

Diagnostic des lésions kystiques du pancréas par l'aspiration à l'aiguille fine guidée sous échographie digestive

Quel prélèvement et pourquoi ?

Utilité de la microbiopsie sur la paroi du kyste et de l'analyse du liquide en technique monocouche

Monique FABRE

Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU de Bicêtre, Université Paris Sud (France)

Diagnosis of cystic pancreatic lesions by endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA) - Which sampling and why ?

Utility of cyst wall microbiopsy and fluid analysis by monolayered processing

RÉSUMÉ

La découverte d'une lésion kystique du pancréas pose de difficiles problèmes de prise en charge. Le traitement est fonction de la nature bénigne ou maligne du kyste. Les données fournies par l'examen clinique et l'imagerie ne permettent pas un diagnostic préopératoire, même si l'échographie digestive a un rôle important dans le diagnostic de ces lésions kystiques dont certaines sont potentiellement malignes. L'analyse biochimique du liquide intra-kystique (marqueurs tumoraux et enzymes pancréatiques) a été proposée pour permettre de préciser la nature du kyste. L'aspiration à l'aiguille fine permet un diagnostic fiable uniquement si la ponction et le traitement de l'échantillon suivent rigoureusement un mode opératoire spécifique. Les différents points critiques concernant le prélèvement, la préparation de l'échantillon cellulaire et de la microbiopsie sont étudiés. Une étude combinée cytologique et histologique est recommandée. Dans ces conditions, il est facile de faire un diagnostic positif de lésions kystiques telles que le cystadénocarcinome mucineux, l'adénocarcinome canalaire nécrotique, le carcinome à cellules acineuses, les tumeurs endocrines et la tumeur solide pseudopapillaire. Il convient ensuite de différencier les tumeurs mucineuses de celles qui ne le sont pas. La cytologie monocouche est utile pour faire le diagnostic des tumeurs paucicellulaires comme le cystadénome séreux ; elle permet de compléter l'analyse en autorisant des études immunocytochimiques.

SUMMARY

The discovery of a pancreatic cystic lesion implies a challenge for the physician. The selection of the appropriate treatment depends on the ability to distinguish benign from malignant cysts. The clinical and radiological features of these lesions may not permit a preoperative diagnosis, even if endoscopic ultrasonography has an important role to determine which cystic lesions have malignant potential. Analysis of cyst fluid aspirates for tumor markers and enzymes has been proposed as an aid to differential diagnosis. An accurate diagnosis by fine-needle aspiration (FNA) needs a careful and specific handling and preparation of the sample. Critical issues for preparation of sample, cytological and histological procedures are reviewed. Combined cytology and microbiopsy are recommended. FNA provides easy and definitive diagnosis for mucinous cystadenocarcinoma, necrotic ductal carcinoma, acinar cell carcinoma, endocrine neoplasms and solid pseudopapillary tumor. Then, the major role of FNA is to differentiate mucinous from nonmucinous pancreatic cyst. Monolayered smears are useful for paucicellular tumors such as serous cystadenoma and for ancillary techniques such as immunodetection.

INTRODUCTION

Les lésions kystiques du pancréas sont inhabituelles. Du fait des progrès actuels de l'imagerie, elles sont de plus en plus souvent détectées de façon fortuite. Cette découverte est à l'origine d'une difficile prise en charge de cette lésion par le médecin traitant.

La décision thérapeutique est fonction des possibilités de déterminer la nature bénigne ou maligne du kyste. Les tumeurs malignes et kystiques du pancréas sont rares, représentant 1 % de tous les cancers pancréatiques et sont potentiellement accessibles à un traitement chirurgical. C'est la raison pour laquelle il est important de bien en faire le diagnostic [1]. Cer-

Tirés à part : Monique FABRE, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU de Bicêtre, Université Paris Sud, 78, rue du Général-Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre (France). Tél. : 33.1.45.21.27.35. Fax : 33.1.45.21.32.81. Email : monique.fabre@bct.ap-hop-paris.fr

Mots-clés : aspiration à l'aiguille fine, biopsie, carcinome, cystadénome, cytologie, échographie digestive, pancréas, ThinPrep, tumeur endocrine, tumeur kystique, tumeur solide pseudopapillaire.

Key-words : biopsy, carcinoma, cystadenoma, cystic tumor, cytology, endocrine tumor, endoscopic ultrasonography, fine-needle aspiration, pancreas, solid pseudopapillary tumor, ThinPrep.

tains auteurs sont partisans d'un abord chirurgical d'emblée pour toute suspicion de tumeur kystique du pancréas, mais le taux de complication péri-opératoire peut atteindre 40 % avec des complications mineures ou majeures [2]. Par ailleurs, de petites lésions kystiques chez le sujet âgé ne doivent pas être nécessairement opérées, une surveillance attentive pouvant être proposée [3]. D'autres auteurs recommandent pour le pseudo-kyste et le cystadénome séreux non symptomatique une simple surveillance, alors qu'une résection est nécessaire pour les autres tumeurs kystiques.

Les lésions kystiques pancréatiques comprennent une groupe hétérogène de lésions associées à une présentation clinique souvent très proche. Elles peuvent correspondre à une pathologie d'origine congénitale, inflammatoire ou tumorale. La grande majorité de ces lésions correspondent à des pseudo-kystes qui représentent 75-90 % de l'ensemble de la pathologie kystique pancréatique [1]. Ils apparaissent souvent dans un contexte de pancréatite aiguë, d'alcoolisme ou de traumatisme abdominal. Les tumeurs kystiques représentent environ 5 % de l'ensemble des tumeurs pancréatiques. Elles peuvent correspondre à des tumeurs bénignes comme le cystadénome séreux ou à des tumeurs potentiellement malignes comme le cystadénome mucineux, la tumeur intracanalair papillaire et mucineuse et la tumeur solide pseudopapillaire. Le reste de la pathologie tumorale comprend le cystadénocarcinome mucineux, les remaniements nécrotiques des tumeurs endocrines, du carcinome à cellules acineuses, de l'adénocarcinome canalaire ou mucineux, et des entités plus rares comme les kystes congénitaux, le kyste lympho-épithélial, le lymphangiome et les kystes péri-pancréatiques [1].

Le diagnostic de tumeur kystique pancréatique repose sur différents examens radiologiques tels que l'échographie, le scanner, l'imagerie par résonance magnétique, la cholango- et pancréatographie rétrograde endoscopique et l'échoendoscopie digestive (EED) [4-7]. Mais, ni le tableau clinique, ni l'imagerie ne permettent un diagnostic formel de ces lésions [8-11]. L'analyse biochimique du liquide de ponction du kyste (dosage de l'amylase, de la lipase et des marqueurs tumoraux) a été proposée comme une aide diagnostique [4]. Dans la plupart des séries publiées, le nombre de lésions kystiques analysées est faible. Le taux de faux positifs et faux négatifs demeure élevé, en particulier pour le diagnostic de cystadénome séreux [12]. Un des facteurs limitant est la possibilité d'avoir une contamination par le suc pancréatique d'une lésion dont le point de départ est en fait péripancréatique et non intrapancréatique [13]. Par ailleurs, la standardisation des ces dosages reste délicate et varie d'un laboratoire à l'autre. C'est pourquoi, il convient d'attendre pour déterminer l'apport de ces dosages dans la prise en charge d'une lésion kystique du pancréas [4, 14]. En effet, il a été démontré que, par les données fournies par l'imagerie et l'analyse biochimique du liquide du kyste, il n'était possible d'établir un bon diagnostic que pour 20 % des cystadénomes séreux, 30 % des cystadénomes mucineux et 29 % des cystadénocarcinomes [11].

La cytologie et l'histologie obtenue par ponction aspiration à l'aiguille fine (PAF) guidée sous échographie, scanner ou sous EED ont une efficacité bien établie dans le diagnostic des cancers solides du pancréas, qu'elles soient réalisées avant la chirurgie ou avant la mise en route d'un traitement palliatif. La sensibilité est de 85-95 % et la spécificité de 100 % [1, 15-16]. Il n'en est pas de même pour les tumeurs kystiques où la sensibilité de la PAF est plus faible (49-62 %), ce qui est dû essentiellement à la difficulté d'obtenir des échantillons cellulaires [7, 17-23]. Il a été rapporté dans une série de 59 lésions kystiques pancréatiques, un taux de sensibilité pour le diagnostic de carcinome de 67-71 % avec la cytologie exclusive [1, 20]. En effet, dans la plupart des lésions kystiques malignes pancréatiques, la tumeur présente un secteur solide, rendant plus facile la ponction qui va concerner ce secteur charnu. Ces difficultés expliquent pourquoi de nombreux chirurgiens et anatomo-pathologistes restent très réservés sur les possibilités diagnostiques des tumeurs kystiques pancréatiques par la PAF. C'est pourquoi, il paraît important de préciser la place et les limites de la PAF dans le diagnostic des lésions kystiques du pancréas [22-23].

POURQUOI EST-IL DIFFICILE DE FAIRE LE DIAGNOSTIC PAR L'IMAGERIE DES LÉSIONS KYSTIQUES PANCRÉATIQUES ?

L'étude de la littérature montre que de nombreuses tumeurs kystiques peuvent être prises à tort pour des pseudo-kystes. Le nombre d'erreurs est plus élevé pour les examens effectués sous échographie ou sous scanner [10]. L'EED a un rôle fondamental pour déterminer quelles lésions kystiques sont probablement malignes. Bien que la sensibilité diagnostique de l'imagerie ait été améliorée par les progrès faits grâce à l'EED, celle-ci demeure moins bonne que pour les tumeurs solides.

Le cystadénome séreux est classiquement constitué de kystes d'un diamètre inférieur à 2 cm et d'un nombre supérieur à 5, comportant des calcifications « en rayon de roue ». Les tumeurs mucineuses comprennent des kystes de plus de 2 cm de diamètre et d'un nombre inférieur à 5 avec des calcifications périphériques. Mais, de grandes variations sont possibles dans les aspects radiologiques de ces tumeurs. La distinction entre un cystadénome séreux macrokystique et une tumeur mucineuse est difficile en raison de la nature macrokystique de ces deux entités [9]. De même, le cystadénome séreux oligokystique peut se présenter comme une lésion uniloculaire à contenu hémorragique ; il peut être alors difficile de le différencier d'un pseudokyste. De même, il n'est pas toujours facile de mettre en évidence la communication entre une structure kystique et un canal pancréatique dilaté permettant de différencier la tumeur intracanalair papillaire et mucineuse du cystadénome mucineux. Il est également possible d'être en présence d'une lésion kystique cancéreuse ne présentant pas les signes pouvant faire évoquer cette possibilité :

nodules au sein de la paroi, matériel anormal flottant dans la lumière ou dans celle d'un canal dilaté ou image d'infiltration péri-kystique [4].

POURQUOI EST-IL DIFFICILE D'OBTENIR UN BON PRÉLÈVEMENT À PARTIR D'UNE LÉSION KYSTIQUE PANCRÉATIQUE ?

La fiabilité diagnostique de la PAF est opératoire dépendante. Quand elle est réalisée par un opérateur entraîné, le rendement de celle-ci est élevé et peut remplacer un grand nombre de biopsies diagnostiques peropératoires. Quand elle est réalisée par un opérateur peu entraîné, la PAF peut au contraire conduire à des erreurs de diagnostic et se révèle potentiellement dangereuse [24]. On sait que plus l'opérateur est entraîné, plus le prélèvement sera cellulaire. De même, le nombre de prélèvements non évaluables par absence de matériel sera plus faible. Il a été démontré en pathologie mammaire que, pour les ponctions de lésions kystiques et bénignes, le nombre représentatif de PAF était de 18,7 % pour l'opérateur entraîné et seulement de 6 % pour celui non entraîné [24].

La plus faible sensibilité des lésions kystiques peut aussi s'expliquer par la difficulté de sélectionner la partie la plus cellulaire du kyste [1, 22-23].

On sait également que la fiabilité diagnostique augmente avec le nombre de ponctions. Mais, ce dernier est limité en raison du risque plus élevé de complications pour les lésions kystiques (1,2-14 %). Les ponctions des lésions kystiques pancréatiques sont associées à un risque plus élevé de poussées de pancréatite aiguë, d'hémorragie extra-digestive, de pneumonie de déglutition et de douleur, en particulier pour les lésions situées au niveau de la tête et du crochet. Même si le nombre de ponctions n'est pas corrélé au taux de complications, le nombre de ponction des lésions kystiques est réduit pour minimiser ce risque, ce qui explique également la plus faible cellularité de la PAF [25-27].

Enfin, la technique standard utilisée classiquement pour la PAF des tumeurs solides n'est pas adaptée aux lésions kystiques car la cellularité du prélèvement doit être prise en compte.

POURQUOI EST-IL DIFFICILE DE BIEN INTERPRÉTER UN PRÉLÈVEMENT D'UNE LÉSION KYSTIQUE PANCRÉATIQUE OBTENU PAR PONCTION GUIDÉE SOUS EED ?

Un taux élevé d'échantillons non représentatifs est observé pour les lésions kystiques du pancréas, contrastant avec un nombre bien plus faible pour les lésions solides à l'origine d'une meilleure sensibilité de la PAF pour ces dernières. Comment peut-on expliquer ces résultats ?

Il faut tout d'abord savoir que l'épithélium qui borde le kyste peut être ulcéré ou décollé, le plus souvent à la suite de remaniements inflammatoires, ce qui explique cette faible cellularité. Deuxièmement, la méthode de ponction et de traitement de l'échantillon au laboratoire peut accentuer cette paucicellularité. Enfin, il est toujours plus difficile à un pathologiste de faire sur une PAF le diagnostic de lésion inflammatoire ou de tumeur bénigne (diagnostic d'exclusion) que celui de lésion maligne [1, 22].

La fiabilité diagnostique de la PAF est dépendante de l'expérience du pathologiste et du cytologiste dans l'interprétation microscopique des échantillons de PAF (cytologie et microbiopsie).

COMMENT FAIRE POUR OBTENIR UN BON PRÉLÈVEMENT D'UNE LÉSION KYSTIQUE PANCRÉATIQUE ?

Points critiques pour l'endoscopiste

La qualité du prélèvement (liquide aspiré et paroi périphérique du kyste), la bonne conduite de la prise en charge de celui-ci et de la préparation du matériel prélevé sont fondamentales dans le succès du diagnostic [1-22].

Préparation des échantillons

Il convient dans un premier temps d'aspirer le liquide dans la lumière du kyste et de noter la quantité aspirée, la couleur (claire, citrin, brunâtre, franchement hémorragique), la consistance (« eau de roche » ou trouble, épaisse, filante ou gélatineuse). Ensuite, l'aspiration doit se faire au niveau de la paroi du kyste en exerçant plusieurs fois un mouvement de va-et-vient à l'aiguille. Les petits fragments tissulaires cohésifs et les caillots doivent être récupérés et fixés pour l'examen histologique. Après chaque ponction, le matériel aspiré doit être rapidement technique pour l'analyse cytologique et/ou histologique.

Techniques cytologiques

Si le liquide est « eau de roche », il est indispensable de réaliser une concentration cellulaire. C'est pour cela qu'il est inutile de réaliser un étalement conventionnel car celui-ci ne permettra pas d'identifier du matériel cellulaire analysable. Ce liquide doit être adressé frais au laboratoire si le délai est court ; sinon, il sera acheminé en ajoutant quelques gouttes de formol dans le liquide pour permettre une bonne conservation des cellules, et cela si le délai de transport est supérieur à deux heures. La méthode ThinPrep, une technique de recueil en milieu liquide est très utile pour ce type de liquide paucicellulaire. Dans ce cas, le liquide aspiré et la rinçure de l'aiguille sont mis dans un flacon contenant une solution de transport Cytolyt® qui est une solution tamponnée à base de méthanol contenant un hémolytique et un protéolytique.

Si le liquide ponctionné est épais, filant, gélatineux ou trouble, quelques gouttes sont étalées sur une ou plusieurs lames, immédiatement fixées à l'air par l'infirmière présente dans la salle. Ces lames seront utiles pour réaliser les colorations spéciales du mucus (PAS et bleu alcian). La méthode ThinPrep est également recommandée, même si une partie des mucines peut être dissoute par la solution de recueil.

Techniques histologiques

Dans la mesure du possible, une biopsie doit être faite pour l'analyse histologique. Seuls les fragments cohésifs et les caillots sont gardés pour cette analyse. Ils sont plongés directement dans un fixateur comme l'AFA ou le formol qui peuvent être colorés par quelques gouttes d'éosine ou d'hématoxyline pour permettre un meilleur repérage des petits fragments. Toutes les petites particules cohésives identifiées sur la lame au moment de l'étalement des cellules sont délicatement récupérées avec la pointe d'un bistouri et transférées dans le fixateur, afin de pouvoir confectionner un cytobloc à partir de ces grumeaux de cellules. L'histologie permet des coupes sériées, des colorations spéciales et une étude immuno-histochemique.

Analyse biochimique du liquide

Une quantité suffisante de liquide (> 1ml) est gardée pour la détermination de la concentration en amylase et en lipase ainsi que pour le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire, (ACE), du Ca19-9, du Ca72-4, de la mucine gastrique M1 et de l'oncogène Ki-ras.

Points critiques pour le laboratoire

Techniques cytologiques

Au laboratoire, le technicien fait une étude macroscopique du liquide adressé et note le volume. Le liquide est centrifugé à 1 500 t/m pendant cinq minutes. Le surnageant est jeté, et le culot de centrifugation est étalé sur lame s'il est estimé suffisamment cellulaire ou si la cellularité est faible, analysé par cytocentrifugation (Cytospin3, Thermo-Shandon, 95 612 Eragny, France). Les étalements cellulaires sont colorés par le Diff-Quick (Dadde SA Behring, 92081 Paris La Défense, France).

Contribution de la cytologie monocouche

Les cellules en suspension en milieu liquide sont transférées dans une solution de fixation PreservCyt® avant d'être techniquées dans l'automate ThinPrep® 2000 (Cytoc Co., Marlborough, MA, USA). Cet automate réalise en trois étapes la dispersion, la concentration suivie du transfert des cellules sur une lame sous la forme d'une pastille de 20 mm de diamètre. La méthode ThinPrep® permet d'obtenir des étalements « monocouche » qui se détachent sur un fond très propre facilitant la lecture. La coloration de Papanicolaou est utilisée en routine. Cette technique est automatisée, minimisant les pertes cellulaires et optimisant les détails morphologiques. Elle permet d'ob-

tenir une qualité constante des lames en augmentant la cellularité, en réduisant les débris cellulaires et en augmentant les détails nucléaires. La lecture en est facilitée par l'analyse d'une seule lame au lieu des nombreuses lames d'étalements conventionnels et, de ce fait, la reproductibilité de l'examen est améliorée [28]. Si c'est nécessaire, il est possible de préparer de nouvelles lames à partir des cellules restant dans le flacon et d'obtenir un culot de cellules de qualité identique permettant de réaliser pour préciser le diagnostic des techniques complémentaires comme l'immunocytochimie. Des résultats préliminaires d'une étude menée sous l'égide de la Société Française de Cytologie Clinique effectuée sur 279 PAF de lésions d'organes profonds montrent une meilleure sensibilité dans le diagnostic de malignité de la technique ThinPrep par rapport à la technique cytologique conventionnelle par étalement, le « gold standard » étant l'histologie (communication personnelle).

Techniques histologiques

Si le culot de centrifugation est suffisamment volumineux, il est remis en suspension dans une solution de fixation AFA ou de formol à 10 % et centrifugé à 1500 t/m pendant 20 minutes pour préparer un cytobloc. Les coupes sériées sont colorées par l'HES, le PAS et le bleu alcian. Les carottes biopsiques comme les cytoblocs peuvent bénéficier de l'étude immuno-histochemique.

LA FIABILITÉ DE L'ANALYSE CYTOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DÉPEND DU TYPE TUMORAL

Certains diagnostics sont faciles en raison de la présence de critères cytologiques positifs : un tableau spécifique et une grande cellularité sont habituellement observés pour les tumeurs potentiellement malignes ou malignes.

Dans le cas d'une *tumeur endocrine*, les remaniements dégénératifs et kystiques sont à l'origine d'une forte cellularité. On observe sur le frottis de nombreuses cellules isolées de forme polygonale, à noyau rond et uniforme, avec un nucléole mal visible et une chromatine « poivre et sel ». Il peut y avoir des cellules binucléées ou multinucléées dont les noyaux pléiomorphes, pourvus d'un nucléole ont une chromatine plus grossière et sont parfois en mitoses. Le cytoplasme est basophile, fragile, à limites mal définies. Quelques cellules ont une différenciation plasmocytoïde, avec un noyau excentré et un cytoplasme dense mieux défini. Il peut y avoir des cellules à cytoplasme clarifié et vacuolé. Les cellules s'agencent de façon dispersée, en rosettes ou en travées à bordures mal définies. Elles s'attachent sur des axes fibro-vasculaires contenant de fins capillaires. La confirmation du diagnostic est apportée par l'étude de l'expression des marqueurs neuro-endocrines. La chromogranine A, la synaptophysine, la neurone spécifique éolase (NSE) sont détectées dans le cytoplasme des cellules tumorales. L'accumulation de la protéine p53 est

recherchée dans le noyau (Fig. 1). L'index de prolifération est apprécié par l'antigène Ki67 en utilisant l'anticorps MIB-1 [29-31].

Dans le cas d'une *tumeur solide pseudo-papillaire*, l'étalement est très cellulaire et contient de nombreuses papilles rectilignes et arborescentes. Au centre, il existe un fin axe fibro-vasculaire qui est surmonté par un empilement de cellules monomorphes. Le centre de la papille est occupé par un stroma PAS+. Des remaniements kystiques sont remplis de sang. Les noyaux sont en position centrale, de forme ronde ou ovale, avec une chromatine fine et un petit nucléole. Les noyaux peuvent présenter des inclusions et des incisures longitudinales. Le cytoplasme est pauvre, mal défini, parfois vacuolisé et contenant des inclusions PAS+. De la nécrose, des macrophages parfois multinucléés sont observés dans le fond de la préparation (Fig. 2). Les cellules tumorales ne contiennent pas de mucus (PAS seulement positif sur les inclusions et bleu alcian négatif) [32]. Les immunodétections les plus utiles au diagnostic positif sont la vimentine, l'alpha-1-anti-trypsin (A1AT), l'alpha-1-antichymotrypsine (A1ACT) et le CD57. La positivité cellulaire est intense pour A1AT et A1ACT mais ne touche que quelques groupements cellulaires, alors que la positivité pour la vimentine et CD56 est plus diffuse. Les récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone peuvent être également exprimés [33-35]. Le principal diagnostic différentiel se pose avec le groupe des tumeurs endocrines.

Dans le cas d'un *carcinome à cellules acineuses*, la cytologie est riche, constituée de nombreux groupements acineux ou glandulaires. Les cellules tumorales présentent des atypies, comportant des noyaux ronds ou ovales, une chromatine épaisse, un à deux nucléoles turgescents. Le cytoplasme d'abondance variable est granuleux, PAS+, et contient des grains de zymogène. Ces cellules expriment les enzymes pancréatiques : lipase, trypsine, chymotrypsine et amylase [36-37]. La plupart des cellules sont marquées avec les cytokératines (KL1), le Ca19-9, A1AT et la chromogranine ; elles n'expriment pas l'antigène de membrane épithélial (EMA) et Muc-1.

Dans le cas d'un *cystadénocarcinome mucineux*, le liquide mucineux épais et visqueux englobe de nombreuses cellules cancéreuses isolées ou en amas (Fig. 3), mêlées à des débris nécrotiques [1].

Dans le cas d'une *dégénérescence pseudo-kystique d'un adénocarcinome canalaire*, les travées et groupes de cellules cancéreuses sont typiquement constitués d'amas denses de cellules qui se chevauchent. Elles sont très cohésives en particulier en périphérie des amas. Les cellules sont cylindriques, à polarité perturbée. Les noyaux allongés aux extrémités pointues ont une chromatine clarifiée. Les membranes nucléaires sont indentées, d'aspect fripé ou convoluté. Les nucléoles sont proéminents. Des monstruosité et des mitoses peuvent être observées. Le fond de la préparation contient des noyaux nus, de la nécrose et des cellules inflammatoires [1]. La présence de noyaux fantomatiques est un bon signe en faveur de la malignité.

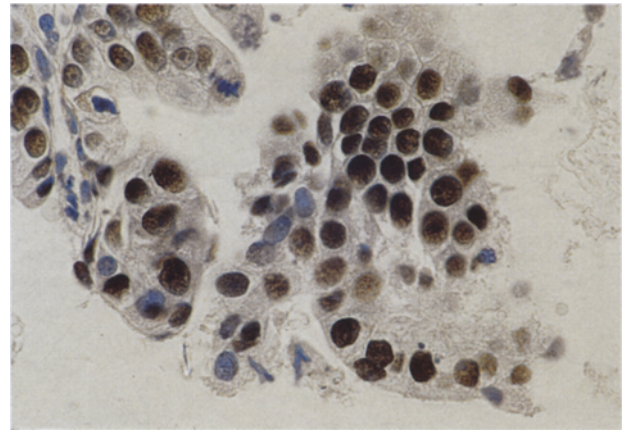


Figure 1
Cytologie monocouche de carcinome endocrine :
accumulation intranucléaire de p53.
Monolayered cytology of endocrine carcinoma :
nuclear accumulation of p53.

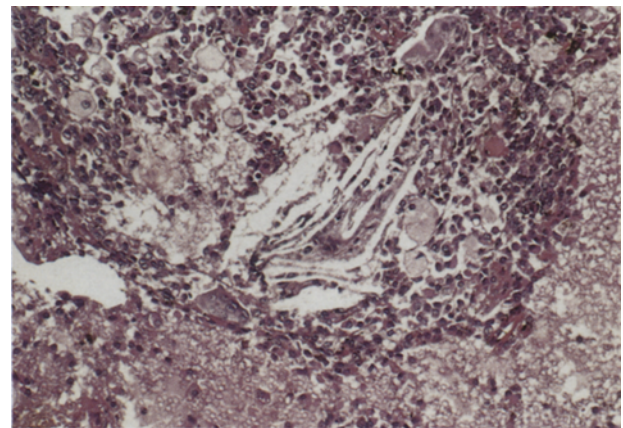


Figure 2
Microbiopsie d'une tumeur solide pseudopapillaire : petites cellules
peu cohésives entourées de cristaux de cholestérol et d'histiocytes
spumeux (HES).
Microbiopsy of solid pseudopapillary tumor : loose groups of small cells,
surrounded by foam cells and cholesterol crystals (HES).

Certains diagnostics sont difficiles en raison de la difficulté d'identifier les critères cytologiques, en particulier en raison de la faible cellularité et du type de la lésion.

L'aspiration d'un *pseudokyste* ramène un matériel abondant brunâtre qui ne comporte pas, par définition, de bordure épithéliale. Les pseudokystes qui compliquent une pancréatite aiguë contiennent des produits de nécrose, des noyaux nus, des polynucléaires, des macrophages chargés d'hémosidérine, des débris pigmentaires mêlés à de la fibrine et du sang. Les cellules canalaire sont habituellement absentes, sauf si le pseudokyste communique avec le canal de Wirsung ou ses branches de division. Le diagnostic de pseudokyste reste un diagnostic d'exclusion [1].

Dans le cas d'un *cystadénome séreux*, le liquide eau de roche contient quelques travées ou raclures de cel-

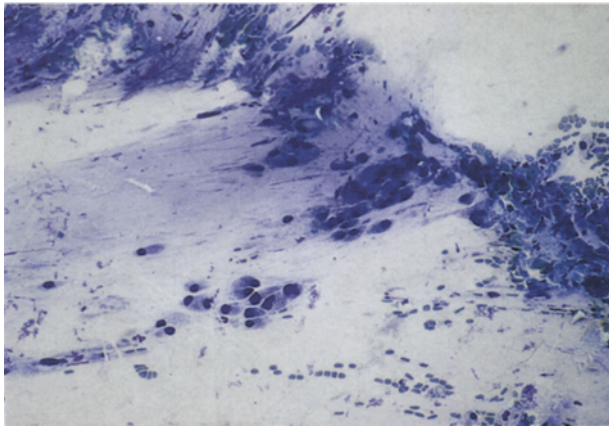


Figure 3

Etallement conventionnel d'un cystadénocarcinome mucineux : flaques de mucus violacé contenant des amas cancéreux basophiles (Diff-Quick).
Conventional smear of a mucinous cystadenocarcinoma : purplish stained mucin pools with groups of basophilic malignant cells (Diff-Quick).

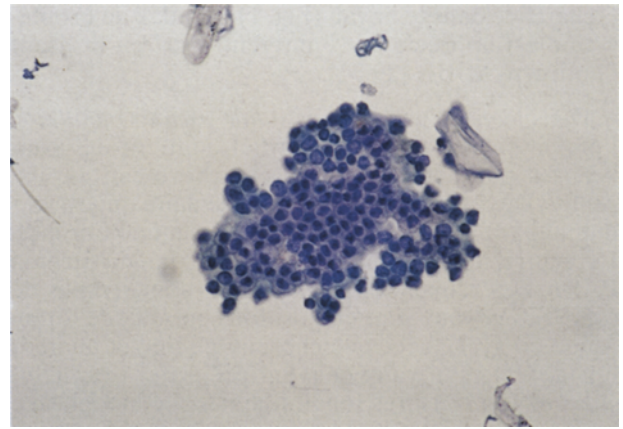


Figure 4

Cytologie monocouche d'un cystadénome séreux : petites cellules épithéliales régulières dans un fond propre (Papanicolaou).
Monolayered cytology of a serous cystadenoma : small cuboidal and regular epithelial cells in clear background (Papanicolaou).

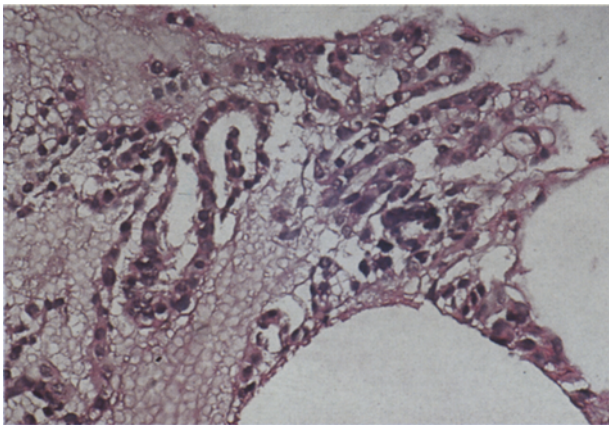


Figure 5

Microbiopsie d'un cystadénome séreux : rubans de cellules cubiques à cytoplasme clair contenant du glycogène (PAS).
Microbiopsy of a serous cystadenoma : strips of small cuboidal cells that have central nuclei and clear, glycogen-rich cytoplasm (PAS).

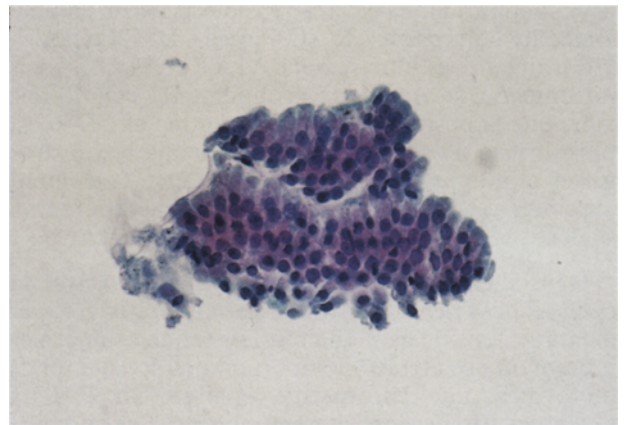


Figure 6

Cytologie monocouche d'un cystadénome mucineux : cellules cylindriques formant un amas tridimensionnel (Papanicolaou).
Monolayered cytology of a mucinous cystadenoma : columnar cells arranged in tridimensional cluster (Papanicolaou).

lules épithéliales « monocouche », de petite taille, cubiques, à noyau central. En technique ThinPrep, les cellules sont petites régulières en petits nids sur un fond très propre (Fig. 4) [1]. Le cytoplasme peu abondant et clair contient du glycogène (PAS+, qui devient négatif après action de l'amylase) (Fig. 5). Quelquefois, le noyau peut être plus dense avec quelques incisures.

Dans le cas d'une *tumeur mucineuse*, le liquide est épais, de consistance visqueuse. Les mucines extracellulaires ne doivent pas être confondues avec des débris nécrotiques. Ce matériel montre une substance abondante qui peut masquer les cellules épithéliales et qui se colore intensément en pourpre avec le Papanicolaou et le Diff-Quick. A un plus fort grossissement, les microfibrilles parallèles de mucus sont bien mises en évidence. Les mucines restent présentes en technique ThinPrep [1, 22]. La population cellulaire est constituée de cellules caliciformes et de cellules cylindriques, dont le rapport nucléo-

cytoplasmique est normal et qui sont disposées en cellules isolées, en travées ou en amas tridimensionnels (Fig. 6). La mucosecrétion dans le cytoplasme est d'abondance variable. Les mucines déplacent le noyau au pôle basal. Les colorations au PAS et au bleu alcian sont intensément positives. Les noyaux sont indentés et le nucléole est petit. Comme la bordure épithéliale du kyste peut être constituée d'un revêtement bénin, borderline et malin, une possible dégénérescence maligne ne doit jamais être éliminée. Le stroma pseudo-ovarien situé en dessous de la bordure épithéliale, décrit sur des prélèvements chirurgicaux ne figure pas sur les PAF. Par ailleurs, il faut toujours interpréter la présence de mucine avec prudence, en raison de la possibilité de contamination du prélèvement par le mucus d'origine gastro-intestinale.

Dans le cas d'une *tumeur intracanaulaire papillaire et mucineuse*, le liquide est très épais et gélatineux (Fig. 7), riche en cellules. Il contient des papilles, des

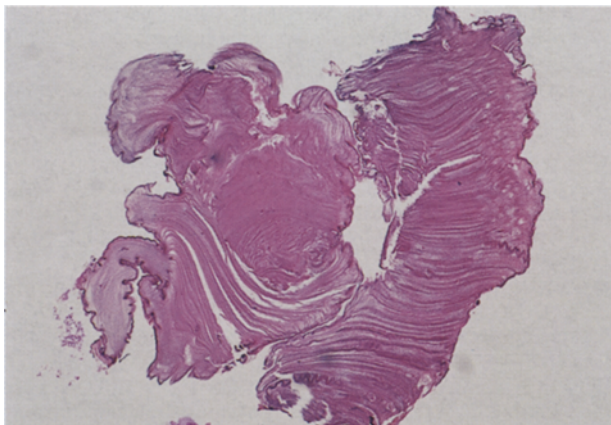


Figure 7

Microbiopsie d'une tumeur intracanaléaire papillaire et mucineuse : épaisses strates parallèles de mucus fortement colorés à l'HES.

Microbiopsy of a mucinous intraductal papillary tumor : tightly cohesive bands of mucin deeply stained by HES.

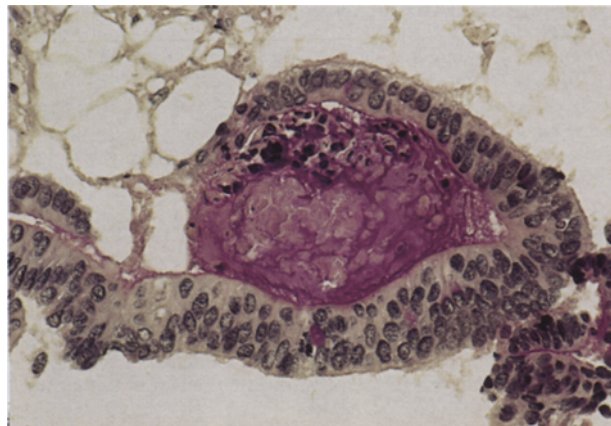


Figure 8

Microbiopsie d'une tumeur intracanaléaire papillaire et mucineuse maligne : épais moules de mucus et franges de cellules cylindriques avec des atypies sévères (PAS).

Microbiopsy of a malignant mucinous intraductal papillary tumor : thick mucin and prominent papillae of columnar cells, with severe atypia (PAS).

formations tubulo-papillaires, des cellules isolées cylindriques plus ou moins atypiques. Dans la variante bénigne, les noyaux sont régulièrement espacés, agencés de façon palissadique [38]. Dans la variante maligne, les chevauchements et les atypies sont fréquents (Fig. 8). La bordure épithéliale de cette tumeur est identique à celle d'une tumeur mucineuse. Il n'est pas possible de les différencier l'une de l'autre par la cytologie ou la microbiopsie.

CONCLUSION

D'après notre propre expérience, les recommandations suivantes peuvent être proposées :

- des informations sur l'histoire clinique du patient, les résultats des données biologiques, radiologiques et endoscopiques doivent être fournies ;

- des informations sur la taille, le siège de la lésion, le nombre et les conditions de la ponction doivent accompagner le prélèvement ;

- une quantité suffisante de liquide doit être prélevée pour permettre l'analyse morphologique et l'analyse biochimique du liquide ;

- une analyse couplée cytologique (en cytologie conventionnelle et en milieu liquide selon ThinPrep) et histologique si possible doit être réalisée [1, 22-23, 39].

En outre, il est important que la ponction soit réalisée par des opérateurs entraînés.

Dans ces conditions, il est possible d'obtenir par la PAF un diagnostic définitif pour des lésions comme le cystadénocarcinome mucineux, le carcinome canalaire nécrosé, le carcinome à cellules acineuses, les tumeurs endocrines et la tumeur solide pseudopapillaire. Ensuite, la PAF doit être en mesure de séparer les tumeurs kystiques mucineuses de celles non mucineuses. Dans quelques cas, le cystadénome séreux peut être diagnostiqué, en particulier en s'aidant de l'automate ThinPrep[®] qui permet de concentrer les échantillons cellulaires peu cellulaires et qui fait ressortir sur un fond très propre une population de cellules « monocouche ». Le pseudokyste reste un diagnostic d'exclusion. Des techniques complémentaires telles que la surexpression de Muc-1, p53, la détection de mutations de l'oncogène Ki-ras et la mesure de l'activité des télomérases peuvent être des outils diagnostiques utiles pour permettre dans les cas difficiles de différencier les lésions kystiques malignes de celles qui ne le sont pas comme les tumeurs bénignes et les pseudokystes [40-45].

En résumé, les lésions kystiques du pancréas peuvent être diagnostiquées avec un bon seuil de confiance si un certain nombre de conditions sont soigneusement respectées passant par un bon examen clinique, une étude radiologique complète et une technique adaptée de prélèvement et de traitement du liquide aspiré.

RÉFÉRENCES

1. CENTENO B.A., BISHOP PITMAN M. — Fine-needle aspiration biopsy of the pancreas. Butterworth-Heinemann, 1999.
2. HORVATH K.D., CHABOT J.A. — An aggressive resectional approach to cystic neoplasms of the pancreas. *Am. J. Surg.*, 1999, 178, 269-274.
3. KIMURA W., MAKUUCHI M. — Operative indications for cystic lesions of the pancreas with malignant potential : our experience. *Hepatogastroenterology*, 1999, 46, 483-491.
4. HAMMEL P. — Diagnostic value of cyst fluid analysis in cystic lesions of the pancreas : current data, limitations, and perspectives. *J. Radiol.*, 2000, 81, 487-490.

5. BENTZ J.S., KOCHMAN M.L., FAIGEL D.O., GINSBERG G.G., SMITH D.B., GUPTA P.K. — Endoscopic ultrasound-guided real-time fine-needle aspiration : clinicopathologic features of 60 patients. *Diagn. Cytopathol.*, 1998, 18, 98-109.
6. CHANG K.J., NGUYEN P., ERICKSON R.A., DURBIN T.E., KATZ K.D. — The clinical utility of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of pancreatic carcinoma. *Gastrointest. Endosc.*, 1997, 45, 387-393.
7. BRANDWEIN S.L., FARRELL J.J., CENTENO B.A., BRÜGGE W.R. — Detection and tumor staging of malignancy in cystic, intraductal, and solid tumors of the pancreas by EUS. *Gastrointest. Endosc.*, 2001, 53, 722-727.
8. DE CALAN L., LEVARD H., HENNET H., FINGERHUT A. — Pancreatic cystadenoma and cystadenocarcinoma : diagnostic value of preoperative morphological investigations. *Eur. J. Surg.*, 1995, 161, 35-40.
9. CURRY C.A., ENG J., HORTON K.M., URBAN B., SIEGELMAN S., KUSZYK B.S., FISHMAN E.K. — CT of primary cystic pancreatic neoplasms : can CT be used for patient triage and treatment ? *Am. J. Roentgenol.*, 2000, 175, 99-103.
10. PROCACCI C., BIASIUTTI C., CARBOGNIN G., ACCORDINI S., BICEGO E., GUARISE A., SPOTO E., ANDREIS I.A., DE MARCO R., MEGIBOW A.J. — Characterization of cystic tumors of the pancreas : CT accuracy. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, 1999, 23, 906-912.
11. LE BORGNE J., DE CALAN L., PARTENSKY C. — Cystadenomas and cystadenocarcinomas of the pancreas : a multi-institutional retrospective study of 398 cases. French Surgical Association. *Ann. Surg.*, 1999, 230, 152-161.
12. SCHACHTER P.P., AVNI Y., GVIRZ G., ROSEN A., CZERNIAK A. — The impact of laparoscopy and laparoscopic ultrasound on the management of pancreatic cystic lesions. *Arch. Surg.*, 2000, 135, 260-264.
13. LEWANDROWSKI K.B., SOUTHERN J.F., PINS M.R., COMPTON C.C., WARSHAW A.L. — Cyst fluid analysis in the differential diagnosis of pancreatic cysts. A comparison of pseudocysts, serous cystadenomas, mucinous cystic neoplasms, and mucinous cystadenocarcinoma. *Ann. Surg.*, 1993, 217, 41-47.
14. HAMMEL P., VOITOT H., VILGRAIN V., LEVY P., RUSZKIEWSKI P., BERNADES P. — Diagnostic value of CA 72-4 and carcinoembryonic antigen determination in the fluid of pancreatic cystic lesions. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1998, 10, 345-348.
15. WILLIAMS D.B., SAHAI A.V., AABAKKEN L., PENMAN I.D., VAN VELSE A., WEBB J., WILSON M., HOFFMAN B.J., HAWES R.H. — Endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy : a large single centre experience. *Gut*, 1999, 44, 720-726.
16. DAVID O., GREEN L., REDDY V., KLUSKENS L., BITTERMAN P., ATTAL H., PRINZ R., GATTUSO P. — Pancreatic masses : a multi-institutional study of 364 fine-needle aspiration biopsies with histopathologic correlation. *Diagn. Cytopathol.*, 1998, 19, 423-427.
17. SPERTI C., PASQUALI C., GUOLO P., POLVEROSI R., LIESSI G., PEDRAZZOLI S. — Serum tumor markers and cyst fluid analysis are useful for the diagnosis of pancreatic cystic tumors. *Cancer*, 1996, 78, 237-243.
18. NGUYEN G.K., SUEN K.C., VILLANUEVA R.R. — Needle aspiration cytology of pancreatic cystic lesions. *Diagn. Cytopathol.*, 1997, 17, 177-182.
19. DI STASI M., LENCIONI R., SOLMI L., MAGNOLFI F., CATURELLI E., DE SIO I., SALMI A., BUSCARINI L. — Ultrasound-guided fine needle biopsy of pancreatic masses : results of a multicenter study. *Am. J. Gastroenterol.*, 1998, 93, 1329-1333.
20. CENTENO B.A., WARSHAW A.L., MAYO-SMITH W., SOUTHERN J.F., LEWANDROWSKI K. — Cytologic diagnosis of pancreatic cystic lesions. A prospective study of 28 percutaneous aspirates. *Acta Cytol.*, 1997, 41, 972-980.
21. CENTENO B.A. — Fine-needle aspiration biopsy of the pancreas. *Clin. Lab. Med.*, 1998, 18, 401-427.
22. FABRE M., COCHAND-PRIOU B. — Diagnosis of pancreatic lesions by fine needle aspiration : present status and pitfalls. *Ann. Pathol.*, 1999, 19, 429-438.
23. FABRE M., LABADIE M. — Rapid staining and guided fine needle aspiration for deep masses. *Clin. Exp. Pathol.*, 1999, 47, 297-302.
24. LJUNG B.M., DREJET A., CHIAMPI N., JEFFREY J., GOODSON W.H. 3rd, CHEW K., MOORE D.H. 2nd, MILLER T.R. — Diagnostic accuracy of fine-needle aspiration biopsy is determined by physician training in sampling technique. *Cancer*, 2001, 93, 263-268.
25. WIERSEMA M.J., VILMANN P., GIOVANNINI M., CHANG K.J., WIERSEMA L.M. — Endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy : diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology*, 1997, 112, 1087-1095.
26. AFFI A., VAZQUEZ-SEQUEIROS E., NORTON I.D., CLAIN J.E., WIERSEMA M.J. — Acute extraluminal hemorrhage associated with EUS-guided fine needle aspiration : frequency and clinical significance. *Gastrointest. Endosc.*, 2001, 53, 221-225.
27. O'TOOLE D., PALAZZO L., AROTARENA R., DANCOUR A., AUBERT A., HAMMEL P., AMARIS J., RUSZKIEWSKI P. — Assessment of complications of EUS-guided fine-needle aspiration. *Gastrointest. Endosc.*, 2001, 53, 470-474.
28. FABRE M., MONGES G., BENLAGHA N., GIOVANNINI M., DANCOUR A., AMOUYAL P., PATRIARCHE C., BERNARDINI B., ROCHER L., NEIDHART R., PAUZE J.L., AMOUYAL G. — Paired comparison of conventional and ThinPrep fine needle aspiration (FNA) biopsy. A prospective series of 42 deep masses. *Clin. Exp. Pathol.*, 1998, 46, 238.
29. AKOSA A.B., DESA L.A., PHILLIPS I., BENJAMIN I.S., POLAK J.M., KRAUSZ T. — Aspiration cytodiagnosis of pancreatic endocrine tumors. *Cytopathology*, 1994, 5, 369-379.
30. COLLINS B.T., CRAMER H.M. — Fine-needle aspiration cytology of islet-cell tumors. *Diagn. Cytopathol.*, 1996, 15, 37-45.
31. SHAW J.A., VANCE R.P., GEISUNGER K.R., MARSHALL R.B. — Islet cell neoplasms. A fine-needle aspiration cytology study with immunocytochemical correlations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1990, 94, 142-149.
32. KASHIMA K., HAYASHIDA Y., YOKOYAMA S., NAGAHAMA J., SATO K., DAA T., GAMACHI A., NAKAYAMA I. — Cytologic features of solid and cystic tumor of the pancreas. *Acta Cytol.*, 1997, 41, 443-439.
33. PELOSI G., IANNUCI A., ZAMBONI G., BRESAOLA E., IACONO C., SERIO G. — Solid and cystic papillary neoplasm of the pancreas : a clinico-cytopathologic and immunocytochemical study of five new cases diagnosed by fine-needle aspiration cytology and a review of the literature. *Diagn. Cytopathol.*, 1995, 13, 233-246.
34. MANDREKAR S.R., PINTO R.G., PATIL R., VERNEKAR J., PALLYEKAR S., NADKARNI N. — Solid and papillary epithelial neoplasm of the pancreas. Report of a case with diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol.*, 1997, 41, 1823-1827.
35. CRAWFORD B.E. — Solid and papillary epithelial neoplasm of the pancreas. Diagnosis by cytology. *South. Med. J.*, 1998, 91, 973-977.
36. LABATE A.M., KLIMSTRA D.L., ZAKOWSKI M.F. — Comparative cytologic features of pancreatic acinar cell carcinoma and islet cell tumor. *Diagn. Cytopathol.*, 1997, 16, 112-116.
37. SAMUEL L.H., FRIERSON H.F. Jr. — Fine needle aspiration of acinar cell carcinoma of the pancreas : a report of two cases. *Acta Cytol.*, 1996, 40, 585-591.
38. YAMAGUCHI K., TANAKA M. — Atlas of cystic neoplasms of the pancreas. Kyushu University Press, Karger, 2001.
39. CARLSON S.K., JOHNSON C.D., BRANDT K.R., BATTS K.P., SALOMAO D.R. — Pancreatic cystic neoplasms : the role and sensitivity of needle aspiration and biopsy. *Abdom. Imaging.*, 1998, 23, 387-393.
40. IWAO T., TSUCHIDA A., HANADA K., EGUCHI N., KAJIYAMA G., SHIMAMOTO F. — Immunocytochemical

- detection of p53 protein as an adjunct in cytologic diagnosis from pancreatic duct brushings in mucin-producing tumors of the pancreas. *Cancer*, 1997, 81, 163-171.
41. MONGES G.M., MATHOULIN-PORTIER M.P., ACRES R.B., HOUVENAEGHEL G.F., GIOVANNINI M.F., SEITZ J.F., BARDOU V.J., PAYAN M.J., OLIVE D. — Differential MUC 1 expression in normal and neoplastic human pancreatic tissue. An immunohistochemical study of 60 samples. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1999, 112, 635-640.
 42. PINTO M.M., EMANUEL J.R., CHATURVERDI V., COSTA J. — *Ki-ras* mutations and the carcinoembryonic antigen level in fine needle aspirates of the pancreas. *Acta Cytol.*, 1997, 41, 427-434.
 43. FUKUSHIMA N., SUZUKI M., FUKAYAMA M. — Analysis of *Ki-ras* oncogene mutation directly applied to atypical cell clusters on cytological smear of bile and pancreatic juice. *Pathol. Int.*, 1998, 48, 33-40.
 44. YEH T.S., CHENG A.J., CHEN T.C., JAN Y.Y., HWANG T.L., JENG L.B., CHEN M.F., WANG T.C. — Telomerase activity is a useful marker to distinguish malignant pancreatic cystic tumors from benign neoplasms and pseudocysts. *J. Surg. Res.*, 1999, 87, 171-177.
 45. INOUE H., TSUCHIDA A., KAWASAKI Y., FUJIMOTO Y., YAMASAKI S., KAJIYAMA G. — Preoperative diagnosis of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas with attention to telomerase activity. *Cancer*, 2001, 91, 35-41.

INTRODUCTION

Pancreatic cystic lesions are uncommon, but detected at an increased rate in the current era of sophisticated abdominal imaging. The discovery of a cystic lesion in the pancreas implies a challenge for the physician. The selection of the appropriate treatment depends on the ability to distinguish benign from malignant cysts. Malignant cystic tumors are rare and comprise only about 1 % of all pancreatic malignancies, there are potentially curable. Therefore, correct diagnosis and treatment of these lesions are of great importance [1]. An aggressive resectional approach to all suspected cystic neoplasms of the pancreas is proposed by some authors, but the overall perioperative complication rate may reach 40 % with major and minor complications [2]. Small cystic lesions in elderly patients should not necessarily be operated on, but followed-up carefully [3]. Other authors recommend simple observation for pseudocysts and asymptomatic serous cystadenomas, and resection for other tumors [4].

Pancreatic cystic lesions comprise a pathologically heterogeneous group of lesions, which share many common clinical features. Cystic lesions can be classified as congenital, inflammatory and neoplastic. The vast majority are pseudocysts, which account for approximately 75-90 % of all pancreatic cystic lesions [1]. They are usually preceded by a history of acute pancreatitis, alcoholism or abdominal trauma. Cystic neoplasms account for approximately 5 % of all neoplasms of the pancreas, including benign lesions such as serous cystadenomas or potentially malignant but early cured lesions such as mucinous cystic neoplasms, intraductal papillary mucinous neoplasms, and solid pseudopapillary tumor. The remaining consist of mucinous cystadenocarcinoma, cystic degeneration of endocrine tumors, acinar cell carcinoma, ductal carcinoma, and mucinous adenocarcinoma or other rare entities such as congenital cysts, lymphoepithelial cyst, lymphangioma, peripancreatic cysts [1].

The diagnosis of a cystic pancreatic tumor requires different imaging techniques, including ultrasonography (US), computed tomography (CT), magnetic resonance imaging, endoscopic retrograde cholangiopancreatography, and endoscopic ultrasonography

(EUS) [4-7]. The clinical and radiological features of these lesions may not permit a preoperative diagnosis [8-11]. Analysis of cyst fluid aspirates for tumor markers and enzymes (amylase and lipase) has been proposed as an aid to differential diagnosis [4]. In most of published series, the number of cystic pancreatic lesions is low. The rate of false negative and false positive still remains high for benign neoplasm such as serous cystadenoma [12]. Pitfalls in the analysis of cyst fluid include direct communication with the pancreatic duct, cases of nonpancreatic cysts [13]. Furthermore, measurements of these markers need to be standardized within each center. More evaluation and follow-up will be required before the value of these markers can be assessed and interpreted in combination with clinical data and imaging findings [4, 14]. An accurate preoperative diagnosis of tumor type is proposed by a combination of radiological investigations and cyst fluid analysis for a limited number of neoplasms : about 20 % of serous cystadenoma, 30 % of mucinous cystadenoma, and 29 % of cystadenocarcinoma [11].

Fine-needle aspiration (FNA) cytology and biopsy under US-, CT- and EUS-guidance has dramatically increased the possibility of diagnosis for solid pancreatic neoplasms before surgery or palliative therapy. EUS-FNA provides 85-95 % sensitivity and 100 % specificity in diagnosing malignant solid tumors [1, 15-16]. However, the sensitivity for cystic neoplasms is lower (49-62 %) mostly because it is difficult to obtain representative samples [7, 17-23]. The sensitivity of cytology alone for the detection of carcinoma is about 67-71 % in a series of 59 cystic pancreatic lesions [1, 20]. In most cases, malignant neoplasms have solid areas associated with the cysts, and aspiration of the solid area usually yields diagnostic material. Accordingly, there is considerable reluctance among surgeons and pathologists alike to place reliance on FNA in the diagnosis of cystic pancreatic tumors. Therefore, it is important to determine the role and the limitations of FNA versus cystic lesions of the pancreas [22].

WHY CYSTIC PANCREATIC LESIONS DIAGNOSIS BY IMAGING IS DIFFICULT?

Numerous cystic neoplasms misdiagnosed as pseudocysts are reported in the literature. Errors occur

mainly on US-, CT-imaging [10]. EUS has an important role to determine which cystic lesions have malignant potential. The sensitivity for diagnosing cystic pancreatic neoplasms is improved with specific attention on EUS images. However, it remains lower than for solid neoplasms.

Serous cystadenoma is classically composed of cysts smaller than 2 cm in diameter and over five in number with sunburst calcification, while mucinous cystic tumors comprise cysts larger than 2 cm and fewer than five in number with peripheral calcification. But, a wide variation in appearance of serous cystadenoma has been reported. The discrimination of macrocystic serous cystadenoma from mucinous neoplasm is difficult because of a macrocystic nature of the two diseases [9]. Since serous oligocystic adenoma may present as a unilocular cystic lesion filled with blood, difficulties may arise in distinguishing it from pseudocyst. Similarly, the differential diagnosis between intraductal papillary mucinous tumor and mucinous cystadenoma is based on the communication with a dilated pancreatic duct, which is not always easy to identify. Mural nodules, intracystic or intraductal material, pericystic infiltration are not always present for allowing a suspicion of malignancy [4].

WHY ACCURATE SAMPLING FOR CYSTIC PANCREATIC LESIONS IS DIFFICULT?

Factors that affect the accuracy of FNA include formal training of the operator. FNA, when performed by well-trained physicians is highly accurate and can replace a large number of surgical biopsies. When performed by poorly trained physicians, FNA is often misleading and potentially harmful [24]. Specimens obtained by skilled operators are significantly more cellular. The number of non-evaluable samples is lower. For breast lesions, the cellularity of benign cysts was estimated representative for 18.7 % for trained physicians, versus 6 % for physicians without formal training [24].

Another error may explain the lower sensitivity for cystic lesions : the needle may miss the diagnostic cellular area of the tumor [1, 22-23].

The accuracy of FNA is also improved by increasing the number of needle passes. The number of sampling passes is limited because of the high risk of complications of EUS-guided FNA for pancreatic cystic lesions (1.2-14 %) such as acute pancreatitis, acute extraluminal hemorrhage, aspiration pneumonia, and pain, particularly for lesions in the head/uncinate process. If the number of needles passes is not predictive of complications, the number of punctions for cystic lesions is often reduced for minimizing such potential risk for complications, and aspirated material is of scant cellularity [25-27].

Moreover, a standard FNA procedure for solid tumors is non-appropriate and affects the accuracy because the preparation of specimen for cystic lesions depends on their cellularity.

WHY CORRECT INTERPRETATION OF SAMPLES OBTAINED BY EUS FNA FROM CYSTIC PANCREATIC LESIONS IS DIFFICULT ?

A high number of unsatisfactory samples inducing a lower sensitivity is observed for cystic pancreatic lesions, while guided-FNA biopsy is a sensitive test for diagnosing solid pancreatic malignancies. Three causes may be considered : first, the material is poor due to variability of cyst lining and epithelial denudation because of inflammatory process; second, the standard sampling procedures of endoscopist and cytotechnologist are not adapted to this type of material and may increase the low cellularity; third, identification of inflammatory or benign lesion via FNA is more difficult than malignant lesion by the pathologist [1, 22].

The accuracy of FNA depends on the experience of pathologist and cytologist in the microscopic interpretation of FNA specimens (cytology and microbiopsy).

HOW TO PERFORM ACCURATE SAMPLING FOR CYSTIC PANCREATIC LESIONS ?

Critical issues for the endoscopist

The quality of the aspirate (cystic fluid and the margin wall of the lesion) and the proper handling and preparation of the aspirated sample are crucial to the ultimate success of the diagnosis [1, 22].

Preparation of specimens

First, the lumen of the cyst or the pseudocyst is aspirated. Examination of fluid : amount, color (clear, straw-colored, brownish, frankly hemorrhagic), consistency (watery to turbid, thick, stringy or gelatinous) is required. Second, the needle is moved back and forth several times in the wall of the lesion. Small cohesive fragments and clots are collected and fixed for histology. After each sampling pass, the aspirated material must be quickly processed for cytological and/or histological procedures.

Cytological procedures

If the content is watery, fluid concentration methods must be used. No smears are used, because the cellularity is too low to allow a diagnosis. Fluid is collected fresh (if quickly sent to the Lab) or preserved by adding few drops of formalin fixative in vial (if sent to the Lab more than 2 hours after sampling). ThinPrep method, a fluid based technique for collection of aspirates is very useful for watery liquid specimen. The needle is washed with Cytolyt® solution and cells are collected in a vial containing the same transport solution. Cytolyt® contains a methanolic, buffered preservative solution designed to lyse red blood cells and prevent protein precipitation.

If the fluid content is thick, stringy, gelatinous or turbid, some drops of fluid are smeared onto one or more

glass slides, immediately air-dried by trained nurses at the bedside. One or more air-dried conventional smears are useful for PAS and alcian blue. ThinPrep method is also recommended, even if this transport solution may partly dissolve mucins.

Histological procedures

When possible, a biopsy is collected for further histological analysis. Only small cohesive fragments and clots are kept. They are expelled directly into the AFA or 10 % buffered formalin fixatives containing some drops of hematoxylin or eosin stains for a better identification of small specimens. All small particles, if identified on the slide prior to smearing, are gently removed with a small forceps and transferred to fixative for cellblock preparation. Histology permits multiple sections, special stains and reliable immunohistochemical techniques.

Biochemical fluid analysis

A sufficient quantity of fluid (>1cc) is kept for determination of amylase and lipase contents, and dosage of tumor markers such as carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), cancer antigen 72-4 (CA 72-4), gastric mucin M1, Ki-ras oncogene.

Critical issues for the laboratory

Cytological procedures

In the lab, the cytotechnologist makes a macroscopic analysis of the fluid and records its volume. The fluid is centrifuged at 1,500 rpm for five minutes. The supernatant is then discarded, and the sediment is smeared on glass slides if judged grossly cellular or resuspended and used to prepare cytopspins (Shandon Southern Instruments, Pittsburgh, Pa, USA), if the material is scarce. Smears are stained with a modified Wright's stain (Diff-Quick, Baxter Healthcare Co, McGaw Park Ill).

Contribution of monolayered specimens

The liquid cell suspension is rinsed in a vial of fixative PreservCyt[®] solution before being processed in the automated sample ThinPrep[®] 2000 processor (Cytoc Co., Marlborough, MA, USA). The three steps conducted by the processor are dispersing the sample, collecting the cells, and effecting cell transfer onto the glass slide in a 20 mm diameter circle. ThinPrep[®] method provides a monolayered cell population with a cleaner background, facilitating cytological evaluation. Papanicolaou staining is routinely used. This standardized monolayered specimen preparation minimizes cell loss and preserved morphological details. It provides consistent slide quality by increasing cellularity, reducing obscuring elements, and enhancing nuclear details. Only one slide analysis allows interpretation instead of several conventional smears. The reduction of the screening time per case gives a better level of confidence [28]. If there is a need for additional diagnostic testing such as immunocytochemistry, the laboratory can go back to the vial and

prepare additional slides that contain the same diagnostic material. For malignancy diagnosis, preliminary results of the French Society of Clinical Cytology study on ThinPrep[®] and conventional smears applied to 279 various deep organs sampled by FNA and compared to histology show a better sensitivity for ThinPrep than for conventional smears (personal communication).

Histological procedures

If enough material remained into the centrifugation sediment, resuspending the pellet in AFA or 10 % buffered formalin and centrifuging at 1500 rpm for 20 minutes prepare a cell block. Serial paraffin sections are routinely stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES), periodic acid-Schiff (PAS) and alcian blue. Immunodetection are obtained on tissue core and cellblocks of aspirates.

ACCURACY OF CYTOLOGICAL AND HISTOLOGICAL ANALYSIS DEPENDS ON TUMOR TYPE

Some diagnosis are easy because cytological criteria for positive diagnosis are present : specific pattern and high cellularity are usually observed in potentially malignant or malignant neoplasms.

In case of endocrine neoplasms, degeneration and cyst formation give a highly cellularity. Numerous isolated polygonal-shaped cells having uniform round nuclei with inconspicuous nucleoli and a "salt-and-pepper" nuclear chromatin pattern are observed. Binucleation and multinucleation, coarse chromatin, nucleoli, pleiomorphism, and mitotic figures may be found. The cytoplasm is basophilic, wispy, and ill defined. Some cells may have abundant well-defined, dense cytoplasm and eccentrically placed nuclei, which imparts a plasmocytoid appearance to the cells. Clear cell variant is composed of cells with abundant, vacuolated cytoplasm. The cells may aggregate in loose groups or rosette-like structures or sheets with poorly defined borders. Neoplastic cells surround fibrovascular stroma containing delicate endothelial channels. Confirmation is provided by positivity for neuroendocrine markers. Chromogranin A, synaptophysin, neuron specific enolase (NSE) are positive in cytoplasm of cells from endocrine neoplasms. Nuclear accumulation of p53 protein is searched (Fig. 1). The proliferating nuclear index is evaluated by Ki-67 antigen detection, using MIB-1 antibody [1, 29-31].

In case of solid pseudopapillary tumor of pancreas (Fig. 2), aspirates are typically highly cellular and contain numerous straight or branching papillary structures. At the center is a delicate fibrovascular core surrounded by monomorphic multilayered cells. The core is surrounded by a layer of myxoid periodic acid-Schiff (PAS) stained stroma. Cystic area is blood-filled. The nuclei are centrally placed, round to oval, with bland chromatin, and micronucleoli. The nuclei may have inclusions and longitudinal grooves. The cytoplasm is scant, ill-defined, amphophilic, vacuola-

ted with some PAS-positive inclusions. Necrosis, macrophages, giant-cells are observed in background. The tumor cells are not positively stained with PAS (except for the PAS-positive globules) or alcian blue [32]. The most diagnostic and useful immunohistochemical markers are vimentin, alpha-1-antitrypsin (AIAT), alpha-1-antichymotrypsin (AIACT), and CD57. The cellular positivity for AIAT and AIACT is intense but involves only small cell clusters or single cells, whereas the positivity for vimentin and CD57 in contrast, is usually diffuse. Estrogen and progesterone receptors are sometimes demonstrated [33-35]. Difficulties may be encountered in typing solid papillary tumor cells resembling those of an endocrine neoplasm [18].

In case of acinar cell carcinoma, numerous clusters of tumors cells showing acinar and glandular structures with no stromal component characterize the cytology. The neoplastic cells that show more pronounced atypia, have round-to oval coarsely granular, hyperchromatic nuclei that contain one to two prominent nucleoli. The cytoplasm is scant to moderate and amphophilic, with accentuated granularity on MGG. The cytoplasmic granules are PAS-stained. The cytoplasmic granularity is due to zymogen granules, which are the target of most immunocytochemical stains [36-37]. These cells are labeled by at least one enzyme marker: lipase, trypsin, chymotrypsin, and amylase. More neoplastic cells are positive with KL1, Ca 19-9, AIAT, chromogranin, and negative with EMA, Mucl.

In case of mucinous cystadenocarcinoma (Fig. 3), thick viscous consistency mucinous fluid shows a high cellularity and cellular groups of malignant cells with abundant necrotic proteinaceous debris [1].

In case of pseudocystic degeneration of ductal carcinoma, the sheets and groups of malignant cells are typically thick due to nuclear crowding and overlapping. They appear very tightly cohesive around the edges because of lack of peripheral dyshesion. The cells are pyramidal. The polarity is disturbed. Carrot-shaped nuclei have pointed ends. The nuclei are pale with parachromatin clearing. The nuclei show indentations, notches, and grooves or extreme convoluted deformities. The nucleoli are prominent. Nuclear irregularities, pleiomorphism, and mitotic activity must be searched. The background of smears may contain some naked nuclei, debris and inflammatory cells [1]. The presence of coagulative necrosis producing tumor ghost cells is a hallmark of malignancy.

Some diagnoses are difficult because cytological criteria for diagnosis are difficult to assess, mostly due to low cellularity, contaminants, and type of lesions.

Aspiration of pseudocysts results in a large volume of brownish fluid, which do not have an epithelial lining by definition. The pseudocysts complicating acute pancreatitis gives fluid collections, usually rich in necrotic debris, naked nuclei, polymorphonuclear leukocytes, hemosiderin-laden histiocytes, pigmented background debris, blood and fibrin. Ductal epithelial cells are usually absent, but the communication of the

cyst with the duct system results sometimes in the presence of few benign ductal cells. Pseudocyst diagnosis is difficult because it is made by exclusion [1].

In case of serous cystadenoma, the fluid is watery and contains monolayered epithelial sheets and strips of small cuboidal cells. ThinPrep smears typically have a clean background, and the regular cells occur in small clusters (Fig. 4). They have central nuclei and sparse, glycogen-rich cytoplasm (periodic acid-Schiff positive and diastase sensitive) without vacuolization (Fig. 5). Sometimes, nuclear grooves are present [1].

In case of mucinous cystic tumors, clear, thick viscous consistency fluid is noted. Extracellular mucin is present, which must be distinguished from amorphous background material and necrotic debris. This material shows abundant pools and strands of background substance, almost obscuring the epithelial cells, and which gives a deep purplish color with Papanicolaou and Diff-Quick stainings. At higher magnification, this material has the fine parallel fibrillary structure of mucin. Background mucin is evident even on ThinPrep smears [1, 22]. The smears are cellular, made of a monomorphic population of goblet cells, or tall columnar cells, with a normal nuclear-to-cytoplasmic ratio, arranged in isolated cells, sheets and tridimensional clusters (Fig. 6). The cytoplasm shows varying degrees of mucus secretion. Intracellular mucin displaces nuclei peripherally against the cytoplasmic borders. Strong periodic acid-Schiff and alcian blue positivity are observed. Nuclear grooves and small nucleoli are present. Because the cyst lining is typically heterogeneous, malignancy cannot be excluded. The ovarian-like stroma that characterizes this tumor on surgical resection is not present on FNA. Caution should also be exercised when interpreting mucinous epithelium in an aspirate obtained by EUS, because gastrointestinal epithelium and background mucin may represent contaminant.

In case of intraductal papillary mucinous neoplasms, very thick and abundant accumulation of mucinous fluid (Fig. 7), prominent papillae or papillotubular aggregates or clusters of columnar cells, with mild or severe atypia are observed. The benign component shows nuclei evenly spaced with peripheral palisade [38]. The malignant component shows nuclear crowding and overlapping (Fig. 8). The tumor cells of intraductal papillary mucinous tumor are similar to the epithelium of mucinous cystic tumors. They cannot be differentiated each other only by cytology or microbiopsy.

CONCLUSION

Further to our current experience, the following procedures are recommended:

— information on the patient's clinical history, biological, radiological and endoscopic findings have to be collected;

— information on the size of the lesion, its location, the number and conditions of the punctions has to be provided with the samples;

— a sufficient quantity of fluid should be aspirated for biochemical analysis and cytological diagnosis;

— combined cytology (conventional and ThinPrep smears), and microbiopsy if possible, must be performed [1, 22-23, 39].

Moreover, experienced EUS operators should perform aspiration. FNA cytology and histology provide easy and definitive evidence of diagnosis for mucinous cystadenocarcinoma, necrotic ductal carcinoma, acinar cell carcinoma, endocrine neoplasms, and solid pseudopapillary tumor. Then, the major role of FNA is to differentiate mucinous from nonmucinous pancreatic cyst. In some cases, serous cystadenomas may be diagnosed, especially when using the ThinPrep[®]

processor which allows to concentrate scant samples and provides a monolayered cell population with a cleaner background. Pseudocysts diagnosis is only made by exclusion. Ancillary techniques such as overexpression of Muc-1, p53, detection of mutations of the oncogene Ki-Ras and measurement of telomerase activity may be a useful diagnostic tool in the differentiation of malignant pancreatic cystic tumors from benign neoplasms and pseudocysts [40-45].

In summary, cystic pancreatic lesions can be diagnosed with a high level of confidence through a careful physical examination, thorough radiological studies, and proper handling and preparation of the aspirated liquid sample.