Intérêt du Ki67 dans les tumeurs carcinoïdes typiques et atypiques en pathologie pulmonaire

Introduction

En pathologie pulmonaire, les tumeurs neuroendocrines (TNE) se divisent en quatre catégories : le carcinoïde typique (CT), le carcinoïde atypique (CA), le carcinome neuroendocrine à grandes cellules (CNEGC) et le carcinome neuroendocrine à petites cellules (CPC).

D'après la classification OMS (organisation mondiale de la santé) 2021, les tumeurs neuroendocrines pulmonaires doivent être regroupées à des fins pronostiques et thérapeutiques en trois groupes :

1/ les CT, qui sont des tumeurs malignes de bas grade bénéficiant d'un traitement chirurgical ;

2/ les CA qui sont des tumeurs malignes de grade intermédiaire bénéficiant d'un traitement chirurgical également [1] ;

3/ les CNEGC et CPC, qui sont des tumeurs malignes de haut grade avec un pronostic plus sombre, relevant le plus souvent d'un traitement par radiothérapie et/ou chimiothérapie.

Le sous-typage des tumeurs neuroendocrines pulmonaires est un processus codifié dans lequel les quatre variantes histologiques sont classées par leur aspect morphologique, le nombre de mitoses établit sur 2 mm^2 et la présence de nécrose. Les aspects morphologiques évocateurs associés à l'expression immunohistochimique de marqueurs neuroendocrines (chromogranine, synaptophysine et CD56) sont nécessaires pour poser leur diagnostic.

Les tumeurs carcinoïdes pulmonaires CT et CA sont des tumeurs rares dont le taux d'incidence varie de 0,2 à 2/100 000 habitants/an aux Etats-Unis et en Europe et le rapport entre CT et CA est d'environ 8/10 [1]. Il s'agit de tumeurs rares représentant moins de 2 % de toutes les néoplasies pulmonaires. Il existe une prédominance féminine et l'incidence est la plus élevée entre la cinquième et la sixième décade. Les CT ont une localisation intéressant préférentiellement la partie proximale ou intermédiaire d'un lobe pulmonaire alors que les CA sont plus fréquemment périphériques. Les CT sont généralement de plus petite taille que les CA. Morphologiquement, leur architecture est classiquement neuroendocrine en nids, en travées ou en rosettes, composées de cellules éosinophiles, monotones, cohésives aux

noyaux dont la chromatine est fine, d'aspect « poivre et sel ». S'il s'agit de CT, il n'y a pas de nécrose et le nombre de mitose est inférieur à 2 pour 2mm², s'il s'agit de CA le compte mitotique est compris entre 2 et 10 pour 2mm² et/ou il existe de la nécrose tumorale.

Les CPC et les CNEGC sont des tumeurs plus fréquentes que les tumeurs carcinoïdes et représentent respectivement environ 15 et 3% des néoplasies pulmonaires. Les CPC sont le plus souvent proximaux ou intermédiaires et les CNEGC plutôt périphériques. Les CPC présentent une architecture moins bien différenciée et sont souvent très nécrotiques avec des nappes de cellules monotones pouvant montrer par place quelques aspects de rosettes, des noyaux se déformant mutuellement et de très nombreuses mitoses (> 10 pour 2 mm²). Les CNEGC ont une architecture neuroendocrine évocatrice au faible grandissement mais montrent de larges plages de nécrose, des cellules aux noyaux souvent nucléolés ou vésiculeux et un index mitotique également très élevé (> 10 pour 2 mm²).

Les CT présentent généralement une longue espérance de vie avec des taux de survie global à 5 et 10 ans supérieur à 90 %. Les CA présentent une évolution clinique plus agressive et un taux de survie global à 5 ans allant de 56 à 87 %, qui est plus faible chez les patients avec ganglions positifs [2] [3]. Les CPC et les CNEGC ont un pronostic très défavorable avec une survie médiane superposable de 10 mois d'après l'OMS.

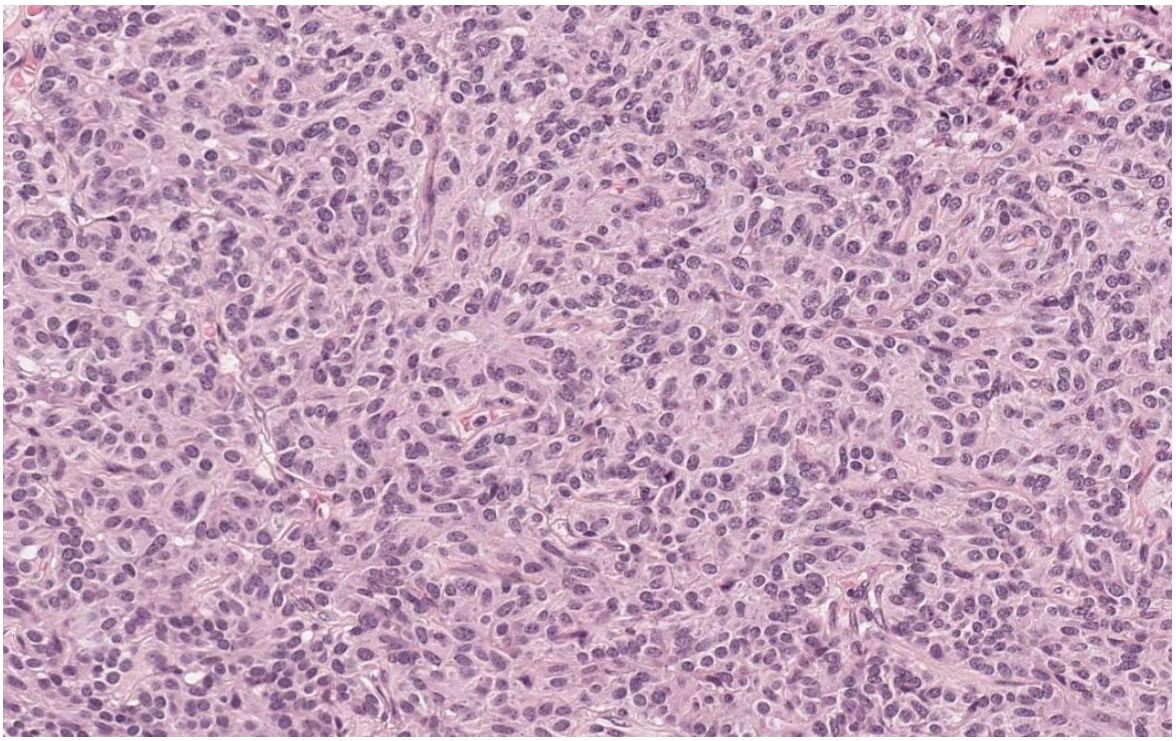


Image 1 : Carcinoïde typique : tumeur homogène comportant classiquement peu de stroma, composée de cellules monotones éosinophiles aux noyaux ronds et réguliers. L'activité mitotique est faible et la nécrose absente.

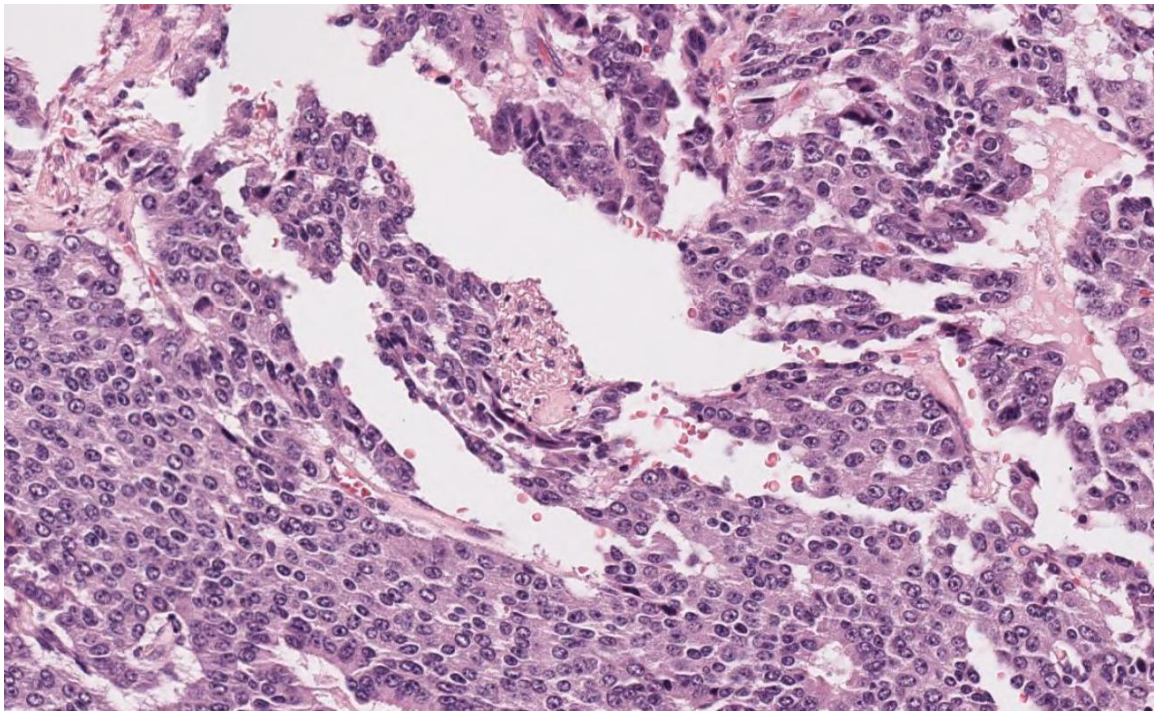


Image 2. Carcinoïde atypique : au fort grossissement, des zones de nécroses sont visibles.

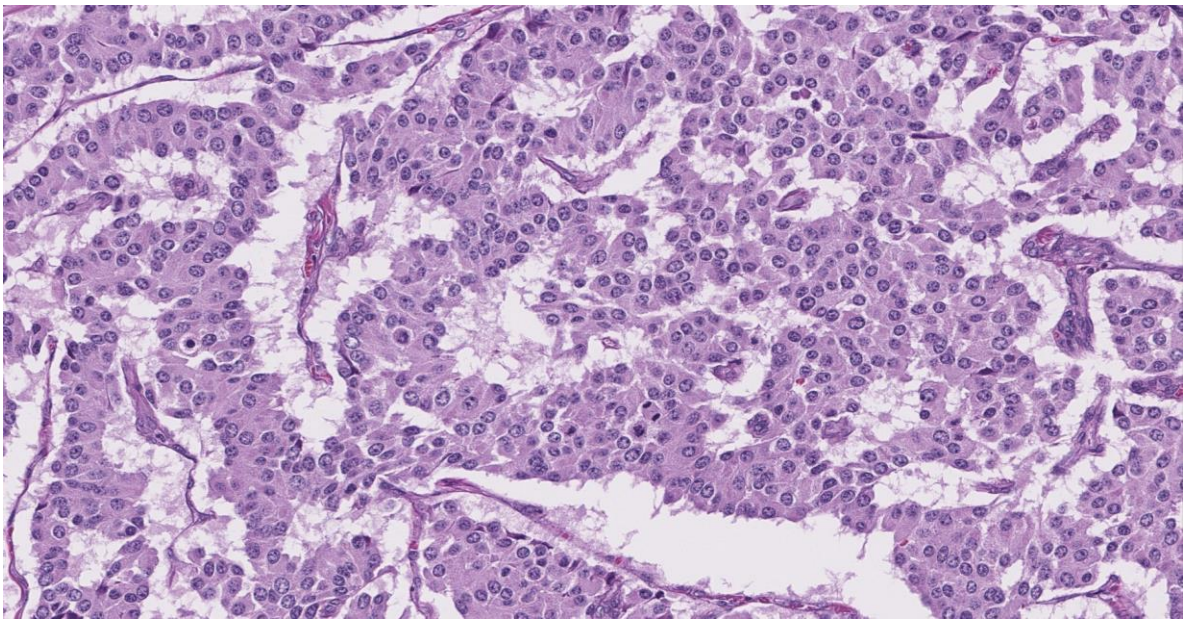


Image 3 : Carcinoïde atypique montrant des figures mitotiques

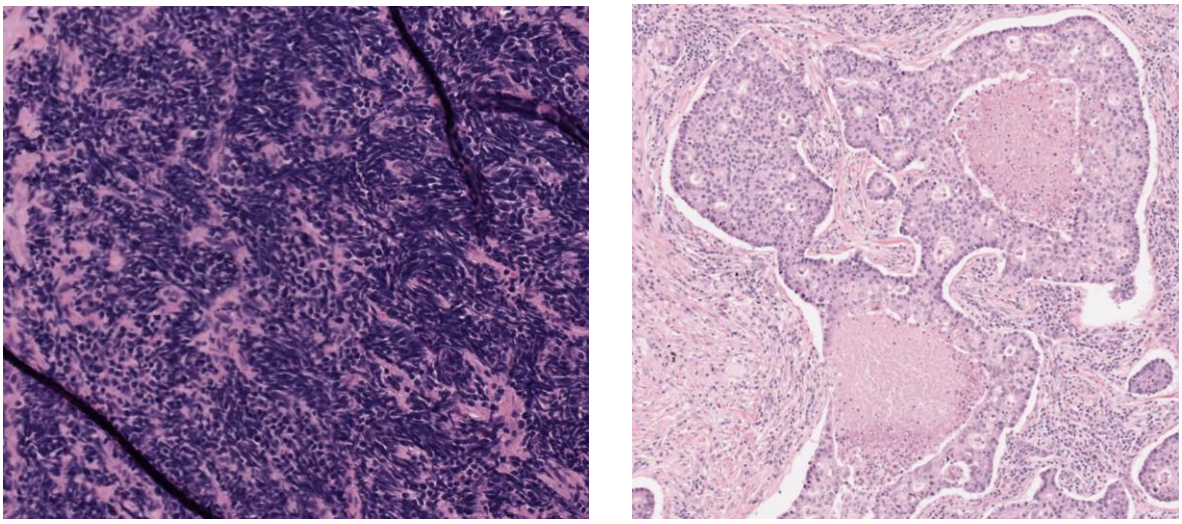


Image 4 : Carcinome neuroendocrine à petites cellules à gauche, carcinome neuroendocrine à grandes cellules à droite

Les métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux se développent chez 4 à 64 % des patients atteints de carcinoïdes, le plus souvent en association avec les CA (30 à 40% des cas) bien que présentes chez 5 à 20 % des patients atteint de CT [4] [5].

Les patients peuvent également présenter des métastases à distance, essentiellement dans le foie, les os, le cerveau, le tissu sous-cutané, les glandes sous-cutané et dans les glandes mammaires. Les métastases à distance sont rares dans les CT (5% des cas) et plus fréquentes dans les CA (20-30%) [6].

Pour la majorité des patients, le traitement chirurgical a une visée curatrice ce d'autant que les traitements chimio et radiothérapiques ont une efficacité limitée sur ces tumeurs [7] [8]. Le problème majeur avec les tumeurs carcinoïdes est qu'elles peuvent récidiver parfois plus de 10 ans après le diagnostic initial, souvent sous forme de maladie métastatique, ce qui ne peut être prédit de manière fiable au moment du diagnostic. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour les maladies métastatiques et les critères histopronostiques prédictifs de cette récidive manquent.

La classification en 3 grades est donc très fortement dépendante du compte mitotique. Or les mitoses sont parfois difficiles à reconnaitre [9] et une forte variabilité inter observateur et intra observateur sur ce comptage mitotique a été mis en évidence dans quelques études [10].

Les tumeurs neuroendocrines ne sont pas limitées uniquement à la pathologie thoracique mais se retrouvent dans de nombreux autres organes et notamment en pathologie digestive. La classification 2010 des tumeurs neuroendocrines du tube digestif de l'OMS a intégré l'index de prolifération estimé à l'aide du Ki67 (Ki67) qui apporte une valeur pronostique [11] et diagnostique pour distinguer en 3 grades les tumeurs neuroendocrines bien différenciées [12]. Les tumeurs neuroendocrines digestives peu différenciées sont classées séparément.

L'antigène Ki-67, identifié par l'anticorps monoclonal Ki-67, est un antigène de 359 kD, non histone, à demi-vie courte, qui est codée par le gène MKI67, composé de 15 exons, qui se situe sur le chromosome 10 en position 10q26.2. Il s'agit d'une protéine jouant un rôle essentiel dans le contrôle et la synchronisation de la prolifération cellulaire, qui subit un mécanisme complexe de phosphorylation et de déphosphorylation post-traductionnel par les régulateurs clés du cycle cellulaire. Fonctionnellement, l'expression de Ki-67 est finement régulée par des microARN spécifiques, elle est produite pendant tout le cycle cellulaire, avec un maximum dans les phases G2 et M (phase de la mitose) et n'est pas exprimée en phase G0. Le comptage assisté par intelligence artificielle (IA) du Ki67, est considéré comme une

méthode alternative prometteuse. Les nouvelles méthodes de comptage automatisé du Ki67 visent à compter l'ensemble des cellules tumorales négatives et positives puis à en établir un rapport. Les méthodes automatisées présentent des propriétés d'objectivité, de rapidité et de haute répétabilité [13].

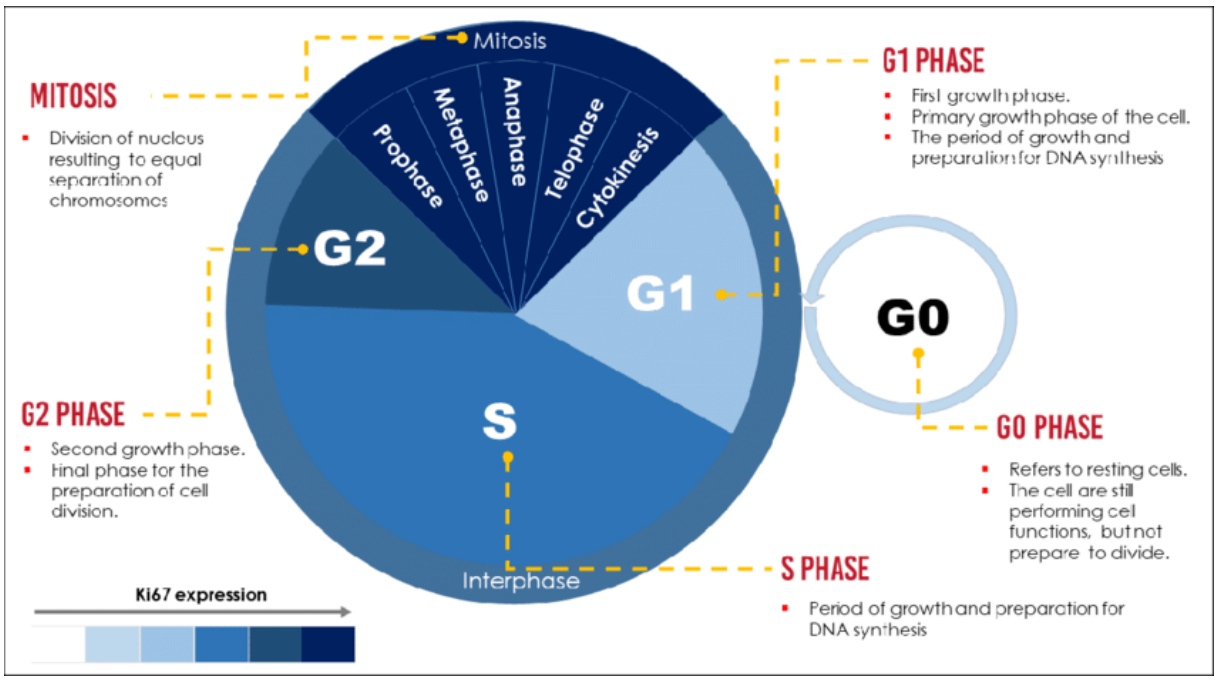


Schéma 1 : expression du Ki67 au cours du cycle cellulaire

La classification OMS 2019 des tumeurs neuroendocrines digestives définit de façon précise la méthode de quantification du marquage Ki67 par le compte d'au moins 500 cellules dans les régions les plus marquées "hot-spots", qui sont identifiées par balayage de la lame au faible grossissement et les classe comme suit :

1/ Les tumeurs neuroendocrines bien différenciées de grade 1, définies comme des tumeurs neuroendocrines présentant un index mitotique inférieur à 2 pour 2 mm² et un Ki67 inférieur à 3 %.

2/ Les tumeurs neuroendocrines bien différenciées de grade 2, définies comme des tumeurs neuroendocrines présentant un index mitotique compris entre 2 et 20 et/ou un Ki67 compris entre 3 et 20 %.

3/ Les tumeurs neuroendocrines bien différenciées de grade 3, définis comme des tumeurs neuroendocrines présentant un compte mitotique supérieur à 20 et/ou un Ki67 supérieur à 20%.

4/ Les tumeurs neuroendocrines peu différenciées, présentant un compte mitotique supérieur à 20 et/ou un Ki67 supérieur à 20% et regroupant deux sous-types : les carcinomes neuroendocrines à petites cellules et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules.

L'utilisation du Ki67 possède différents avantages, les biais inter et intra-observateur sont bien inférieurs à celui du compte mitotique [14][15], bien qu'il ne les supprime pas complètement [16] [17]. De plus, il est d'utilisation courante, familier des pathologistes et des cliniciens et bénéficie d'une forte disponibilité dans les différents laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques (ACP). Le comptage du Ki67 reste un défi raison de sa variabilité d'expression au sein d'une même tumeur. Actuellement, la mesure du Ki67 peut être divisée en deux méthodes principales : la méthode manuelle et la méthode assistée par logiciel de reconnaissance d'image. Les recommandations de comptage émises par la société nationale française de gastro-entérologie consistent à l'évaluation du Ki67 dans un champ d'au moins 500 cellules sur la zone de hot-spot, et non pas par l'évaluation de la valeur moyenne sur plusieurs champs. Aucune recommandation ne précise le seuil d'intensité de marquage du Ki67 à prendre en compte comme étant positif, cependant il est communément accepté que toutes les intensités de marquage soient interprétées comme tel. Le résultat est à exprimer en pourcentage de cellules positives par rapport au nombre de cellules tumorales total compté [18]. Il est également recommandé pour améliorer la reproductibilité de réaliser ce comptage sur une impression papier en couleur [19] [11].

Il existe plusieurs clones d'anticorps Ki-67 disponibles sur le marché, le clone Mib-1 s'est imposé comme étant le réactif le plus fiable pour reconnaître Ki-67 sur coupe en paraffine [20]. D'autres clones utilisés en routine ont une fiabilité équivalente comme le clone 30-9 [21]. Toutefois il est important de noter qu'il n'existe pas de protocole standardisé pour l'utilisation en laboratoire de cet anticorps ce qui peut conduire à une variabilité inter-laboratoire [22].

Selon la nouvelle classification de l'OMS 2021, le rôle principal du Ki-67 dans les tumeurs neuroendocrines du poumon est d'aider à distinguer les tumeurs carcinoïdes des CPC et CNEGC, en particulier dans les petites biopsies avec artefacts d'écrasement dans lesquelles l'identification des mitoses est difficile. Le rôle et l'intérêt du Ki-67 pour la différenciation entre carcinoïdes pulmonaires typiques et atypiques reste controversé et il n'y a actuellement aucun consensus concernant sa valeur diagnostic ou pronostic [23]. Toujours selon l'OMS et la littérature, des méthodes très variables de coloration et d'interprétation du Ki-67 ont été utilisé et aucun seuil cohérent n'a été trouvé pour le diagnostic différentiel entre CT et CA. En effet les seuils varient de 2,3 % à 4,15% pour les CT et de 9 % à 17,8 % pour les CA. Il est également précisé que le Ki67 ne doit pas être utilisé pour le diagnostic, bien que les tumeurs carcinoïdes ayant un Ki67 > 5% soient plus susceptibles d'être des CA. La recommandation est de poursuivre les recherches avant d'incorporer le KI-67 à la classification des tumeurs neuroendocrines pulmonaires. Cependant, une étude récente [24] a rapporté que le Ki67 peut améliorer la prédiction de l'issue de la maladie sans avoir toutefois de réel impact supplémentaire sur le diagnostic histologique alors que d'autres études proposent une classification en 3 grade basée sur le Ki67 [25] et suggère un intérêt pronostic [26].

L'hôpital Nord de Marseille est un centre de référence de chirurgie thoracique et de nombreux patients ont été opérés et sont suivis pour des tumeurs carcinoïdes pulmonaires. Cela nous a permis de constituer une cohorte unicentrique de patients pour lesquels du matériel histologique était disponible pour l'étude de l'intérêt du Ki67.

Les objectifs de notre étude ont alors été :

- De comparer différentes méthodes numériques de quantification à la méthode de référence ;
- D'évaluer la capacité diagnostique du marquage Ki67 dans la distinction CT et CA ;
- D'évaluer la valeur pronostique du marquage Ki67 dans la prédiction d'une récidive ou d'un décès dans les CT et CA.

Matériel et Méthode

Patients et échantillons tumoraux

137 patients opérés entre janvier 2005 et septembre 2018 pour lesquels a été posé un diagnostic de carcinoïde typique ou atypique ont été sélectionnés à partir d'une base de données du service de chirurgie thoracique du Professeur Thomas de l'hôpital Nord de Marseille.

Les données cliniques comprenant l'âge au moment du diagnostic, le sexe, la date de l'opération, le type de résection et les données de suivi ont été extraites des dossiers électroniques ou papier des patients.

Les données anatomopathologiques comprenant la taille tumorale, le compte mitotique, le stade TNM, le siège tumoral, la nécrose, l'angioinvasion, le nombre de ganglions prélevés, le nombre de ganglions positifs et les limites d'exérèse ont été extraites des comptes rendus initialement rédigés par le pathologiste ayant posé le diagnostic tumoral.

Autorisation institutionnelle

L'utilisation des données de santé a été validée par le délégué de la protection des données de l'assistance publique des hôpitaux de Marseille. Elle est considérée en règle vis-à-vis du règlement général sur la protection des données.

Coupes en paraffine

Pour chaque cas, deux blocs de tissu tumoral représentatifs de la pièce de résection primaire ont été sélectionnés pour une évaluation immunohistochimique sur coupes de 3 microns d'épaisseur.

Immunohistochimie

Les lames de tissu ont été déparaffinées dans du xylène, lavées à l'alcool benzylique, puis rincées à l'eau distillée. Les peroxydases endogènes ont été bloquées en incubant le tissu dans du peroxyde d'hydrogène. L'anticorps primaire Ki67 (clone 30-9 Ventana) a été appliqué sur le tissu. Puis la coloration a été réalisée à l'aide d'un système entièrement automatisé (système Benchmark XT ; Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ).

Numérisation

Les lames ont été numérisées au grossissement x20 à l'aide d'un scanner de lame aperio scanscope.

Quantification du Ki67

Le Ki67 a été évalué par 6 méthodes par lame : une méthode par comptage manuel et cinq méthodes par analyse d'image numérique.

Le comptage manuel (cpt.manuel) est la méthode de référence utilisée en pathologie digestive. Il a été effectué sur une impression papier en couleur du hot-spot.

Le hot-spot a été défini après balayage de la lame, il s'agit de la zone comportant le plus de marquage positif du Ki67. Le Ki67 est d'expression hétérogène au sein d'une même lésion et en cas de doute lors de cette première évaluation semi-quantitative, plusieurs zones ont été comptées et la zone comportant le Ki67 le plus élevé a été retenue.

Pour chaque zone, 500 cellules tumorales ont été comptées : les 500 cellules ont d'abord été rayées les unes après les autres par un feutre noir, puis les cellules positives, toutes intensités de marquages confondues, ont été cerclées à l'aide d'un feutre rouge. Le rapport cellules positives/cellules totales a ensuite été exprimé en pourcentage.

L'analyse d'image numérique a été réalisée à l'aide de deux logiciels : Qupath et Calopix.

Qupath est un logiciel en accès libre créé par la faculté de médecine d'Edimbourg spécialement pour l'analyse d'image anatomopathologique et comprenant un algorithme de détection cellulaire intégrant une intelligence artificielle (IA) à calibrer.

Calopix est un logiciel acheté par l'APHM et couramment utilisé par les services d'anatomopathologie pour l'analyse d'image, il utilise un algorithme de détection de pixels.

Pour Qupath, une zone de 2 mm2 englobant la zone de hot-spot a été sélectionnée. Après avoir été calibré sur les vingt premières lames analysées, l'algorithme de détection cellulaire intégrant une IA a ensuite été exécuté.

La calibration de Qupath a été faite en modifiant les paramètres suivants : image de détection (détection optimale de l'image), sigma (segmentation nucléaire), surface minimale (exclusion des petites cellules non tumorales telles que les cellules inflammatoires), surface

maximale (réduction du bruit immunohistochimique), le seuil de détection et le seuil d'intensité de détection minimal (réglage de l'intensité du marquage à partir de laquelle les cellules sont considérées comme des cellules Ki67-positives). A la suite de cette calibration, deux algorithmes ont été retenus différant par leur valeur de seuil d'intensité de détection minimal, nous les avons nommés seuil bas et seuil haut. Ensuite nous avons lancé les analyses pour chaque algorithme lame après lame sans autre ajustement. Quatre analyses ont été réalisées, deux analyses en seuil bas et deux analyses en seuil haut : les deux premières sur la même zone de 2 mm² centrées autour du hot-spot et les deux suivantes sur 500 cellules au niveau du hot spot. La détection des cellules positives rapportées à la détection totale des cellules tumorale donne l'index Ki67 en pourcentage.

Une dernière analyse avec un algorithme de détection de pixels colorés positivement avec le logiciel Calopix a été réalisée sur lame entière. Cette analyse sur lame entière demandant une forte puissance de calcul ne pouvait pas être réalisée par Qupath. Dans cette méthode, les cellules analysées comprenaient aussi bien les cellules tumorales que toutes les cellules des tissus adjacents (stroma, parenchyme pulmonaire non tumoral).

Ces analyses sont nommées comme suit :

- Ki67.lame : comptage par Calopix du Ki67 sur lame entière ;
- Ki67.haut : comptage par Qupath sur une zone tumorale de 2mm² du Ki67 utilisant un seuil de détection haut, c'est-à-dire prenant en compte uniquement les intensités de marquage immunohistochimique fortes ;
- Ki67.bas : comptage par Qupath la même zone que Ki67.haut utilisant un seuil bas, c'est-à-dire détectant toutes les intensités de marquage, y compris les faux marquages « bavage » ;
- cpt.IA.haut : comptage par Qupath sur une zone tumorale de 500 cellules du Ki67 utilisant un seuil de détection haut ;
- cpt.IA.bas : comptage par Qupath sur le même zone que cpt.IA.haut du Ki67 utilisant un seuil bas.

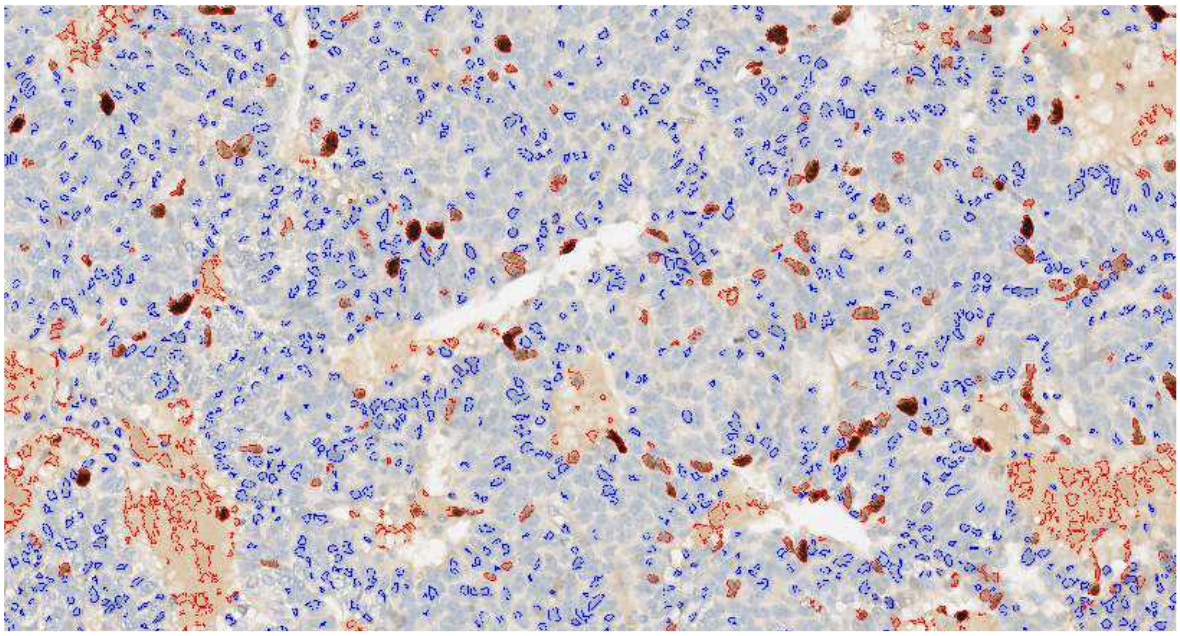


Image 5. Ki67.lame, comptage par Calopix : identification des pixels positifs (rouge) et négatifs (bleu) sur lame entière

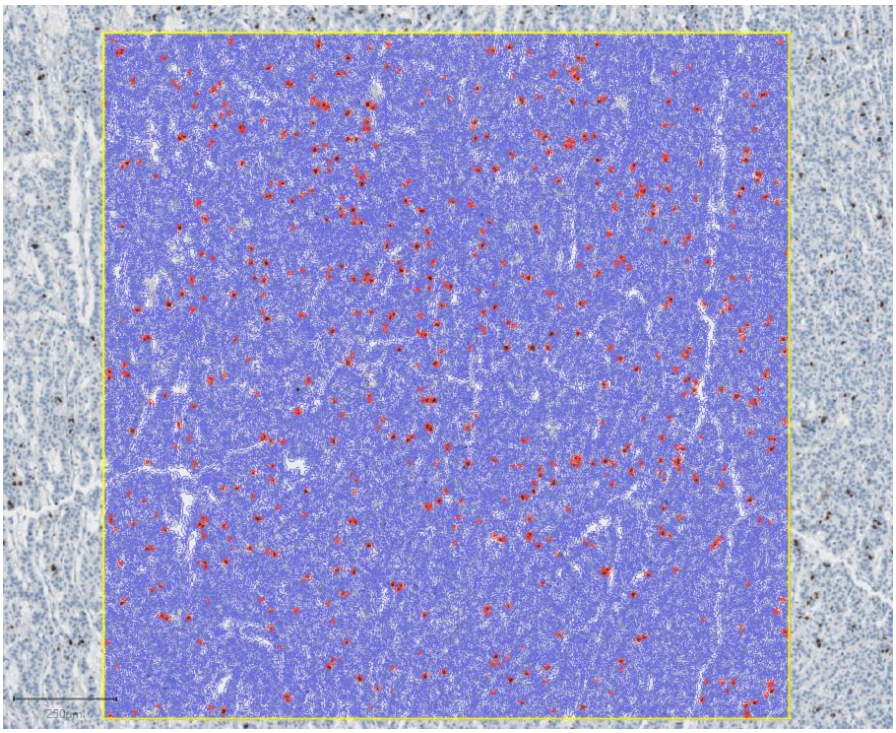


Image 6. Ki67.bas, comptage par Qupath du Ki67 sur une zone de 2mm² centré autour du hot-spot avec un seuil bas (Ki67 = 3.2%)

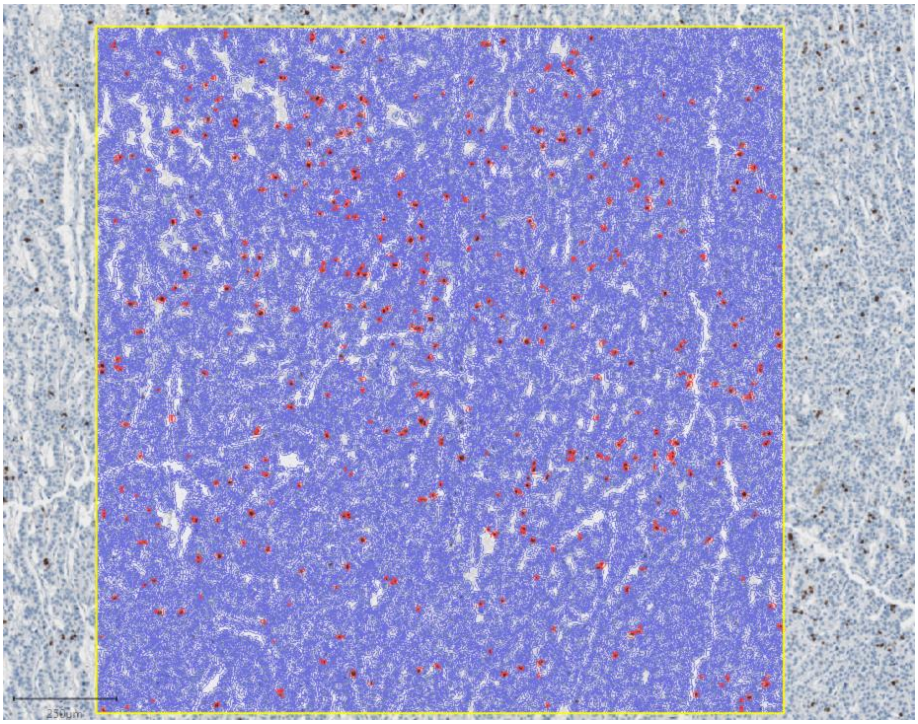


Image 7. Ki67.haut, comptage par Qupath du Ki67 sur la même zone qu'à l'image 6 avec un seuil haut (Ki67=2,1%).

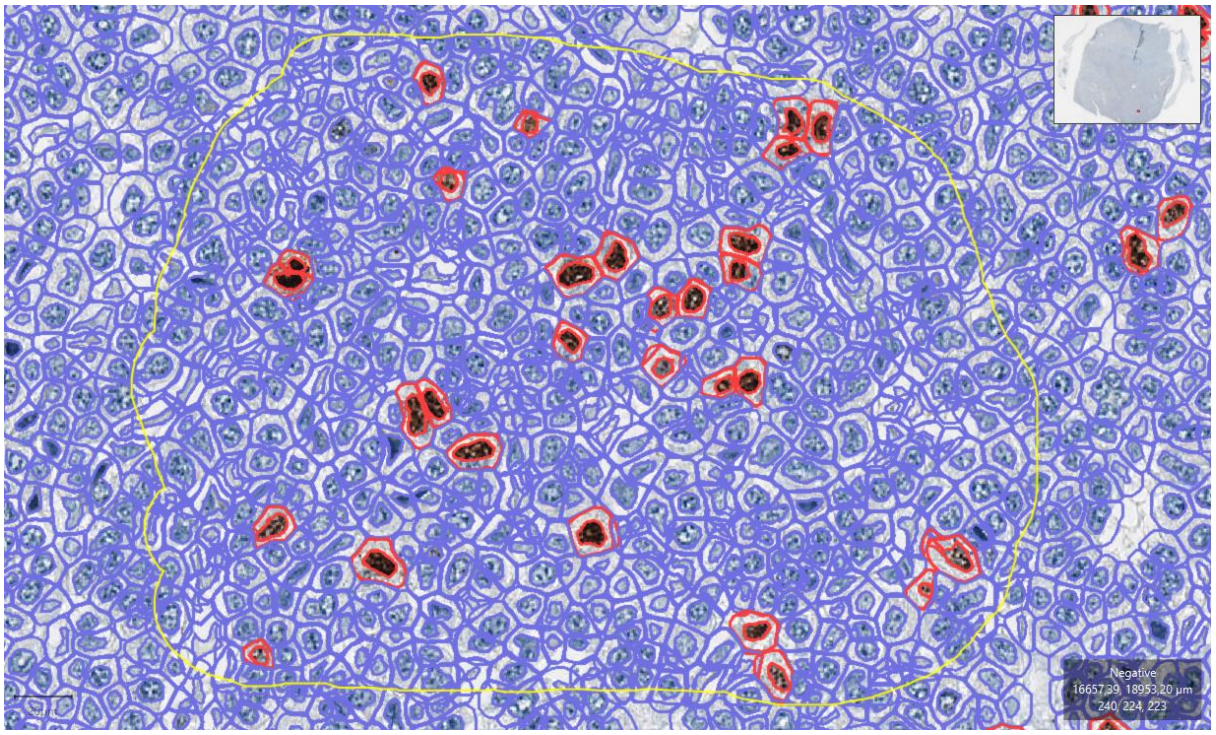


Image 8. Cpt.IA.bas, comptage par Qupath sur 500 cellules au niveau du hot spot (seuil bas)

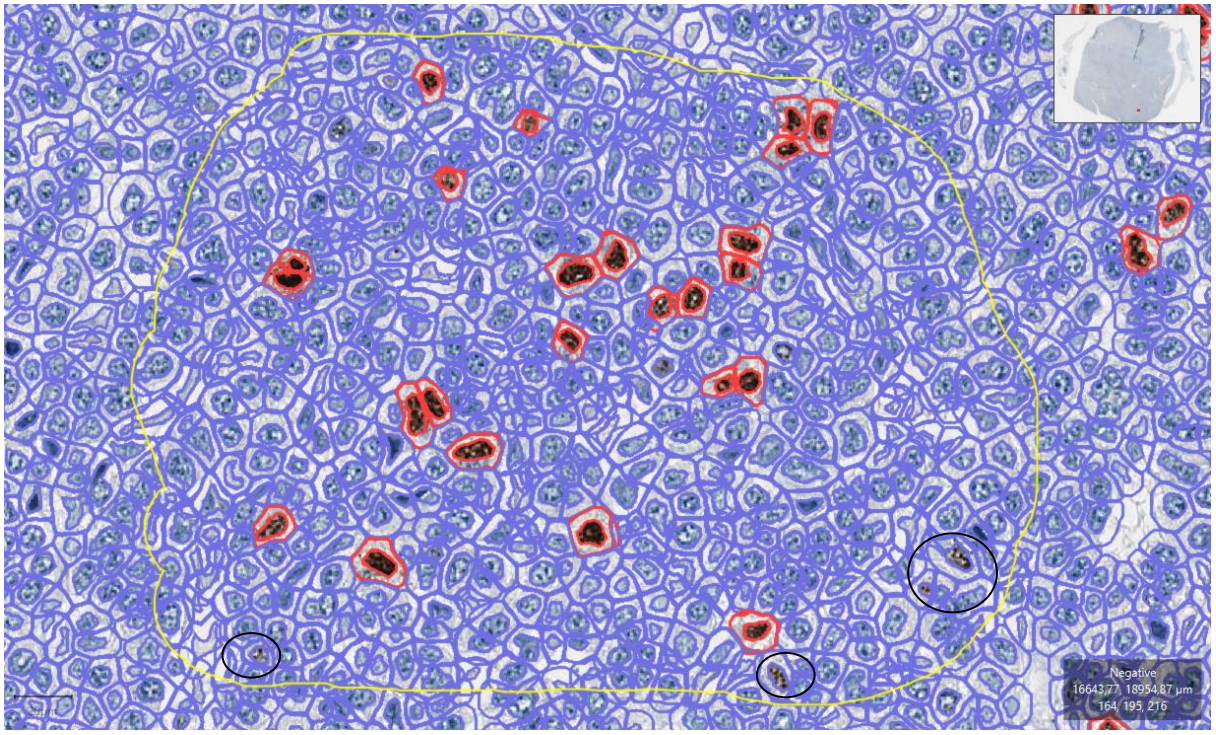


Image 9. Cpt.IA.haut, comptage par Qupath sur la même zone qu'à l'image 8 (seuil haut)

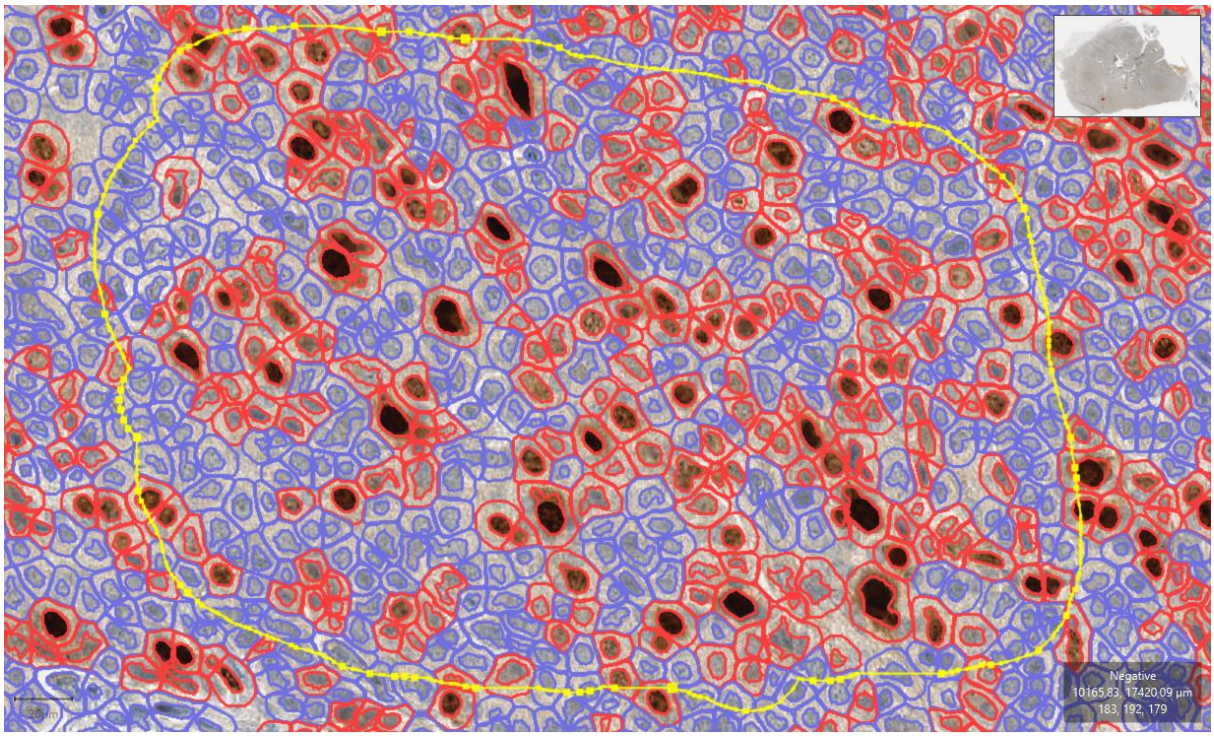


Image 10. Cpt.IA.bas, Comptage par Qupath sur 500 cellules au niveau du hot-spot, avec bavage cytoplasmique de l'anticorps interprété comme positif (seuil bas)

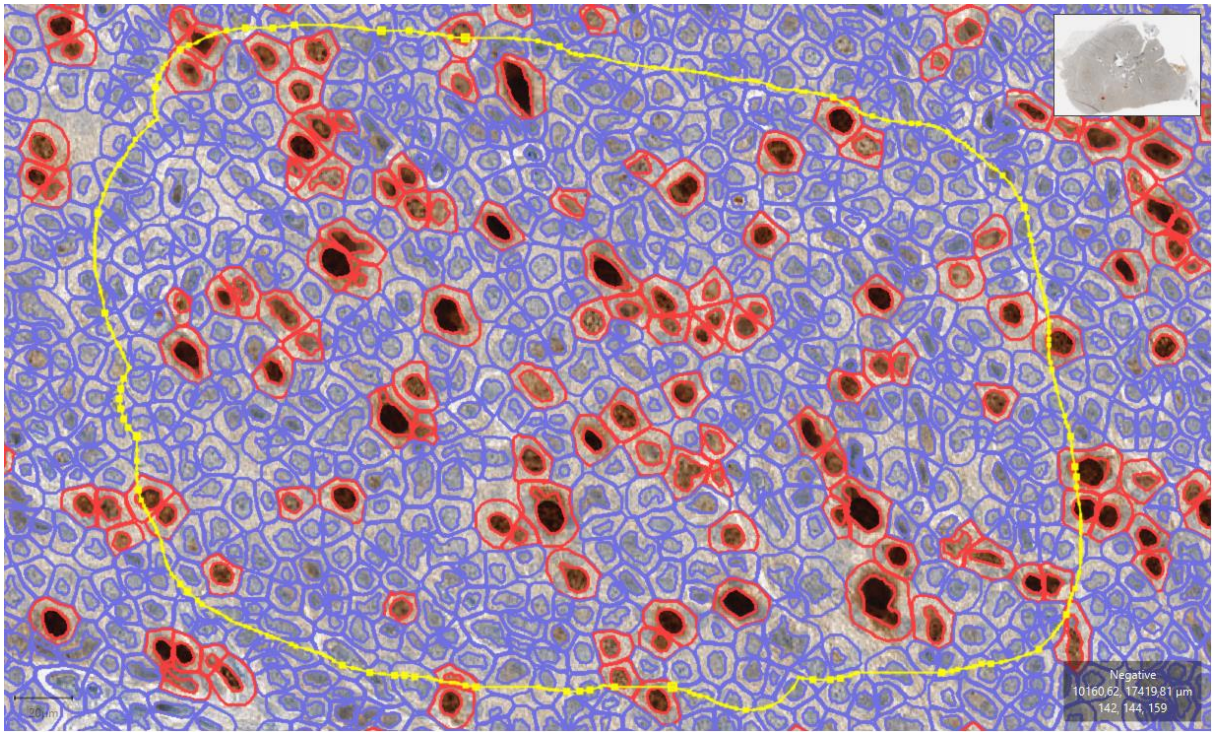


Image 11. Cpt.IA.haut, Comptage par Qupath sur la même zone qu'à l'image 10, avec bavage cytoplasmique de l'anticorps corrigé par un seuil de détection haut, mais ne comptant pas certains marquages nucléaires de faible intensité

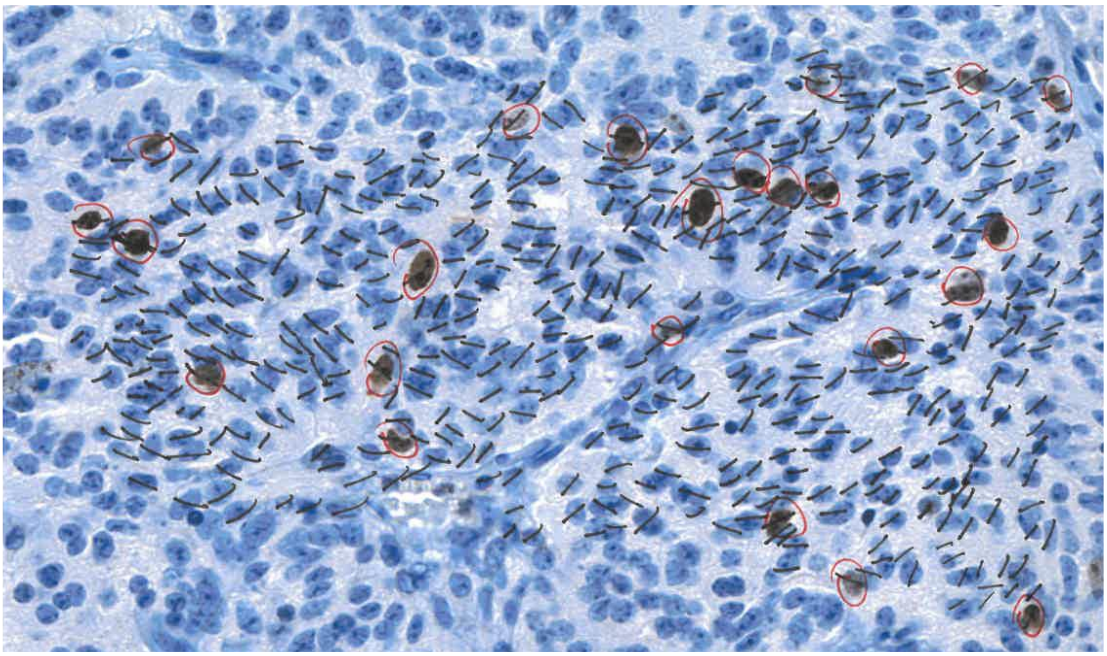


Image 12. Cpt.manuel : Comptage manuel d'un hot-spot sur photo imprimée en couleur

Analyse statistique

Les variables continues ont été décrites par leur moyenne, écart-type, valeur minimum et maximum. Les variables catégorielles ont été décrites par leur effectif et pourcentage.

Les variables continues ont été comparées par le test non paramétrique U de Mann-Whitney. Les variables catégorielles ont été comparées par le test du chi-deux ou par le test de Fisher, selon les conditions d'applications.

Les corrélations entre les différentes mesures de Ki67 ont été estimées et testées par la méthode de Pearson.

La survie sans événement a été estimée par la méthode de Kaplan-Meyer et les distributions de survie sans événement ont été comparées par le test du log-rank. Les distributions des différentes mesures de Ki67 ont été catégorisées par leur valeur médiane.

Pour les différentes mesures de Ki67, nous avons utilisé l'approche par courbe ROC pour rechercher d'éventuels seuils permettant de classer les patients selon leur statut vis-à-vis des évènements (présence vs absence) et selon le diagnostic (carcinoïde typique vs carcinoïde atypique). Nous avons estimé les aires sous la courbes ROC (AUC) ainsi que les valeurs de sensibilité, spécificité avec leurs intervalles de confiance à 95 % respectifs.

Les tests ont été réalisés en situation bilatérale et ont été considérés comme statistiquement significatifs pour $p \leq 0,05$. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel R (version 3.1.0).

Résultats

Description des effectifs

Parmi les 137 patients analysés, 110 présentaient un diagnostic de carcinoïde typique, 26 un diagnostic de carcinoïde atypique et 1 le diagnostic de carcinoïde, nos (sans autre précision). Le patient présentant le diagnostic de carcinoïde, nos a bénéficié d'une biopsie chirurgicale et le diagnostic n'a pas pu être réévalué sur pièce opératoire, car il s'est avéré que la biopsie avait emporté toute la lésion. Ce patient a été exclu de l'étude. L'âge moyen au diagnostic était de 53.29 ans, 87 patients étaient des femmes et 49 des hommes.

Au moment du diagnostic les patients présentant un diagnostic initial de carcinoïde typique avait un âge moyen de 54.26 ans, 74 étaient des femmes et 36 des hommes. Une localisation tumorale multifocale a été retrouvée chez 7 patients. Le siège tumoral était proximal pour 69 patients, intermédiaire pour 19 patients, périphérique pour 16 patients et de siège inconnu pour 6 patients. Douze patients avaient été opérés d'une résection atypique, 86 d'une lobectomie, 5 d'une lobectomie élargie et 7 d'une bilobectomie. Le nombre moyen de ganglions prélevés était de 13,7. La taille tumorale moyenne était de 21 mm et variait de 3 à 100 mm. D'après la classification TNM 8^{e} édition de 2017 : 21 patients étaient au stade T1a, 46 au stade T1b, 17 au stade T1c, 13 au stade T2a, 4 au stade T2b, 5 au stade T3 et 2 au stade T4 ; 80 étaient au stade N0, 13 au stade N1 et 6 au stade N2. Une ou plusieurs métastases ganglionnaires étaient présentes chez 19 patients. Sept patients avaient une angio-invasion et 1 était en limites non saines.

Les patients présentant un diagnostic initial de carcinoïde atypique avaient un âge moyen de 49.19 ans, comptaient 13 femmes et 13 hommes. Une localisation tumorale multifocale a été retrouvée chez 2 patients. Le siège tumoral était proximal pour 17 patients, intermédiaire pour 6 patients et périphérique pour 3 patients. Trois patients avaient été opérés d'une résection atypique, 18 d'une lobectomie, 3 d'une bilobectomie et 2 d'une pneumonectomie. Le nombre moyen de ganglions prélevés était de 16,65. La taille tumorale moyenne était de 34 mm et variait de 5 à 120 mm. D'après la classification TNM 8^{e} édition

de 2017 : les patients étaient 2 au stade T1a, 6 au stade T1b, 5 au stade T1c, 7 au stade T2a, 4 au stade T3 et 2 au stade T4 ; 12 patients étaient au stade N0, 8 au stade N1 et 5 au stade N2. Une ou plusieurs métastases ganglionnaires étaient présentes chez 13 patients. Dix patients présentaient de la nécrose et avaient une angio-invasion et aucun n'était en limites non saines.

	Variable	Carcinoïde Typique	Carcinoïde Atypique
Caractéristiques cliniques	Nombre	110	26
	Age moyen	54.26	49.19
	Femmes	74	13
	Hommes	36	13
Siège tumoral	Multifocal	7	2
	Proximal	69	17
	Intermédiaire	19	6
	Périphérique	16	3
	Siège inconnu	6	0
Geste opératoire	Résection atypique	12	3
	Lobectomie	86	18
	Lobectomie élargie	5	0
	Bilobectomie	7	3
	Pneumonectomie	0	2
Nombre moyen de ganglions prélevé		13.7 (1-33)	16.65 (1-40)
Caractéristiques histologiques	Taille tumorale moyenne (mm)	21 (3-100)	34 (5-120)
	Stade T1a	21	2
	T1b	46	6
	T1c	17	5
	T2a	13	7
	T2b	4	0
	T3	5	4
	T4	2	2
	Stade N0	80	12
	N1	13	8
	N2	6	5
	Patients avec métastase(s) ganglionnaire(s)	19	13
	Nécrose	0	10
	Angio-invasion	7	10
	Limites non saines	1	0

Tableau 1 – Description des effectifs

Comparaison de la survie globale entre CT et CA

Les 136 patients ont été suivis pendant 2 à 15 ans et l'événement pris en compte dans l'étude de la survie a été le premier survenant : récidive ou décès. Pendant la durée de suivi, 21 patients (15.4 %) ont présenté un évènement. Parmi ces 21 patients ayant présentés un évènement, 7 ont récidivés sous forme de métastase hépatique (4 sont décédés des suites de ces métastases) et 14 sont décédés d'autres causes. En raison du faible effectif de patients décédés des suites de leur tumeur, il ne nous a pas été possible de réaliser des analyses de survie spécifique.

Une proportion de 26.92 % des patients ayant un diagnostic de CA a présenté un évènement contre une proportion de 12.72% des patients ayant un diagnostic de CT. Une analyse statistique a été réalisée et montre de manière significative une meilleure survie à 1 an, 5 ans et 10 ans des CT par rapport au CA (tableau 2). Toutefois en raison du chevauchement des courbes de survie lors de la première année de suivi les courbes de survie de Kaplan-Meier montrent une p-value légèrement supérieure à 0.05 (figure1).

	Survie à 1an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	p-value
CT	98% (96-1)	91% (85-97)	84% (76-92)	p=0.0289
CA	88% (77-1)	77% (62-95)	71% (54-92)	

Tableau 2 : probabilité de survie dans le temps. Entre parenthèse : intervalle de confiance.

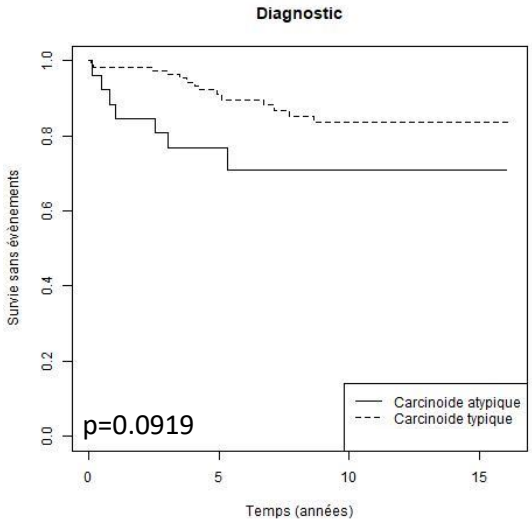


Figure 1 : Courbes de survie selon le diagnostic.

Intérêt pronostique sur la survie globale des facteurs conventionnels

Une analyse statistique a été réalisée pour connaître la valeur pronostique des variables catégorielles que sont le sexe, la nécrose et l'angio-invasion ainsi que la valeur pronostique des variables continues que sont l'âge, la taille tumorale, le nombre de ganglions positifs et les mitoses. Le statut 0 correspond à la survie sans évènement, le statut 1 à la survie avec évènement.

Variable	Classe	Statut 0	Statut 1	p-value
Sexe	Femmes	68.7	38.1	0.00723
	Hommes	31.3	61.9	
Nécrose	Présence	5.22	19.05	0.04792
	Absence	94.78	80.95	
Angio-invasion	Présence	12.28	14.29	0.72894
	Absence	87.72	85.71	

Tableau 3 : survie selon les variables catégorielles. Les résultats sont exprimés en pourcentage.

Variable	Statut	Valeur moyenne (min-max)	Ecart-type	Effectif	p-value
Age	0	50.49 (15-82)	17.69	115	<0.000001
	1	68.67 (38-84)	9.78	21	
Taille	0	23.55 (3-100)	15.4	114	0.32593
	1	25.25 (5-120)	27.74	20	
Ganglions positifs	0	0.47 (0-6)	1.1	110	0.76598
	1	0.58	1.26	19	
Mitoses	0	1.35 (0-8)	1.48	114	0.23737
	1	1.83 (0-7)	2.53	21	

Tableau 4 : survie selon les variables continues. Les résultats sont exprimés en valeur absolue.

Un âge moyen à 50.49 ans (contre 68.87 pour le groupe de statut 1), l'absence de nécrose et le sexe féminin étaient de bons facteurs pronostiques tous statistiquement significatifs. La taille tumorale, le nombre de ganglions positifs, le compte mitotique et l'angio-invasion au moment du diagnostic n'avaient pas de valeur pronostique.

Des courbes de survie selon le stade T, de la classification TNM 8e édition 2017 ont également été réalisées et ne montraient pas de résultats significatifs. Seuls les tumeurs de stade T4 montraient une tendance à une survie plus péjorative (figure 2).

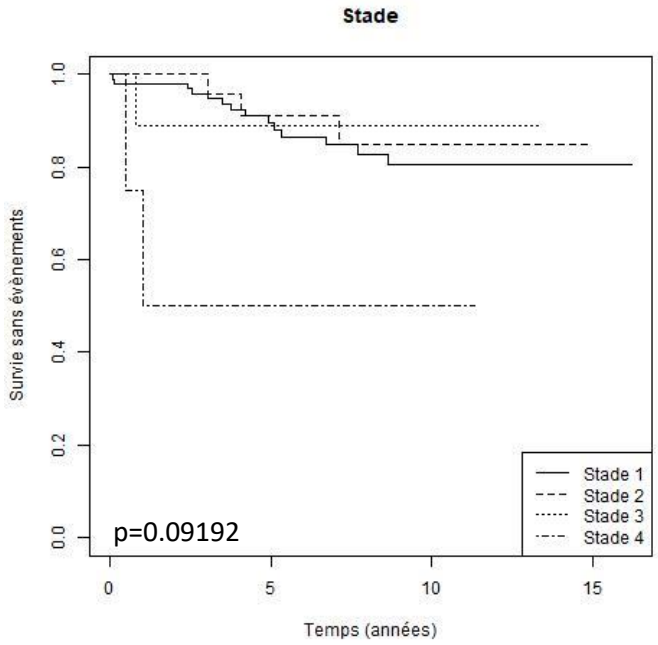


Figure 2. Courbes de survie selon le stade T

Corrélation entre les différentes méthodes de comptage et le comptage manuel

Les méthodes de quantification utilisées dans ce travail ont été comparées à la méthode de référence en pathologie neuroendocrine digestive (figure 3). Les coefficients de corrélation (présentés après chaque méthode entre parenthèse), ont été estimés et testés par la méthode de Pearson. Les trois méthodes les plus fortement corrélées à la méthode de comptage manuel étaient le « cpt.IA.haut » (0.98), le « cpt.IA.bas » (0.96) et le « Ki67.haut » (0.94). La quantification sur lame entière et la méthode « Ki67.bas » étaient peu corrélées à la méthode de référence (respectivement 0.48 et 0.44).

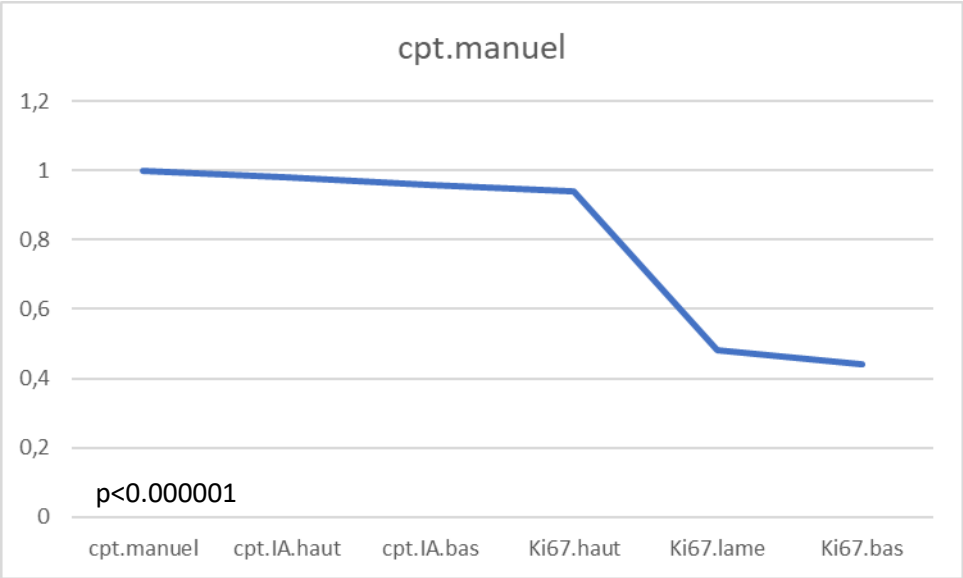


Figure 3 : Corrélation des différentes méthodes de comptage au comptage manuel

La méthode de comptage assisté par logiciel d'intelligence artificielle cpt.IA.haut était celle la mieux corrélée au comptage manuel, suivaient les méthodes cpt.IA.bas et Ki67.haut.

Intérêt diagnostique du Ki67

Nous avons testé la capacité diagnostique du Ki67, en cherchant un seuil susceptible de permettre la distinction entre CT et CA. Les résultats sont détaillés dans le tableau 5 et dans la courbe ROC, figure 4. Quatre méthodes de comptage étaient pertinentes et donnaient des résultats significatifs : trois assistées par IA et la méthode de comptage manuel (« Ki67.haut », « cpt.IA.haut », « cpt.IA.bas » et « cpt.manuel »). Les deux autres (« Ki67.lame » et « Ki67.bas »), comme attendu en raison de leur mauvaise corrélation à la méthode de comptage manuel, ne montraient pas de résultats statistiquement significatifs.

Méthode de comptage	Diagnostic	Ki67 moyen (min-max)	Ecart de moyennes	Ecart-type	p-value
Cpt.manuel	CT	3.63 (0-31)	8.25	3.63	<0.000001
	CA	11.88 (1.6-47.2)		11.88	
Cpt.IA.bas	CT	4.32 (0.4-46)	10.26	5.38	<0.000001
	CA	14.58 (1.6-54.3)		14.47	
Cpt.IA.haut	CT	3.1 (0-27.9)	7.23	3.55	<0.000001
	CA	10.33 (1.2-42.3)		10.69	
Ki67.haut	CT	2.1 (0-31.2)	5.21	3.55	<0.000001
	CA	7.37 (0.4-41.6)		9.62	
Ki67.lame	CT	5.15 (0.3-52.9)	4.17	8.51	0.06152
	CA	9.32 (1-79.2)		15.36	
Ki67.bas	CT	3.45 (0.2-42.4)	2.87	6.16	0.06629
	CA	6.32 (0-42.9)		10.24	

Tableau 5 : valeurs moyennes du Ki67 de chaque méthode de comptage en fonction du diagnostic (%).

La technique qui séparait le mieux CT et CA était cpt.IA.bas avec un écart de moyenne de 10.26 points et ce de manière significative. La méthode de comptage manuel (cpt.manuel) donnait également de bons résultats et montrait un écart de moyennes de 8.25 points entre les groupes CT et CA. Les méthodes cpt.IA.haut et Ki67.haut produisaient également des résultats significatifs et des écarts de moyennes respectivement de 7.23 et 5.21 points.

Les courbes ROC (figure 4) des 3 techniques pertinentes assistées par IA se confondaient avec celle du comptage manuel. Les aires sous la courbe pour cpt.manuel, cpt.IA.bas, cpt.IA.haut et KI67.haut était respectivement de 0.84, 0.83, 0.83 et 0.81. Ces différentes méthodes de comptage sont similaires et ont une valeur diagnostique équivalente.

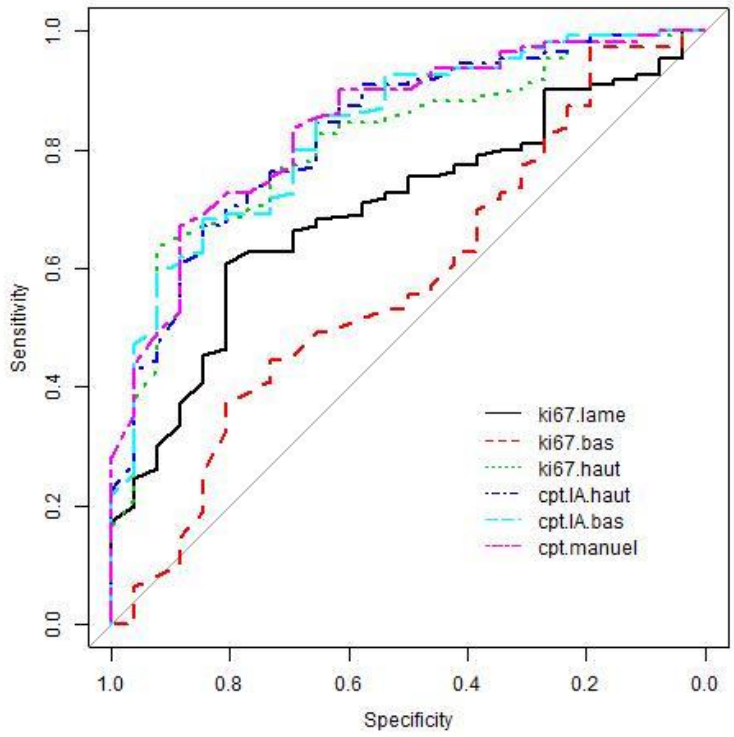


Figure 4 : courbes ROC, diagnostic CA versus CT. L'ensemble des aires sous la courbe est disponible en annexe.

Pour chaque technique de comptage pertinente nous avons recherché, à partir des courbes ROC ci-dessus, la valeur diagnostique pour laquelle le compromis entre sensibilité et spécificité était le meilleur et le seuil à partir duquel la spécificité du diagnostic de CT était de 100%.

Méthode	**Valeur diagnostic**	**Sensibilité**	**Spécificité**
Cpt.manuel	4.5	75.45	73.08
	1.5	28.18	100
Cpt.IA.bas	4.95	71.82	73.08
	1.55	21.82	100
Cpt.IA.haut	3.65	76.36	73.08
	1.15	22.73	100
Ki67.haut	2.25	76.36	73.08
	0.35	16.36	100

Tableau 6 : valeurs diagnostiques du Ki67 selon les différentes méthodes de comptage. Le détail des sensibilités et spécificité de l'ensemble des valeurs est disponible en annexe.

La méthode de comptage manuel montre l'aire sous la courbe la plus grande et est donc la meilleure. Avec un seuil de 1.5% elle permet d'éliminer le diagnostic de CA avec une spécificité de 100%. Toutefois avec cette méthode, la valeur de compromis optimale de Ki67 à 4.5%, permet de faire le diagnostic différentiel entre CT et CA avec une sensibilité et une spécificité respectivement de seulement 75.45% et 73.08%. Les trois autres méthodes produisent des valeurs avec des sensibilités et des spécificités comparables.

Intérêt pronostique sur la survie globale du Ki67

De même pour chaque technique de comptage nous avons recherché la valeur pronostique du Ki67 concernant la survie globale (SG). Aucune méthode n'a pu mettre en évidence de manière statistiquement significative de différence entre les deux groupes de survie avec et sans évènement. Le statut 0 correspond à la SG sans évènement et le statut 1 à la SG avec évènement.

Méthode de comptage	**Statut**	**Ki67 moyen (min-max)**	**Ecart de moyennes**	**Ecart-type**	**p-value**
Cpt.manuel	0	4.57 (0-31)	4.12	4.9	0.65781
	1	8.69 (1-47.2)		13.32	
Cpt.IA.bas	0	5.64 (0.4-46.5)	4.16	7.15	0.71099
	1	9.8 (1-54.3)		14.94	
Cpt.IA.haut	0	3.87 (0-27.9)	3.95	4.15	0.6754
	1	7.82 (1-42.3)		12.43	
Ki67.haut	0	2.54 (0-31.2)	3.65	3.76	0.69751
	1	6.19 (0.2-41.6)		11.01	
Ki67.bas	0	3.5 (0-42.4)	3.26	6.17	0.24368
	1	6.76 (0.3-42.9)		10.97	
Ki67.lame	0	6.13 (0.3-79.2)	1.14	10.85	0.58152
	1	4.99 (0.3-18.4)		5.92	

Tableau 7 : valeur pronostique du Ki67 selon les différentes de comptage (%).

Des courbes ROC (figure 5) selon les différentes méthodes de comptage ont été réalisées et aucune n'avait de valeur pronostique. En effet, ces courbes croisent la diagonale et n'ont ni de sensibilité ni de spécificité suffisante pour établir un pronostique.

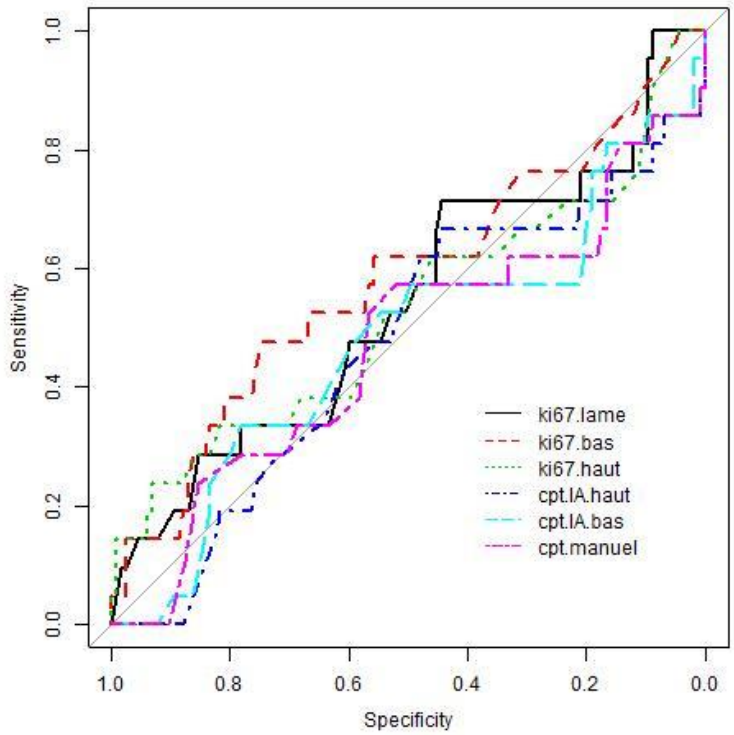


Figure 5 : courbes ROC, intérêt pronostic du Ki67. Le détail de l'ensemble des aires sous la courbe est disponible en annexe.

Des courbes de survies (figure 6) pour chaque méthode ont été réalisées avec la valeur médiane du Ki67 en l'absence de valeur seuil significative. Elles confirment l'absence de pertinence pronostique du Ki67. En effet, les courbes ont tendance à se superposer ou à se croiser et les résultats obtenus ne sont pas significatifs.

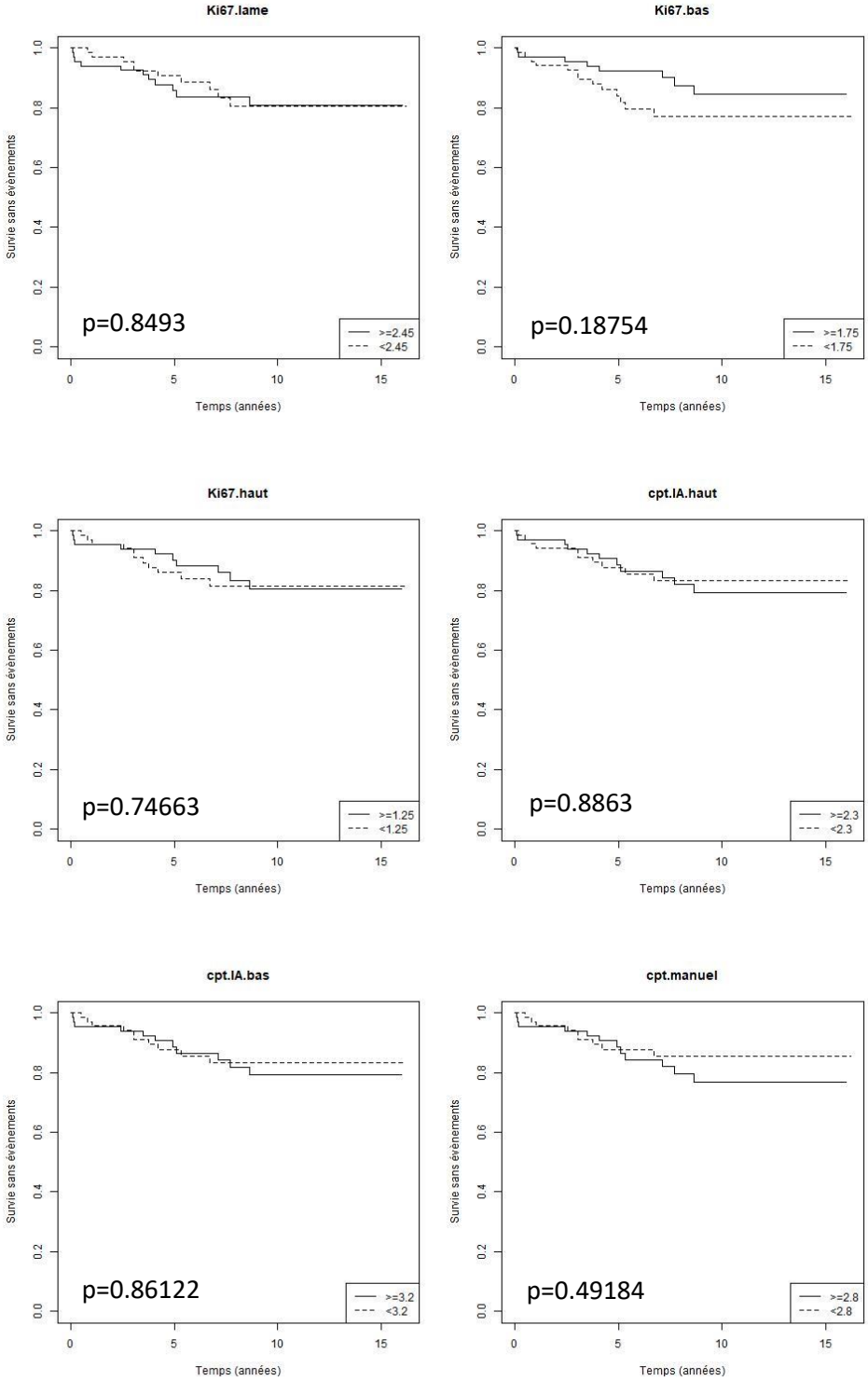


Figure 6 : courbes de survie selon la valeur médiane du Ki67 pour chaque méthode.

Ces résultats, non significatifs, s'expliquent par le fort chevauchement mis en évidence entre les résultats de Ki67 des deux groupes (box-plot figure 7).

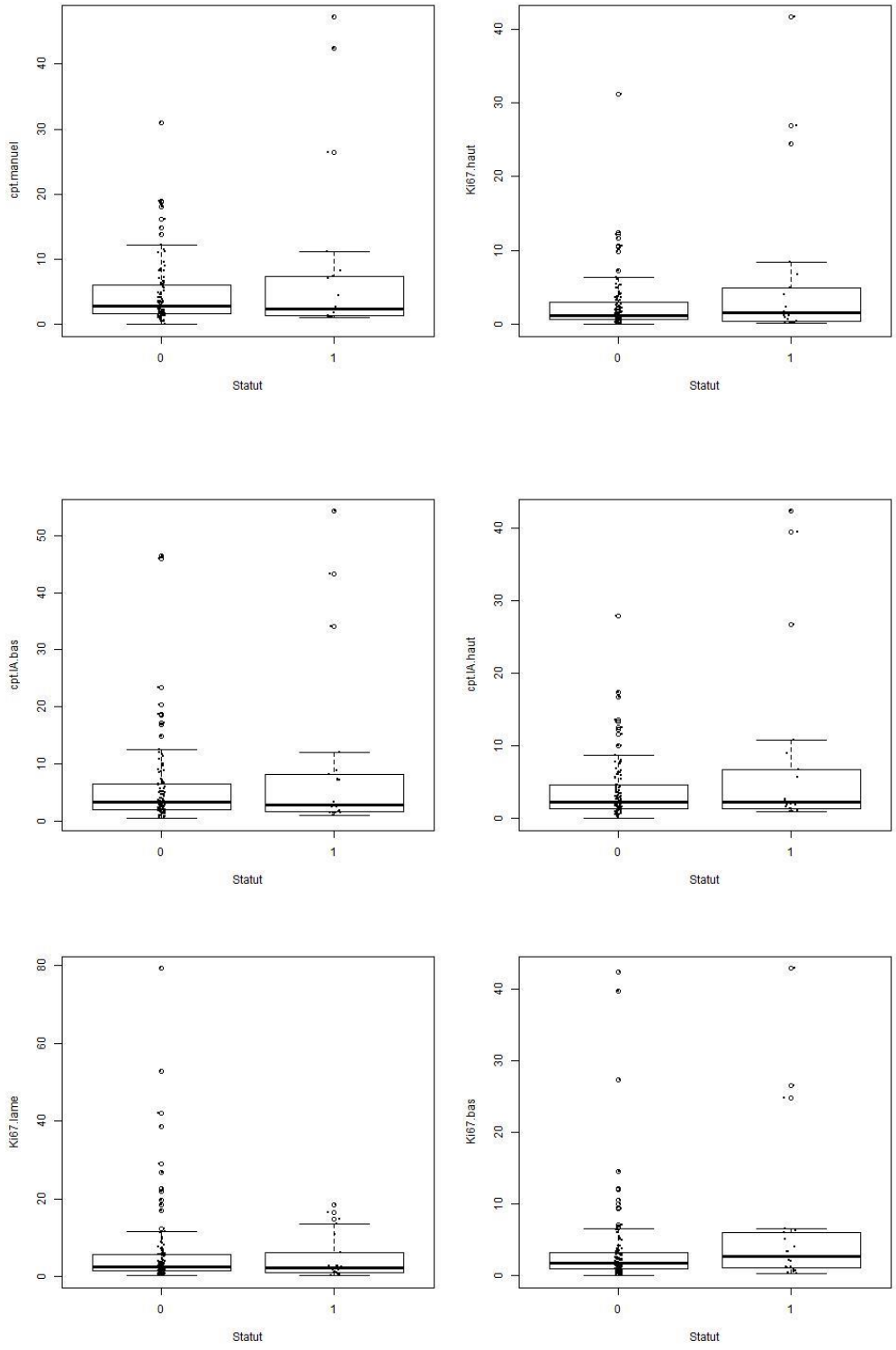


Figure 7 : « Box-plots » du Ki67 selon la survie globale d'après les différentes méthodes de comptage.

Survie sans métastase

Nous nous sommes ensuite intéressés à la survie sans métastase (SSM) : sans survenue de métastase (statut SSM 0) et avec survenue de métastase (statut SSM 1). En raison du faible effectif ayant présenté un évènement (7), il n'a pas été possible de faire des analyses de survie par la méthode de Kaplan-Meyer ni d'étudier les distributions de survie par le test du log-rank ni de réaliser des courbes ROC pour mettre en évidence une valeur seuil. Seul le test non paramétrique U de Mann-Whitney a pu être utilisé pour comparer les valeurs moyennes de Ki67 selon les différentes méthodes de comptage.

Méthode de comptage	**Statut SSM**	**Ki67 moyen (min-max)**	**Ecart de moyennes**	**Ecart-type**	**p-value**
Cpt.manuel	0	4.4 (0-31.0)	15.7	4.74	0.00175
	1	20.1 (2.4-47.2)		18.5	
Cpt.IA.bas	0	5.4 (0.4-46.5)	17.2	6.86	0.00191
	1	22.6 (3.2-54.3)		20.8	
Cpt.IA.haut	0	3.7 (0-27.9)	15.2	4.03	0.000914
	1	18.9 (2.4-42.3)		17.0	
Ki67.haut	0	2.4 (0-31.2)	13	3.64	0.00111
	1	15.4 (1.7-41.6)		15.6	
Ki67.bas	0	3.3 (0-42.4)	12.9	5.87	0.000867
	1	16.2 (2.1-42.9)		15.5	
Ki67.lame	0	5.8 (0.3-79.2)	3	10.4	0.055
	1	8.8 (2.0-18.4)		7.14	

Tableau 8 : valeurs moyennes du Ki67 selon la survenue ou non de métastases.

La technique qui séparait le mieux les groupes de survie avec et sans métastase était cpt.IA.bas avec un écart de moyennes de 17.2 points et ce de manière significative, le Ki67 moyen du groupe ayant présenté une métastase était significativement plus élevé à 22.6%. La méthode de comptage manuel (cpt.manuel) donnait également de bons résultats et montrait un écart de moyennes de 15.7 points entre les groupes CT et CA et le Ki67 moyen

du groupe ayant présenté une métastase était significativement plus élevé à 20.1%. Les méthodes cpt.IA.haut, Ki67.haut et Ki67.bas produisaient également des résultats significatifs et des écarts de moyennes respectivement de 15.2, 13 et 12.9 points.

Discussion

Les objectifs de notre travail étaient de comparer différentes méthodes numériques de quantification du Ki67 à la méthode de référence et d'étudier les valeurs diagnostique et pronostique du marquage Ki67 dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires bien différenciées (carcinoïdes). Pour cela nous avons constitué une cohorte rétrospective monocentrique de 136 patients opérés et suivis par l'équipe de chirurgie thoracique du Pr P Thomas.

Les caractéristiques anatomo-cliniques de notre population étaient comparables aux données de la littérature. L'âge moyen était de 53.29 ans et le sexe-ratio F/H était supérieur à 1. Les CT étaient de plus petite taille que les CA. La survie globale était meilleure dans le groupe CT que dans le groupe CA à 1 an, 5 ans et 10 ans.

Malgré un suivi de 2 à 15 ans seuls 4 patients sont décédés des suites de leur tumeur et il ne nous a pas été possible d'étudier la survie spécifique. Parmi les facteurs pronostiques classiquement utilisés, seuls la nécrose, l'âge et le sexe avaient une valeur pronostique sur la survie globale. Concernant le stade T, selon la TNM 2017 8^{e} édition, seul le stade T4 montrait une tendance pronostique avec une survie plus péjorative de ces patients. La taille tumorale, le nombre de ganglion positifs, l'angio-invasion et le compte mitotique pris isolément étaient sans valeur pronostique. Une grande étude de 2021 de He et al [27] réalisée sur 1956 patients présentant un diagnostic de tumeur carcinoïde (CT ou CA) et s'intéressant à la survie spécifique montre une valeur pronostique du stade T, de la taille tumorale et du nombre de ganglions positifs.

En l'absence de consensus sur la méthode de comptage de KI67 validé en pathologie pulmonaire, nous avons testé cinq méthodes informatisées par logiciels d'analyse d'image et la méthode de comptage manuel qui est la référence dans les TNE digestives.

Une des difficultés de la quantification du Ki67 est la présence de cellules positives non tumorales, essentiellement des cellules endothéliales des nombreux capillaires présentes dans les TNE et des éventuelles cellules inflammatoires. L'œil du pathologiste évite la plupart de ces pièges, ce que ne peut pas faire l'analyse d'image. De plus l'IA est susceptible de prendre en compte un marquage non spécifique lié à un problème technique (« bavage »).

La première méthode numérisée a été le comptage du Ki67 sur lame entière par logiciel d'analyse d'image sans intervention humaine. Dans ce cas, le résultat était exprimé en pourcentage de pixels marqués sans distinction des structures histologiques. Cette approche visait à tester une autre stratégie que celle des « hot-spots ». Cette méthode est peu corrélée au comptage de référence (coefficient de corrélation à 0.48) et ne produit aucun résultat significatif. Le logiciel prenant en compte toutes les intensités de marquage de Ki67 sur l'ensemble de la lame (les surfaces et les marquages des cellules non tumorales, du stroma et du tissu adjacent), un grand nombre d'éléments indésirables et de surfaces non tumorales était inclus dans le calcul final et l'hétérogénéité de la zone d'analyse était donc augmentée. Il n'a pas été possible d'appliquer cette analyse de lame entière avec le logiciel Qupath en raison de la puissance de calcul nécessaire à la quantification des cellules pour des lésions mesurant plusieurs cm^2.

Deux méthodes de comptage sur une zone tumorale hotspot de 2 mm^2 par logiciel d'analyse d'image ont été utilisées. Ces méthodes intégrant de l'intelligence artificielle permettent l'individualisation des cellules tumorales. Elles visent à reproduire la démarche humaine sur un plus grand nombre de cellules (environ 20 000 cellules). Deux seuils ont été testés : un seuil détectant toutes les intensités de marquage (Ki67.bas) comme dans la méthode de référence, le second ne quantifiant que les marquages fortement positifs (KI67.haut). La méthode Ki67.haut est fortement corrélée à notre standard (coefficient de corrélation à 0.94) alors que le comptage Ki67.bas obtient de mauvais résultats (coefficient de corrélation à 0.44). L'utilisation d'un seuil haut par l'IA sur une plus grande surface donne donc de meilleurs résultats que l'utilisation d'un seuil bas. Dans cette approche, par rapport à la méthode de référence, 2 paramètres sont modifiés : le nombre de cellules comptées et l'intensité du marquage. Le fait d'augmenter le nombre de cellules prises en compte conduit à une « dilution » du hotspot que l'on semble compensée en ne comptant que les cellules fortement marquées. Par rapport à la méthode « lame entière » la reconnaissance précise

des cellules tumorales ainsi que la standardisation de la zone à quantifier tant dans sa surface (2mm²) que dans sa topographie (centrée autour du hot-spot) augmente la spécificité des éléments cellulaires détectés.

Les deux dernières méthodes réalisées par logiciels d'analyse d'image intégraient le même système d'intelligence artificielle permettant l'individualisation des cellules tumorales. Comme dans la méthode standard, nous avons compté environ 500 cellules (entre 500 et 550) au niveau du « hot-spot » avec 2 seuils de détection : un seuil prenant en compte toutes les intensités de marquage (cpt.IA.bas) et un seuil prenant en compte les intensités de marquage fort (cpt.IA.haut). Ces deux méthodes étaient fortement corrélées à notre méthode standard avec des coefficients de corrélation respectivement de 0.96 et 0.98. Ceci montre l'efficacité de l'IA dans la segmentation des cellules. La présence de quelques artefacts pris en compte par la méthode utilisant un seuil de détection bas n'influence que très peu la corrélation à la méthode de référence. Ces résultats nous montrent l'importance du comptage dans le hot-spot pour l'augmentation de la spécificité et de la reproductibilité des résultats. L'intensité du marquage a moins d'importance, le fait de pouvoir limiter le comptage aux cellules fortement marquées permet probablement d'éliminer certains marquages indésirables.

Très peu d'études ont comparé le comptage manuel au comptage informatisé du Ki67 en pathologie pulmonaire. Swarts et al [26] comparant 147 CT et 54 CA retrouvaient des résultats de Ki67 plus élevés avec le comptage manuel. Dans leur étude, avec le comptage manuel, l'indice de prolifération Ki67 variait de 0 à 25 % alors qu'il variait de 0 à 16% pour le comptage automatisé. Cela était dû principalement à une surestimation par le comptage automatisé du nombre de cellules tumorales totales.

De plus nombreuses études ont été réalisées en pathologie neuroendocrine digestive. L'article princeps qui a conduit à l'adoption de la quantification manuelle sur impression papier est probablement celui de Reid et al en 2015 [11]. Ces auteurs ont comparé le comptage manuel sur impression papier et automatisé du Ki67 dans 68 tumeurs neuroendocrines pancréatiques bien différenciées. La zone de comptage n'a pas été prédéfinie pour les différentes méthodes et a été choisie de manière arbitraire. L'image imprimée était la méthode la plus fiable et la plus reproductible, mais prenait plus de temps que le comptage automatisé. Le comptage automatisé était le plus coûteux (le coût du

système automatisé a été estimé à 50 000-150 000 dollars américains). Cette méthode n'a pas été retenue car il existait une incapacité relative du logiciel à distinguer les cellules tumorales Ki67-positives des autres types de cellules marquées au Ki67 (lymphocytes, cellules endothéliales, cellules stromales) qui a contribué de manière significative au surcomptage et à des indices Ki67 élevés erronés. Des coupes trop épaisses contribuaient également à des erreurs de logiciel. De plus, la présence d'un pigment de fond abondant a entraîné de graves erreurs de calcul de la part de l'instrument et des indices Ki67 augmentés dans certaines tumeurs. Inversement, le système automatisé semblait également sous-compter occasionnellement dans certains cas, car il ne tenait pas compte des noyaux modérément colorés, en raison d'un manque de calibrage approprié de l'instrument. Cette étude suggère que ces erreurs peuvent être évitées ou minimisées si les hot-spots sont présélectionnés et si le logiciel est pré-étalonné pour éviter l'analyse des tissus non tumoraux.

Nos analyses ont été effectuées uniquement sur des coupes fines de 3 microns et des progrès significatifs ont été réalisés avec le logiciel Qupath. Tout d'abord, la possibilité d'un étalonnage en amont pour diminuer la reconnaissance des cellules non tumorales (notamment les cellules inflammatoires de plus petite taille) a augmenté la qualité des analyses. Ensuite, nous avons démontré que l'utilisation d'un seuil de détection haut, ne prenant pas en compte le bruit de fond nous permettait d'obtenir des résultats mieux corrélés au comptage manuel. Nous confirmons aussi que l'utilisation du comptage dans une zone de hot-spot augmente significativement la reproductibilité. Notre étude montre donc une équivalence de résultats entre des méthodes de comptages automatisées et la méthode de comptage manuel.

Nous avons ensuite étudié quelle méthode de quantification du Ki67 avait la meilleure valeur diagnostique. C'est la méthode de référence du comptage manuel sur 500 cellules sur impression papier de la zone tumorale de hot-spot qui s'est avérée être la méthode la plus performante pour le diagnostic différentiel entre CT et CA. Avec cette méthode, les valeurs moyennes différaient significativement avec un Ki67 moyen à 3.6% pour les CT et à 11.9% pour les CA. Avec un seuil de 4.5 %, nous obtenions une sensibilité de 75.45% et une spécificité de 73.08%. L'OMS suggère une valeur diagnostique proche, à 5%. Un abaissement de ce seuil augmentait encore plus la spécificité mais diminuait significativement la

sensibilité. Ainsi un seuil de Ki67 à 1.5% avait une spécificité à 100% et était donc capable d'éliminer le diagnostic de CA, mais la sensibilité était de seulement 37.27%. Les méthodes assistées par IA les mieux corrélées au comptage manuel avaient une valeur diagnostique similaire.

Il ne semble donc pas pertinent de séparer les CT des CA sur la seule base de leur caractère prolifératif. L'utilisation de ce seuil comme seul critère diagnostique risquerait de donner des parts de faux-positifs ou de faux-négatifs non négligeables.

Les CT/CA sont classés selon leur prolifération évaluée par l'index mitotique mais aussi selon un autre élément qui entre en compétition avec cette prolifération : c'est la nécrose. Une tumeur peu proliférative mais comportant de la nécrose sera classée CA. Dans notre étude, 2 des 10 patients présentant de la nécrose avait un Ki67 < 4.5 % avec la méthode de comptage manuel.

L'utilisation du Ki67 pourrait toutefois apporter une aide diagnostique non négligeable sur des petits échantillons tumoraux biopsiques parfois artéfactés. L'OMS propose déjà le Ki67 comme outil de diagnostic différentiel entre les tumeurs carcinoïdes et les tumeurs neuroendocrines de haut grade (CPC/CNEGC) en stipulant qu'une tumeur neuroendocrine ayant un Ki67 > 30% sera plus probablement de haut grade. De la même manière, notre travail montre qu'en cas de Ki67 inférieur à 1.5%, la spécificité du diagnostic de CT est excellente.

Enfin, nous avons également voulu tester la capacité du Ki67 à prédire la récidive ou le décès des tumeurs carcinoïdes. Concernant la survie globale, le Ki67 ne semble pas avoir de valeur pronostique indépendante quelle que soit la méthode de comptage utilisée. Les valeurs moyennes de Ki67 entre les groupes de survie sans évènement et les groupes de survie avec évènement n'étaient pas différentes significativement. Les courbes de survie se croisent et ont tendance à se superposer. L'aire sous les courbes ROC des différentes méthodes était également peu satisfaisante et aucun seuil ayant une sensibilité et une spécificité suffisantes n'a pu être mis en évidence. Cela étant dû au fort chevauchement des résultats de KI67 entre les deux groupes de survie.

En raison du faible nombre d'effectif étant décédé de la maladie (4), il n'a pas été possible d'effectuer des analyses statistiques de survie spécifique. Néanmoins les moyennes des deux

groupes de survie avec et sans métastase ont été comparées. Elles étaient significativement différentes pour l'ensemble des méthodes de comptage excepté la méthode de comptage sur lame entière. Avec le comptage manuel, une valeur moyenne pour le groupe de survie sans métastase à 4.4% a été retrouvée contre une valeur moyenne à 20.1% pour le groupe de survie avec métastase. Ainsi les tumeurs carcinoïdes ayant un Ki67 élevé autour des 20% sont plus susceptible de présenter des métastases.

Prédire le pronostic des tumeurs carcinoïdes reste complexe. Peu de patients décèderont des suites de la maladie et obtenir des effectifs présentant un nombre d'évènements suffisant pour permettre d'étudier la survie spécifique nécessite de grandes cohortes et un suivi très long. De plus grands effectifs avec un plus grand nombre de patients ayant présenté un évènement nous auraient peut-être permis de mieux appréhender la valeur pronostique du Ki67 sur la survie et notamment sur la survie spécifique. Notre analyse montre que des critères pronostiques conventionnels pris isolément tels que la taille tumorale, les métastases ganglionnaires, l'angio-invasion et les mitoses ne sont pas de bons facteurs prédictifs de la survie globale. L'existence de nécrose peut également peser dans ce résultat. En effet, l'analyse des facteurs pronostiques conventionnels montre sa forte valeur pronostique. Excepté l'âge et le sexe, il s'agissait du seul critère pronostique significatif de notre étude, ce résultat reste cependant de faible valeur car seulement 10 de nos patients présentaient de la nécrose (4 ayant survécu sans évènement et 6 ayant présenté un évènement). La nécrose ne peut donc pas être prise avec certitude comme facteur pronostique indépendant.

Enfin, l'évolution de certains patients est déconcertante, dans notre cohorte un patient présentant un diagnostic de CT a présenté une métastase hépatique à 3 ans de suivi alors qu'un autre patient ayant un diagnostic de CA montre une survie à 15 ans sans évènement.

Conclusion

Alors que l'index Ki67 s'est imposé comme un facteur pronostique majeur dans les TNE digestives, la dernière classification de l'OMS des TNE pulmonaire le mentionne comme « désirable » sans définir clairement sa place dans la démarche diagnostique. Notre travail a été de mettre au point différents algorithmes de quantification explorant différemment la

sélection des zones de comptage, le nombre de cellules nécessaires et le seuil de positivité, le tout comparé à la méthode de référence qu'est le comptage manuel.

Notre travail testant plusieurs approches de quantification sur une cohorte rétrospective de 136 patients porteurs de carcinoïdes nous a permis de préciser plusieurs points.

Les outils d'analyse d'image modernes comprenant une couche d'intelligence artificielle permettent l'individualisation des cellules et produisent des résultats équivalents à la fastidieuse méthode de référence du comptage manuel sur une photo imprimée. On note également que la quantification numérique est peu sensible aux variations du seuil de détection. En comptage manuel, tout signal, aussi faible soit-il, doit être pris en compte or la technique d'immunomarquage, bien que très standardisée, peut s'accompagner de légers phénomènes de bruit de fond qui parasitent la quantification. Ces progrès font que la quantification numérique du Ki67 et plus largement des immunomarquages quantitatifs (récepteurs hormonaux, HER2…) devrait s'imposer dans un avenir proche. Le gain de temps, d'ergonomie et de reproductibilité devraient encore s'accroitre avec le passage des Service d'ACP au tout numérique. A l'image du CHU de Rennes, pionnier dans cette démarche, l'avenir de la spécialité passe par une numérisation de la totalité des lames produites et une interprétation sur écran d'ordinateur plutôt qu'au microscope. Dans ce nouveau paradigme, l'utilisation intégrée de logiciels d'analyse d'image deviendra la règle. Dans notre travail, nous avons utilisé le logiciel Qupath, libre de droit, et réalisé différents paramétrages concernant le seuil, la taille des objets à quantifier, qui ont permis d'obtenir d'excellents résultats. Cette démarche est adaptée à un travail exploratoire mais pas à une utilisation à visée diagnostique réelle puisqu'il y aurait un risque, en cas de paramétrage individuel erroné, de perte de reproductibilité. De tels logiciels auront vocation à être industrialisé et devront faire l'objet d'une certification qui engendreront donc un coût supplémentaire.

Nous avons testé nos algorithmes de quantification du Ki67 à la recherche d'un seuil qui aurait une valeur diagnostique et constituerait un critère diagnostique supplémentaire, en complément de l'index mitotique et de la présence de nécrose. Les méthodes les plus fiables sont la quantification manuelle et les techniques numériques équivalentes. Cela montre que, comme leur morphologie, les TNE digestives et pulmonaires partagent des critères pronostiques qui justifient la poursuite de travaux visant à construire une classification commune. La sensibilité et la spécificité sont toutefois insuffisantes pour

pouvoir intégrer ce marqueur comme élément du diagnostic. Néanmoins, on note que, tout comme l'OMS recommande de classer en tumeur neuroendocrine de haut grade, toute TNE même bien différenciée présentant un index Ki67 supérieur à 30%, notre travail suggère qu'aucun carcinoïde atypique ne présente d'index Ki67 inférieur à 1,5%.

Enfin, nous avons exploré la valeur pronostique de nos différentes quantifications du Ki67. De manière générale, la détermination du pronostic des TNE est complexe. On le voit dans notre travail, les tumeurs carcinoïdes surviennent généralement entre la cinquième et la sixième décade et sont de bon pronostique ce qui fait que la mortalité spécifique de notre cohorte est trop faible pour en tirer des conclusions significatives. Toutefois un Ki67 élevé autour des 20% semble associé à un plus haut risque de présenter une métastase. Pour des raisons d'effectif, l'étude de la valeur pronostique du Ki67 dans les TNE pulmonaires relève probablement d'un travail multicentrique.

Annexes

1- Aires sous les courbes ROC diagnostiques en fonction de la méthode de comptage utilisée :

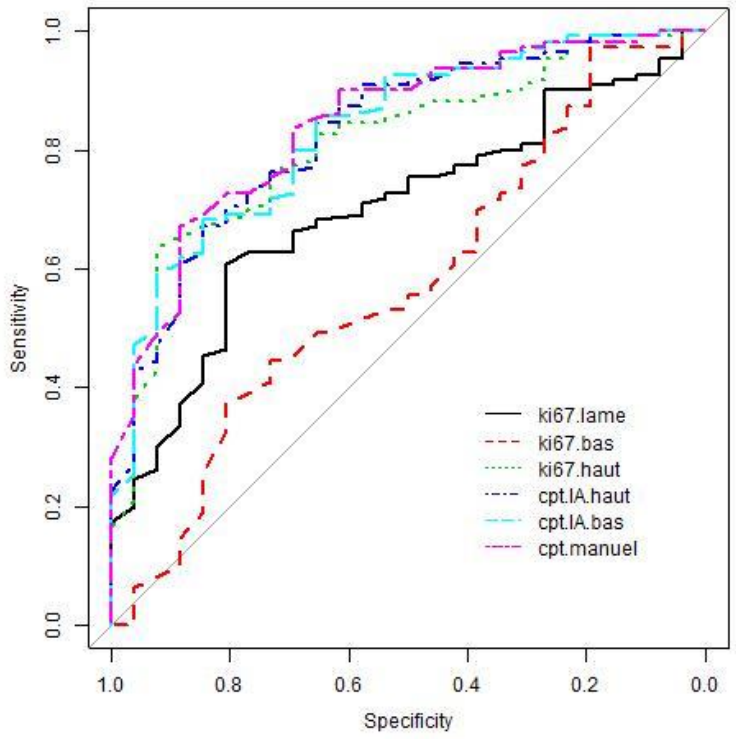


Figure 4 : courbes ROC, diagnostic CA versus CT.

- Aire sous la courbe ROC ki67.lame : 0.7 et IC à 95 % : 0.6 ; 0.8
- Aire sous la courbe ROC ki67.bas : 0.58 et IC à 95 % : 0.5 ; 0.7
- Aire sous la courbe ROC ki67.haut : 0.81 et IC à 95 % : 0.7 ; 0.9
- Aire sous la courbe ROC cpt.IA.haut : 0.83 et IC à 95 % : 0.7 ; 0.91
- Aire sous la courbe ROC cpt.IA.bas : 0.83 et IC à 95 % : 0.7 ; 0.92
- Aire sous la courbe ROC cpt.manuel : 0.84 et IC à 95 % : 0.8 ; 0.92

2- Tableaux des valeurs seuils de Ki67 pour le diagnostic de CT versus CA.

Les tableaux sont présentés selon les différentes méthodes de comptage en fonction de leur sensibilité et de leur spécificité.

Seuils pour ki67.lame

Valeurs seuils et Se et Sp avec leurs IC à 95 % (UCI : borne inférieure ; LCI : borne supérieure) :

Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
66.05	100	100	100	3.85	0	11.54
22.35	95.45	90.91	99.09	7.69	0	19.23
17.65	92.73	87.27	97.27	11.54	0	26.92
15.65	91.82	86.36	96.36	15.38	3.85	30.77
12.9	90.91	85.45	95.45	19.23	7.69	34.62
11.1	90	83.64	95.45	26.92	11.54	46.15
6.4	80.91	72.73	88.18	30.77	15.38	50
6.05	80	71.82	87.27	34.62	19.23	53.85
5.95	79.09	70.91	86.36	38.46	19.23	57.69
5.65	77.27	69.09	85.45	42.31	23.08	61.54
5	75.45	67.27	83.64	50	30.77	69.23
4.05	72.73	63.64	80.91	53.85	34.62	73.08
3.85	70.91	61.82	79.09	57.69	38.46	76.92
3.4	68.18	59.09	77.27	65.38	46.15	84.62
3.15	66.36	57.27	75.45	69.23	50	84.62
2.75	62.73	53.64	71.82	76.92	61.44	92.31
2.65	60.91	51.82	70	80.77	65.38	96.15
1.95	45.45	36.36	54.55	84.62	69.23	96.15
1.75	37.27	28.18	46.36	88.46	76.92	100
1.45	30	21.82	38.18	92.31	80.77	100
1.15	24.55	16.36	32.73	96.15	88.46	100
0.95	17.27	10	24.55	100	100	100

Seuils pour ki67.bas

Valeurs seuils et Se et Sp avec leurs IC à 95 % (UCI : borne inférieure ; LCI : borne supérieure) :

Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
42.65	100	100	100	3.85	0	11.54
12.1	97.27	93.64	100	19.23	7.69	34.62
6.15	87.27	80.91	92.73	23.08	7.69	38.46
5	82.73	75.45	90	26.92	11.54	46.15
3.65	77.27	69.09	84.57	30.77	15.38	50
3.25	72.73	64.55	80.91	34.62	15.38	53.85
3.05	70	61.82	79.09	38.46	19.23	57.69
2.45	62.73	53.64	71.82	42.31	23.08	61.54
2.25	57.27	49.07	66.36	46.15	26.92	65.38
2.05	55.45	46.36	64.57	50	30.77	69.23
1.85	52.73	43.64	61.82	53.85	34.62	73.08
1.75	51.82	43.61	60.91	57.69	38.46	76.92
1.65	50	40.91	60	61.54	42.31	80.77
1.55	49.09	40	58.18	65.38	46.15	84.62
1.45	45.45	36.36	54.55	69.23	53.75	88.46
1.35	44.55	35.45	53.64	73.08	53.85	88.46
1.15	37.27	28.18	46.36	80.77	65.38	96.15
0.95	25.45	18.18	34.55	84.62	69.23	96.15
0.65	14.55	8.18	20.93	88.46	76.92	100
0.35	6.36	1.82	10.91	96.15	88.46	100
-Inf	0	0	0	100	100	100

Seuils pour ki67.haut

Valeurs seuils et Se et Sp avec leurs IC à 95 % (UCI : borne inférieure ; LCI : borne supérieure) :

Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
36.4	100	100	100	3.85	0	11.54
11.95	99.09	97.27	100	19.23	7.69	34.62
10.55	98.18	95.45	100	23.08	7.69	42.31

Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
6.95	95.45	91.82	99.09	26.92	11.54	46.15
5.15	90.91	85.45	96.36	30.77	11.54	50
4.65	89.09	82.73	94.55	38.46	19.23	57.69
4.1	88.18	81.82	93.64	46.15	26.92	65.38
3.9	86.36	80	92.73	50	30.77	69.23
3.75	85.45	78.18	91.82	53.85	34.62	73.08
3.4	84.55	77.27	90.91	61.54	42.31	80.77
3	82.73	75.45	90	65.38	46.15	84.62
2.25	76.36	68.18	84.55	73.08	53.85	88.46
1.85	70	60.91	79.09	76.92	61.54	92.31
1.65	67.27	58.18	76.36	84.62	69.23	96.15
1.5	63.64	54.55	72.73	92.31	80.77	100
0.85	38.18	29.09	47.27	96.15	88.46	100
0.35	16.36	10	23.64	100	100	100

Seuils pour cpt.IA.bas

Valeurs seuils et Se et Sp avec leurs IC à 95 % (UCI : borne inférieure ; LCI : borne supérieure) :

Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
33.65	100	100	100	7.69	0	19.23
15.1	99.09	97.27	100	19.23	3.85	34.62
12.9	98.18	95.45	100	23.08	7.69	38.46
11.2	96.36	92.73	99.09	26.92	11.54	46.15
9.45	95.45	90.91	99.09	34.62	15.38	53.85
7.95	94.55	90	98.18	42.31	23.08	61.54
7.2	91.82	86.36	96.36	50	30.77	69.23
6.5	90.91	85.45	96.36	57.69	38.46	76.92
5.85	87.27	80.91	93.64	61.54	42.31	80.77
5.45	84.55	77.27	90.91	65.38	46.15	84.62
3.65	76.36	68.18	83.64	73.08	53.85	88.46
3.45	72.73	64.55	80.91	76.92	61.44	92.31
3.05	70	60.91	78.18	80.77	65.38	96.15

Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
2.75	67.27	58.18	75.45	84.62	69.23	96.15
2.35	60.91	50.91	70	88.46	76.92	100
1.95	47.27	38.18	56.36	92.31	80.77	100
1.75	42.73	33.64	51.82	96.15	88.46	100
1.15	22.73	15.45	30.91	100	100	100

Seuils pour cpt.IA.bas

Valeurs seuils et Se et Sp avec leurs IC à 95 % (UCI : borne inférieure ; LCI : borne supérieure) :

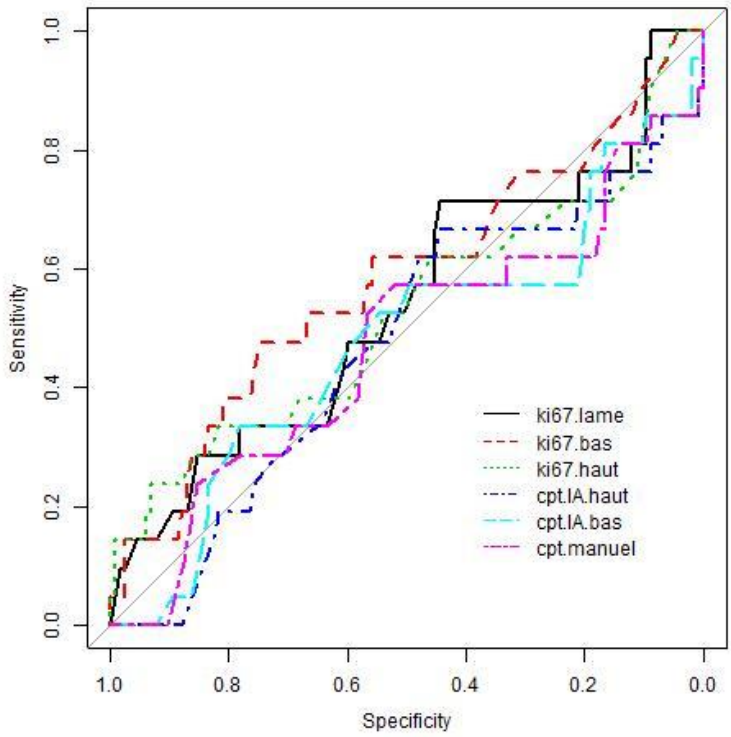
Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
46.25	100	100	100	7.69	0	19.23
19.55	99.09	97.27	100	23.08	7.69	42.31
17.9	98.18	95.45	100	26.92	11.54	46.15
15.85	96.36	92.73	99.09	30.77	15.38	50
12.25	95.45	90.91	99.09	34.62	15.38	53.85
11.05	93.64	88.18	97.27	42.31	23.08	61.54
9.3	92.73	87.27	97.27	53.85	34.62	73.08
7.25	86.36	79.98	91.82	57.69	38.46	76.92
7	85.45	78.18	91.82	65.38	46.15	84.62
6.1	80	72.7	87.27	69.23	50	84.62
4.95	71.82	63.64	80	73.08	53.85	88.46
4.35	69.09	60	77.27	80.77	65.38	92.31
3.95	68.18	59.09	76.36	84.62	69.23	96.15
3.35	61.82	52.73	70.91	88.46	76.92	100
3.15	59.09	50	68.18	92.31	80.77	100
2.5	47.27	38.18	57.27	96.15	88.46	100
1.55	21.82	14.55	30	100	100	100

Seuils pour cpt.manuel

Valeurs seuils et Se et Sp avec leurs IC à 95 % (UCI : borne inférieure ; LCI : borne supérieure) :

Seuil	Se	Se.LCI	Se.UCI	Spe	Spe.LCI	Spe.UCI
36.7	100	100	100	7.69	0	19.23
22.7	99.09	97.27	100	11.54	0	23.08
15.5	98.18	95.45	100	26.92	11.54	46.15
13	97.27	93.64	100	30.77	15.38	50
11.3	96.36	92.73	99.09	34.62	19.23	53.85
8.5	93.64	89.09	98.18	46.15	26.92	65.38
7.1	90	84.55	95.45	61.54	42.31	80.77
6.3	85.45	79.09	91.82	65.38	46.15	84.62
6.1	83.64	76.36	90	69.23	50	84.71
4.5	75.45	67.27	83.64	73.08	53.85	88.46
3.7	72.73	64.55	80.91	80.77	65.38	96.15
3.5	69.09	60	77.27	84.62	69.23	96.15
3.3	67.27	58.18	75.45	88.46	76.92	100
2.3	49.09	39.09	58.18	92.31	80.77	100
2.1	43.64	34.55	52.73	96.15	88.46	100
1.5	28.18	20	37.27	100	100	100

3- Aires sous les courbes ROC pronostiques en fonction de la méthode de comptage utilisée :



3

Figure 5 : courbes ROC, intérêt pronostic du Ki67. Le détail de l'ensemble des aires sous la courbe est disponible en annexe.

- Aire sous la courbe ROC ki67.lame : 0.54 et IC à 95 % : 0.4 ; 0.69
- Aire sous la courbe ROC ki67.bas : 0.58 et IC à 95 % : 0.4 ; 0.73
- Aire sous la courbe ROC ki67.haut : 0.53 et IC à 95 % : 0.4 ; 0.68
- Aire sous la courbe ROC cpt.IA.haut : 0.47 et IC à 95 % : 0.3 ; 0.61
- Aire sous la courbe ROC cpt.IA.bas : 0.47 et IC à 95 % : 0.3 ; 0.62
- Aire sous la courbe ROC cpt.manuel : 0.47 et IC à 95 % : 0.3 ; 0.62

Références Bibliographiques

[1] M. E. Caplin *et al.*, « Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids », *Annals of Oncology*, vol. 26, nº 8, p. 1604-1620, août 2015.

[2] W. D. Travis, « Advances in neuroendocrine lung tumors », *Annals of Oncology*, vol. 21, p. vii65-vii71, oct. 2010.

[3] G. Maurizi *et al.*, « Long-term results after resection of bronchial carcinoid tumour: evaluation of survival and prognostic factors », *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, vol. 19, nº 2, p. 239-244, août 2014.

[4] A. E. Hendifar, A. M. Marchevsky, et R. Tuli, « Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease », *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 12, nº 3, p. 425-436, mars 2017.

[5] J.-C. Das-Neves-Pereira *et al.*, « Individual risk prediction of nodal and distant metastasis for patients with typical bronchial carcinoid tumors☆☆☆ », *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, vol. 34, nº 3, p. 473-478, sept. 2008.

[6] N. Rekhtman, « Neuroendocrine tumors of the lung: an update », *Arch Pathol Lab Med*, vol. 134, nº 11, p. 1628-1638, nov. 2010.

[7] P. Luigi Filosso *et al.*, « F-001THE IMPACT OF ADJUVANT CHEMOTHERAPY ON ATYPICAL CARCINOIDS OF THE LUNG: A PROPENSITY SCORE ANALYSIS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF THORACIC SURGEONS LUNG NEUROENDOCRINE DATABASE », *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, vol. 21, nº suppl_1, p. S1-S1, août 2015.

[8] T. Walter *et al.*, « Evaluation of the combination of oxaliplatin and 5-fluorouracil or gemcitabine in patients with sporadic metastatic pulmonary carcinoid tumors », *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 96, nº Journal Article, p. 68-73, 2016.

[9] C. A. Bertram *et al.*, « Are pathologist-defined labels reproducible? Comparison of the TUPAC16 mitotic figure dataset with an alternative set of labels », *arXiv:2007.05351 [cs, eess, q-bio]*, vol. 12446, p. 204-213, 2020.

[10] F. Wilm *et al.*, « How Many Annotators Do We Need? -- A Study on the Influence of Inter-Observer Variability on the Reliability of Automatic Mitotic Figure Assessment », *arXiv:2012.02495 [cs]*, janv. 2021.

[11] M. D. Reid *et al.*, « Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative analysis of four counting methodologies », *Mod Pathol*, vol. 28, nº 5, p. 686-694, mai 2015.

[12] F. T. Bosman, F. Carneiro, R. H. Hruban, et N. D. Theise, « WHO classification of tumours of the digestive system. », *WHO classification of tumours of the digestive system.*, nº Ed. 4, 2010.

[13] A. Laurinavicius *et al.*, « A methodology to ensure and improve accuracy of Ki67 labelling index estimation by automated digital image analysis in breast cancer tissue », *Breast Cancer Res*, vol. 16, nº 2, p. 3390, avr. 2014.

[14] A. Warth *et al.*, « Interobserver agreement of proliferation index (Ki-67) outperforms mitotic count in pulmonary carcinoids », *Virchows Arch*, vol. 462, nº 5, p. 507-513, mai 2013.

[15] S. Gunia *et al.*, « Ki67 staining index and neuroendocrine differentiation aggravate adverse prognostic parameters in prostate cancer and are characterized by negligible inter-observer variability », *World J Urol*, vol. 26, nº 3, p. 243-250, juin 2008.

[16] « Challenges in Ki-67 assessments in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinomas* - Walts - 2021 - Histopathology - Wiley Online Library ».
[17] J. Ogino *et al.*, « Validity and reproducibility of Ki-67 assessment in gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas », *Pathology International*, vol. 63, nº 2, p. 102-107, 2013.
[18] J.-Y. Scoazec, « Classification et facteurs pronostiques des tumeurs neuroendocrines intestinales », *Colon Rectum*, vol. 11, nº 4, Art. nº 4, nov. 2017.
[19] « Comparison of different anti-Ki67 antibody clones and hot-spot sizes for assessing proliferative index and grading in pancreatic neuroendocrine tumours using manual and image analysis - Owens - 2020 - Histopathology - Wiley Online Library ».
[20] Pelosi *et al* « Ki-67 Antigen in Lung Neuroendocrine Tumors: Unraveling a Role in Clinical Practice - ScienceDirect ». Journal of Thoracic Oncology Volume 9, Issue 3, March 2014, Pages 273-284.
[21] R. Horii *et al.*, « Performance analysis of the anti-Ki67 antibody clone 30-9 for immunohistochemical staining of breast cancer », *Breast Cancer*, vol. 27, nº 6, p. 1058-1064, nov. 2020.
[22] « Quality assessment of Ki67 staining using cell line proliferation index and stain intensity features - Lanng - 2019 - Cytometry Part A - Wiley Online Library ».
[23] V. Grøndahl *et al.*, « Characteristics of 252 patients with bronchopulmonary neuroendocrine tumours treated at the Copenhagen NET Centre of Excellence », *Lung Cancer*, vol. 132, p. 141-149, juin 2019.
[24] A. E. Walts, D. Ines, et A. M. Marchevsky, « Limited role of Ki-67 proliferative index in predicting overall short-term survival in patients with typical and atypical pulmonary carcinoid tumors », *Mod Pathol*, vol. 25, nº 9, p. 1258-1264, sept. 2012.
[25] A. M. Marchevsky, A. Hendifar, et A. E. Walts, « The use of Ki-67 labeling index to grade pulmonary well-differentiated neuroendocrine neoplasms: current best evidence », *Mod Pathol*, vol. 31, nº 10, p. 1523-1531, oct. 2018.
[26] D. R. A. Swarts *et al.*, « Limited additive value of the Ki-67 proliferative index on patient survival in World Health Organization-classified pulmonary carcinoids », *Histopathology*, vol. 70, nº 3, p. 412-422, 2017.
[27] Y. He, F. Zhao, Q. Han, Y. Zhou, et S. Zhao, « Prognostic nomogram for predicting long-term cancer-specific survival in patients with lung carcinoid tumors », *BMC Cancer*, vol. 21, nº 1, p. 1-13, févr. 2021.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les moeurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

ORDRE NATIONAL DES MÉDECINS
Conseil National de l'Ordre