pondéré plus élevé.

Les discordances les plus fréquemment rencontrées, toutes méthodes utilisées, concernent les classements dans les catégories de grade 1 et 2 puisqu'elles représentent 3 patients sur 4 selon la méthode M1 et tous les patients selon la méthode M2. Cela met en avant la réelle difficulté des pathologistes à effectuer le compte mitotique sur les TNE/CNEp peu proliférants et à repérer les zones les plus

mitotiques au sein de tous les prélèvements effectués sur la tumeur primitive. Les mitoses sont rares au sein de ces tumeurs peu proliférantes, ce qui diminue le pouvoir discriminatif de l'indice mitotique.

B. Concordance entre les méthodes M1 et M2

Selon nos résultats, les deux méthodes de compte mitotique étaient concordantes en valeurs numériques et en grade.

Cependant, en additionnant les résultats des deux opérateurs, 15 patients classés de grade 1 par la méthode M1 étaient classés de grade 2 par la méthode M2. Entre les deux méthodes, les discordances concernent donc majoritairement les classements dans les catégories de grade 1 et 2.

Un patient classé de grade 2 avec 20 mitoses pour 2mm^2 par la méthode M1 était classé de grade 3 avec 24 mitoses pour 2mm^2 par la méthode M2. Cette tumeur était décrite comme bien différenciée.

Cette discordance met en évidence la difficulté d'établir un grade fiable pour les tumeurs se situant en zone charnière entre grade 2 et grade 3. En comparaison, les autres CNEp de grade 3 de notre étude présentaient en moyenne 62 et 68 mitoses pour 2mm^2 pour les méthodes M1 et M2. Notre étude retrouve donc, comme il l'a déjà été décrit, deux catégories de CNEp : les peu proliférants, souvent bien différenciés, avec un nombre de mitose proche de la valeur seuil avec les grades 2 et les CNEp très proliférants avec un nombre de mitoses très élevé. Certaines études ont montré que ces CNEp peu ou très proliférants auraient un pronostic et des capacités de réponse à la chimiothérapie différents (66)(24).

La méthode M2 établit un indice mitotique plus élevé et donc un résultat plus péjoratif que la méthode M1.

C. Concordance entre les méthodes de compte mitotique et la méthode K2

Selon les méthodes statistiques, les résultats obtenus par les deux méthodes d'évaluation de l'indice mitotique sont concordants avec ceux obtenus par la méthode K2 d'évaluation de l'IP en valeur numérique et en grade.

Cependant en comparant les résultats obtenus par la méthode M1 et ceux par la méthode K2, 10 cas sont discordants, et concernent majoritairement la catégorie de classement G1 et G2 et en comparant les résultats obtenus par la méthode M2 et ceux par la méthode K2, 11 cas sont discordants et concernent également majoritairement la catégorie de classement G1 et G2 (Tableau 6 et 7).

Ces deux méthodes de compte mitotique sont donc comparables et donnent des résultats quasiment similaires avec un seul cas discordant de plus pour la méthode M2.

L'évaluation du grade par l'indice mitotique et l'indice de prolifération sont des méthodes statistiquement comparables. Il existe tout de même quelques discordances et celles-ci majoritairement pour différencier les TNEp de grade 1 de celles de grade 2. Dans notre étude, la méthode K2 donne des résultats plus péjoratifs que les méthodes de compte mitotique et cela de façon plus marqué en comparant avec la méthode M1.

Ces discordances peuvent s'expliquer par la rareté des mitoses au sein de ces tumeurs peu proliférantes, ce qui rend le pouvoir discriminatif de l'indice mitotique moins bon que celui de l'indice de prolifération par le Ki67.

Elles pourraient également remettre en question la pertinence des seuils choisis par l'ENETS pour différencier les grades 1 des grades 2 par l'indice mitotique et par l'indice de prolifération, comme il l'a déjà été fait par de nombreuses études. Certaines en accord avec la définition du grade établie par l'ENETS (67) d'autres ayant déterminé des seuils plus significativement associés à la survie et plus pertinents pour l'évaluation des grades comme *Scarpa et al.* et *Khan et al.* qui définissent le seuil de 5% pour différencier les grades 1 des grades 2 par l'analyse du Ki67 (68)(57)(46).

Pour les deux méthodes de compte mitotique, 3 cas classés de grade 2 avec un nombre moyen de mitose de 12 pour 2mm² étaient reclassés de grade 3 avec un pourcentage de Ki67 moyen de 33% par la méthode K2. Avec l'analyse du Ki67, le nombre de CNEp de grade 3 était multiplié par 2.

Ces résultats sous-entendent une capacité moindre des méthodes de compte mitotique à distinguer les cas de hauts grades comme il l'a été montré dans d'autres études (69).

Cela s'explique par la difficulté technique plus importante pour l'élaboration du l'indice mitotique que pour celui de l'indice de prolifération. En effet, les mitoses sont beaucoup plus difficilement repérables sur une coupe colorée par l'HES que des noyaux marqués par l'anticorps anti-Ki67. Les mitoses prennent un aspect différent en fonction de la phase du cycle dans laquelle la cellule tumorale se trouve et cela participe à la difficulté technique.

Lors d'une mauvaise préservation tissulaire, le compte mitotique sur 40 HPF s'avère très difficile du fait de l'aspect très pycnotique des noyaux. Ceci entraîne un désavantage par rapport au Ki67 dont l'évaluation s'effectue de toute façon sur l'analyse de 2000 cellules dans des zones sélectionnées et non pas sur des champs de cellules. Cela apporte une qualité supérieure de l'analyse de l'IP par rapport à celle du compte mitotique. De plus, l'analyse de l'IP s'effectue au sein de zones de « hot spot » qui sont souvent facile à mettre en évidence, contrairement aux zones riches en mitoses pour l'évaluation du compte mitotique.

Cette discordance s'explique également par le fait que la phase de mitose en elle-même ne représente qu'une petite partie du cycle cellulaire. Le Ki67 s'exprime, quant à lui, au sein des cellules en phase G1 à G2, concernant une plus grande population cellulaire et permettant ainsi d'affiner l'évaluation du pouvoir proliférant d'une tumeur.

De plus en plus de diagnostics de TNE/CNEp sont effectués sur microbiopsies. Sur ces prélèvements de petite taille, il est très souvent impossible de réaliser le compte mitotique, ne pouvant être effectué sur 40 HPF du fait du manque de matériel.

Quelques études récentes sur cytologies ont mis en évidence la fiabilité de l'IP par le Ki67 par rapport à l'indice mitotique évalué par l'anticorps anti-phosphohistone H3 (70)(71).

Dans ces cas, il est aujourd'hui clairement établi que l'IP est la méthode la plus fiable avec la meilleur valeur pronostique (58), autant sur les pièces opératoires que sur les microbiopsies et les cytologies.

Cependant, même si avec la technique d'évaluation manuelle du Ki67 sur photo imprimée le risque est diminué, il est toujours possible de confondre les cellules tumorales avec celles du stroma ou avec les cellules inflammatoires, ce qui conduirait à donner un résultat d'indice de prolifération faussement plus élevé. Le

seuil utilisé pour séparer une tumeur de grade 1 d'une tumeur de grade 2 est tellement bas que quelques cellules peuvent parfois suffire à surévaluer le grade. Une double technique immunohistochimique associant marqueurs neuroendocrines et Ki 67 pourrait s'envisager en pratique courante pour les cas difficiles à classer.

D. Courbes de survie sans récurrence

L'IP par l'évaluation du Ki67 selon la méthode manuelle sur photo imprimée a été montré comme très corrélée au devenir clinique et au pronostic des patients. Certaines études ont montré la supériorité du Ki67 par rapport au compte de mitose en terme de valeur pronostique (46). D'autres études au contraire ont montré une nette concordance entre ces deux méthodes (72).

Même si les courbes de survie sans récurrence semblent comparables entre les deux méthodes de compte mitotique, notre étude a montré que seule la méthode M1 de compte mitotique est corrélée au taux de survie sans récurrence de façon significative.

Nos résultats doivent cependant être interprétés avec prudence et il ne peut y avoir d'affirmation statistique du fait d'un effectif réduit de patients ayant un CNEp de grade 3.

Les deux méthodes de compte mitotique donnent des résultats quasiment comparables en terme de survie avec un cas récidivant en plus pour les TNEp de grade 1 selon la méthode M1 et un cas en plus pour les TNEp de grade 2 selon la méthode M2. Cela s'explique par des résultats plus péjoratifs de l'IM selon la méthode M2.

Les courbes de survies selon les grades évalués par la méthode K2 semblent réparties de façon plus homogène avec une nette différence de pente entre celle représentant les CNEp de grade 3 et celle des TNEp de grade 2.

Selon les méthodes de compte mitotique, les récurrences sont plus nombreuses pour les patients ayant une TNEp de grade 2 que pour les patients ayant un CNEp de grade 3. Certaines tumeurs de grade 2 étaient d'ailleurs peu différenciées. Cela dénonce les limites de l'indice mitotique, qui est moins fiable que l'indice de prolifération pour déterminer les CNEp de grade 3 et relève l'importance de la différenciation tumorale comme marqueur pronostique.

Ces résultats vont dans le sens de la supériorité de la méthode d'analyse de l'IP par compte sur photo imprimée par rapport de l'IM en termes de valeur pronostique. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence et ces différences sont également dues à un effectif réduit de tumeurs de haut grade et ce de façon plus importante avec les méthodes de compte mitotique entraînant un biais dans l'interprétation des résultats. Ce faible effectif de CNEp s'explique par le fait que ces tumeurs de haut grade ne bénéficient que rarement d'un traitement chirurgical.

Ces deux méthodes de compte mitotique pourraient donc être utilisées pour l'élaboration de l'indice mitotique avec une préférence en termes de reproductibilité inter-observateur pour la méthode M1.

L'indice mitotique reste un facteur pronostique fiable, assez rapidement analysable et reproductible. Toutefois, ces capacités discriminatoires sont moins bonnes que celles du Ki67 et cela de façon plus importante en cas de mauvaise préservation tissulaire. De plus en plus de diagnostics de TNE/CNEp sont effectués sur microbiopsies. L'enjeu d'une évaluation exacte et fiable du grade dans ce cas de figure est important car déterminant pour la suite de la prise en charge. Sur ces prélèvements

de petite taille, il est très souvent impossible de réaliser le compte mitotique, ne pouvant être effectué sur 40 HPF du fait du manque de matériel. Dans ces cas, il est aujourd'hui clairement établi que l'IP est la méthode la plus fiable et ayant la meilleure valeur pronostique (58). Cependant, l'interprétation du Ki 67 peut s'avérer difficile dans certains cas de figure tel que la mauvaise fixation tissulaire ou encore en présence de difficultés techniques.

Dans de nombreuses circonstances, le Ki 67 semble être la méthode de choix dans l'élaboration du grade des TNE/CNEp.

II. Evaluation de la méthode d'analyse de l'IP par compte manuel au microscope (K1)

De multiples études comparant les différentes techniques de compte du Ki 67 dans l'élaboration de l'IP ont déjà été menées. La plupart d'entre elles concluent à la supériorité de la méthode de compte manuel sur photo imprimée. La méthode par compte manuel au microscope ressort souvent comme peu concordante et peu reproductible (49).

Dans notre étude, l'analyse de l'IP par compte manuel au microscope est une méthode reproductible. Sa reproductibilité est meilleure que celles des deux méthodes de compte mitotique avec seulement 3 cas discordants.

Elle montre également des résultats très concordants avec ceux de la méthode par compte manuel sur photo imprimée et cela de façon plus importante que ceux des méthodes de comptes mitotiques avec seulement, en additionnant les résultats des deux opérateurs, 5 cas discordants dont 1 cas concernant les grades 2 et 3.

Les courbes de survie correspondant aux deux méthodes de grade par analyse de l'IP sont comparables.

Cette méthode d'évaluation du grade apparaît donc comme supérieure à celle de l'indice mitotique en termes de reproductibilité inter-observateur et de concordance avec la méthode « gold standard ». Elle est également moins longue à effectuer.

Son utilisation en pratique courante se justifie.

La technique par compte manuel sur photo imprimée est largement reconnue comme la plus reproductible et la plus fiable dans la littérature. En 2010, Verbeke a recommandé son utilisation en pratique courante mais sans en expliquer la méthodologie (73). Dans notre expérience, cette technique est longue à effectuer et peu envisageable en pratique courante. Cependant, elle pourrait être utilisée en cas de discordance entre l'IM et l'IP pour trancher et décider du grade final ainsi que pour les cas où les résultats du Ki67 par la méthode de compte au microscope seraient situés autour des valeurs seuils.

CONCLUSION

L'évaluation du compte mitotique dans l'élaboration du grade pronostique des TNE/CNEp est une méthode fiable et reproductible.

Les deux méthodes analysées dans notre étude sont comparables en tous points excepté une meilleure reproductibilité dans l'évaluation du compte mitotique en effectuant la moyenne de 5 séquences de 2mm².

Quelques discordances entre les grades ont été mises en évidence et cela de façon plus marquée pour les faibles grades amenant la question souvent posée de la pertinence des seuils établis de façon arbitraire par l'ENETS dans la définition des grades pronostiques.

Nous avons montré la supériorité de l'IP par compte du Ki 67 par la méthode manuelle au microscope par rapport au compte mitotique en termes de reproductibilité, de temps passé à l'analyse et de concordance avec la méthode « gold standard » par compte du Ki67 sur photo imprimée.

Du fait de réelles difficultés pour l'élaboration de l'indice mitotique dans certains cas tels que sur prélèvements biopsiques ou lors d'une mauvaise préservation tissulaire, la question de son intérêt par rapport à l'indice de prolifération par le Ki 67 est à aborder.

Aujourd'hui la pratique courante dans l'élaboration du grade des TNE/CNEp privilégie l'analyse du Ki67 qui, par de nombreuses études, a été démontré comme un facteur pronostique supérieur au compte mitotique. En cas de situation de discordance entre les deux techniques, la valeur de l'IP est souvent retenue dans l'élaboration du

grade. L'analyse par compte manuel sur photo imprimée du Ki67 est difficilement utilisable en pratique car très longue à réaliser et nécessitant un matériel encombrant et coûteux.

L'analyse seule de l'IP par évaluation du Ki67, lorsque celle-ci est possible, selon la méthode de compte manuel au microscope est donc justifiée et cela aussi bien sur pièce opératoire, sur biopsie que sur cytologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Klimstra DS, Modlin IR, Adsay NV, Chetty R, Deshpande V, Gönen M, et al. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: application of the Delphic consensus process to the development of a minimum pathology data set. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):300–13.
2. Scoazec J-Y, Couvelard A. Tumeurs neuroendocrines du tube digestif et du pancréas : ce que le pathologiste doit savoir et doit faire en 2014. *Ann Pathol*. 2014 Feb;34(1):40–50.
3. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*. 2008 Jan;9(1):61–72.
4. Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, Svejda B, Kidd M, Modlin IM. The Epidemiology of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011 Mar;40(1):1–18.
5. Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol*. 2008 Oct;19(10):1727–33.
6. Pape U-F, Böhmig M, Berndt U, Tiling N, Wiedenmann B, Plöckinger U. Survival and Clinical Outcome of Patients with Neuroendocrine Tumors of the Gastroenteropancreatic Tract in a German Referral Center. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr 1;1014(1):222–33.
7. O'Connor TP, Wade TP, Sunwoo YC, Reimers H-J, Palmer DC, Silverberg AB, et al. Small cell undifferentiated carcinoma of the pancreas. Report of a patient with tumor marker studies. *Cancer*. 1992 Sep 15;70(6):1514–9.
8. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*. 2003 Feb 15;97(4):934–59.
9. Caldarella A, Crocetti E, Paci E. Distribution, incidence, and prognosis in neuroendocrine tumors: a population based study from a cancer registry. *Pathol Oncol Res*. 2011 Sep;17(3):759–63.
10. Niederle MB, Hackl M, Kaserer K, Niederle B. Gastroenteropancreatic

- neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Dec 1;17(4):909–18.
11. Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, Svejda B, Kidd M, Modlin IM. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011 Mar;40(1):1–18, vii.
 12. Ito T, Sasano H, Tanaka M, Osamura RY, Sasaki I, Kimura W, et al. Epidemiological study of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in Japan. *J Gastroenterol*. 2010 Feb;45(2):234–43.
 13. Perez EA, Koniaris LG, Snell SE, Gutierrez JC, Sumner WE, Lee DJ, et al. 7201 carcinoids: increasing incidence overall and disproportionate mortality in the elderly. *World J Surg*. 2007 May;31(5):1022–30.
 14. Hauso O, Gustafsson BI, Kidd M, Waldum HL, Drozdov I, Chan AKC, et al. Neuroendocrine tumor epidemiology: contrasting Norway and North America. *Cancer*. 2008 Nov 15;113(10):2655–64.
 15. Lepage C, Bouvier AM, Phelip JM, Hatem C, Vernet C, Faivre J. Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population. *Gut*. 2004 Apr;53(4):549–53.
 16. Sundin A, Vullierme M-P, Kaltsas G, Plöckinger U. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Radiological Examinations. *Neuroendocrinology*. 2009;90(2):167–83.
 17. Kwekkeboom DJ, Krenning EP, Scheidhauer K, Lewington V, Lebtahi R, Grossman A, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Somatostatin Receptor Imaging with (111)In-pentetreotide. *Neuroendocrinology*. 2009;90(2):184–9.
 18. Bosman FT, International Agency for Research on Cancer, editors. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon: IARC; 2010. 417 p. (World Health Organization classification of tumours).
 19. Davies K. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Curr Gastroenterol Rep*. 2009 Mar 14;11(2):119–27.
 20. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One Hundred Years After “Carcinoid”: Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 20;26(18):3063–72.

21. Halfdanarson TR, Rubin J, Farnell MB, Grant CS, Petersen GM. Pancreatic endocrine neoplasms: Epidemiology and prognosis of pancreatic endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Jun;15(2):409–27.
22. Basturk O, Yang Z, Tang LH, Hruban R, McCall C, Adsay V, et al. Increased (> 20%) ki67 proliferation index in morphologically well differentiated pancreatic neuroendocrine tumors (PanNETs) correlates with decreased overall survival. *Mod Pathol*. 2013 Feb 1;26(Suppl. 2):423A.
23. Vélayoudom-Céphise F-L, Duvillard P, Foucan L, Hadoux J, Chougnet CN, Leboulleux S, et al. Are G3 ENETS neuroendocrine neoplasms heterogeneous? *Endocr Relat Cancer*. 2013 Oct 1;20(5):649–57.
24. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermarck LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol*. 2013 Jan;24(1):152–60.
25. Falconi M, Bartsch DK, Eriksson B, Klöppel G, Lopes JM, O'Connor JM, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Neoplasms of the Digestive System: Well-Differentiated Pancreatic Non-Functioning Tumors. *Neuroendocrinology*. 2012;95(2):120–34.
26. Klöppel G, Couvelard A, Perren A, Komminoth P, McNicol A-M, Nilsson O, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Towards a Standardized Approach to the Diagnosis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Their Prognostic Stratification. *Neuroendocrinology*. 2009;90(2):162–6.
27. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010 Feb 24;17(6):1471–4.
28. College of american pathologists. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Tumors of the Endocrine Pancreas [Internet]. 2016. Available from:
<http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/cp-pancreasendo-16protocol-3300.pdf>
29. Adsay NV, Bagci P, Tajiri T, Oliva I, Ohike N, Balci S, et al. Pathologic staging of pancreatic, ampullary, biliary, and gallbladder cancers: pitfalls and practical limitations of the current AJCC/UICC TNM staging system and opportunities for improvement.

Semin Diagn Pathol. 2012 Aug;29(3):127–41.

30. Saka B, Oliva I, Bandyopadhyay S, Basturk O, Balci S, Maithel S, et al. Will the pT1 and pT2 pancreas cancer please stand up? “Peripancreatic soft tissue” is involved in most pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC), negating its value as a staging parameter and necessitating a new staging scheme. *Lab Invest*. 2014 Feb 1;94(Suppl. 1):454A.

31. Saka B, Balci S, Bagci P. Proposal for a New and Prognostically Valuable Tumor Size Based T-Stage for Pancreatic Adenocarcinoma. *Modern Pathology*. 2014;(27):453A.

32. Ekeblad S, Skogseid B, Dunder K, Oberg K, Eriksson B. Prognostic Factors and Survival in 324 Patients with Pancreatic Endocrine Tumor Treated at a Single Institution. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 1;14(23):7798–803.

33. Fischer L, Kleeff J, Esposito I, Hinz U, Zimmermann A, Friess H, et al. Clinical outcome and long-term survival in 118 consecutive patients with neuroendocrine tumours of the pancreas. *Br J Surg*. 2008 May;95(5):627–35.

34. La Rosa S, Klersy C, Uccella S, Dainese L, Albarello L, Sonzogni A, et al. Improved histologic and clinicopathologic criteria for prognostic evaluation of pancreatic endocrine tumors. *Hum Pathol*. 2009 Jan;40(1):30–40.

35. Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, et al. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2007 Oct;451(4):757–62.

36. Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*. 2006 Oct;449(4):395–401.

37. Hill JS, McPhee JT, McDade TP, Zhou Z, Sullivan ME, Whalen GF, et al. Pancreatic neuroendocrine tumors: the impact of surgical resection on survival. *Cancer*. 2009 Feb 15;115(4):741–51.

38. Zerbi A, Capitanio V, Boninsegna L, Pasquali C, Rindi G, Fave GD, et al. Surgical treatment of pancreatic endocrine tumours in Italy: results of a prospective multicentre study of 262 cases. *Langenbecks Arch Surg*. 2010 Sep 21;396(3):313–21.

39. Partelli S, Gaujoux S, Boninsegna L, et al. Pattern and clinical predictors of lymph node involvement in nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors (nf-pannets). *JAMA Surg*. 2013 Oct 1;148(10):932–9.

40. Pavel M, Baudin E, Couvelard A, Krenning E, Öberg K, Steinmüller T, et al. ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology*. 2012;95(2):157–76.
41. Cadiot G, Baudin E, Couvelard A. Tumeurs neuroendocrines digestives. *Thésaurus Natl Cancérologie Dig*. 2016 Mar;
42. Khan MS, Caplin ME. Therapeutic management of patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Oct 1;18(S1):S53–74.
43. Ramage JK, Ahmed A, Ardill J, Bax N, Breen DJ, Caplin ME, et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours (NETs). *Gut*. 2012 Jan;61(1):6–32.
44. Dhall D, Mertens R, Bresee C, Parakh R, Wang HL, Li M, et al. Ki-67 proliferative index predicts progression-free survival of patients with well-differentiated ileal neuroendocrine tumors. *Hum Pathol*. 2012 Apr;43(4):489–95.
45. Sorbye H, Strosberg J, Baudin E, Klimstra DS, Yao JC. Gastroenteropancreatic high-grade neuroendocrine carcinoma: Neuroendocrine Carcinoma. *Cancer*. 2014 Sep 15;120(18):2814–23.
46. Khan MS, Luong TV, Watkins J, Toumpanakis C, Caplin ME, Meyer T. A comparison of Ki-67 and mitotic count as prognostic markers for metastatic pancreatic and midgut neuroendocrine neoplasms. *Br J Cancer*. 2013 May 14;108(9):1838–45.
47. McCall CM, Shi C, Cornish TC, Klimstra DS, Tang LH, Basturk O, et al. Grading of Well-differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors Is Improved by the Inclusion of Both Ki67 Proliferative Index and Mitotic Rate. *Am J Surg Pathol*. 2013 Nov;37(11):1671–7.
48. Van Velthuysen M-LF, Groen EJ, van der Noort V, van de Pol A, Tesselaar MET, Korse CM. Grading of Neuroendocrine Neoplasms: Mitoses and Ki-67 both Essential. *Neuroendocrinology*. 2014 Oct 25;
49. Reid MD, Bagci P, Ohike N, Saka B, Seven IE, Dursun N, et al. Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative analysis of four counting methodologies. *Mod Pathol*. 2015 May;28(5):686–94.
50. Reid MD, Balci S, Saka B, Adsay NV. Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocr Pathol*. 2014 Mar;25(1):65–79.

51. Jamali M, Chetty R. Predicting Prognosis in Gastroentero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors: An Overview and the Value of Ki-67 Immunostaining. *Endocr Pathol*. 2008 Dec;19(4):282–8.
52. Hamilton NA, Liu T-C, Cavatiao A, Mawad K, Chen L, Strasberg SS, et al. Ki-67 predicts disease recurrence and poor prognosis in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Surgery*. 2012 Jul;152(1):107–13.
53. Boninsegna L, Panzuto F, Partelli S, Capelli P, Delle Fave G, Bettini R, et al. Malignant pancreatic neuroendocrine tumour: lymph node ratio and Ki67 are predictors of recurrence after curative resections. *Eur J Cancer*. 2012 Jul;48(11):1608–15.
54. Panzuto F. Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: comparison between gastrointestinal and pancreatic localization. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Dec 1;12(4):1083–92.
55. Strosberg JR, Cheema A, Weber J, Han G, Coppola D, Kvols LK. Prognostic validity of a novel American Joint Committee on Cancer Staging Classification for pancreatic neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 1;29(22):3044–9.
56. Palazzo M, Lombard-Bohas C, Cadiot G, Matysiak-Budnik T, Rebours V, Vullierme M-P, et al. Ki67 proliferation index, hepatic tumor load, and pretreatment tumor growth predict the antitumoral efficacy of lanreotide in patients with malignant digestive neuroendocrine tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Feb;25(2):232–8.
57. Scarpa A, Mantovani W, Capelli P, Beghelli S, Boninsegna L, Bettini R, et al. Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients. *Mod Pathol*. 2010 Jun;23(6):824–33.
58. Yang Z, Tang LH, Klimstra DS. Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *Am J Surg Pathol*. 2011 Jun;35(6):853–60.
59. Hasegawa T, Yamao K, Hijioka S, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, et al. Evaluation of Ki-67 index in EUS–FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endoscopy*. 2013 Nov 11;46(01):32–8.
60. Strimpakos AS, Syrigos KN, Saif MW. Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Role of Novel Agents. *JOP*. 2011 Mar 9;12(2):117–9.

61. Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, et al. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2007 Oct;451(4):757–62.
62. Tang LH, Gonen M, Hedvat C, Modlin IM, Klimstra DS. Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol*. 2012 Dec;36(12):1761–70.
63. Remes SM, Tuominen VJ, Helin H, Isola J, Arola J. Grading of Neuroendocrine Tumors With Ki-67 Requires High-quality Assessment Practices: *Am J Surg Pathol*. 2012 Sep;36(9):1359–63.
64. Young HTM, Carr NJ, Green B, Tilley C, Bhargava V, Pearce N. Accuracy of visual assessments of proliferation indices in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *J Clin Pathol*. 2013 May 23;jclinpath – 2012–201217.
65. Goodell PP, Krasinskas AM, Davison JM, Hartman DJ. Comparison of Methods for Proliferative Index Analysis for Grading Pancreatic Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors. *Am J Clin Pathol*. 2012 Apr 1;137(4):576–82.
66. Basturk O, Tang L, Hruban RH, Adsay NV, Yang Z, Krasinskas AM, et al. POORLY DIFFERENTIATED NEUROENDOCRINE CARCINOMAS OF THE PANCREAS: A CLINICOPATHOLOGIC ANALYSIS OF 44 CASES. *Am J Surg Pathol*. 2014 Apr;38(4):437–47.
67. Pape U, Jann H, Müller- Nordhorn J, Bockelbrink A, Berndt U, Willich SN, et al. Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2008 Jul 15;113(2):256–65.
68. Pelosi G, Bresaola E, Bogina G, Pasini F, Rodella S, Castelli P, et al. Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables. *Hum Pathol*. 1996 Nov;27(11):1124–34.
69. Kroneman TN, Voss JS, Lohse CM, Wu T-T, Smyrk TC, Zhang L. Comparison of Three Ki-67 Index Quantification Methods and Clinical Significance in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Endocr Pathol*. 2015 Jun 14;
70. Fung AD, Cohen C, Kavuri S, Lawson D, Gao X, Reid MD. Phosphohistone H3 and Ki-67 labeling indices in cytologic specimens from well-differentiated neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas: a comparative

analysis using automated image cytometry. *Acta Cytol.* 2013;57(5):501–8.

71. Farrell JM, Pang JC, Kim GE, Tabatabai ZL. Pancreatic neuroendocrine tumors: accurate grading with Ki-67 index on fine-needle aspiration specimens using the WHO 2010/ENETS criteria. *Cancer Cytopathol.* 2014 Oct;122(10):770–8.

72. Strosberg J, Nasir A, Coppola D, Wick M, Kvols L. Correlation between grade and prognosis in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Hum Pathol.* 2009 Sep;40(9):1262–8.

73. Verbeke C. Endocrine tumours of the pancreas. *Histopathology.* 2010 May 1;56(6):669–82.

AUTEUR : SCHERMAN Laurine

Date de Soutenance : Vendredi 13 mai 2016

Titre de la Thèse : Etude comparative de deux méthodes d'évaluation du compte mitotique et de l'analyse du Ki 67 dans l'élaboration du grade des tumeurs/carcinomes neuroendocrines du pancréas : reproductibilité inter-observateur, concordance et valeur pronostique

Thèse - Médecine - Lille 2016

Cadre de classement : DES Anatomie et Cytologie Pathologiques

Mots-clés : Tumeur / Carcinome neuroendocrines du pancréas, grade, indice mitotique, compte mitotique, indice de prolifération, Ki 67,

Résumé :

Contexte : Les tumeurs/carcinomes neuroendocrine du pancréas (TNE/CNEp) sont des pathologies rares dont l'incidence est en augmentation et dont le pronostic est variable. Leur potentiel de malignité est aujourd'hui évalué par leur capacité proliférative. L'objectif est de comparer deux méthodes de compte mitotique et une méthode de compte manuel du Ki 67 dans la détermination du grade des TNE/CNEp en établissant leur reproductibilité inter-observateur, leur concordance et leur valeur pronostique et en les comparant à la méthode « gold standard » de compte du Ki67 sur photo imprimée.

Méthode : Le compte mitotique sur 42 tumeurs primitives du pancréas a été effectué selon deux méthodes et l'indice de prolifération par le Ki67 a été évalué par compte manuel au microscope et sur photo imprimée après numérisation. Les techniques ont été chronométrées. Les concordances ont été analysées selon le coefficient de Spearman et le test du Fisher exact et la reproductibilité inter-observateur selon le kappa pondéré. Les courbes de survie sans récurrence, analysées par le test du Log-Rank, étaient effectuées en fonction du grade par les 2 méthodes de compte mitotique et de compte du Ki67.

Résultats : Les deux méthodes de compte mitotique (M1 et M2) qui nécessitent en moyenne une analyse de 15 minutes, sont reproductibles en inter-observateur (kappa pondéré à 0,83 [0,67 ; 0,99] pour M1; 0,63 [0,42 ; 0,84] pour M2). Elles sont concordantes entre elles ($p = 0,98$; $p < 0,0001$) et avec la méthode d'analyse du Ki67 sur photo imprimée ($p = 0,72$; $p < 0,0001$). Seulement l'une des méthodes est corrélée au taux de survie sans récurrence ($p = 0,0038$ pour M1; $p = 0,1046$ pour M2). La méthode de compte manuel du Ki67, qui nécessite en moyenne une analyse de 12 minutes, est reproductible (kappa pondéré à 0,90 (0,79 ; 1)), concordante avec la méthode d'analyse sur photo imprimée ($p = 0,90$; $p < 0,0001$) et corrélées au taux de survie sans récurrence ($p = 0,0100$). En comparant avec le gold standard, les discordances entre les grades sont moins importantes avec la méthode de compte du Ki67 qu'avec celles de compte mitotique.

Conclusion : Ces méthodes d'analyse de l'indice mitotique et de l'indice de prolifération (IP) par le Ki67 sont fiables dans l'élaboration du grade des TNE/CNEp. L'analyse du Ki67 sur compte au microscope est supérieure au compte mitotique en termes de reproductibilité, concordance et valeur pronostique et est moins longue à effectuer. L'analyse seule de l'IP selon la méthode de compte manuel au microscope se justifie.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Sébastien AUBERT

Assesseurs : Monsieur le Professeur Bruno CARNAILLE

Mme le Docteur Christine DO CAO

Directeur : Mme le Professeur Emmanuelle LETEUTRE