

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je remercie le **Tout Puissant ALLAH**, le Très Miséricordieux, le Tout Miséricordieux (Celui qui donne des bénédictions et de la prospérité à tous les êtres sans montrer de différence) pour nous avoir assisté tout au long de ces quatre années de formation.

A notre prophète MOHAMED Paix et Salut sur Lui

« Oh Dieu accorde ta bénédiction et ton Salut, à notre Seigneur Mouhammad ; qui a ouvert ce qui était clos ; qui a clos ce qui a précédé ; le défenseur de la vérité par la vérité ; le Guide du Droit chemin ; ainsi qu'à sa noble famille ; suivant sa valeur et l'estimation de son ultime dignité »

Puisse ALLAH nous éclairer dans sa lumière divine, Amin.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à mes parents (père, mère, oncles et tantes) pour leur soutien, leur contribution et leur patience, ainsi qu'à mes proches, ami(e)s et collègues.

A sœur Mariam, notre complicité a toujours été une fierté pour moi. En plus d'être une sœur tu es aussi une fidèle amie. Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers toi.

A notre maître, madame la professeure

CHBANI LAÏLA

J'ai eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et j'ai trouvé auprès de vous la conseillère qui nous a reçu en toutes circonstances avec sympathie, sourire et bienveillance. Vos compétences professionnelles incontestables ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous. Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.

Vous resterez toujours à mes yeux, cette brillante professeure d'anatomie pathologique s'exprimant avec aisance et qui est très généreuse dans la transmission de son savoir aux étudiants. Votre porte est toujours ouverte pour nous accueillir, et nous faire profiter de votre Savoir. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma sincère gratitude.

Puisse Dieu Tout-Puissant vous accorder prospérité, bonheur et santé.

A notre maître, madame la professeure

EL FATEMI HINDE

Merci de m'avoir reçu au sein de votre prestigieux service Cher Maître. Nul mot ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond respect et la considération que j'ai pour vous. Je suis très touché par votre extrême courtoisie et le dévouement avec lequel vous m'aviez encadré tout au long de cette formation. Votre culture scientifique, votre compétence, vos qualités humaines et votre disponibilité ont suscité en nous une grande admiration et sont pour vos élèves un exemple à suivre. Vous avez guidé nos pas et illuminé notre chemin vers le savoir. J'ai trouvé auprès de vous la conseillère et le guide. Je vous adresse mes plus sincères remerciements et vous assure de mon profond respect. Puisse Dieu Tout-Puissant vous accorder prospérité, bonheur et santé.

A notre maître, madame la professeure

HAMMAS NAWAL

Votre compétence, votre dynamisme, votre modestie, votre rigueur, et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en nous une grande admiration et un profond respect. Nous tenons à vous exprimer notre haute estime, et profonde Reconnaissance. Veuillez accepter, cher maître, dans ce travail nos sincères remerciements et toute la reconnaissance que nous vous témoignons. Puisse Dieu Tout-Puissant vous accorder prospérité, bonheur et santé.

Sommaire

I.	Introduction	13
II.	Rappel histologique :.....	13
1.	Le système neuroendocrinien :.....	13
2.	Structure :.....	14
3.	Fonctions :.....	16
4.	Caractéristiques anatomopathologiques :.....	18
b.	Immunohistochimie	22
III.	Historique:.....	27
IV.	Objectifs de l'étude :.....	29
V.	MATERIELS ET METHODES	30
1.	Etude épidémiologique :.....	30
2.	Etude anatomopathologique :.....	31
2.1.	Etude histologique :.....	31
3.	Evaluation du grade tumoral :.....	39
3.1.	L'index mitotique :.....	39
3.2.	L'index de prolifération Ki67	39
4.	Etude statistique	42
VI.	RESULTATS	44
1.	Caractéristiques clinico-pathologiques des patients :.....	44
1.1.	Répartition selon l'âge :.....	45
1.2.	Répartition selon le sexe :.....	46
1.3.	Répartition selon le siège de la tumeur primitive :.....	46
1.4.	Répartition selon le stade de différenciation :.....	47

CONCORDANCE ENTRE L'INDEX MITOTIQUE ET LE KI67 DANS L'ELABORATION DU GRADE HISTOPRONOSTIQUE
DES TUMEURS NEUROENDOCRINES DIGESTIVES AU SERVICE ANATOMO-PATHOLOGIQUE DU CHU HASSAN II DE FES
A PROPOS DE 50 CAS

1.5.	Les métastases :	48
1.6.	Les envahissements :	49
2.	Evaluation de l'index de prolifération par le Ki67 et par le compte mitotique .	49
2.1.	Répartition selon l'évaluation par Ki67 :	49
2.2.	Répartition selon l'évaluation par le compte mitotique :	50
2.3.	Concordance entre l'index mitotique et Ki67 :	51
VII.	Discussions	55
1.	Caractéristiques clinico-pathologiques des patients :	55
1.1.	Caractéristiques cliniques:	55
1.1.1.	Les tumeurs neuroendocrines digestives fonctionnelles :	55
1.1.2.	Les TNE digestives non fonctionnelles :	59
1.1.	Age :	60
1.2.	Sexe :	60
1.3.	Le siège de la tumeur primitive :	61
1.4.	Le stade de différenciation :	61
1.5.	Les métastases :	61
1.6.	Les embolies vasculaires :	62
2.	Evaluation de l'index de prolifération par le Ki67 et par le compte mitotique :	62
VIII.	Conclusion et recommandations	64
	Références bibliographiques	65

Liste des abréviations

ACTH	Adreno CorticoTrophic Hormone
AJCC	American Joint Commitee on Cancer
APUD	Amine Precursor and Uptake
CFG	Champ au fort grossissement
CGRP	Calcitonin Gene-related Peptide
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CNE	Carcinome neuroendocrine
CNEd	Carcinome neuroendocrine digestif
CNEp	Carcinome neuroendocrine pancréatique
CNEPD	Carcinome neuroendocrine peu différencié
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
FSH	Follicle Stimulating Hormone
G1,2,3	Grade 1, 2, 3
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran
HPF	High Power Field
IHC	Immunohistochimie
IM	Index mitotique
IP	Index de prolifération
MiNEN	Mixte neuroendocrine non neuroendocrine neoplasms
NEM1	Néoplasie Endocrinienne Multiple Type1
NPY	NeuroPeptide Y

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PHH3	Phosphohistone H3
PRL	Prolactine
PP	Pancreatic Polypeptide
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
SNED	Système Neuroendocrinien diffus ou disséminé
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TED	Tumeur Endocrine Digestive
TNEd	Tumeur Neuroendocrine digestive
TNEp	Tumeur Neuroendocrine pancréatique
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
UICC	Surveillance Epidemiology and End Results

RESUME

Contexte:

Les tumeurs neuroendocrine digestives (TNEd) sont des tumeurs rares représentant 1 à 2% de l'ensemble des tumeurs digestives, et constituent un groupe hétérogène de lésions néoplasiques, différentes par leurs propriétés sécrétoires et fonctionnelles, leurs mécanismes pathogéniques, leurs présentations cliniques, et enfin par leurs évolution et leur pronostic. Le diagnostic est anatomo-pathologique et les marqueurs neuroendocrines sont indispensables pour affirmer le diagnostic de tumeur neuroendocrine. Leur potentiel de malignité est évalué par leur capacité proliférative et leur différenciation.

Méthode:

Il s'agit d'une étude rétrospective incluant 50 patients atteints de TNE digestives, durant la période de janvier 2011 à janvier 2018 au service d'Anatomie pathologique du CHU Hassan II de Fès.

L'indice de prolifération Ki67% a été évalué par le comptage au microscope optique. L'indice mitotique a été déterminé par un compte de mitose sur 10 champs au fort grossissement (HPF) et le résultat a été reporté en nombre de mitoses par 2mm².

L'accord de concordance entre ces deux techniques a été analysé selon le coefficient Kappa de Cohen.

Il est un nombre réel, sans dimension, compris entre -1 et 1.

On a utilisé le « barème » suivant pour interpréter la valeur κ obtenue :

CONCORDANCE ENTRE L'INDEX MITOTIQUE ET LE KI67 DANS L'ELABORATION DU GRADE HISTOPRONOSTIQUE
DES TUMEURS NEUROENDOCRINES DIGESTIVES AU SERVICE ANATOMO-PATHOLOGIQUE DU CHU HASSAN II DE FES
A PROPOS DE 50 CAS

< 0	Grand désaccord
0.00 – 0.20	Accord très faible
0.21 – 0.40	Accord faible
0.41 – 0.60	Accord moyen
0.61 – 0.80	Accord satisfaisant
0.81 – 1.00	Accord excellent

Résultats:

L'âge moyen était de 55,08 ans avec des extrêmes allant de 19–80 ans. Le sexe ratio M/F était de 1 (25 hommes /25 femmes).

Dans notre série, les sièges les plus représentés étaient le pancréas (12cas, soit 24% des cas), suivi de l'intestin grêle (10 cas, soit 20% des cas) et de l'estomac (9 cas, soit 18% des cas). Les autres sites étaient appendiculaire (14%), colique (10%), duodénale et vésiculaire (6%) et hépatique (2%).

Avec le compte mitotique, 13 cas (26%) étaient classés de grade 1, 25 cas (50%) de grade 2 et 12 cas (24%) de grade 3.

Avec l'index de prolifération Ki67%, 15 cas (30%) étaient classés de grade 1, 21 cas (42%) de grade 2 et 14 cas (28%) de grade 3.

Pour déterminer la concordance entre la méthode de compte mitotique (M) et la méthode de compte du Ki67(K), le coefficient kappa de Cohen a été réalisé.

Dans notre étude, l'analyse statistique effectuée sur les deux résultats sous forme de grade, a montré un kappa de Cohen à 0,721 situé dans l'intervalle [0,61; 0,80], considéré comme un accord satisfaisant entre les deux méthodes.

Conclusion:

La méthode d'analyse de l'index mitotique est fiable dans l'élaboration du grade des TNEd. Dans notre étude, les deux méthodes analysées sont comparables avec une concordance satisfaisante. Bien que la corrélation entre le taux de mitose et l'indice Ki67 soit bonne, cependant quelques discordances entre les grades (1 et 2) et (3 et 2) ont été mises en évidence, d'où l'intérêt d'associer les 2 méthodes pour évaluer le potentiel agressif de ce type de tumeur.

I. Introduction

Les tumeurs neuroendocrines (TNE) digestives, appelées aussi tumeurs endocrines digestives (TED) sont des tumeurs d'origine épithéliale, qui expriment des marqueurs neuroendocrines.

Elles sont rares, représentent 1 à 2% de l'ensemble des tumeurs digestives [1]. Elles constituent un groupe hétérogène de lésions néoplasiques, qui se diffèrent entre elles par leurs propriétés sécrétoires et fonctionnelles, leurs mécanismes pathogéniques, leurs présentations cliniques, et enfin par leurs évolutions et leur pronostic.

Elles peuvent survenir sur n'importe quelle partie du tube digestif (de l'œsophage à l'anus), sur le pancréas et exceptionnellement le foie et sur la vésicule biliaire.

II. Rappel histologique :

1. Le système neuroendocrinien :

Le système neuroendocrinien est un réseau de cellules dispersées dans tout le corps, dont la structure ressemble à celle des cellules nerveuses et qui produisent des hormones comme les cellules endocrines [11].

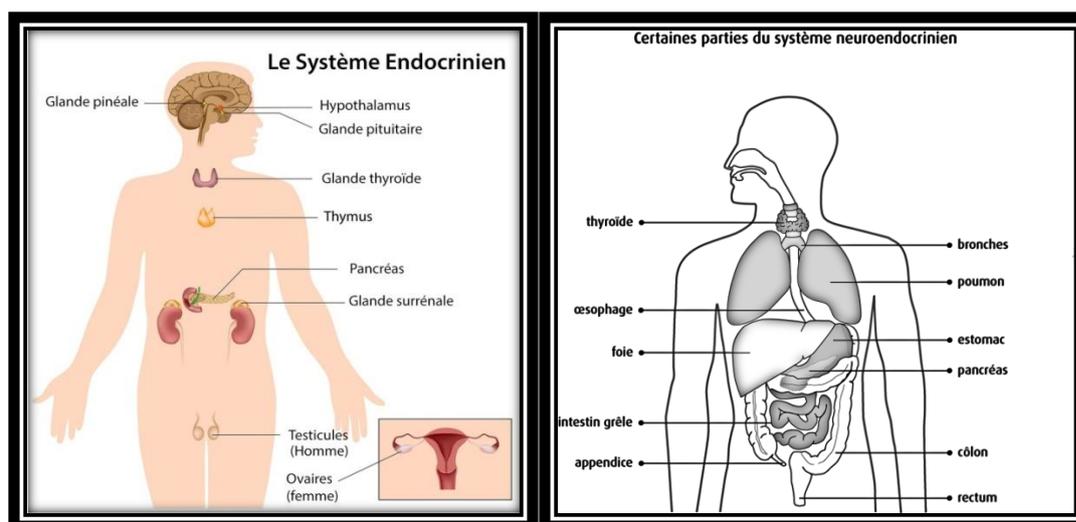
Le terme « neuroendocrine » est utilisé pour définir des cellules par leurs propriétés sécrétoires et non par leur siège ou leurs origines embryologiques. Le système de cellules neuroendocrines (NE) regroupe des neurones et des cellules endocrines ayant un phénotype commun caractérisé par l'expression de marqueurs protéiques généraux, les marqueurs neuroendocrines, et par des produits de sécrétion hormonale spécifiques [12].

2. Structure :

Le système neuroendocrinien est formé par le système endocrinien, et le système neuroendocrinien diffus [11] :

Le système endocrinien :

- constitué de glandes endocrines, ou glandes à sécrétion interne, qui libèrent des hormones directement dans le sang ou dans la lymphe.
- Il comprend l'hypophyse, l'épiphyse, la glande thyroïde, les glandes parathyroïdes et les glandes surrénales, ainsi que les îlots pancréatiques et les ovaires ou les testicules [11].



Figures 5, 6 : Principaux sièges des cellules neuroendocrines [32].

Le système neuroendocrinien diffus ou disséminé « SNED » : est un ensemble hétérogène de cellules spécialisées, ayant des origines embryologiques diverses, intégrant des structures fonctionnelles aussi variables que les glandes endocrines [22]. Il se compose de cellules NE dispersées dans tout le corps, qui peuvent libérer leurs produits de sécrétion selon un mode constitutif ou régulé [22]. Il existe une très grande variété de cellules NE. Les sièges les plus reconnus et les plus explorés sont l'appareil respiratoire et le tractus gastro-intestinal.

Tableau 2 : Sièges et principaux produits de sécrétion des cellules NE [14, 23].

Siège	Principale sécrétion
Antéhypophyse	PRL,GH,ACTH,FSH,LH,TSH
Thyroïde	Calcitonine, somatostatine, CGRP
Parathyroïde	Parathormone
Thymus	Calcitonine ?
Poumon	Bombésine, calcitonine, somatostatine, leuénképhaline
Pancréas	Insuline, PP, somatostatine
Tube digestif	Sérotonine,ACTH,enképhaline,gastrine,somatostatine,cholécystokinine,VIP,PP,motiline ,entéroglucagon,neurotensine
Peau, prostate, ovaire, col utérin, autres sites	Somatostatine, ACTH, enképhaline, calcitonine, CGRP
Médullosurrénale et paraganglions	Amines vasopressives, somatostatine, enképhaline, calcitonine, NPY, neurotensine

Les cellules neuroendocrines du tractus gastro-intestinal

Le terme de cellules endocrines s'applique à un ensemble de cellules dont la fonction est de sécréter une ou plusieurs hormones dans le milieu intérieur [24].

- Mode d'organisation embryologique, anatomique et physiologique

La plupart des cellules du SED ne dérivent pas de précurseurs issus de la crête neurale, mais se forment sur place à partir de la même cellule souche que les autres types de cellules épithéliales qui les entourent [25].

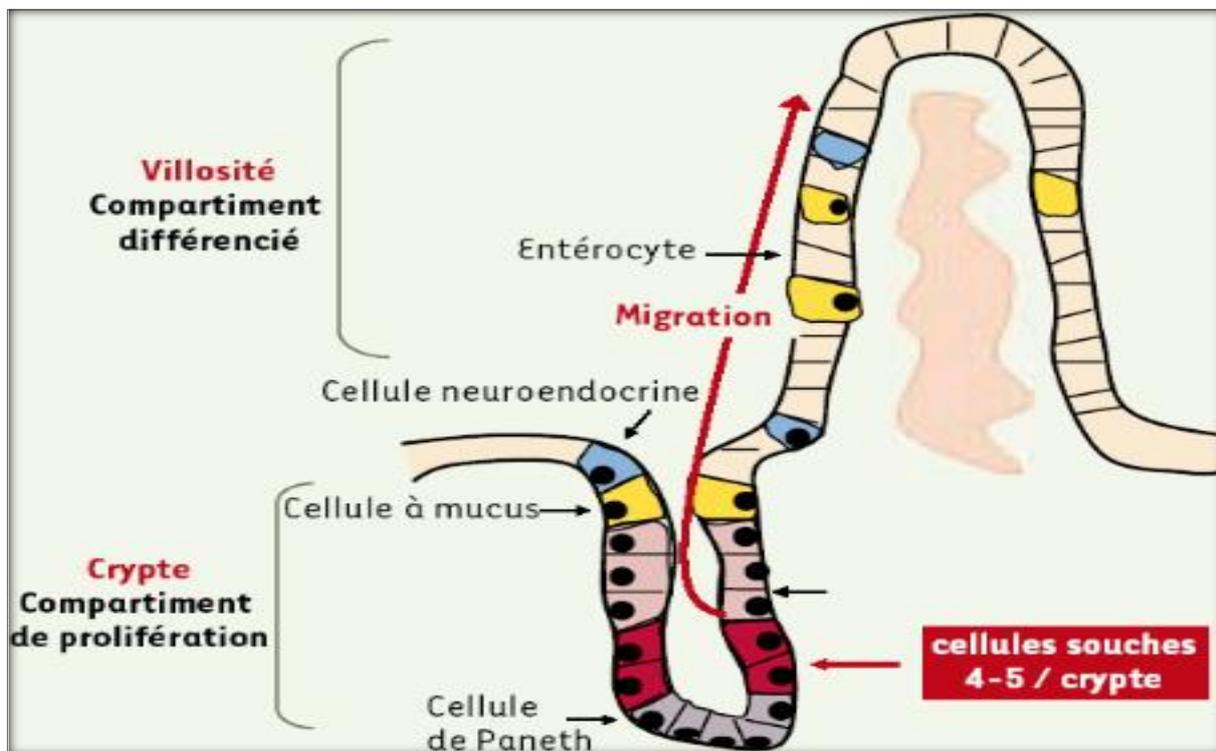


Figure 7 : Cellule souche intestinale [25].

3. Fonctions :

La cellule neuroendocrine a la propriété de synthétiser puis de sécréter une ou plusieurs hormones. Ces substances chimiques peuvent être de nature lipidique c'est le cas des hormones stéroïdes (testostérone/oestrogène) ou protidique (solubles dans le plasma).

L'hormone une fois sécrétée, agit d'une manière sélective sur une cellule cible. Cette dernière exprime des récepteurs spécifiques qui, stimulés par la fixation de l'hormone, lui permettent de modifier l'activité biologique de la cible et induire un rétro contrôle négatif sur la production de l'hormone. Il y'a ainsi un équilibre entre la synthèse/sécrétion des hormones.

Trois voies d'action des hormones sont possibles :

- La mode endocrine: la voie endocrine qui correspond au passage de l'hormone dans la circulation sanguine et à sa diffusion dans l'ensemble

de l'organisme, opérant ainsi une action sur des cibles cellulaires situées à distance,

- La voie paracrine: qui correspond à la diffusion locale de l'hormone, permettant ainsi une action sur des cibles cellulaires à courte distance, et
- La voie autocrine: où le médiateur chimique est libéré dans le milieu extracellulaire pour agir en retour directement sur la cellule responsable de sa synthèse.

Les hormones peptidiques après leur synthèse au niveau des cellules endocrines, vont être stockées dans des vésicules ou grains de sécrétion. Ces derniers après une stimulation extra cellulaire, libèrent leur contenu hormonal par exocytose dans le tissu conjonctif pour rejoindre le réseau vasculaire. Les grains de sécrétion, en plus de leur rôle de stockage, assurent aussi la maturation des hormones qu'ils contiennent. En effet, et moyennant un équipement enzymatique et moléculaire riche, ils permettent l'activation de la pro-hormone inactive en hormone prête à être secréter dans le milieu extracellulaire [24].

La matrice de ces grains comporte également des constituants spécifiques qui interviennent probablement dans la maturation, le stockage et la sécrétion des hormones : les mieux connus sont les chromogranines (A et B).

Un autre exemple est constitué par les vésicules neurosécrétoires (ou small synaptic vesicles).

Ces organites ne sont pas spécifiques des cellules endocrines : ce sont les homologues des vésicules présynaptiques des neurones. Il n'est donc pas surprenant que les constituants moléculaires des vésicules neurosécrétoires soient identiques à ceux des vésicules présynaptiques : les plus caractéristiques sont la

synaptophysine, la synaptotagmine et la synaptobrévine [26]. Les fonctions physiologiques des vésicules neurosécrétoires restent encore mal connues ; il est probable que les neuropeptides qu'elles contiennent et libèrent dans le milieu extracellulaire par exocytose, contribuent à la régulation de certaines fonctions des cellules endocrines.

Les cellules « NE » du tractus gastro-intestinal en deux fonctions principales :

- A effets sur la mobilité : elles agissent sur les muscles lisses de l'œsophage, l'estomac, le duodénum, les canaux biliaires et pancréatiques, l'intestin grêle et le colon.
- A effets sur les sécrétions digestives : par une stimulation en agissant sur les sels minéraux et donc les molécules d'eau, en activant les canaux ioniques des cellules sécrétrices spécialisées [27].

4. Caractéristiques anatomopathologiques :

Pour la première fois, en 2000 l'OMS a fait apparaître les TNE-GEPs dans sa classification. Cette classification dite « OMS 2000 » est ensuite complétée en 2004 pour les tumeurs neuroendocrines du pancréas [40].

Cette classification reconnaît, dans un premier temps, les tumeurs endocrines pures et les tumeurs mixtes endocrines-exocrines. Dans un second temps, les TNE-GEPs sont classées de façon uniforme en trois catégories :

- (a) les tumeurs endocrines bien différenciées de comportement bénin,
- (b) les tumeurs endocrines bien différenciées de comportement incertain et les carcinomes bien différenciés de comportement malin mais de bas grade et

(c) les carcinomes peu différenciés de comportement malin et de haut grade. Dans un dernier temps, ces tumeurs sont distinguées selon leur site anatomique d'origine, leur taille, leur degré de prolifération ou encore leur degré d'extension.

En 2010, l'OMS a actualisé sa classification des TNE-GEPs [39] et introduit plusieurs changements :

- (a) le terme « neuroendocrine », abandonné en 2000, est officiellement adopté puisque les cellules endocrines expriment des marqueurs communs aux cellules nerveuses (synaptophysine par exemple) ;
- (b) le terme « néoplasmes neuroendocrines » rassemble les TNE-GEPs bien et peu différenciées et
- (c) les tumeurs neuroendocrines du tractus digestif et du pancréas sont individualisées. En intégrant certains critères du grade tumoral (Tableau 1), la classification OMS 2010 reconnaît [38]:
 - (1) les tumeurs neuroendocrines G1,
 - (2) les tumeurs neuroendocrines G2 et
 - (3) les carcinomes neuroendocrines à grande ou petites cellules.
 - (4) MANEC (mixed adeno-neuroendocrine carcinoma).

Tableau1 : Grade des tumeurs neuroendocrines selon l'OMS 2010 [38].

Grade	Index mitotique	Ki67%
G1	<2	≤2
G2	2-20	3-20
G3	>20	>20

Tableau 2 : Correspondance entre les classifications OMS 2000 et OMS 2010 des tumeurs endocrines digestives [30].

<i>Correspondence between the 2000 and 2010 WHO classifications of digestive neuroendocrine tumors.</i>	
OMS 2010	OMS 2000
Tumeur neuroendocrine G1	Tumeur endocrine bien différenciée de comportement bénin Tumeur endocrine bien différenciée de comportement incertain à index mitotique < 2 et index Ki67 ≤ 2 % Carcinome endocrine bien différencié à index mitotique < 2 et index Ki67 ≤ 2 %
Tumeur neuroendocrine G2	Tumeur endocrine bien différenciée de comportement incertain à index mitotique compris entre 2 et 20 et/ou index Ki67 compris entre 3 et 20 % Carcinome endocrine bien différencié à index mitotique compris entre 2 et 20 et/ou index Ki67 compris entre 3 et 20 %
Carcinome neuroendocrine à petites cellules	Carcinome peu différencié à petites cellules
Carcinome neuroendocrine à grandes cellules	Pas de catégorie correspondante
Carcinome mixte adéno-neuroendocrine	Tumeur mixte

Une nouvelle classification OMS 2017 des tumeurs (neuroendocrines) digestives a été adoptée. Cette nouvelle classification utilise une nouvelle terminologie comportant cinq catégories : tumeur neuroendocrine G1 ; tumeur neuroendocrine G2 ; tumeur neuroendocrine G3 ; carcinome neuroendocrine peu différenciés G3 (à petites cellules ; à grandes cellules) ; le terme mixed adeno-neuroendocrine carcinoma (MANEC) est abandonné au profit de celui de mixed neuroendocrine non neuroendocrine neoplasm (MiNEN). Cette classification de l'OMS 2017 est basée sur l'aspect histologique (la différenciation) et le grade qui reflète la prolifération tumorale (index mitotique sur 10 champs à fort grossissement ou

index de prolifération Ki67 sur 2000 cellules) [2]. Les termes de carcinome neuroendocrine bien différencié ou de tumeur neuroendocrine bien différenciée de pronostic incertain ont disparu [2] depuis la classification de l'OMS 2010.

Ainsi les TNEd bien différenciées, de grade 1–2 ont un potentiel de malignité plus faible que les TNEd, de grade 3 qui ont un fort potentiel de malignité [1].

Tableau 3 : Classification OMS 2017 des tumeurs neuroendocrines [30].

<i>2017 WHO classification of pancreatic neuroendocrine neoplasms.</i>	
Classification OMS 2017	Commentaires
<i>Tumeur neuroendocrine G1</i> Morphologie bien différenciée Index mitotique < 2 et index Ki-67 < 3 %	Les critères de diagnostic ont été légèrement modifiés par rapport à la classification OMS 2010 ; le grade G1 est défini par un index Ki-67 strictement inférieur à 3 % et non plus ≤ 2 %
<i>Tumeur neuroendocrine G2</i> Morphologie bien différenciée Index mitotique 2–20 et/ou index Ki-67 3–20 %	Les critères de diagnostic n'ont pas été modifiés par rapport à la classification OMS 2010
<i>Tumeur neuroendocrine G3</i> Morphologie bien différenciée Index mitotique > 20 et/ou index Ki-67 > 20 %	Cette catégorie n'existait pas dans la classification OMS 2010
<i>Carcinome neuroendocrine</i> Morphologie peu différenciée Type à grandes cellules Type à petites cellules Index mitotique > 20 et/ou index Ki-67 > 20 %	Les critères de diagnostic n'ont pas été modifiés par rapport à la classification OMS 2010
<i>Tumeur mixte neuroendocrine – non neuroendocrine (Mixed NEuroendocrine non neuroendocrine Neoplasm, MiNEN)</i>	La terminologie a été modifiée par rapport à la classification OMS 2010, où le terme utilisé était celui de tumeur mixte adéno-neuroendocrine (MANEC)
Les modifications par rapport à la classification OMS 2010 sont indiquées en gras.	

a. Les mitoses :

La division cellulaire est un processus constitué de différentes phases : G0 (phase de repos), G1, S (phase de synthèse), G2 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).

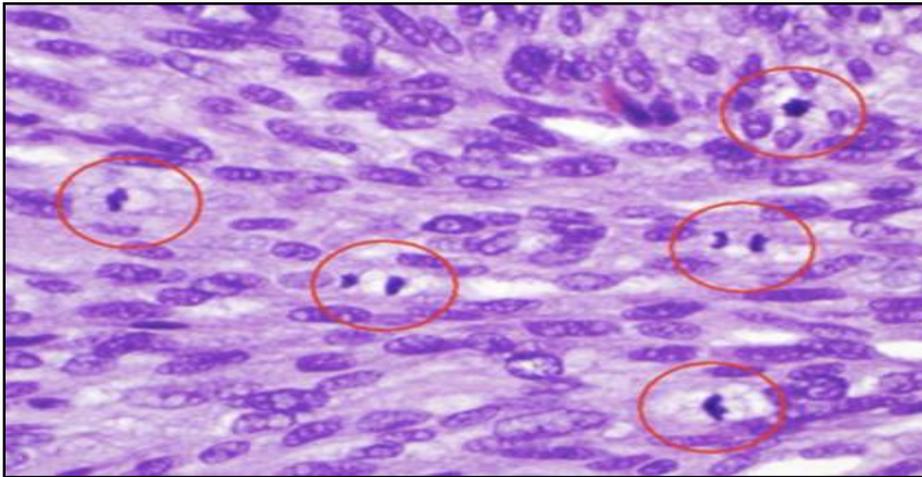


Figure 1 : mitoses en prophase (spot unique), métaphase (deux spots opposés),
télophase (ligne centrale), HES x 40.

b. Immunohistochimie

- Les marqueurs neuroendocrines :

Une fois le diagnostic de TNEd suspecté sur la morphologie, il est recommandé de confirmer le diagnostic par la positivité immunohistochimique des anticorps anti-synaptophysine et anti-chromogranineA [29].

La chromogranine une glycoprotéine composant la matrice des granules sécrétoires neuroendocrines (Fig8). 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 (Fig4). 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.

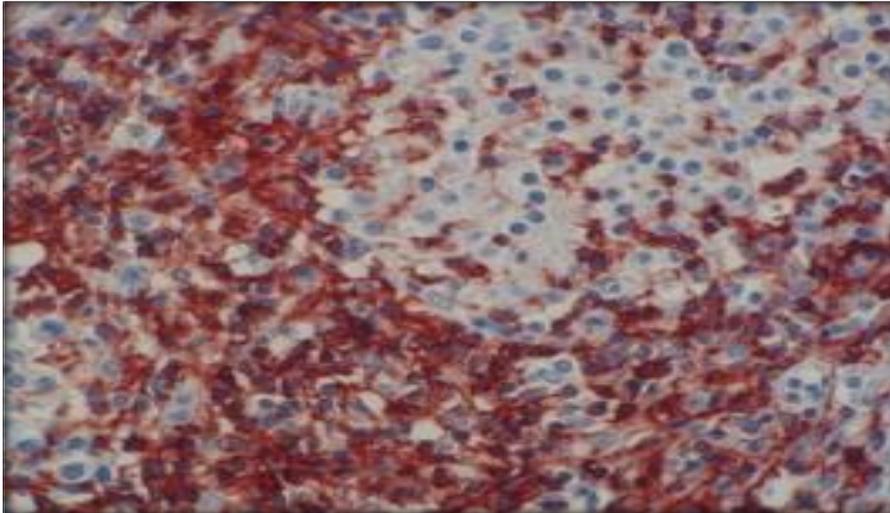


Figure 2: marquage positif à la chromogranine A.

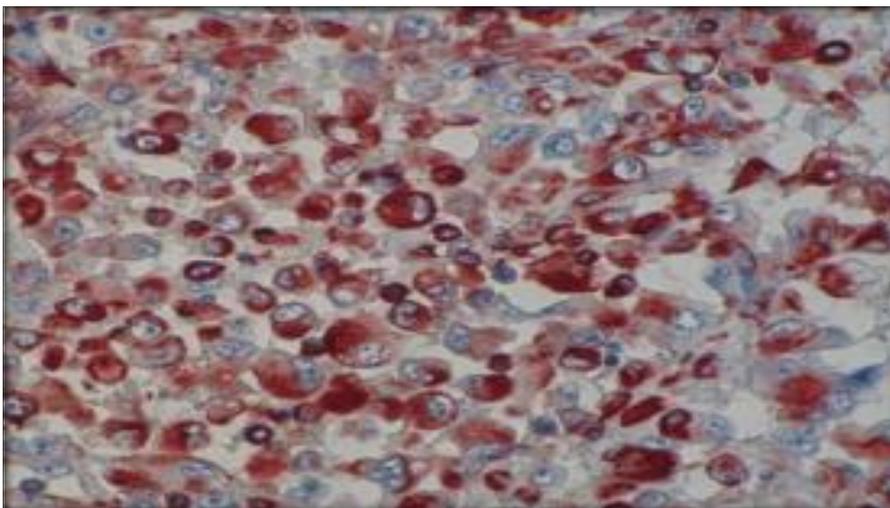


Figure 3: marquage positif à la synaptophysine.

- **Le 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 et est limitée au noyau.

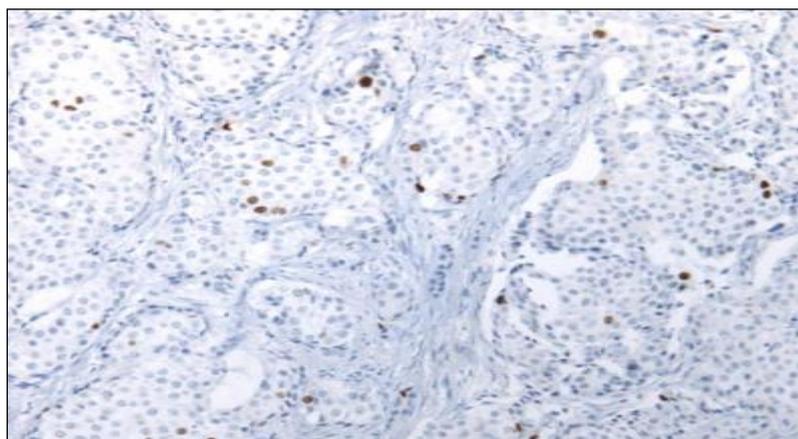


Figure 4 : TNEp bien différenciée, immunohistochimie par le Ki67, x 10. « hot spot » zone de plus forte densité de cellules marquées.

c. La différenciation :

C'est un critère pronostic majeur.

- Les tumeurs neuroendocrines bien différenciées :

Ces lésions ont une architecture organoïde en lobules ou en travées. Le stroma varie d'une tumeur à l'autre, toujours vascularisé. Les cellules tumorales sont monomorphe, de taille souvent moyenne, au noyau rond ou ovale uniforme contenant parfois un ou plusieurs petits nucléoles, à chromatine fine, au cytoplasme abondant et à limites nettes. Elles expriment habituellement les marqueurs neuroendocrines. Elles sont appelées tumeurs neuroendocrines bien différenciées et cela indépendamment de leur extension locale ou à distance [32].

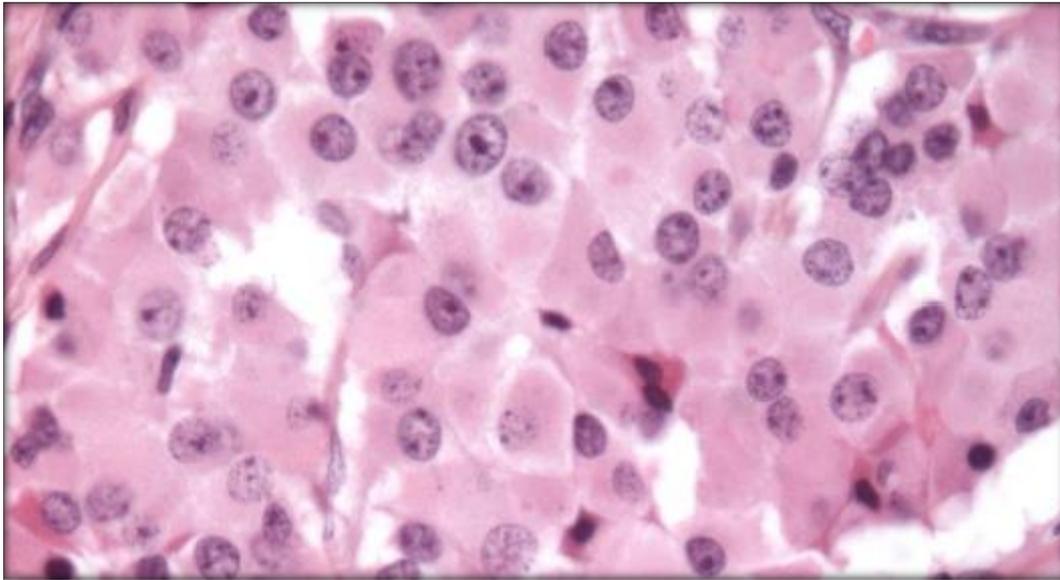


Figure 5 : TNEp bien différenciée : noyaux réguliers contenant des nucléoles, au cytoplasme abondant éosinophile.

– Les carcinomes neuroendocrines peu différenciés :

Ces lésions se disposent en massifs, de forme irrégulière sans structure organoïde, la nécrose est fréquente. Elles correspondent à des carcinomes neuroendocrines peu différenciés (CNEPD) à grandes ou à petites cellules.

Les CNEPD à grandes cellules sont constitués de cellules de taille moyenne à grande avec d'importantes atypies cytonucléaires et une architecture plutôt massive avec nécrose centrale.

Les CNEPD à petites cellules sont constitués de cellules de taille moyenne, assez homogènes présentant un haut rapport nucléocytoplasmique et un noyau hyperchromatique. De la nécrose est fréquemment retrouvée.

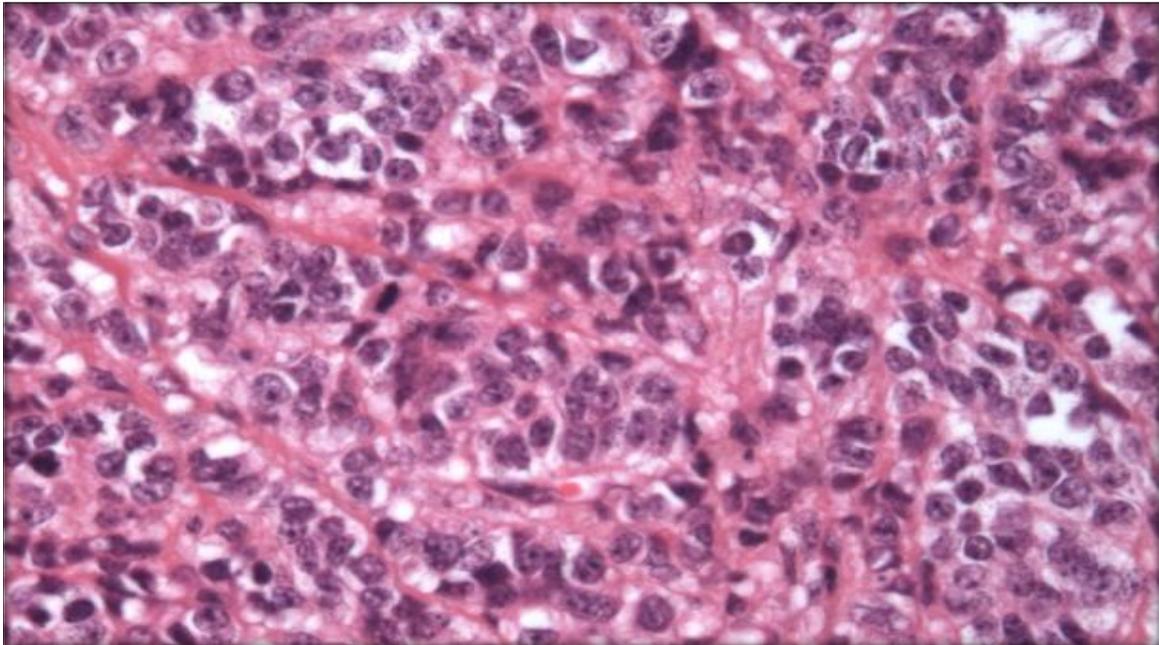


Figure 6 : CNEp peu différencié : noyaux irrégulier, anisocaryotique avec gros nucléoles, cytoplasme peu abondant.

- **Les tumeurs mixtes neuroendocrines-non neuroendocrine (MiNEN) :**

Elles correspondent à des tumeurs associant au moins deux contingents distincts, dont l'un est endocrine. La classification OMS réserve ce terme aux tumeurs épithéliales comportant au moins 30% de cellules endocrines tumorales [32].

III. Historique:

Dans la littérature, la nomenclature des tumeurs neuroendocrines a connu plusieurs modifications [13].

- Heidenhain, a décrit en 1870 une population de cellules chromaffines dans l'intestin grêle, et a suggéré que le tube digestif pourrait avoir une fonction endocrine [14].
- En 1838 Merling [15] décrivit une petite tumeur solide de l'appendice, la nature endocrine de cette tumeur n'a pas été identifiée bien qu'en 1890 Ranson aurait décrit pour la première fois un cas présentant un syndrome carcinoïde [16].
- Le terme « carcinoïde » a été introduit pour la première fois en 1907 par Oberndorfer, [17] pour décrire un groupe de tumeurs intestinales morphologiquement distinct.
- En 1920 Masson démontra la faculté des cellules tumorales à réduire les sels d'argent qui justifiait l'appellation « argentaffinoma » donnée par Berger en 1882 [18].
- En 1938, Freyter proposa le concept de « système endocrinien diffus » selon lequel des cellules dispersées dans l'intestin et autres parties du corps constitueraient un organe endocrinien diffus produisant de la sérotonine [19]. ayant une évolution moins agressive que les adénocarcinomes.
- Puis, en 1964, Pearse introduit le terme « APUDoma » en référence au système APUD qu'il a proposé (Amine Precursor and Uptake Decarboxylation : captation et décarboxylation des précurseurs d'amines).

Ceci constituait un progrès important permettant ainsi une classification des TNE selon des critères biochimiques. Pearse a également émis l'hypothèse que les cellules neuroendocrines auraient une origine commune à partir du neuro ectoderme et de la crête neurale [20]. Cette conception fut par la suite remise en question et est actuellement abandonnée.

- En 1995, Cappella suggéra le terme « tumeur neuroendocrine » pour désigner toute tumeur développée au dépend du système endocrinien diffus [21].

IV. Objectifs de l'étude :

L'objectif de l'étude est de comparer les méthodes de comptage mitotique et du comptage par le Ki67 dans la détermination du grade des TNE/CNEd en établissant leur concordance

V. MATERIELS ET METHODES

1. Etude épidémiologique :

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur 50 patients atteints de TNE digestives, durant une période de huit ans (janvier 2011 – Janvier 2018) au niveau du service d'Anatomopathologie du CHU HASSAN II de Fès.

1.1. Recueil de données :

Les différentes données ont été recueillies à partir de l'application du service d'anatomopathologie du CHU HASSAN II de Fès.

Les différents paramètres étudiés :

- des paramètres épidémiologiques (sexe, âge),
- des paramètres histologiques (type histologique, grade, stade, localisation...),
- des paramètres immunohistochimiques (Chromogranine A, Synaptophysine, Ki67, Cytokératine AE1 /AE3, CD56).

1.2. Patients :

✓ Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans cette étude toutes les TNE digestives diagnostiquées et confirmées par étude histologique et immunohistochimique durant une période de 8 ans au niveau du service d'Anatomopathologie.

✓ Diagnostic

Le diagnostic a été retenu sur l'étude histologique des prélèvements biopsiques et des pièces opératoires avec une confirmation immunohistochimique. Les tumeurs ont été reclassées selon la classification de l'OMS 2017.

2. Etude anatomopathologique :

L'étude anatomopathologique a été menée au service d'anatomopathologie. Le diagnostic des TNE digestives repose sur des arguments macroscopiques, histologiques, et immunohistochimiques qui permettent :

- d'identifier les caractéristiques de ces tumeurs (localisation, taille, aspect solide ou kystique...) ;
- de réaliser un immunomarquage pour confirmer la nature neuroendocrine de la tumeur.
- de déterminer les facteurs histopronostiques : indice de prolifération Ki67 et l'index mitotique ;

Chaque prélèvement biopsique parvient au laboratoire dans le formol à 10%, et il doit être accompagné d'une fiche de renseignement où il est mentionné la nature du prélèvement et le numéro de la biopsie. Les pièces opératoires sont fixées au laboratoire d'anatomopathologie dans le formol à 10% dans un récipient faisant 10 fois le volume de la pièce.

2.1. Etude histologique :

2.2.1. La macroscopie :

L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire. Elle permet :

- a. Description de la tumeur (localisation, taille et nombre)
- b. Description des composantes solides et/ou kystiques
- c. Description de la composante nécrotique éventuelle
- d. Description d'éventuelle invasion (en profondeur ou l'extension) et des métastases.

Elle a pour but de sélectionner les parties à prélever pour l'étude microscopique. Ces parties concernent :

- Les zones anormales,
- Les zones d'aspect macroscopique sain,
- Les limites d'exérèse.

Le médecin anatomopathologiste effectue des coupes d'environ de 1.5 mm d'épaisseur qui vont être déposées dans des cassettes portant le numéro de la pièce étudiée.

Ces différentes étapes se déroulent sous une hotte aspirante (Fig 7) pour garantir les conditions sanitaires appropriées.

Le reste de la pièce est conservée pendant quelques semaines pour faire des prélèvements complémentaires en cas de besoin.



Figure 7 : Hotte aspirante

2.2.2. Technique de base :

L'examen d'un tissu comporte plusieurs étapes :

- La fixation : elle permet la conservation du tissu
- La circulation des tissus
- L'inclusion en paraffine chauffée
- La réalisation des coupes
- La confection des lames
- La coloration des coupes par Hématoxyline–Eosine(HE)
- Le montage et l'étude microscopique.

a. La fixation du tissu :

La fixation permet la conservation et le durcissement des tissus. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur (10 fois le volume de la pièce).

Le fixateur le plus utilisé en microscopie optique est le formol à dilué 10%.

Cette étape très est importante, en effet si le fixateur ne pénètre pas dans le tissu, celui-ci risque de se putréfier.

La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement (au minimum 2 à 5 heures pour une biopsie et 48 à 72 heures pour une pièce opératoire).

b. La circulation des tissus : (Fig 8)

Elle comporte trois étapes essentielles :

✓ La déshydratation

L'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur. Les prélèvements ayant achevé leur fixation sont déposées dans des cassettes, puis elles seront mises dans un automate à inclusion. L'échantillon est progressivement déshydraté par

passages successifs dans des solutions alcooliques de plus en plus concentrés : sept bacs de degrés croissants : (les trois premiers bacs à 70% ,80%,90% (10h) et le reste éthanol pur 100% pour 1h), jusqu'à ce que toute l'eau (des tissus et du milieu de fixation) ait été soustraite et que l'échantillon soit totalement imprégné d'alcool absolu.

✓ **L'éclaircissement**

L'alcool est ensuite remplacé par un solvant organique de la paraffine dans lequel peuvent se dissoudre à la fois l'alcool et la paraffine (la paraffine n'est pas soluble dans l'alcool). Cependant, l'alcool est chassé par 03 bacs successives de xylène (pour : 1h, 1h30, puis 2h). Ce dernier va rendre le tissu transparent.

✓ **L'imprégnation**

L'échantillon va être imprégner ou enrober dans la paraffine liquide ; (02 passages pendant 2h puis 3h successivement) jusqu'à l'obtention d'une pièce qui ne contient ni eau, ni alcool, ni solvant intermédiaire.



Figure 8 : Automate à inclusion Tissue-Tek VIP.

✓ L'inclusion en paraffine chauffée :

Cette étape se fait à l'aide d'un automate d'enrobage, et d'une plaque à congélation (Fig 9).



Figure 9 : Appareils d'enrobage et de congélation.

L'inclusion se fait manuellement, on oriente bien le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine (Fig 10A), et on le couvre avec une demie cassette (Fig 10B). Une fois que l'échantillon est bien immergé dans la paraffine, on le laisse refroidir sur une plaque à congélation (Fig 10C), par la suite on enlève le moule métallique, et on dépose la demi-cassette dans un congélateur. Enfin, on obtient un bloc de paraffine dur contenant la pièce prélevée (Fig 10D).

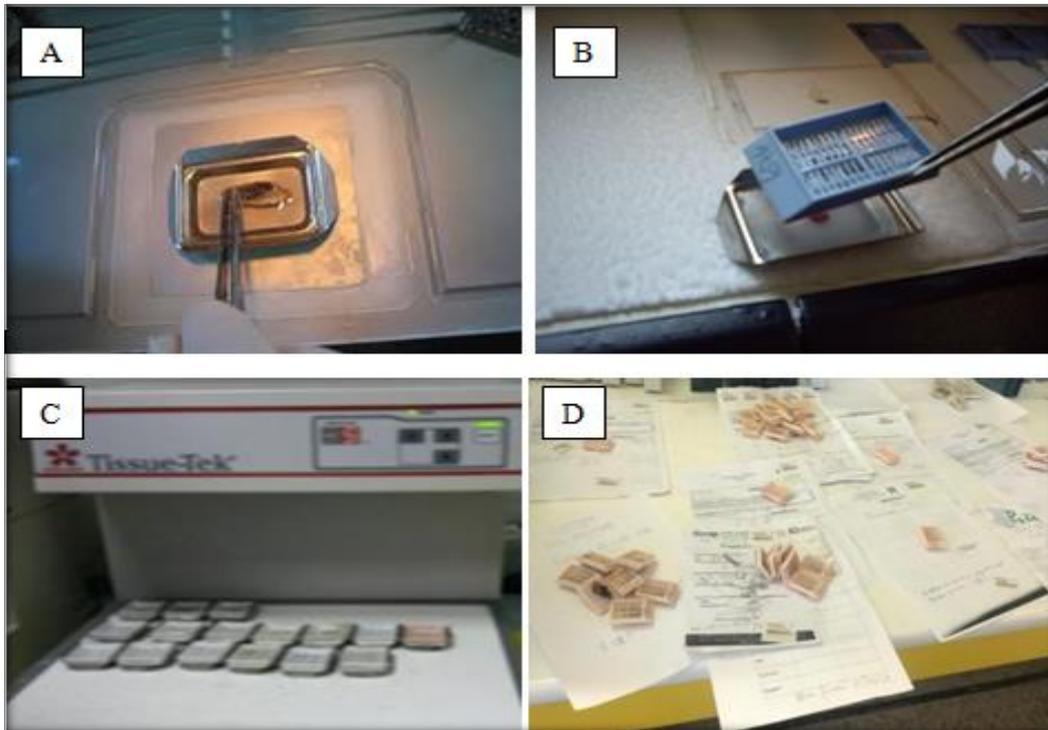


Figure 10 : Etapes d'inclusion dans la paraffine avec obtention de blocs.

c. La réalisation des coupes :

Le microtome est l'appareil qui sert à réaliser des coupes (Fig 11A)

Chaque bloc d'inclusion coupé à 4 μm d'épaisseur au microtome manuel forme un ruban très fin (Fig 11B). Ce ruban est étalé sur un film d'eau distillée pour éliminer ses plis (Fig 11C). Ensuite, il est déposé sur une lame, cette lame est placée sur une plaque chauffante pour la sécher (Fig 11D).

Les lames sont numérotées, regroupées dans un portoir (Fig 11E), ensuite mises dans l'étuve à 60°C pendant 1h30mn pour s'assurer de la fixation des coupes sur les lames et pour les déparaffiner (Fig 11F).

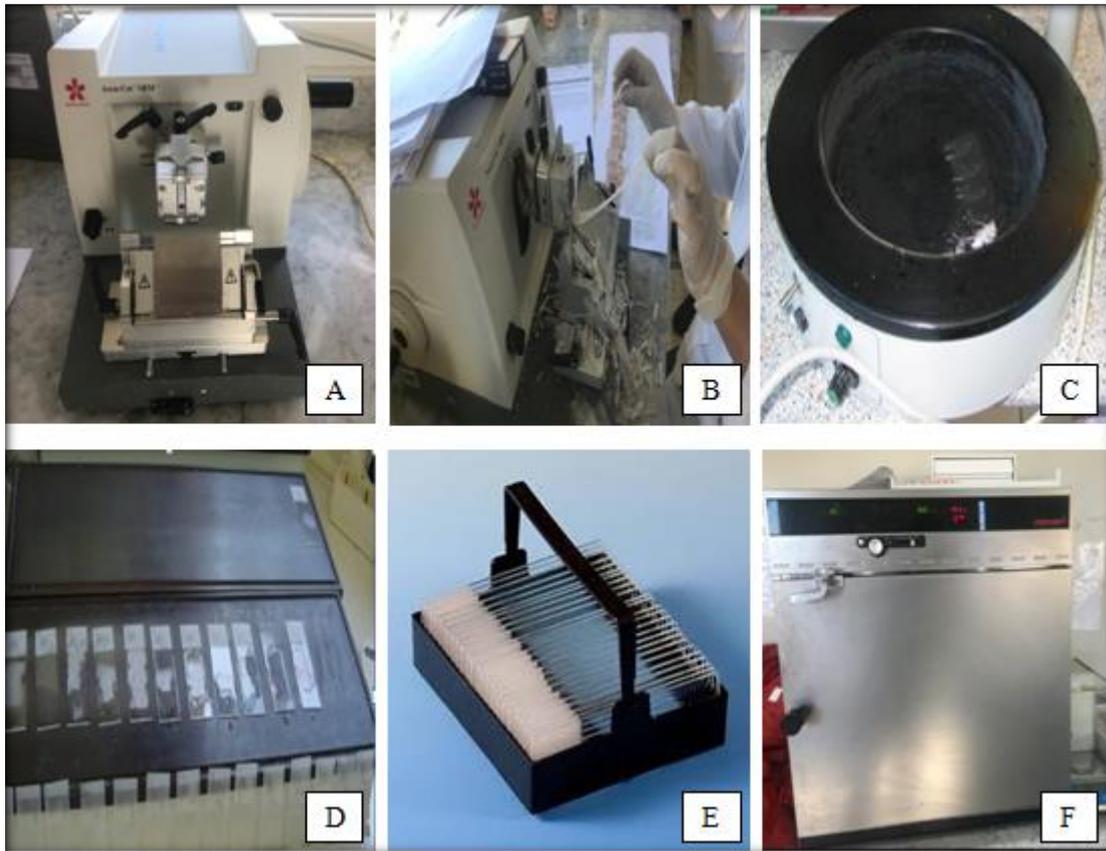


Figure 11 : Réalisation des coupes

d. La coloration des coupes par Hématoxyline-Eosine(HE) :

Cette étape se fait avec un automate de coloration (Fig 12).

La coloration la plus utilisée en histologie est HE (Hématoxyline /Eosine) : c'est une coloration bichromatique qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine : l'hématoxyline est un colorant basique, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement (acides). Il colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques. L'éosine est un colorant acide, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement (basiques). Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophile.



Figure 12 : Automate de coloration Tissue-Tek DRS.

e. Le montage et l'étude microscopique :

Après déshydratation, les coupes colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique. Les lames sont séchées à l'air libre et sont enfin prêtes pour l'observation microscopique.

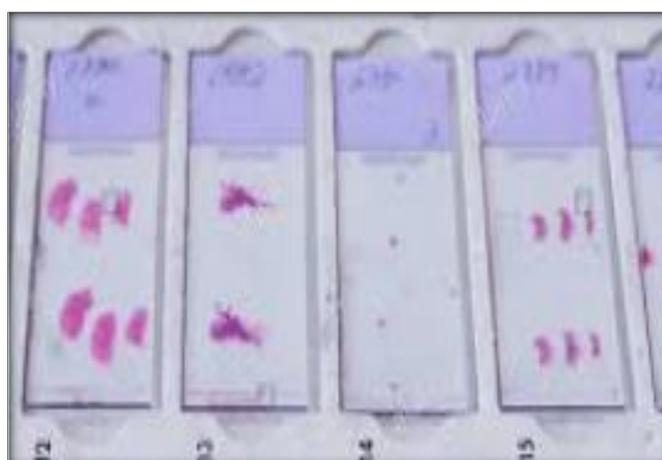


Figure 13 : lames à interpréter

3. Evaluation du grade tumoral :

Les grades de chaque tumeur, établis par l'index mitotique et par l'index de prolifération par le Ki67 sont évalués par un pathologiste expérimenté.

3.1. L'index 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 10 CFG (2mm²) consécutifs.

Le résultat était donné sous forme d'un nombre de mitose pour 10 CFG.

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.

3.2. L'index de prolifération Ki67

3.2.1. Immunohistochimie

L'étape d'immunohistochimie était réalisée par une automate, de type: Benchmark XT (Ventana) (Fig 18).

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 (Fig 15).

Chacune de ces coupes tumorales était étalée sur une lame silanée (Dako Flex) 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) (Figure 14), permettant d'obtenir des résultats homogènes et d'éviter des erreurs de manipulation.

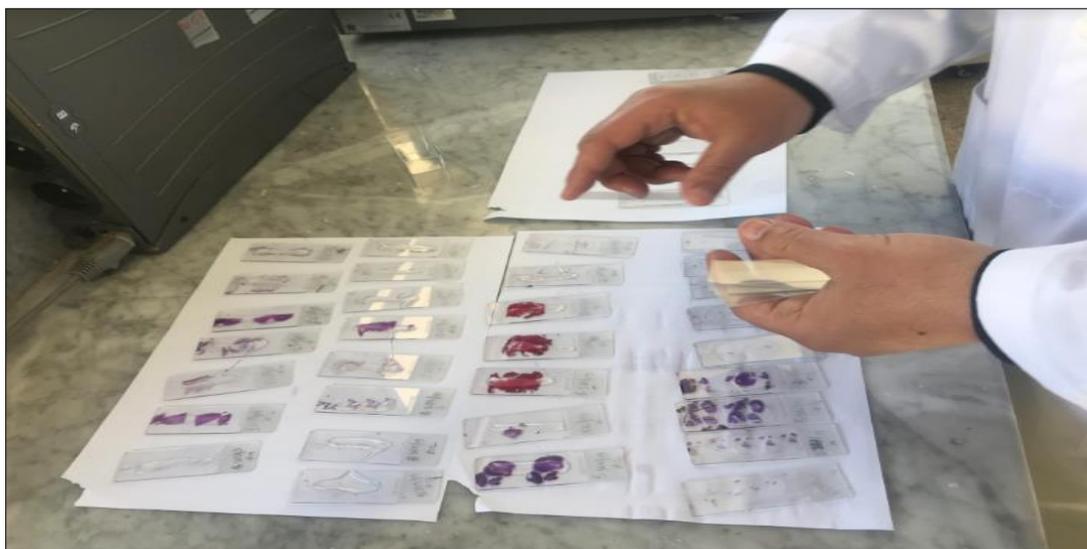


Figure 14 : Coupes tumorales étalées sur lames silanées



Figure 15 : Appareil d'immunohistochimie Benchmark XT (VENTANA).



Figure 16 : Lame d'immunohistochimie (Ki67) prête pour la lecture.

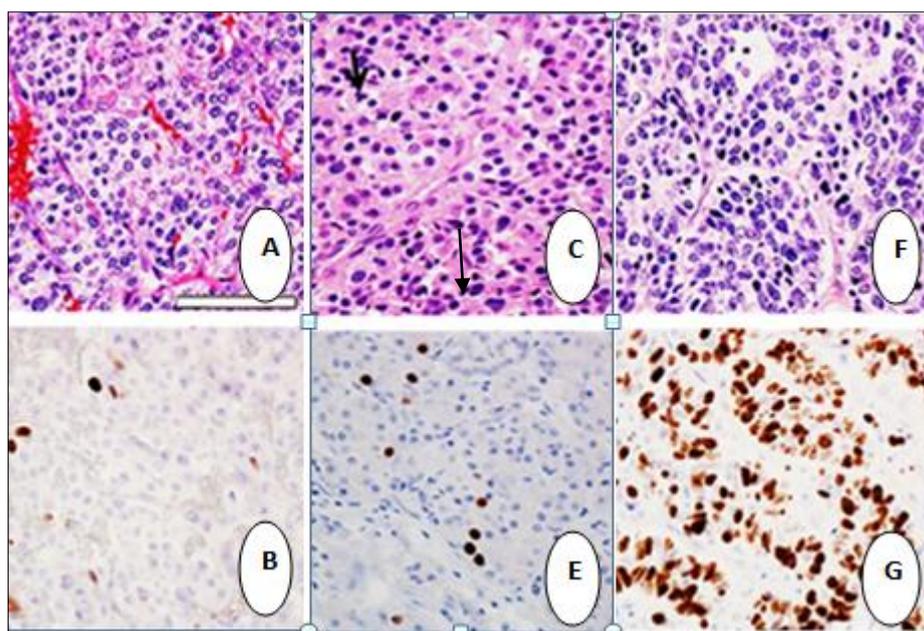


Figure 17 : TNEp Grade 1(A), avec index de prolifération Ki67 à 2% (B).

Grade 2 avec 2 figures de mitose (C) et index de prolifération Ki67 à 3% (E).

Grade 3 avec index de prolifération \geq à 20%.

3.2.2. Evaluation de l'index de prolifération(IP)

L'index de prolifération a été déterminé selon la méthode d'évaluation par compte manuel au microscope. Cette analyse était effectuée par une pathologiste expérimentée.

✓ **Compte au microscope**

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 nucléaire diffus de faible à forte intensité, était ensuite déterminé sur un échantillon d'au moins 2000 cellules au fort grossissement.

4. Etude statistique

Les données ont été collectées sur excel et l'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel IBM SPSS (statistics version 21).

Les variables quantitatives des caractéristiques cliniques étaient exprimées en moyenne plus ou moins l'écart type lorsque la distribution est symétrique et en médiane lorsque que la distribution est asymétrique.

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

Le coefficient de corrélation de Spearman et le coefficient Kappa de Cohen ont été analysé pour déterminer la concordance entre les deux méthodes :

La méthode de compte mitotique et la méthode de compte du Ki67.

Le test du Khi-deux a été utilisé pour les comparaisons de fréquence entre caractéristiques clinico-pathologiques et les grades. Le seuil de significativité était de 0,05.

Tableau 4 : « barème » utilisé pour interpréter la valeur Kappa obtenue [33]:

< 0	Grand désaccord
0.00 - 0.20	Accord très faible
0.21 - 0.40	Accord faible
0.41 - 0.60	Accord moyen
0.61 - 0.80	Accord satisfaisant
0.81 - 1.00	Accord excellent

VI. RESULTATS

1. Caractéristiques clinico-pathologiques des patients :

Tableau 5 : Caractéristiques clinico-pathologiques des patients

Caractéristiques	Nombre (N=50)	%
Sexe	Femme : 25	50
	Homme : 25	50
Age (médian)	58 ans (19-80)	
Pièces	35	70
Biopsies	15	30
Emboles vasculaires	1	2
Envahissements péri nerveux	5	10
Métastases à distance synchrones	13	26
Métastases ganglionnaires synchrones	7	14

Le test du Khi-deux utilisé pour les comparaisons de fréquence entre les caractéristiques (sexe, âge, emboles vasculaires, envahissements périnerveux, métastases à distance et ganglionnaires) et les grades (Ki67 ou compte mitotique) n'a pas montré de corrélation statistiquement significative ($P > 0,05$), probablement en raison de la petite taille de l'échantillon.

1.1. Répartition selon l'âge :

La moyenne d'âge est de 55,08 ans (+/- 15,485), avec un minimum de 19 ans et un maximum de 80 ans.

Tableau 6 : statistique selon l'âge

	N	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart type
Age	50	19	80	55,08	58	15,485

7 tranches d'âges sont identifiées, les TEND sont plus fréquentes chez les sujets âgés entre 60 et 70 ans (13 cas, soit 26 %). Elles sont rares chez les jeunes (2 cas, soit 4%) pour la tranche d'âge ≤20 ans. (Fig18).

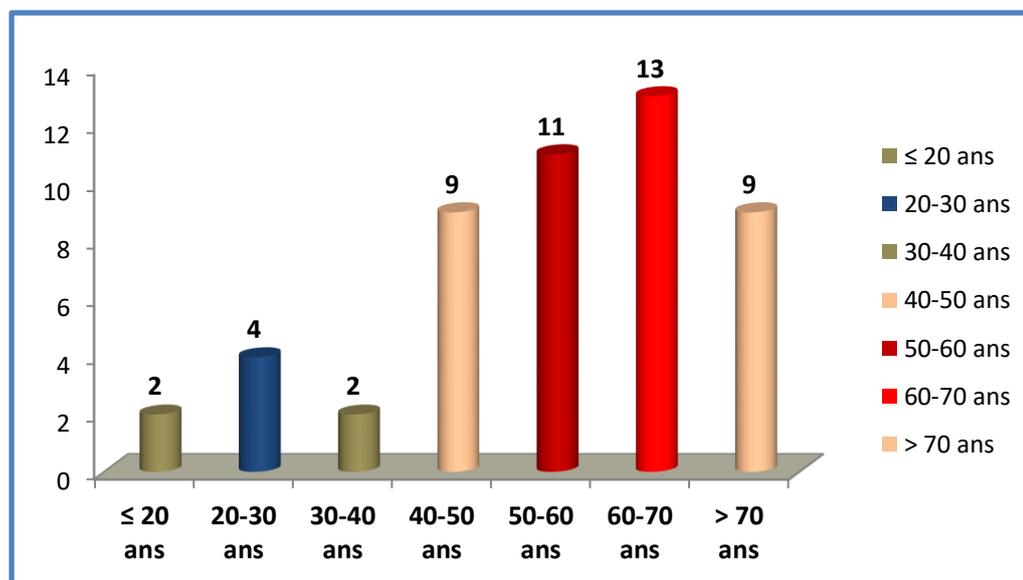


Figure 18 : Répartition des cas selon les tranches d'âge.

1.2. Répartition selon le sexe :

Le sexe ratio homme/femme est égal à 1 (H/F=1).

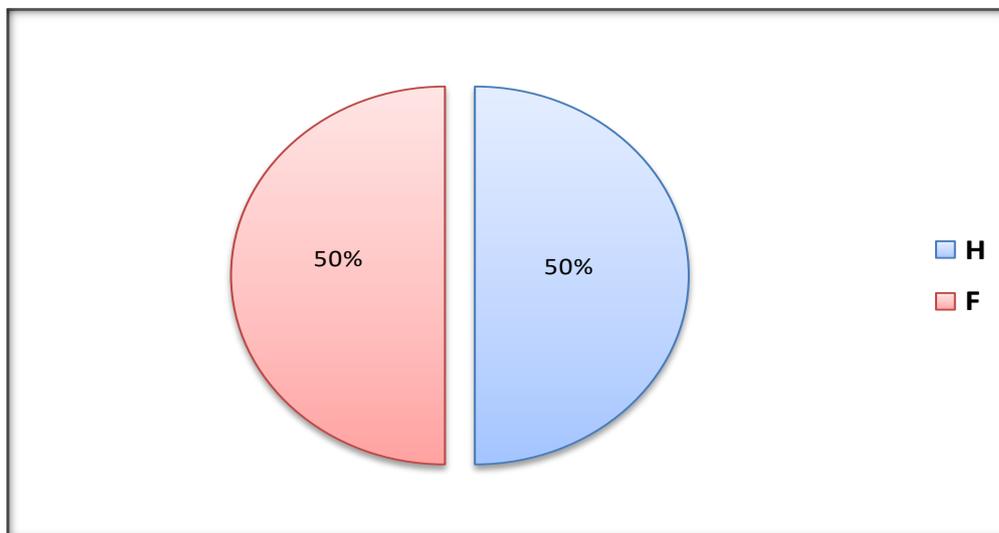


Figure 19 : Répartition des cas selon le sexe.

1.3. Répartition selon le siège de la tumeur primitive :

Dans notre série, la localisation pancréatique est la plus fréquente (12 cas, soit 24% des cas), suivie de l'intestin grêle (10 cas, soit 20%). La localisation hépatique est la moins fréquente (1 cas, soit 2%).

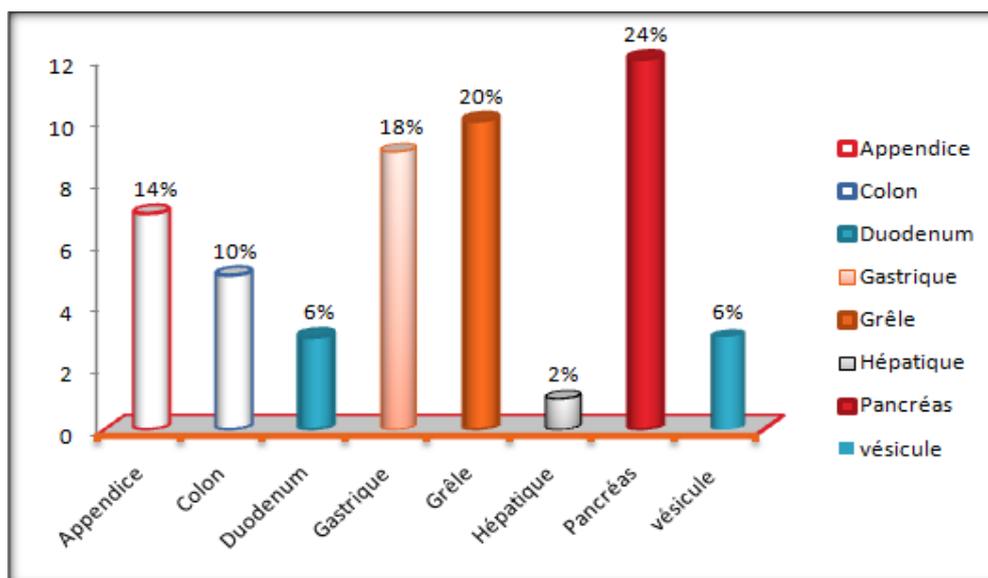


Figure 20: Répartition des cas selon le siège de la tumeur primitive.

1.4. Répartition selon le stade de différenciation :

La différenciation des TNEd nous a causé des difficultés, car les termes de carcinome neuroendocrine bien différencié ou de tumeur neuroendocrine bien différenciée de pronostic incertain ont disparu [2]. Cela nous a amené à reclasser ces cas dans la catégorie des tumeurs neuroendocrines bien différenciées soit de grade 2 ou de grade 3 selon l'évaluation du Ki67.

Ainsi nous avons recueilli :

- ✓ 1 cas (2%) de carcinome neuroendocrine peu différencié à grande cellules,
- ✓ 1 cas (2%) de carcinome neuroendocrine mixte,
- ✓ 2 cas (4%) de carcinome neuroendocrine peu différencié à petite cellules
- ✓ 46 cas (92%) de tumeur neuroendocrine bien différenciée. (Fig19).

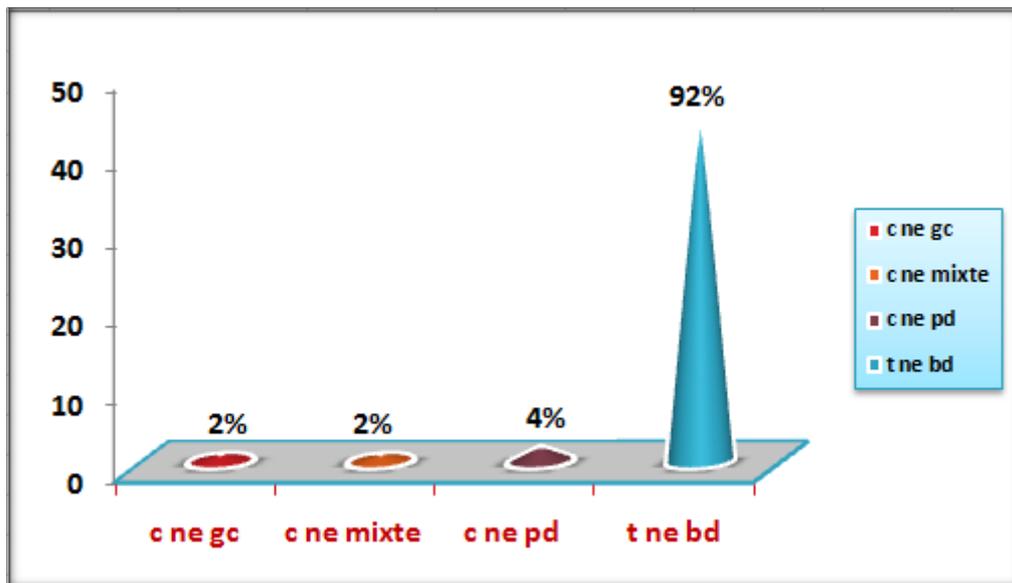


Figure 21: Répartition des cas selon le stade de différenciation.

Parmi les 46 cas (92%) de tumeurs neuroendocrines bien différenciées : (Fig25)

- 15 cas (30%) sont classées TNE bien différenciées grade 1,
- 21 cas (42%) sont classées TNE bien différenciées grade 2 et

- 10 cas (20%) sont classés TNE bien différenciés grade 3.

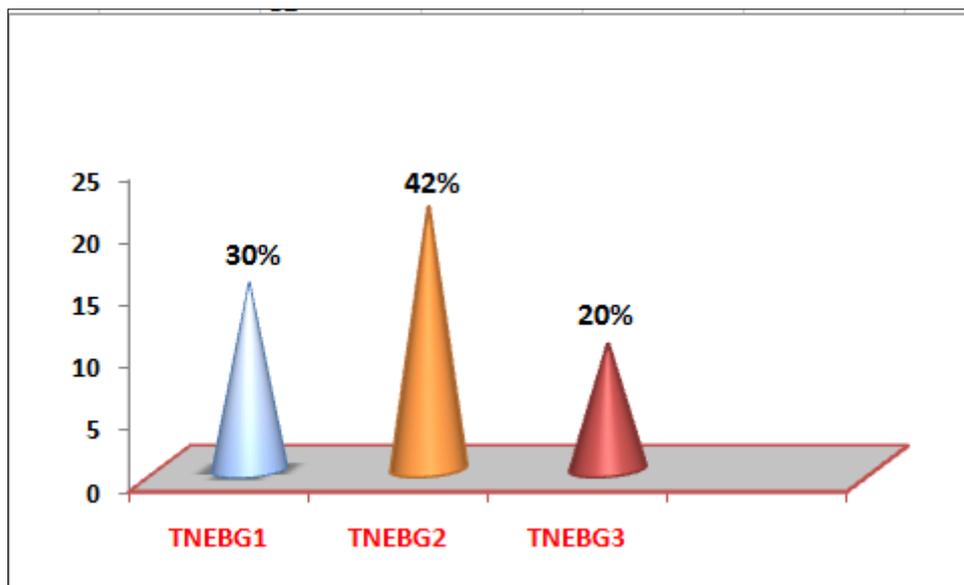


Figure 22 : Répartition des tumeurs neuroendocrines bien différenciées.

1.5. Les métastases :

Au moment du diagnostic, 13 patients (26%) avaient des métastases à distance (Tableau 4). Le site le plus fréquent était le foie (9 cas, soit 69,24%), suivi de l'épilon (2 cas, soit 15,38), de la rate et de la paravertèbre (1 cas chacun, soit 7,69%). 7 patients (14%) présentaient des métastases ganglionnaires.

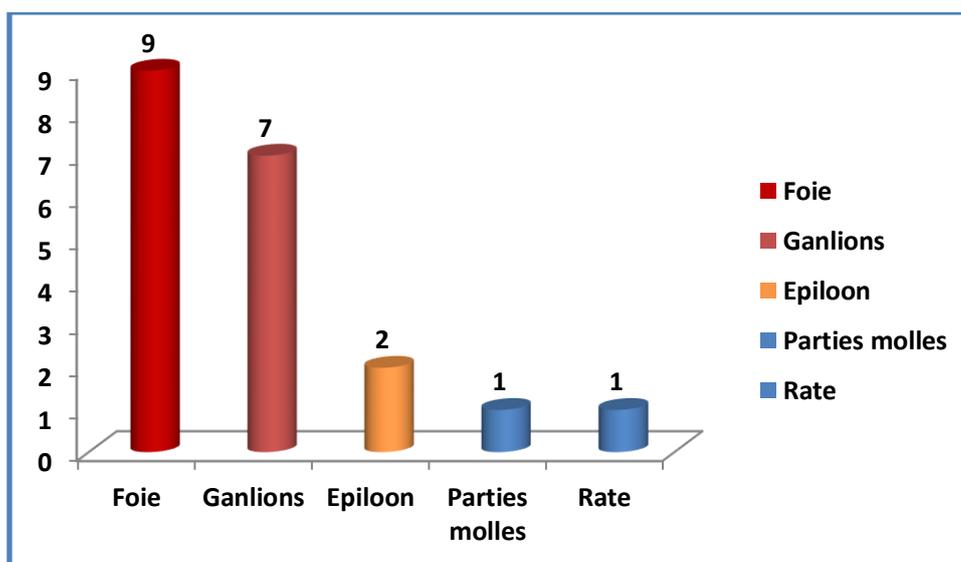


Figure 23 : Répartition des métastases (à distance et ganglionnaires).

1.6. Les envahissements :

Au moment du diagnostic, 5 cas (10%) présentaient des envahissements périnerveux et 1 cas (2%) des emboles vasculaires.

2. Evaluation de l'index de prolifération par le Ki67 et par le compte mitotique

2.1. Répartition selon l'évaluation par Ki67 :

Sur les 50 patients inclus :

- ✓ 15 cas (30%) sont classés de grade 1 avec une moyenne de compte de 1,3% et des extrêmes de 0 et 2%.
- ✓ 21 cas (42%) sont classés de grade 2 avec une moyenne de compte de 9,14% et des extrêmes de 3% et 20%.
- ✓ 14 cas (28%) dont 4 peu différenciés sont classés de grade 3 avec une moyenne de compte de 54,50% et des extrêmes de 30% et 98%.

Tableau 7: Statistiques descriptives du compte par le Ki67

	N	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart type
Ki67 Grade 1	15	0,00%	2,00%	1,3333%	0,72375%
Ki67 Grade 2	21	3,00%	20,00%	9,1429%	4,56383%
Ki67 Grade 3	14	30,00%	98,00%	54,5000%	21,38565%
N	50				



Figure 25 : Répartition des cas selon l'évaluation par le Ki67.

2.2. Répartition selon l'évaluation par le compte mitotique :

Sur les 50 patients inclus :

- ✓ 13 cas (26%) étaient classés de grade 1 avec une moyenne de 0,62 mitose et des extrêmes de 0 et 1 mitose.
- ✓ 25 cas (50%) étaient classés de grade 2 avec une moyenne de 8,20 mitoses et des extrêmes de 2 et 20 mitoses.
- ✓ 12 cas (24%) dont 4 peu différenciés étaient classés de grade 3 avec une moyenne de 31,75 mitoses et des extrêmes de 22 et 40 mitoses.

Tableau 8: Statistiques descriptives du compte mitotique

	N	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart type
Mitose Grade 1	13	0	1	0,62	0,506
Mitose Grade 2	25	2	20	8,20	5,454
Mitose Grade 3	12	22	40	31,75	7,841
N	50				

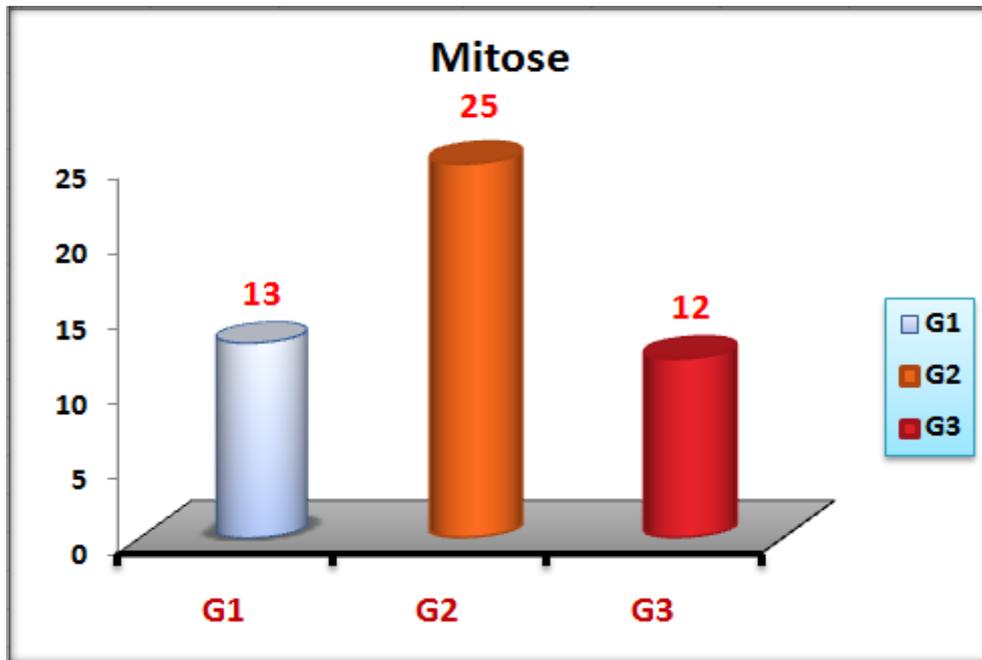


Figure 26 : Répartition des cas selon l'évaluation par la mitose.

2.3. Concordance entre l'index mitotique et Ki67 :

La concordance observée entre les deux méthodes était :

- ✓ 11 cas pour le grade 1
- ✓ 19 cas pour le grade 2
- ✓ 11 cas pour le grade 3

La discordance observée entre les deux méthodes était :

- ✓ 3 cas classés grade 1 par le compte par le Ki67 étaient classés grade 2 par le compte mitotique.
- ✓ 1 cas classé grade 1 par le compte par le Ki67 était classé grade 3 par le compte mitotique.
- ✓ 2 cas classés grade 2 par le compte par le Ki67 étaient classés grade 1 par le compte mitotique.
- ✓ 3 cas classés grade 3 par le compte par le Ki67 étaient classés grade 2 par le compte mitotique.

Ainsi, nous avons observé 41 cas de concordance et 9 cas de discordance (Tableau 9, Figure 27).

Tableau 9 : Concordance entre la Mitose et le ki67

		Grade par ki67			Total
		G1	G2	G3	
Grade par Mitose	G1	11**	2*	0	13
	G2	3*	19**	3*	25
	G3	1*	0	11**	12
Total		15	21	14	50

** Concordance (41 cas)

*Discordance (9 cas)

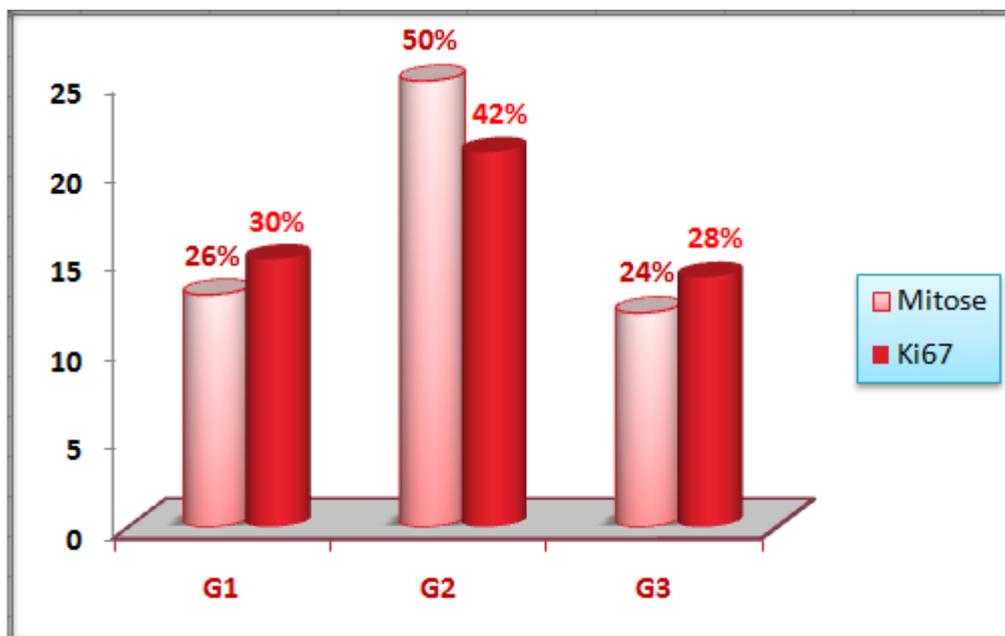


Figure 27: Concordance entre l'index mitotique et Ki67.

L'analyse statistique effectuée sur les résultats des deux méthodes sous forme de grade, a montré un kappa de Cohen à **0,721** situé dans l'intervalle [0,61; 0,80], considéré comme un accord satisfaisant. Ce résultat ($p=0,000$; $P < 0,05$) est hautement significatif. (Tableau 10).

Tableau 10 : Coefficient kappa de Cohen

		Valeur	Erreur standard asymptotique	T approximé	Signification approximée
Mesure d'accord	Kappa	0.721	0.084	7.180	0.000
Nombre d'observations valides		50			

L'étude statistique effectuée sur les résultats des deux méthodes sous forme, numérique, a montré un coefficient de Pearson à 0,998, considéré comme une corrélation positive forte ($P=0,040$; $P < 0,05$).

Tableau 11 : coefficient de corrélation de Pearson

	Valeur	Erreur standard asymptotique ^a	T approximé ^b	Signification approximée
Intervalle par R de Intervalle Pearson	,998	,002	15,781	,040 ^c

a. L'hypothèse nulle n'est pas considérée.

b. Utilisation de l'erreur standard asymptotique dans l'hypothèse nulle.

c. Basé sur une approximation normale.

VII. Discussions

1. Caractéristiques clinico-pathologiques des patients :

1.1. Caractéristiques cliniques:

1.1.1. Les tumeurs neuroendocrines digestives fonctionnelles :

Les tumeurs neuroendocrines peuvent se situer dans tout l'appareil digestif, incluant le tube digestif, le pancréas et le foie. Elles sont parfois associées à des syndromes cliniques spécifiques causés par une hypersécrétion tumorale d'hormones (sérotonine, 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 [1], les glucagonomes, les somatostatines, les gastrinomes et les VIPomes.

a. Le syndrome carcinoïde :

Il est la manifestation clinique caractéristique des TNE GI. Il s'agit le plus souvent d'une tumeur neuroendocrine métastatique du jéjunum distal, de l'iléum ou du caecum. Il est dû à l'action de substances vasoactives (sérotonine surtout mais aussi la bradykinine, l'histamine, la substance P..) sécrétées par la tumeur et qui sont normalement dégradées au niveau du foie. Ce syndrome n'est retrouvé que dans 2% à 5% de l'ensemble des TNE primitives. Ainsi le syndrome carcinoïde s'observe surtout en cas de métastases hépatiques ayant atteint un seuil critique de volume tumoral ou dans le cas d'une tumeur primitive (même sans métastases) qui déversent directement leurs sécrétions dans la circulation systémique via la veine cave inférieure court-circuitant le métabolisme et la dégradation hépatique. Ce syndrome associe : [8]

- ✓ Un flush cutané : c'est le symptôme le plus fréquent sous forme d'un érythème paroxystique vasomoteur de la face, du cou et de la face antérieure du thorax pouvant apparaître spontanément mais souvent déclenché par une émotion, l'exercice, certains aliments ou la prise d'alcool.
- ✓ Une diarrhée chronique de type motrice faites de selles impérieuses et liquides. Plus rarement il s'agit de diarrhées par malabsorption.
- ✓ Des douleurs abdominales : Il peut s'agir de coliques intestinales induites par l'hyper motricité, elle-même source de diarrhée ; Les autres causes des douleurs abdominales (obstruction intestinale, métastases hépatiques ou infarctus entéro- mésentérique par ischémie ou fibrose) sont le fait de la tumeur primitive ou de ses métastases.
- ✓ Un bronchospasme peut s'associer au flush dans certains cas, ou être induit par une induction anesthésique il doit donc être prévenu avant tout geste opératoire.

b. 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 (< 1 cm) 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 [9].

c. Les gastrinomes

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

Les symptômes se manifestent par:

- ✓ des douleurs abdominales
- ✓ des ulcères peptiques, multiples et récidivants,
- ✓ des diarrhées et un reflux œsophagien secondaire à l'hypersécrétion de gastrine entrant dans le cadre du syndrome de Zollinger–Ellison. 30% de ces tumeurs développent des métastases hépatiques [10].
- ✓ Une concentration plasmatique élevée en gastrine est une aide pour le

diagnostic.

d. 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.

e. 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 majorité des cas. Les symptômes principaux du VIPome sont

- ✓ une diarrhée hydrique massive et prolongée (volume des selles à jeun > 750 à 1000 mL/jour et des selles de non-jeûne > 3000 mL/jour). Chez la moitié des patients, la diarrhée est constante; la gravité de la diarrhée varie dans le temps.
- ✓ une hypokaliémie, une acidose métabolique et une déshydratation.

f. Les somatostatинomes :

Le plus souvent uniques, elles se développent dans le pancréas ainsi que dans le duodénum. Les manifestations cliniques inconstantes, se traduisent :

- ✓ par des diarrhées,
- ✓ une perte de poids,

- ✓ la constitution de lithiases des voies biliaires ou un diabète.
- ✓ une augmentation de la concentration plasmatique de la somatostatine aide pour le diagnostic.

1.1.2. Les TNE digestives non fonctionnelles :

Les tumeurs neuroendocrines non fonctionnelles représentent 30 à 40% des TNEd [9]. 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 [9].

Les TNEd sont souvent diagnostiquées 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 [9].

Dans notre série nous n'avons pas pu exploiter ces données (caractéristiques cliniques) à partir des dossiers cliniques.

1.2. **Caractéristiques épidémiologiques et pathologiques :**

Dans notre étude, les comparaisons de fréquence entre les caractéristiques (sexe, âge, embolies vasculaires, envahissements périnerveux, métastases à distance et ganglionnaires) et les grades (Ki67 ou compte mitotique) n'étaient statistiquement significatives ($P > 0,05$). Ce résultat est superposable à celui de Tracht et al en ce qui concerne les métastases ganglionnaires ($P = 0,041$; $P > 0,05$) [4].

L'incidence annuelle des tumeurs neuroendocrines en France est estimée à 2 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes [35].

Enfin, même si l'incidence reste faible, les TNE constituent, du fait de leur longue survie, le deuxième cancer en termes de prévalence après le cancer colorectal [4]

Aux Etats-Unis, les études effectuées sur la base de données SEER montrent une augmentation du taux d'incidence annuelle [5]. Ce phénomène s'explique probablement 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 [6,7] et enfin une vraie augmentation de leur incidence non expliquée pour l'instant.

Dans notre contexte, nous ne disposons d'aucune donnée concernant l'incidence des TNE gastro-intestinales à Fès.

1.1. Age :

En France, l'âge moyen au diagnostic des TNEd se situe autour de 67 ans chez l'homme et de 65 ans chez la femme [4].

Dans notre série ainsi que dans une série algérienne nous constatons que cette maladie est rare entre chez les sujets jeunes, soit 4% (≤ 20 ans) dans notre série et 6% (10–20 ans) dans la série algérienne [31].

1.2. Sexe :

En France comme dans les autres parties du monde, le sexe ratio est presque égal à 1, mais il existe une légère prédominance masculine avec un sexe-ratio de 1.5 dans l'étude du registre bourguignon et en Suisse [4]. Ces résultats sont superposables à celui de notre étude qui enregistre un sexe ratio égal à 1.

1.3. Le siège de la tumeur primitive :

- En Algérie, dans la région de Constantine (CHU de Constantine), les sites les plus représentés étaient l'intestin grêle dans 44% des cas, et le pancréas dans 22 % des cas [1].
- En France, la localisation la plus fréquente des TNE bien différenciés malignes, était l'intestin grêle, puis le pancréas. Les centres spécialisés avaient observé plus de cas de tumeurs pancréatiques (36% dans l'étude PRONET) [4].
- Une étude récente faite aux USA a porté sur 645 patients. Elle a trouvé une atteinte colorectale chez 30.1% des patients, de l'œsophage chez 22.2%, du pancréas chez 20.2%, hépatobiliaire chez 11.6% et de l'estomac chez 9.6% [31].

Ainsi, nous constatons que la fréquence des sites varie selon les études. Cependant, nos résultats (localisation pancréatique : 24% et intestinale : 20%) sont comparables avec ceux des études menées en France et en Algérie.

1.4. Le stade de différenciation :

En France, 54% étaient de grade G1, 28% de grade G2, 13.5% de grade G3 ; dans 4% cas, le grade était non indiqué ou non évaluable [4].

Dans la série de **Mechehoud N.** en Algérie : 11 % étaient des tumeurs de Grade 1, 44% étaient des tumeurs de Grade 2, 17% étaient des tumeurs de Grade 3, et 28% étaient non précis [1].

Dans notre étude aussi, on a constaté que les TNE bien différenciées de grade G2 étaient les plus fréquentes (42%).

1.5. Les métastases :

Dans notre série, les métastases hépatiques étaient les plus fréquentes. Ce résultat est compatible avec les données de la littérature [1, 2].

1.6. Les embolies vasculaires :

Dans la série de Laurine S. (CHU de Lille), 10 patients (24%) sur 42 ont présenté des embolies vasculaires [31].

Dans notre étude 5 patients (10%) sur 50 ont présenté des embolies vasculaires.

2. Evaluation de l'index de prolifération par le Ki67 et par le compte mitotique :

Dans notre étude bien que la corrélation entre le taux de mitose et l'indice Ki67 soit bonne ($P < 0,05$), il existe tout de même des cas de discordance, ce qui est conforme aux résultats d'une grande étude multi-institutionnelle récente [36].

Ces discordances peuvent s'expliquer par :

- ✓ La difficulté des pathologistes à repérer les zones les plus mitotiques sur les TNE peu proliférations.
- ✓ Les mitoses changent d'aspect morphologique en fonction de la phase du cycle dans laquelle la cellule tumorale se trouve et cela peut rendre la reconnaissance des figures de mitose difficile et subjective.
- ✓ Une mauvaise fixation tissulaire.
- ✓ Les seuils établis entre les faibles grades (G1 et G2).

PHH3 est une protéine histone située dans la chromatine eucaryote. Il a été démontré qu'elle coïncide avec la mitose dans le temps et dans l'espace. Il est présent lorsque les chromosomes sont complètement condensés et est négligeable dans la phase d'interphase [37].

Plusieurs études récentes ont démontré l'efficacité de l'immunomarquage PHH3 dans l'identification précise de figures mitotiques dans divers types de tumeurs, avec des résultats significatifs [37].

VIII. Conclusion et recommandations

La méthode d'analyse de l'index mitotique est fiable dans l'élaboration du grade des TNEd. Dans notre étude, les deux méthodes analysées sont comparables avec une concordance satisfaisante. Bien que la corrélation entre le taux de mitose et l'indice Ki67 soit bonne, cependant quelques discordances entre les grades (1 et 2) et (3 et 2) ont été mises en évidence d'où l'intérêt d'associer les 2 méthodes pour évaluer le potentiel agressif de ce type de tumeur.

Les discordances entre les faibles grades (1 et 2) font discuter les seuils établis, cela d'autant plus que la reconnaissance des figures de mitose peut être difficile et souvent subjective.

L'utilisation de PHH3 peut être justifiée dans l'identification précise de figures mitotiques.

Références bibliographiques

- [1]. **Mechehoud Nihed.** Etude rétrospective sur les tumeurs neuroendocrines digestives dans la région de Constantine : aspects épidémiologiques et anatomopathologiques. 2017, 90 p.
- [2]. **Camilo Adem et Thomas Petit (Dir),** Mémento de pathologie 5^{ème} édition : Tumeurs endocrines digestives : Paris, octobre 2017 ; p125.
- [3]. **Walter T ; Scoazec JY ; Lepage c.** Epidémiologie des tumeurs neuroendocrines digestives en France. Hépatogastro et oncologie digestive 2013 ; 20 : 160–166. Doi : 10.1684/hpg.2013.0852.
- [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]. **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.
- [6]. **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.
- [7]. **Nahon S, Launay J-M, Matuchansky C.** Syndrome carcinoïde : aspects cliniques, physiopathologiques et thérapeutiques récents. Hépatogastro Oncol Dig. 1998.
- [8]. **Anatomie pathologique des tumeurs neuro-endocrines.** JP SAINT ANDRÉ, I VALO, S GUYÉTANT. e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2003,

- [9]. **d'Herbomez M.** Les marqueurs biologiques des tumeurs endocrines digestives. Médecine Nucl. 2009.
- [10]. 2017 **Société canadienne du cancer.** www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancertype/neuroendocrine/neuroendocrine-tumours/the-neuroendocrine-system.
- [11]. **Saint André JP ; Dupre F ; Chenue S et al.** Histopathologie des tumeurs neuroendocrines. Annale d'endocrinologie (paris) 1997 ; 58 ; 101-111.
- [12]. **Arnold R.** Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Introduction: definition, historical aspects, classification, staging, prognosis and therapeutic options. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2005.
- [13]. **Encyclopédie médicale.** MEDIX : système des cellules neuroendocrines <http://pe.sfrnet.org/Data/ModuleConsultationPoster/pdf/2006/1/c3502cef-0d0c-4020-a51c-224a3be9a0a9.pdf>
- [14]. **Klöppel G, Heitz PU.** Die disseminierten (diffusen) endokrinen Zellen. In: Pathologie der endokrinen Organ. Springer Berlin Heidelberg; 1981.
- [15]. **Ransom W.** A case of primary carcinoma of the ileum. The Lancet. 1890.
- [16]. **Oberndorfer, S.** Karzinoide tumoren des dunndarms. Frankfurt Z Pathol. 1907;
- [17]. **Masson P.** Am J Pathol. Carcinoids (Argentaffin-Cell Tumors) and Nerve Hyperplasia of the Appendicular Mucosa. 1928.
- [18]. **Mathonnet M.** Tumeurs endocrines digestives : stratégie diagnostique. J Chir (Paris). 2007.
- [19]. **Pearse E. J** Histochem Cytochem. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the

embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. 1969.

- [20].C. Capella, P. U. Heitz, H. Höfler, G. Klöppel. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut.1995
- [21].EM consulte Système neuroendocrinien disséminé et pathologie cervico-faciale:<http://www.em-consulte.com/article/12174/systeme-neuroendocrinien-dissemine-et-pathologie-c>.
- [22].Stéphanie Lopez. Tumeur neuroendocrine du pancréas (étude de 33 cas). Université de Limoge, faculté de médecine. Revue de littérature 2003 ; 157/1.
- [23].Scoazec JY. Tumeur endocrine (biologie et physiopathologie). Annal de pathol 2005 ; 25 ; 447-61.
- [24].Yakoub M ; Laban E ; Taris M et al. Classification et aspect anatomopathologique de tumeurs endocrines digestives. Médecine nucléaire 33 ; 2009 ; 680-688
- [25].Pauline Andreu, Christine Perret et Béatrice Romagnolo. Wnt et Cellules souches intestinale des liasons dangereuses [en ligne]. Disponible sur : <https://www.erudit.org/fr/revues/ms/2006-v22-n8-9-ms1423/013773ar/>.
- [26].Wiedenmann B, Huttner WB. Synaptophysin and chromogranins/secretogranins : widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. 1989
- [27].M. SCHLUMBERGER, E. BAUBIN. Tumeurs neuroendocrines [en ligne]. Disponible sur : <https://www.em-consulte.com/en/article/74881>, [consulté le 07-605-2019]. Annale d'endocrinologie, (58), N°2, mai 1997, P. 95
- [28].Pizzi S, Azzoni C, Tamburini E, Bottarelli L et al. Adenomatous polyposis coli

alteration in digestive endocrine tumours: correlation with nuclear translocation of beta-catenin and chromosomal instability. *Endocr Relat Cancer*. 2008.

[29].Jean-Yves Scoazec a,*,b, Anne Couvelardc,d, pour le Réseau TENpath :

Classification of pancreatic neuroendocrine tumours: Changes made in the 2017 WHO classification of tumours of endocrine organs and perspectives for the future

[30].Scoazec JY ; Anne C. Une nouvelle classification OMS des tumeurs neuroendocrines digestives. *Annales de pathologie* 2011 31, 88–92

[31].SCHERMAN, Laurine. Etude comparative de deux méthodes d'évaluation du compte mitotique et de l'analyse du Ki67 dans l'élaboration du grade des tumeurs/carcinomes neuroendocrines du pancréas: reproductibilité inter-observateur, concordance et valeur pronostique. Doctorat de médecine. Lille : FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG), 2016, 87 p. Format PDF. Disponible sur : <http://pepite-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esup...> (consulté le 15-02-2019)

[32].Vocabulaire médical, 2 mars 2015, Endocrine/exocrine [en ligne]. Disponible sur : <https://www.vocabulaire-medical.fr/encyclopedie/071-endocrine-exocrine>. [consulté le 19-04-2019].

[33].Frédéric Santos, 9 avril 2018. Le kappa de Cohen : un outil de mesure de l'accord inter-juges sur des caractères qualitatifs [en ligne]. Disponible sur https://www.pacea.u_bordeaux1.fr/IMG/pdf/Kappa_Cohen.pdf. [consulté le 21-04-2019] p 2.

[34]. McCall et al, (2013). Grading of Well-differentiated Pancreatic

Neuroendocrine Tumors Is Improved by the Inclusion of Both Ki67 Proliferative Index and Mitotic Rate. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(11), 1671-1677. doi:10.1097/pas.000000000000089

- [35]. **Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD.** Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997;106:348-60.
- [36]. **Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA.** Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem*. 1978;84:1-15.
- [37]. **Tracht, J., Zhang, K., & Peker, D.** (2017). Grading and Prognostication of Neuroendocrine Tumors of the Pancreas: A Comparison Study of Ki67 and PHH3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 65(7), 399-405.
- [38]. **Camilo Adem et Thomas Petit (Dir),** Mémento de pathologie 4^{ème} édition : Tumeurs endocrines digestives : Paris, octobre 2014 ; p122.
- [39]. **Rindi, G., Petrone, G., & Inzani, F.** (2014). The 2010 WHO Classification of Digestive Neuroendocrine Neoplasms: a Critical Appraisal four years after Its Introduction. *Endocrine Pathology*, 25(2), 186-192. doi:10.1007/s12022-014-9313-z.
- [40]. **DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C:** World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs, Lyon: IARC Press, 2004.