



**HAL**  
open science

# Développement de techniques d'imageries pour le diagnostic et le pronostic des tumeurs du rein

Alexandre Ingels

► **To cite this version:**

Alexandre Ingels. Développement de techniques d'imageries pour le diagnostic et le pronostic des tumeurs du rein. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS451 . tel-02153074

**HAL Id: tel-02153074**

**<https://theses.hal.science/tel-02153074>**

Submitted on 12 Jun 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# DEVELOPPEMENT DE TECHNIQUES D'IMAGERIES POUR LE DIAGNOSTIC ET LE PRONOSTIC DES TUMEURS DU REIN

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée au laboratoire d'Imagerie par Résonance Magnétique  
Médicale et Multi-Modalités

École doctorale n°582 de Cancérologie  
Discipline sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre, le 11 Décembre 2018,  
Par Alexandre INGELS

**Alexandre INGELS**

Composition du Jury :

Jean-Yves SCOAZEC PU-PH, Institut Gustave Roussy	Président
Pierre BIGOT PU-PH, CHU Angers	Rapporteur
Jean-Christophe BERNHARD PU-PH, CHU Bordeaux	Rapporteur
Eric BARRET Institut Mutualiste Montsouris	Examineur
Nathalie LASSAU PU-PH Institut Gustave Roussy (IR4M)	Directrice
Jean-Jacques PATARD PU-PH, CH de Mont-de-Marsan	Directeur

NNT: 2018SACL451

Thèse de doctorat



## REMERCIEMENTS

Beaucoup de personnes à remercier au bout de tant d'années d'études, de travail clinique et de recherche...

- A Nathalie Lassau, pour ta confiance, et ta patience. Pour m'avoir permis de venir à bout de ce travail de longue haleine !
- A Jean-Jacques Patard, pour votre soutien et votre confiance depuis maintenant de nombreuses années. J'ai toujours apprécié votre hauteur d'esprit. Je suis heureux de vous voir épanoui dans votre nouvelle vie et espère avoir encore souvent l'occasion de vous retrouver.
- Aux membres du Jury Jean-Yves Scoazec, Pierre Bigot et Jean-Christophe Bernhard : merci pour votre expertise et le temps passé à la lecture et l'analyse critique de ce travail. Merci de vous être réuni pour former mon jury en acceptant les compromis dans vos agendas.
- A l'équipe du laboratoire IR4M sans qui les travaux auraient été impossible
- A Ingrid Leguerney sans qui aucun travail n'aurait été possible. Tu as été particulièrement investie dans nos projets, nos manips et leur analyse. Merci pour ta rigueur et ton dévouement et merci pour la correction des fautes d'orthographe de ce manuscrit !
- A Eric Barret, nous avons déjà eu l'occasion d'échanger nos bons sentiments dans un moment plus difficile mais puisque l'occasion se représente, je réitère l'expression de ma gratitude et de mon admiration pour ton énergie, ton amitié, ton soutien comme collègue et tes grandes qualités de chirurgiens. Je viens d'apprendre que la route est parfois plus sinueuse que prévue, j'espère que cela permettra un jour à nos chemins de se recroiser.
- A Francois Rozet et Marc Galiano deux supers collègues avec qui j'aurais aimé travailler plus longtemps mais je pense heureusement partager encore beaucoup de bons moments ensemble en sillonnant les routes de Vallée de Chevreuse, de Corse, du Cantal et ailleurs en vélo...
- A Jacques Irani et Yacine Hammoudi, mes deux chefs de service de mon clinicat. Merci mille fois pour votre bienveillance, votre confiance, votre assistance et votre gentillesse. Mon passage à Bicêtre restera un souvenir merveilleux grâce à vous et...
- A Julien Draï, Thomas Bessedé, Geraldine Pignot, Steeve Benadiba, Cecile Verrier, Sebastien Kozal mes acolytes dans les péripéties des gardes, des premiers interventions difficiles, des consultations à rallonge entrecoupées d'urgence ou de manipulations au laboratoire
- A Vincent Izard pour toute l'amitié témoignée depuis mon passage comme interne à Bicêtre jusqu'à ces dernières semaines. Un esprit qui tourne vite, parfois difficile à suivre mais toujours plein de bienveillance et de confraternité.

- A tous mes internes, pour leur aide, parfois leur patience, j'ai certainement appris au moins autant de vous que ce que j'ai pu vous transmettre.
- A Alexandre de la Taille et l'équipe de Mondor pour le nouvel accueil. Je rejoins l'équipe plein d'enthousiasme pour ces nouvelles aventures riches en perspectives.
- A tous les amis ici et là, la liste est longue et je ne veux pas en oublier, je rends donc hommage à l'amitié en général et chacun saura s'y retrouver d'après nos moments partagés
- A mes parents Hélène et Jean, l'éducation est sans doute notre plus précieux héritage, aujourd'hui que j'en ai la responsabilité, je ressens toute la gratitude pour les valeurs que vous nous avez transmises : votre honnêteté, votre générosité, votre simplicité seront toujours pour moi un modèle pour avancer dans la vie. Malgré le temps, la houle et parfois même quelques tempêtes votre couple résiste et donne aujourd'hui l'exemple d'une belle sérénité. Longue vie et bonheur à tous les deux, vous le méritez !
- A mes sœurs Isabelle, Véronique, Florence et mon frère Guillaume, à nos liens qui nous unissent, à nos différences qui nous enrichissent. Les joies, les drames, les moments de communions et les désunions. A nos caractères entiers qui se frottent et parfois s'entrechoquent, à tout ce qui nous construit.
- A mes nièces et neveux, pleins de petites têtes qui grandissent et m'émerveille toujours. Je vous souhaite pleins de réussites et probablement pour certains d'écrire prochainement à leur tour quelques lignes de remerciements dans leur ouvrage.
- A ma femme Sarah, mon alter ego, ma confidente, mon soutien, ma meilleure amie. On s'est retrouvée par hasard sur notre pallier et après quelques années je m'émerveille chaque jour du bonheur de parcourir notre route ensemble. Merci pour ton talent, ta douceur, ta gentillesse désintéressée, ton enthousiasme. Avec toi, tout l'avenir s'annonce avec optimisme.
- A mon fils Aristide, quelques pleurs, quelques nuits difficiles mais un sourire et des premiers pas qui m'expliquent le sens de la vie et la direction dans laquelle la regarder. Le monde où tu démarres est encore pleins d'inconnus, puisse tu t'émerveiller à chaque nouvelle découverte, à chaque nouvelle rencontre. Dévore l'existence à chaque instant en ne renonçant jamais devant le scepticisme et les difficultés. Apprend à regarder chaque objet sous toutes ses perspectives, la vérité et le bonheur se trouvent parfois dans des petits recoins inattendus.
- A la famille qui continue de grandir...

... Et tout ceux que j'oublie ici (promis ce n'est pas toujours volontaire)

## **TABLE DES MATIERES:**

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>I. LES TUMEURS RENALES</b>	<b>7</b>
A. <i>CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE DU CARCINOME A CELLULES RENALES</i>	7
B. <i>EVOLUTION DE L'INCIDENCE DES PETITES TUMEURS RENALES ET CONSEQUENCES SUR LA PRISE EN CHARGE DU CANCER DU REIN.</i>	9
C. <i>EVOLUTION DE LA PRISE EN CHARGE DES CANCERS DU REIN METASTATIQUES</i>	10
<b>II. LES OUTILS DIAGNOSTIQUES ET PRONOSTIQUES ACTUELS DANS LES CANCERS DU REIN</b>	<b>12</b>
A. <i>APPORT DE L'IMAGERIE</i>	12
B. <i>APPORT DE LA BIOPSIE RENALE</i>	13
<b>III. LES NOUVEAUX OUTILS DIAGNOSTIQUES</b>	<b>14</b>
A. <i>LA TOMOGRAPHIE EN COHERENCE OPTIQUE</i>	14
B. <i>L'IMAGERIE MOLECULAIRE</i>	15
<b>IV. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>17</b>
<b><u>CHAPITRE 1 : QUELLE PLACE POUR LES BIOPSIES PRE-THERAPEUTIQUES DANS LE CADRE DES PETITES TUMEURS RENALES ?</u></b>	<b>20</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>20</b>
<b>II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS</b>	<b>20</b>
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>21</b>
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>22</b>
A. <i>DIAGNOSTIC DE MALIGNITE</i>	25
B. <i>DETERMINATION DU SOUS-TYPE HISTOLOGIQUE</i>	25
C. <i>GRADE DE FÜHRMAN</i>	25
D. <i>PRISE EN CHARGE DES TUMEURS</i>	26
E. <i>SCORE RENAL</i>	26
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>27</b>
<b>VI. CONCLUSION</b>	<b>32</b>
<b><u>CHAPITRE 2 : LA TOMOGRAPHIE EN COHERENCE OPTIQUE PAR PONCTION PERCUTANEE POUR DIFFERENCIER LES MASSES RENALES : COHORTE PILOTE</u></b>	<b>33</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>33</b>
<b>II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS</b>	<b>34</b>
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>34</b>
A. <i>CONSIDERATIONS ETHIQUES ET POPULATION</i>	34
B. <i>PROTOCOLE</i>	35
C. <i>ANALYSE OCT</i>	37
D. <i>ANALYSE HISTOLOGIQUE</i>	39
E. <i>STATISTIQUES</i>	40
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>40</b>
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>45</b>
<b>VI. CONCLUSION</b>	<b>47</b>
<b><u>CHAPITRE 3 : RECHERCHE DE MARQUEURS CIBLES POUR UNE APPLICATION EN IMAGERIE MOLECULAIRE</u></b>	<b>48</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>48</b>

<b>II. HYPOTHESE ET OBJECTIF</b>	<b>48</b>	
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>49</b>	
A. <i>PATIENTS ET METHODES</i>		49
B. <i>IMMUNOHISTOCHEMIE</i>		51
C. <i>ANALYSE D'IMAGE</i>		51
D. <i>STATISTIQUES</i>		54
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>55</b>	
A. <i>RESULTATS CLINIQUES DE LA COHORTE</i>		55
B. <i>FACTEURS PREDICTIFS DES RESULTATS CLINIQUES</i>		57
C. <i>CORRELATION ET CALIBRATION</i>		59
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>59</b>	
<b>VI. CONCLUSION</b>	<b>62</b>	
<b>CHAPITRE 4 : EVALUATION DE L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE MOLECULAIRE POUR PREDIRE LA REPONSE AUX THERAPIES CIBLEES DANS LE CANCER DU REIN</b>	<b>63</b>	
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>63</b>	
<b>II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS</b>	<b>64</b>	
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>64</b>	
A. <i>SOURIS ET MODELE TUMORAL</i>		65
B. <i>TRAITEMENT</i>		65
C. <i>PROTOCOLES D'IMAGERIE</i>		65
D. <i>IMMUNOHISTOCHEMIE</i>		70
E. <i>ANALYSES STATISTIQUES</i>		71
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>71</b>	
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>77</b>	
<b>VI. CONCLUSION</b>	<b>79</b>	
<b>CHAPITRE 5 : ECHOGRAPHIE MOLECULAIRE DANS LE CANCER DU REIN – SURVEILLANCE D'UN TRAITEMENT CIBLANT LE VEGFR PAR DES MICROBULLES CIBLEES DANS UN MODELE PRECLINIQUE MURIN DE XENOGREFFES ISSUES DE PATIENTS</b>	<b>81</b>	
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>81</b>	
<b>II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS</b>	<b>82</b>	
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>82</b>	
A. <i>ANIMAUX</i>		82
B. <i>MODELE DE CARCINOME RENAL PAR XENOGREFE DERIVEE DE PATIENTS (PdX)</i>		82
C. <i>PROTOCOLE DE TRAITEMENT</i>		83
D. <i>ECHOGRAPHIE MOLECULAIRE ET QUANTIFICATION DES MARQUEURS</i>		83
E. <i>ANALYSES STATISTIQUES</i>		86
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>86</b>	
A. <i>COHORTES ET CROISSANCE TUMORALE</i>		86
B. <i>REPONSE AU SUNITINIB</i>		89
C. <i>ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES MARQUEURS</i>		90
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>95</b>	
<b>VI. CONCLUSION</b>	<b>99</b>	
<b>CONCLUSION</b>	<b>100</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>102</b>	

# INTRODUCTION

## I. LES TUMEURS RENALES

### A. CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE DU CARCINOME A CELLULES RENALES

En France, le cancer du rein se situe au septième rang des cancers avec 11573 nouveaux cas estimés en 2012. L'incidence est plus forte chez l'homme (67%). Il représente environ 3% des cancers de l'adulte et l'âge moyen du diagnostic est de 65 ans.

Il se situe au neuvième rang des décès par cancer (3957 décès en 2012).

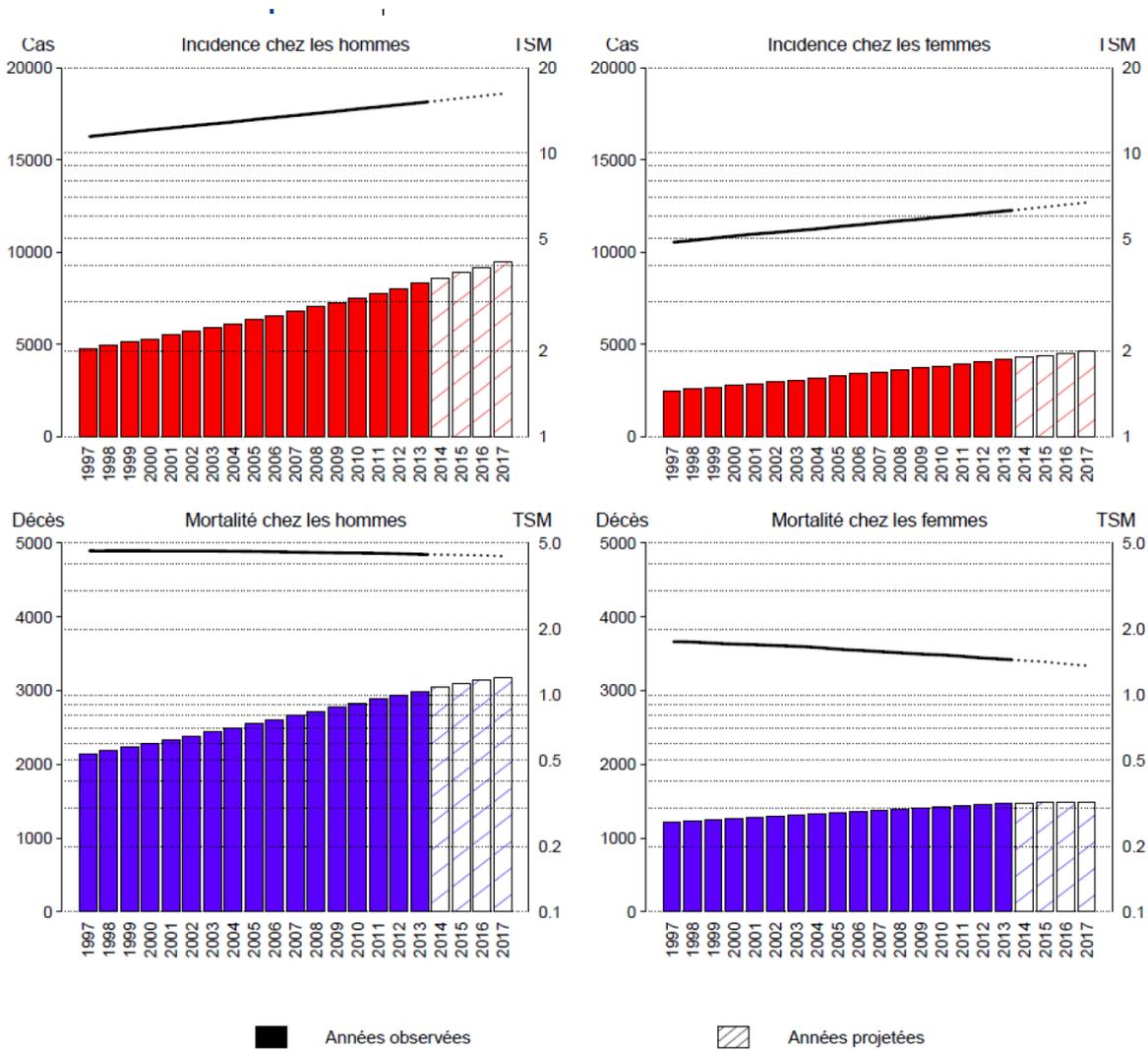
L'incidence du cancer du rein a fortement augmenté au cours des vingt dernières années. Cette augmentation est principalement liée à l'accroissement des petites tumeurs rénales de découverte fortuite avec le développement et la systématisation des examens d'imagerie abdominale.

En revanche le taux de mortalité standardisé est relativement stable (figure 1).

La survie relative à 5 ans est globalement de 63%. Elle est de 90% dans le cas des stades localisés (56% des cas).

Source : (1)

Figure 1 : Évolution du nombre de nouveaux cas et de décès (barres) et des taux standardisés monde correspondants (TSM) (courbes, échelle logarithmique) chez l'homme et chez la femme de 1997 à 2017 en France métropolitaine



## **B. EVOLUTION DE L'INCIDENCE DES PETITES TUMEURS RENALES ET CONSEQUENCES SUR LA PRISE EN CHARGE DU CANCER DU REIN.**

La banalisation de l'utilisation des techniques d'imageries en pratique clinique au cours des dernières décennies a entraîné une augmentation importante de l'incidence du cancer du rein. Cela s'explique par une augmentation des petites tumeurs rénales (lésions  $\leq 4$ cm) découvertes fortuites. Il semblerait que ces petites tumeurs rénales représentent aujourd'hui 48-66% des carcinomes rénaux diagnostiqués (2).

Cette évolution soulève de nouveaux défis. En effet, la prise en charge d'une tumeur rénale reposait autrefois essentiellement sur l'extirpation chirurgicale lorsque les conditions locales le permettaient. Cette prise en charge est remise en cause pour deux raisons : d'une part 20-30% de ces petites tumeurs rénales sont bénignes (3,4), d'autre part, même pour les tumeurs malignes, une proportion significative semblerait avoir une évolution indolente. En effet, des études récentes ont rapporté des résultats carcinologiques équivalents à court et moyen terme lorsque ces tumeurs étaient traitées chirurgicalement, par traitement ablatif ou par surveillance active (5).

Cette recomposition du paysage des tumeurs rénales avec aujourd'hui une part importante des petites tumeurs rénales remet en cause le paradigme d'une prise en charge exclusivement chirurgicale.

Effectivement, il est indispensable de pouvoir établir un diagnostic fiable et précis lors de la découverte d'une petite tumeur rénale afin de pouvoir différencier une tumeur bénigne ne nécessitant ni suivi ni traitement spécifique, une tumeur maligne indolente candidate à une surveillance active ou une tumeur potentiellement agressive justifiant un traitement spécifique ablatif ou chirurgical.

A l'heure actuelle les outils diagnostiques restent limités et reposent essentiellement sur la biopsie rénale.

## C. EVOLUTION DE LA PRISE EN CHARGE DES CANCERS DU REIN

### METASTATIQUES

Sur l'autre versant de la maladie, la prise en charge des cancers du rein métastatiques s'est également fortement améliorée au cours de la dernière décennie.

Le carcinome rénal est un cancer chimio et radio-résistant. Pendant longtemps, les possibilités de traitement au stade métastatique étaient limitées à l'interféron alpha associé à une néphrectomie de cytoréduction. Les résultats étaient modestes avec un faible taux de patients répondeurs.

En 2007, le premier essai validant l'efficacité du Sunitinib, un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant la néo-angiogénèse, pour les carcinomes rénaux à cellules claires marque l'avènement des thérapies ciblées avec une nette amélioration de la survie des patients métastatiques par rapport à l'interféron alpha (6). Les inhibiteurs de la voie m-TOR (mammalian target of rapamycin) ont élargi le spectre des traitements systémiques du cancer du rein avec la démonstration de la supériorité du Temsirolimus dans les situations métastatiques de mauvais pronostics (7) ou de l'Everolimus en deuxième ligne des traitements ciblant le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) (8).

Plus récemment, les immunothérapies de nouvelles générations avec les anti-CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) et anti-PD1 (Programmed cell Death 1) ont élargi encore le champ des traitements possibles pour les patients en situation métastatique. En 2015, l'étude Checkmate 025 a démontré la supériorité du Nivolumab, anti-PD1, sur l'Everolimus en deuxième ligne des traitements anti-VEGFR (9). Tout récemment, l'étude Checkmate 214 a démontré une supériorité de l'association Nivolumab-Ipilimumab (anti-CTLA4) sur le Sunitinib en première ligne pour les carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques de pronostics intermédiaires ou péjoratifs (10). Le défi soulevé par cette diversification de l'arsenal thérapeutique disponible est le suivi des patients et plus particulièrement la détection rapide des progressions. Le suivi des patients métastatiques se fait actuellement par imagerie conventionnelle (scanner) sur le suivi morphologique de la taille des métastases selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria

In Solid Tumors). Le problème est que la réponse à ces nouvelles thérapies ne peut être couplée de manière linéaire à la taille des tumeurs. En effet, la diminution ou l'augmentation de taille peut-être différée ou une masse tumorale composée de fibrose ou de kyste peut garder une taille significative sans cellules tumorales actives.

Ces traitements présentent des toxicités ainsi que des coûts élevés pour le système de soins. La détection retardée de progression sous un traitement expose donc le patient à une perte de chance par le retard de mise en place d'une nouvelle ligne thérapeutique potentiellement plus efficace et par l'exposition à des effets secondaires inutiles. Elle expose également le système de soin à des coûts inutiles par la prolongation d'un traitement coûteux inefficace.

Le développement de marqueurs de réponse précoces à ces nouveaux traitements est donc primordial pour améliorer la prise en charge des patients présentant des cancers du rein métastatiques.

## II. LES OUTILS DIAGNOSTIQUES ET PRONOSTIQUES

### ACTUELS DANS LES CANCERS DU REIN

Actuellement, l'évaluation clinique joue un rôle limité dans le diagnostic du cancer du rein, certains signes non spécifiques doivent en revanche déclencher des examens radiologiques, notamment la palpation d'une masse abdominale, la présence d'adénopathies cervicales ou d'un varicocèle ou d'œdème des membres inférieurs pouvant évoquer un envahissement veineux (11). De même, les examens biologiques ne jouent pas de rôle diagnostique à proprement parler. Cependant, lorsque le diagnostic de cancer métastatique est posé, certains marqueurs biologiques tels que le taux d'hémoglobine, la calcémie corrigée, le taux de plaquettes et de neutrophiles sont associés au pronostic de la maladie (12). L'évaluation diagnostique et pronostique initiale repose donc actuellement essentiellement sur l'imagerie et la biopsie rénale.

#### A. APPORT DE L'IMAGERIE

La plupart des tumeurs rénales sont diagnostiquées lors d'une échographie abdominale ou d'un scanner prescrits pour d'autre cause médicale (découverte fortuite) (13). Ces examens permettent tout d'abord de différencier les tumeurs solides des kystes.

La présence d'un rehaussement après injection de produit de contraste est un élément important dans l'évaluation des tumeurs solides, elle permet d'orienter vers une origine maligne probable de cette tumeur (14).

Le scanner ou l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) sont les examens de base pour l'évaluation des tumeurs rénales. Ils nécessitent une évaluation avant et après injection de produit de contraste afin de pouvoir apprécier le rehaussement et donc la vascularisation de la tumeur. Ces examens sont des étapes essentielles pour le diagnostic de carcinome rénal mais ils ne permettent pas de distinguer des tumeurs malignes de tumeurs bénignes tels que l'angiomyolipome non

graisseux ou l'oncocytome (11).

Ces examens permettent d'apporter des éléments diagnostiques et pronostiques importants dans le cadre de carcinomes rénaux :

- Présence de métastases
- Présence d'adénopathies loco-régionales
- Extension locale de la tumeur, envahissement veineux, atteinte des surrénales et autres organes de proximité

Dans le cadre d'un traitement systémique, le scanner jouera un rôle fondamental pour l'évaluation de la réponse au traitement en mesurant l'évolution des lésions cibles suite à l'instauration du traitement (critère RECIST).

L'apport de l'imagerie est donc important, cependant comme nous l'avons signalé, son rôle ne permet pas toujours de différencier une petite tumeur maligne d'une tumeur bénigne. Par ailleurs, dans le cadre du stade métastatique, l'évolution de la morphologie de la lésion cible n'est pas toujours corrélée à la réponse réelle au traitement systémique (thérapie ciblée ou immunothérapie).

Le développement des nouvelles techniques permettant d'une part de différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes dans le cadre des petites tumeurs rénales et, d'autre part, de décrire précocement la réponse aux traitements systémiques pour les tumeurs métastatiques est donc un axe de recherche présentant potentiellement des applications cliniques pertinentes.

## **B. APPORT DE LA BIOPSIE RENALE**

Les biopsies percutanées des tumeurs rénales peuvent permettre de déterminer la nature histologique des tumeurs rénales dont la malignité ne peut être affirmée sur les examens radiologiques. Les recommandations actuelles imposent la réalisation d'une biopsie lorsque il est envisagé une surveillance active, un traitement ablatif ou un traitement systémique dans le cadre d'une maladie métastatique (11).

Bien que les biopsies soient très efficaces pour différencier une tumeur maligne d'une tumeur

bénigne, ou pour préciser la nature histologique d'une tumeur, elles présentent toutefois des limites. Dans de nombreux cas (0-22,6% (11)), les biopsies ne sont pas contributives, elles ne permettent donc pas de conclure sur la malignité de la tumeur ce qui impose soit la réalisation d'une nouvelle biopsie soit la décision d'une extirpation chirurgicale. Par ailleurs, les biopsies sont beaucoup moins performantes pour définir le grade histologique des tumeurs, une récente étude rapporte une précision de 62,5% (15) ce qui est peu fiable. Or, le grade histologique est un élément pronostique important pouvant guider le choix de la prise en charge entre une surveillance ou un traitement curateur (chirurgical ou ablatif).

Du fait de ces deux limites, les recommandations restent imprécises sur la place des biopsies des petites tumeurs rénales. En effet, contrairement à la plupart des tumeurs solides, leur utilisation n'est pas recommandée systématiquement en dehors des indications précitées (11).

La place des biopsies dans les petites tumeurs rénales reste donc à définir afin de trouver la bonne prise en charge entre une biopsie systématique devant chaque découverte de petite tumeur rénale ou le choix d'une extirpation chirurgicale systématique sans biopsie, lorsque cela est possible. Par ailleurs, il paraît intéressant de développer de nouveaux outils diagnostiques afin de pallier les limites de la biopsie, à savoir, un taux significatif de biopsies non contributives et une faible fiabilité pour prédire le pronostic d'une tumeur à travers l'évaluation du grade tumoral.

### **III. LES NOUVEAUX OUTILS DIAGNOSTIQUES**

#### **A. LA TOMOGRAPHIE EN COHERENCE OPTIQUE**

La tomographie en cohérence optique est une technique d'imagerie qui utilise une onde lumineuse pour capturer des images tridimensionnelles d'un matériau qui diffuse la lumière. Elle présente l'avantage d'une très grande définition, de l'ordre du micromètre et d'une visualisation en temps réel du tissu à l'échelle microscopique. Elle utilise habituellement une lumière infrarouge proche du fait d'une faible absorption des tissus biologiques à ces fréquences. La pénétration est la principale

limite de cette technique avec une profondeur d'analyse à environ 1mm.

Cette technique est déjà largement diffusée en pratique clinique ophtalmologique pour l'imagerie de la rétine et plus récemment en cardiologie pour l'imagerie intravasculaire des maladies coronariennes.

Plusieurs études ont évalué l'apport de cette technique d'imagerie en oncologie notamment pour le carcinome bronchique (16), les carcinomes cutanés (17). Une étude de faisabilité a démontré la possibilité d'appliquer cette méthode par voie percutanée dans le diagnostic des tumeurs rénales (18).

Cette technique pourrait permettre de par son retour d'information instantané de pallier le problème des biopsies non contributives en indiquant immédiatement lorsque le point de ponction ne se trouve pas dans le milieu tumoral (graisse péri-rénale, muscle ou parenchyme rénal sain).

## **B. L'IMAGERIE MOLECULAIRE**

L'imagerie moléculaire est une technique d'imagerie récente consistant à coupler un traceur à une molécule pouvant interagir avec une cible afin de mettre en évidence des interactions moléculaires et cellulaires au sein d'un organisme vivant.

Différentes modalités d'imagerie peuvent être utilisées : imagerie nucléaire avec un traceur radioactif, l'IRM avec un traceur ferromagnétique, les ultrasons avec des microbulles.

Les sondes sont donc l'association du produit de contraste avec la molécule permettant l'interaction avec la cible au sein de l'organisme. Cette molécule peut être une protéine, un composant du métabolisme cellulaire (glucose..) ou un anticorps.

En oncologie, l'imagerie moléculaire permet d'analyser des interactions biochimiques propres au développement tumoral telles que la néo-angiogenèse en ciblant la voie VEGFR. Le suivi de ces interactions pourrait permettre le suivi de modifications précoces du métabolisme tumoral suite à l'instauration tumorale et donc potentiellement d'évaluer la réponse à un traitement avant les modifications morphologiques de la tumeur liée à la nécrose tissulaire secondaire.

Par ailleurs, l'imagerie moléculaire permet d'avoir une visualisation des mécanismes moléculaires étudiés sur l'ensemble de la tumeur. Cet avantage est particulièrement pertinent pour les tumeurs hautement hétérogènes telles que les tumeurs du rein (19).

Les techniques d'imagerie moléculaire, par une méthode non invasive, pourraient permettre d'une part de différencier les petites tumeurs malignes des petites tumeurs bénignes et, d'autre part, de suivre de manière précoce la réponse aux traitements systémiques dans les cancers métastatiques, plus particulièrement dans les thérapies ciblées visant la voie VEGFR. Le développement de ces techniques nécessite de sélectionner des sondes (anticorps) pertinentes à associer au produit de contraste radiologique.

## IV. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE

Les objectifs de la thèse sont ciblés sur le diagnostic des tumeurs rénales.

Dans une première partie, nous nous intéressons aux petites tumeurs rénales à savoir définir la place la plus pertinente des biopsies de tumeurs rénales dans le cas de petites tumeurs rénales pour lesquelles un traitement chirurgical est envisagé (chapitre 1) puis l'intérêt potentiel de la tomographie en cohérence optique pour caractériser les petites tumeurs rénales (chapitre 2).

La seconde partie porte sur l'imagerie moléculaire avec tout d'abord une étude immunohistochimique sur une cohorte de patients traités par néphrectomie afin de rechercher des marqueurs potentiels prédictifs de survie dans le cancer du rein à cellules claires (chapitre 3). Dans le chapitre 4, nous comparerons dans une étude préclinique l'intérêt de l'échographie de contraste et de l'IRM moléculaire pour prédire la réponse aux thérapies ciblées dans le cancer du rein. Enfin dans le chapitre 5, nous évaluerons de manière longitudinale deux traceurs en échographie moléculaire le FSHR et VEGFR1 pour prédire la réponse au Sunitinib dans le cancer du rein.

- Chapitre 1 : QUELLE PLACE POUR LES BIOPSIES PRE-THERAPEUTIQUE DANS LE CADRE DES PETITES TUMEURS RENALES ?
  - **Hypothèse** : bien que non recommandé systématiquement, la biopsie rénale doit avoir une indication rationnelle dans la prise en charge des petites tumeurs rénales pour lesquels un traitement chirurgical peut être envisagé.
  - **Objectif** : Définir à partir d'une cohorte rétrospective de patient, d'une part la fiabilité des biopsies rénales scanno-guidées de petites tumeurs rénales, et d'autre part, l'efficacité de ces biopsies en terme de contribution diagnostique selon les différentes caractéristiques de la tumeur.

- **Chapitre 2 : LA TOMOGRAPHIE EN COHERENCE OPTIQUE PAR PONCTION PERCUTANEE POUR DIIFERENCIER LES MASSES RENALES : COHORTE PILOTE**
  - **Hypothèse :** La tomographie en cohérence optique par voie percutanée peut permettre, grâce aux différentes propriétés optiques tumorales, de différencier les tumeurs malignes des tumeurs bénignes.
  - **Objectif :** Evaluer sur une cohorte prospective la fiabilité des « biopsies optiques » en comparant les données lors de la biopsies avec l’histologie finale tumorale (sur analyse de pièce opératoire ou sur biopsies avant thérapie ablative).
- **Chapitre 3 RECHERCHE DE MARQUEURS CIBLES POUR UNE APPLICATION EN IMAGERIE MOLECULAIRE**
  - **Hypothèse:** L’expression d’un certain nombre de marqueurs rapportés dans la littérature semble avoir un lien avec la survie dans le cancer du rein. La validation de ces marqueurs sur une cohorte indépendante permettrait de définir des sondes d’intérêt pour l’imagerie moléculaire.
  - **Objectif:** analyser sur une cohorte rétrospective de patients opérés de néphrectomie avec un long suivi clinique, l’expression sur le tissu tumoral d’un certains nombres de marqueurs définis à partir des données de la littérature.
- **Chapitre 4 EVALUATION DE L’IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE MOLECULAIRE POUR PREDIRE LA REPONSE AUX THERAPIES CIBLEES DANS LE CANCER DU REIN**
  - **Hypothèse:** Supériorité de l’IRM moléculaire pour prédire la réponse aux agents ciblés dans le cancer du rein par rapport à l’échographie de contraste.
  - **Objectif :** Comparer les méthodes d’imagerie pour prédire la réponse précoce aux thérapies ciblées validées dans le cancer du rein. Nous avons comparé la réponse aux trois agents suivant : sunitinib, bevacizumab et everolimus en utilisant l’échographie de

contraste et l'IRM moléculaire ciblant le  $\alpha\beta3$ , une intégrine de l'endothélium impliquée dans la néo angiogenèse.

- **Chapitre 5** : ECHOGRAPHIE MOLECULAIRE DANS LE CANCER DU REIN – SURVEILLANCE D'UN TRAITEMENT CIBLANT LE VEGFR PAR DES MICROBULLES CIBLEES DANS UN MODELE PRECLINIQUE MURIN DE XENOGREFFES ISSUES DE PATIENTS
  - **Hypothèse**: L'échographie moléculaire ciblant le VEGFR et/ou le FSHR permet de surveiller de manière longitudinale la réponse au Sunitinib.
  - **Objectif** : Comparer l'expression différentielle du signal d'échographie moléculaire en utilisant les sondes FSHR et VEGFR entre un groupe de souris traitée par Sunitinib versus non traité.

# CHAPITRE 1 : QUELLE PLACE POUR LES BIOPSIES PRE- THERAPEUTIQUES DANS LE CADRE DES PETITES TUMEURS RENALES ?

Travaux publiés dans Clinical Genitourinary Cancer (20)

## **I. INTRODUCTION**

Le développement des techniques d'imagerie et de leur utilisation en routine clinique dans l'exploration des douleurs abdominales ou musculo-squelettiques est à l'origine d'une augmentation de l'incidence des tumeurs rénales asymptomatiques de découverte fortuites. Les séries les plus récentes rapportent un taux de tumeurs de découvertes fortuites de 65% parmi les tumeurs rénales solides. Dans ce groupe de tumeurs de découverte fortuite, 38% sont localisées et inférieures à 4cm (21,22). Par ailleurs, 20 à 30% des petites tumeurs rénales (<4cm) sont bénignes (22) alors que 5,2% de ces petites tumeurs rénales sont d'emblée métastatiques (23). Du fait de cette grande variabilité dans la présentation des tableaux cliniques, il semble primordial de pouvoir définir au mieux en pré-thérapeutique la nature maligne d'une petite tumeur rénale ainsi que son sous-type histologique afin de mieux cibler le traitement et le suivi.

Bien que les biopsies semblent la méthode de référence pour définir les caractéristiques tumorales avant traitement, leur usage reste relativement marginal en pratique clinique de routine. Dans une récente analyse d'enquête médicale, seuls 6% des patients traités chirurgicalement d'une tumeur rénale avaient bénéficiés d'une biopsie en préopératoire (24).

## **II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS**

Evaluer à partir d'une expérience mono-centrique, le rendement diagnostique, la précision et le taux

de complications des biopsies rénales scanno-guidées pour les petites tumeurs du rein. Analyser les facteurs prédictifs de biopsies rénales contributives.

### III. MATERIEL ET METHODES

Une requête a été effectuée par la base de données du service d'anatomo-pathologie pour réviser toutes les biopsies rénales scanno-guidées pratiquées entre Janvier 2007 et Décembre 2012. Les patients avaient tous signés une autorisation d'utilisation du tissu prélevé à des fins de recherche et le projet a été validé par le comité éthique de l'Institution. Les critères d'inclusion étaient la présence d'une petite tumeur rénale (<4cm) et un rehaussement du signal sur le scanner après injection de produit de contraste >15 unités Hounsfield. La présence de métastase, un stade >T1a, les techniques de biopsie non scanno-guidées (biopsies sous contrôle écho ou per-opératoire) et les patients ne pouvant pas recevoir d'agent de contraste iodé (insuffisance rénale sévère ou hypersensibilité) étaient les critères d'exclusion. Les données cliniques, d'imagerie et d'anatomo-pathologie étaient étudiées afin de définir les caractéristiques spécifiques à chaque patient : âge, sexe, poids, taille, indice de masse corporelle (IMC), comorbidités, complications dans les 2 mois post-biopsie, prise en charge thérapeutique de la tumeur, caractéristiques scannographiques de la tumeur (latéralité et score RENAL), caractéristiques histologiques (biopsies contributives, caractère malin, sous-type histologique, grade de Fuhrman, nombre de fragments et immunohistochimie). Lorsque la tumeur était traitée chirurgicalement les caractéristiques histologiques de la tumeur étaient comparées avec celles de la biopsie.

Toutes les biopsies étaient pratiquées dans le service de radiologie selon la technique standard, en condition stérile et sous anesthésie locale. Le repérage se faisait sous contrôle scanner. Toutes les biopsies étaient prélevées en utilisant un pistolet co-axial de 18 Gauge automatique.

La biopsie était considérée comme contributive si assez de tissu était prélevé (>1mm), et si la conclusion histologique pouvait au minimum définir s'il s'agissait d'une tumeur maligne ou

bénigne. Elle n'était pas considérée comme contributive si le matériel ne contenait que de la nécrose, du tissu rénal normal, de la fibrose, du contenu séro-hémorragique ou du muscle. Tous les prélèvements étaient fixés puis marqués avec l'hématoxyline et l'éosine. L'immunohistochimie n'était pratiquée qu'en cas de doute sur l'analyse histologique classique ou de possibilité d'une autre tumeur primitive. Les marqueurs immunohistochimiques généralement utilisés étaient la vimentine, CD10, cytokératine 7, cytokératine commune, AMACR et l'antigène de membrane épithéliale. Le choix de ces marqueurs dépendait uniquement du jugement du pathologiste. Les analyses statistiques étaient réalisées avec le logiciel IBM SPSS 22. Un test non paramétrique de Mann-Whitney U était utilisé pour les variables continues et un test du Chi2 pour les variables catégorielles, afin de comparer les groupes entre biopsies contributives et non-contributives. Une analyse transversale de plusieurs variables indépendantes était réalisée avec une régression binaire logistique pour chercher les facteurs prédictifs de biopsies contributives.

## IV. RESULTATS

Cent dix-neuf patients ont eu des biopsies rénales pour tumeur sur cette période. Quarante patients ont été exclus de l'analyse: stade métastatique (n=11), taille tumorale >4cm (n=2) ou du fait de techniques non scanno-guidées (n=27). Soixante dix-neuf procédures de biopsies ont été analysées. Les caractéristiques des patients et des tumeurs sont résumées dans le tableau 1. Aucune complication majeure n'a été rapportée dans cette série (Clavien 3-5). Deux (2.5%) complications de stade de Clavien 2 ont été rapportées et gérées sans hospitalisation : une douleur lombaire associée à de la fièvre et un rétention aigüe d'urine.

Sur les 79 biopsies, 70 (88.6%) sont contributives et 9 (11.4%) non contributives. L'analyse histologique comportait une étude immunohistochimique dans 56 (70.9%) cas décrits dans le tableau 2. Quarante-sept (67.1%) tumeurs sur les 70 biopsies contributives se sont avérées être malignes et 23 (32.9%) bénignes. Le grade de Fühman parmi les tumeurs malignes se répartissait ainsi : grade II 32 (68.1%), grade III 7 (14.9%) et non évaluable du fait de matériel insuffisant dans

8 (17.0%) cas. Vingt-trois (32.9%) tumeurs étaient bénignes : 14 (20.0%) oncocytomes, 5 (7.1%) angiomyolipomes, 1 (1.4%) adénome kystique, 1 (1.4%) tuberculose, 1 (1.4%) néphrite interstitielle, 1 (1.4%) tissu cicatriciel.

Vingt-neuf patients ont été traités chirurgicalement, permettant de comparer les données des biopsies avec celles de la pièce définitive. Deux des biopsies étaient non contributives, après extirpation chirurgicale, il s'agissait d'un carcinome à cellule claire et d'un carcinome papillaire. Au final, 27 biopsies ont été comparées avec les pièces chirurgicales définitives.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et radiologiques de la population étudiée (n=79) et des tumeurs

Characteristic	Value
<b>Gender</b>	
Male	54 (68%)
Female	25 (32%)
<b>Age at Diagnosis (years)</b>	
Median	67.2
Quartile 25-75	60.8-75.5
<b>Body Mass Index (kg/m<sup>2</sup>)</b>	
Median	26.7
Quartile 25-75	24.2-29.4
<b>Tumor Side</b>	
Left	36 (46%)
Right	43 (54%)
<b>Tumor Size (mm)</b>	
Median	25
Quartile 25-75	18.5-32
Unknown	
<b>Exophytic Properties</b>	
50% or more	36 (46%)
Less than 50%	16 (20%)
Entirely endophytic	24 (30%)
Unknown	3 (4%)
<b>Distance Tumor-Collecting System/Sinus</b>	
≥ 7 mm	37 (47%)
Between 4 and 7 mm	10 (13%)
≤ 4 mm	27 (34%)
Unknown	5 (6%)
<b>Anterior/Posterior Location</b>	
Anterior	18 (24%)
Posterior	47 (59%)
Undetermined	9 (11%)
Unknown	5 (6%)
<b>Location Relative to Polar Lines</b>	
Outside polar lines	21 (27%)
Crosses polar lines	10 (13%)
> 50% across or crosses axial midline	43 (54%)
Unknown	5 (6%)
<b>RENAL Nephrometry Score</b>	
Low (4-6)	34 (46%)
Moderate (7-9)	29 (39%)
High (10-12)	9 (15%)

**Tableau 2 :** Expression des marqueurs pour les 56 tumeurs nécessitant un marquage par immunohistochimie

Marker	Clear Cell (n = 23)	Papillary (n = 8)	Chromophobe (n = 10)	Oncocytoma (n = 12)	Angiomyolipoma (n = 1)	Undifferentiated (n = 2)
CD10	14/14 (100%)	4/4 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	NT	NT
Vimentin	21/21 (100%)	8/8 (100%)	0/7 (100%)	0/7 (0%)	NT	2/2 (100%)
CK7	0/22 (0%)	8/8 (100%)	7/8 (88%)	2/12 (17%)	NT	0/1 (0%)
CKc	21/21 (100%)	1/1 (100%)	9/9 (100%)	11/11 (100%)	NT	2/2 (100%)
EMA	8/8 (100%)	6/6 (100%)	5/5 (100%)	8/8 (100%)	NT	NT
P-504S	1/1 (100%)	5/5 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	NT	NT
Smooth muscle actin	NT	NT	NT	NT	1/1 (100%)	NT
HMB45	NT	NT	NT	NT	1/1 (100%)	NT

Abbreviations: CK = cytokeratin; CKc = common cytokeratin; EMA = epithelial membrane antigen; HMB = human melanoma black; NT = not tested; SMA = smooth muscle actin.  
<sup>a</sup>Results reported for each biopsy-based diagnosis.

## A. DIAGNOSTIC DE MALIGNITE

Le pool de biopsies comportait 25 tumeurs malignes et 2 tumeurs bénignes alors que les pièces définitives comprenaient 24 tumeurs malignes et 3 tumeurs bénignes. En effet, une tumeur diagnostiquée comme carcinome chromophobe a finalement été reclassée en oncocytome après analyse complète de la pièce de néphrectomie partielle. La sensibilité, spécificité et précision des biopsies étaient donc respectivement de 100%, 67% et 96%.

## B. DETERMINATION DU SOUS-TYPE HISTOLOGIQUE

Sur les 27 tumeurs, 25 (93%) correspondaient au sous-type histologique définitif. En plus du reclassement du carcinome chromophobe en oncocytome, une tumeur initialement classée comme carcinome à cellule claire sur biopsie fut reclassée en carcinome papillaire.

## C. GRADE DE FÜHRMAN

Seize tumeurs malignes furent évaluées selon le grading de Führman à partir du matériel de biopsie : 13 grade II et 3 grade III. Trois (12%) tumeurs furent reclassées de II à III.

## D. PRISE EN CHARGE DES TUMEURS

Parmi les 79 patients, 52 (67.1%) reçurent un traitement curatif, 24 (30.4%) furent prise en charge par surveillance et 2 (2/5%) perdus de vue. Le groupe traité comprenait 44 (83.0%) carcinomes à cellules claires, 2 (3.8%) oncocytomes et 7 (3.2%) biopsies non contributives.

Les choix thérapeutiques se décomposait ainsi : 38 (71.7%) traitements chirurgicaux dont 25 (47.1%) néphrectomies partielles et 11 (20.7%) néphrectomies élargies, 15 (28.3%) traitements ablatifs par cryothérapie.

## E. SCORE RENAL

Les données scanner des tumeurs étaient accessibles dans 74 cas. Pour 5 patients, le scanner diagnostique injecté n'était plus accessible dans la base de donnée et le scanner non injecté per-biopsie ne permettait pas de définir le score RENAL. Les caractéristiques néphrométrique de la population, notamment la taille, le caractère exophytique, la proximité des sinus, la localisation antérieure ou postérieure, la topographie par rapport aux lignes polaires sont résumées dans le tableau 1. D'après le score RENAL, 34 (46.0%) tumeurs présentaient une complexité faible (score 4-6), 29 (39.0%) modérées (7-9) et 9 (15%) élevées (10-12).

Nous avons étudié l'influence des données cliniques et radiologiques sur la rentabilité des biopsies. Les biopsies sur tumeurs de complexité modérée et élevée (7-12) étaient plus souvent contributives que pour les tumeurs de complexité faible (4-6) : 98% vs 82% (p=0.026). En régression binaire, seul le score RENAL était significativement différent entre le groupe contributif vs non contributif (7.1 vs 5.3, p=0.02). Aucune autre différence significative ne fut relevée parmi les autres paramètres étudiés : sexe (p=0.27), Indice de masse corporelle (p=0.21), latéralité de la tumeur (p=0.51), taille tumorale (p=0.94), caractère exophytique (p=0.41), proximité des sinus (p=0.08), localisation antérieure ou postérieure (p=0.28) topographie par rapport aux lignes polaires (p=0.07). La régression logistique binaire a confirmé le score RENAL comme seul facteur prédictif de biopsies

contributives ( $p=0.04$ , Odds Ratio=1.78).

## V. DISCUSSION

Dans la plupart des cancers, la pratique d'une biopsie permettant la confirmation du caractère malin de la tumeur avant traitement est obligatoire et hautement recommandé. La communauté urologique est restée réticente à cette stratégie pour plusieurs raisons : la sécurité liée à ce geste invasif, la possibilité de biopsies non contributives, le faible impact sur la stratégie thérapeutique finale. Ces raisons doivent être restituées dans le cadre actuel du cancer du rein.

Les événements indésirables les plus préoccupants liés aux biopsies sont l'essaimage tumoral et les saignements. L'essaimage le long du trajet de ponction est extrêmement rare. Cela est particulièrement vrai depuis la généralisation de l'utilisation d'aiguilles coaxiales, limitant le contact entre le matériel tumoral potentiellement malin et le trajet de la ligne de biopsie. A notre connaissance, seuls 6 cas d'essaimage ont été rapportés dans le cas des tumeurs du rein et aucun avec l'utilisation d'aiguilles coaxiales (25). Le taux de complications dans notre série est très bas : 2.5% de complications peu sévères (score de Clavien-Dindo 2) uniquement. Ces résultats sont cohérents avec les séries précédentes rapportant généralement des taux de complications <8% (26). Seule la série de Lechevallier et al a rapporté un taux de complications élevé de 38% (26), ces résultats remontent néanmoins à 2000 et les techniques ont depuis probablement gagné en sécurité. Le rendement diagnostique et la précision ont atteint des niveaux acceptables permettant de guider le clinicien dans sa décision thérapeutique. L'amélioration de ces performances est liée aux progrès du guidage radiologique par scanner ou ultrasons et par l'amélioration des techniques anatomopathologiques avec le développement des marqueurs en immunohistochimie permettant d'affiner le diagnostic (figure 1). En effet, parmi les 79 biopsies de notre série, 56 (70.9%) ont nécessité un marquage immunohistochimique afin de déterminer le diagnostic. La plupart des marqueurs utilisés en routine clinique a été validée au cours des dix dernières années et a certainement permis d'affiner le diagnostic de malignité et la précision du sous-type histologique. Dans notre étude, le rendement

diagnostique était de 88.6%, similaire aux études précédentes publiées allant de 80% à 96% (27–30). Les biopsies scanno-guidées permettent de déterminer la malignité d'une tumeur avec une précision de 96%, cependant elles sont moins performantes pour déterminer le sous-type histologique (cellules claire, papillaire, chromophile...). Le grade de Führman avec une précision dans notre étude de 64% doit tout au plus alerter lorsqu'il s'agit d'un haut grade. Compte tenu du nombre important de tumeurs reclassées vers des grades plus élevés, un grade de Führman bas sur biopsie ne peut rassurer le clinicien et représenter un argument pour surveillance active. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature. En effet, la précision rapportée varie de 86% à 100% pour la détermination de la malignité, 86% à 100% pour la détermination du sous-type histologique et 64% à 76% pour le grade de Führman (25).

Il a longtemps été considéré que la pratique des biopsies tumorales rénales avait un faible impact sur la décision thérapeutique. Ceci était certainement vrai lorsque les tumeurs étaient découvertes lors de manifestations symptomatologiques, à un stade plus avancé et donc avec très peu de doute sur le caractère malin. A cette époque, la tumeur était retirée chirurgicalement lorsque cela était possible. Ce paradigme doit être revu pour deux raisons principales. Tout d'abord, les biopsies rénales ont démontré leur rendement diagnostique et leur faible risque. Par ailleurs, la généralisation de l'utilisation de techniques d'imagerie dans l'exploration de symptômes en routine clinique (douleur abdominales, lombaires,...) a entraîné une augmentation de la découverte fortuite de petites tumeurs rénales asymptomatiques (31). Ces petites tumeurs rénales sont plus fréquentes avec une forte proportion de tumeurs bénignes, parfois difficilement distinguables des tumeurs malignes en imagerie (32). Dans notre série, 32.9% des petites tumeurs rénales étaient bénignes, ces données sont cohérentes avec les données précédemment publiées (33). Les tumeurs bénignes sont inoffensives et leur extirpation chirurgicale expose le patient à des risques de complications significatifs. Dans notre série, les tumeurs bénignes n'étaient pas surveillées en imagerie. Dans deux cas, il fut décidé de ne pas traiter des carcinomes à cellules claires du fait du mauvais état général des patients et de la petite taille tumorale. Dans ce cas, un scanner était réalisé régulièrement afin de contrôler l'évolution. Au final, les biopsies ont donc modifié notre prise en charge puisqu'elles ont

permis de ne pas traiter un nombre important de tumeurs bénignes. Cependant, le résultat des biopsies n'a pas impacté le choix des modalités thérapeutiques entre extirpation chirurgicale ou thérapie focale (cryothérapie). De ce fait, les biopsies permettent la prévention de nombreuses procédures inutiles, diminuant le risque de complications pour le patient et de dépenses de santé inutiles pour le système de santé. Par ailleurs, le traitement des tumeurs rénales a évolué. En effet, alors que la néphrectomie élargie était encore récemment la seule option thérapeutique valable, de nombreuses options acceptables existent aujourd'hui. La surveillance active et la thérapie focale sont des alternatives à la néphrectomie partielle ou élargie dans le cas de mauvais candidats à la chirurgie. Lorsque ces alternatives thérapeutiques sont indiquées, la biopsie est alors l'unique possibilité d'obtenir un diagnostic de certitude histologique et sont donc recommandées (11). Dans notre rapport, les biopsies ont mené à une décision de ne pas intervenir dans 24 cas (30.4%), la cryothérapie percutanée représentait 28.3% des traitements actifs. Dans leur récente revue de la littérature, Volpe et al ont affirmé que les biopsies rénales ont un impact sur la prise en charge des tumeurs rénales dans 24.3% à 68.9% des cas.

Le score RENAL est un algorithme permettant d'évaluer la complexité et la topographie des tumeurs (34). A partir des données d'un scanner rénal avec injection de produit de contraste, il donne un score pour la taille, le caractère exophytique de la tumeur, la proximité des sinus, et le topographie par rapport aux lignes polaires, il précise également si la tumeur est antérieure ou postérieure. Ce score est corrélé à la décision thérapeutique du chirurgien, aux complications peropératoires et post-opératoires, aux résultats carcinologiques et à la dégradation de la fonction rénales après néphrectomie partielle (35–38). L'impact du score RENAL a également été étudié dans le cadre des thérapies ablatives ; en terme de résultats carcinologiques et fonctionnels, les résultats sont controversés (39–42). A notre connaissance, l'impact du score RENAL sur le rendement diagnostique des biopsies n'avait jamais été étudié. De manière surprenante, nous avons mis en évidence un lien entre un score RENAL élevé et un meilleur rendement de biopsies contributives. Les paramètres du score RENAL n'ont pas montré d'association significative lorsqu'ils étaient analysés indépendamment, peut-être du fait de la petite taille de notre cohorte.

Cependant, l'analyse en groupe de complexité a permis de mettre en évidence cette association.

Au regard de ces résultats, les biopsies de tumeurs rénales semblent particulièrement pertinentes dans le cadre des tumeurs complexes du rein. En effet, ces biopsies plus contributives permettront de prévenir des chirurgies particulièrement risquées lorsqu'elles mettront en évidence que la tumeur de score RENAL élevée est de nature bénigne.

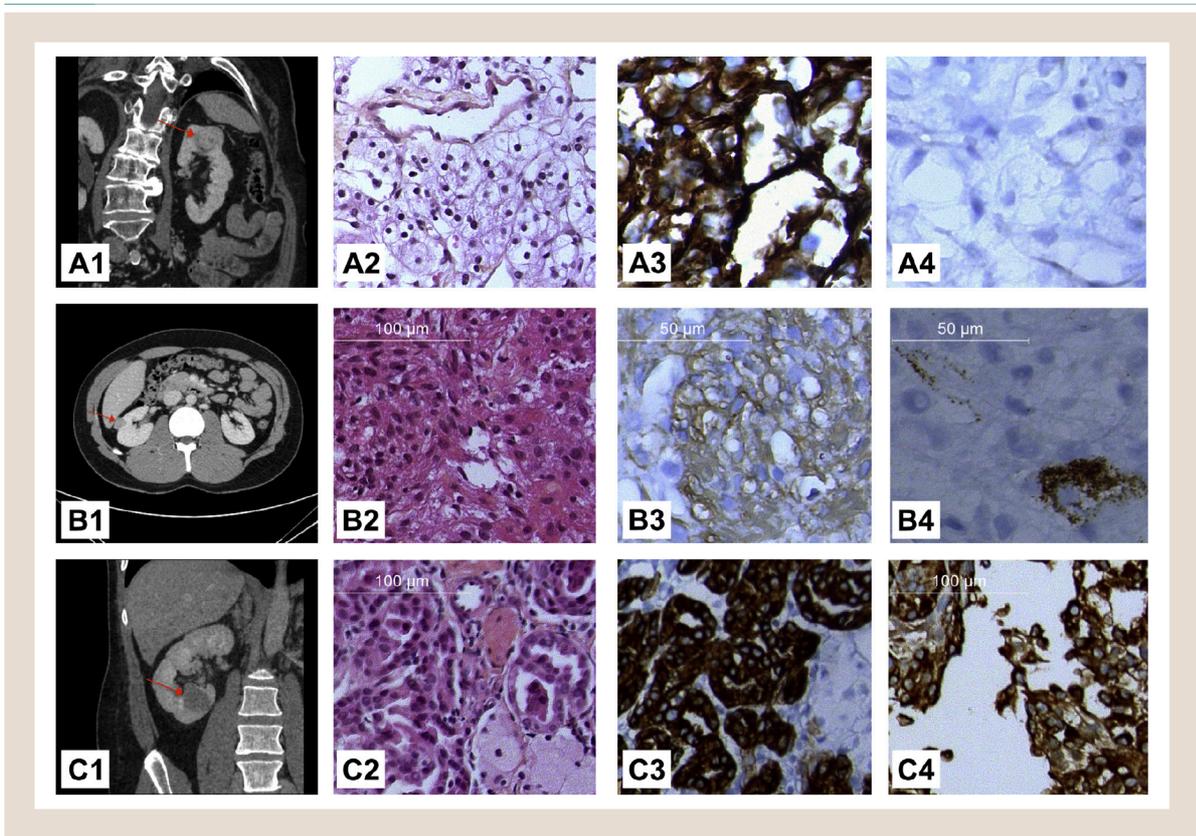
Une difficulté persistante pour les pathologistes est la différenciation des tumeurs bénignes oncocytaires des tumeurs malignes chromophobes (43). L'histologie et l'immunohistochimie ne permettent parfois pas de conclure de manière définitive sur la nature de la tumeur à partir de fragments biopsiques. Le choix d'une extirpation chirurgicale lorsque le patient peut tolérer un tel traitement et que le doute persiste semble raisonnable. Bien qu'élevé (88.6%), le rendement des biopsies des petites tumeurs du rein en terme de taux de biopsies contributives pour déterminer le caractère malin peut être amélioré. Le développement de nouvelles techniques d'imagerie et autres technologies permettant une analyse histologique instantanée du tissu tumoral et un meilleur ciblage du tissu tumoral devrait permettre d'augmenter cette précision diagnostique. Nous montrerons dans le prochain chapitre les résultats de notre expérience dans l'utilisation de la tomographie en cohérence optique et de l'imagerie moléculaire.

Cette étude présente un certain nombre de limites qu'il convient ici de reconnaître : une population d'étude limitée et une analyse rétrospective présentant le risque de biais de sélection. La confirmation histologique des résultats de biopsie n'a pu se faire que pour les patients opérés. La majorité des tumeurs bénignes sur les biopsies n'a pas été opérée, ce second biais de sélection pourrait sous-estimer le taux de faux-négatifs sur les biopsies.

Figure 1 : Evaluations radiologiques et histologiques des tumeurs. Le patient A présente une tumeur de 26mm localisée dans le rein gauche (A1). Cette tumeur présente les caractéristiques histologiques d'un carcinome rénal à cellules claires : architecture de cellules denses à cytoplasme clair, des limites cellulaires claires et distinctes en coloration HES grossissement 20\*10 (A2), expression de la vimentine (A3, 40\*10) et absence d'expression du CK7 (A4, 40\*10). Ce patient a été traité par cryothérapie.

Le patient B présente une tumeur de 21 mm localisée dans le rein droit (B1) et présentant les caractéristiques histologiques d'un angiomyolipome : une architecture triphasique avec des cellules myoïdes allongées, des adipocytes matures et des vaisseaux sanguins dysmorphiques avec d'épaisses parois en coloration HES grossissement 20\*10 (B2), expression de l'AML (B3, 40\*10) et de l'HMB45 (B4, 40\*10).

Le patient C présente une tumeur de 30mm localisée dans le rein droit (C1) présentant les caractéristiques histologiques d'un carcinome papillaire de type 1 : papilles couvertes de larges cellules à contenu cytoplasmique granulaire éosinophile en coloration HES grossissement 20\*10 (C2), expression du marqueur CK7 (C3, 20\*10), du marqueur AMCR (C4, 20\*10). Ce patient a été traité par néphrectomie partielle.



Abbreviations: AMCR = Alpha-Methylacyl-CoA Racemase; AML = Acute Myeloid Leukemia; CK = Cytokeratin; HES = Hematoxylin Eosine Safran; HMB = Human Melanoma Black.

## VI. CONCLUSION

Les biopsies des petites tumeurs rénales peuvent être pratiquées en routine clinique afin de prévenir le risque d'une chirurgie potentiellement morbide inutile. Pour les tumeurs complexes (score RENAL élevé), éviter une chirurgie potentiellement technique et risquée peut diminuer le risque de complications inutiles. L'efficacité des biopsies peut cependant être améliorée.

# CHAPITRE 2 : LA TOMOGRAPHIE EN COHERENCE OPTIQUE

## PAR PONCTION PERCUTANEE POUR DIFFERENCIER LES

### MASSES RENALES : COHORTE PILOTE

Travaux publiés dans Journal of Urology (44)

## I. INTRODUCTION

L'incidence des masses rénales a fortement augmenté au cours des dernières années, entraînant une augmentation importante des traitements (3,45,46). Du fait de la diffusion de l'imagerie abdominale, 68% des tumeurs sont diagnostiqués de petite taille <4cm avant d'être symptomatique (2,47). Le scanner et l'IRM sont très sensibles pour détecter les petites tumeurs rénales mais manquent de spécificité pour différencier les tumeurs malignes des tumeurs bénignes ainsi que les sous-types histologiques (48,49). Comme nous l'avons vu précédemment, une biopsie contributive, définie par la présence de matériel en quantité et en qualité suffisante pour un diagnostic histologique, permet une caractérisation tumorale avec une sensibilité et une spécificité de 90% à 100% (50). Une biopsie non contributive, manquant de matériel en quantité ou en qualité pour permettre une caractérisation histologique de la tumeur, est rapportée dans 10% à 20% des cas de biopsies de masses rénales et même jusqu'à 30% dans les petites tumeurs rénales (50,51). Le temps nécessaire à l'analyse des biopsies ainsi que la nécessité fréquente de répéter la procédure en cas de biopsie non contributive peut retarder sévèrement le diagnostic (50).

La tomographie en cohérence optique (OCT) est une technique d'imagerie de haute résolution permettant l'analyse des propriétés optiques spécifiques à chaque tissu. L'OCT utilise une lumière infra-rouge, rétrodiffusée, permettant la construction d'image en temps réel d'une résolution axiale de 15µm pour une pénétration du tissu allant de 2 à 3mm (52). Le développement récent de fibres

optiques de faible diamètre permet une nouvelle approche du tissu à travers des trocarts. Ceci a conduit à de nouvelles procédures diagnostiques telles que l'OCT trans-bronchique, l'OCT des artères coronaires ou l'OCT des tumeurs rénales (16,52,53). Dans l'analyse OCT de haute résolution, l'atténuation en profondeur du signal au sein du tissu pénétré peut être calculé et est exprimé coefficient d'atténuation ( $\mu_{\text{OCT}}$ ). Les changements cellulaires au cours de la carcinogénèse altèrent les caractéristiques de diffusion de la lumière au sein du tissu (54). Les cellules malignes affichent un nombre de noyaux plus élevé, de forme plus large et plus irrégulière, plus de mitochondries actives, ceci entraîne une différence de diffusion de la lumière (52,55,56). L'utilisation de la mesure du coefficient d'atténuation  $\mu_{\text{OCT}}$  permet une quantification pouvant servir de base à la différenciation tumorale (18,55,57–60).

## II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS

L'hypothèse de cette étude est donc que les tumeurs malignes présentent une valeur  $\mu_{\text{OCT}}$  moyenne significativement plus élevée que les tumeurs bénignes.

Le premier objectif de cette cohorte pilote est de définir les valeurs  $\mu_{\text{OCT}}$  correspondantes au tissu oncocytome et au carcinome rénal. L'objectif secondaire est de définir plus précisément la valeur  $\mu_{\text{OCT}}$  de chacun des principaux sous-types histologiques des carcinomes rénaux à savoir cellules claires, papillaire et chromophobe.

## III. MATERIEL ET METHODES

### A. CONSIDERATIONS ETHIQUES ET POPULATION

Cette étude a été validée par le comité éthique institutionnel du Centre Académique d'Amsterdam (2012-269). Le protocole a été enregistré auprès du Comité Central Néerlandais sur la Recherche Impliquant des Sujets Humains (NL41985.018.12) et dans la base [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT02073110). Tous les participants ont signé un consentement éclairé écrit. La cohorte pilote présentée consistait

en 40 patients inclus dans cette étude prospective, observationnelle, in vivo qui comptera un total de 194 patients. Cette étude respecte les recommandations de l'initiative STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy) (61). Les critères d'inclusion étaient un âge >18 ans, la présence d'une tumeur rénale solide se rehaussant après injection de produit de contraste au scanner, candidat pour un traitement curateur.

## **B. PROTOCOLE**

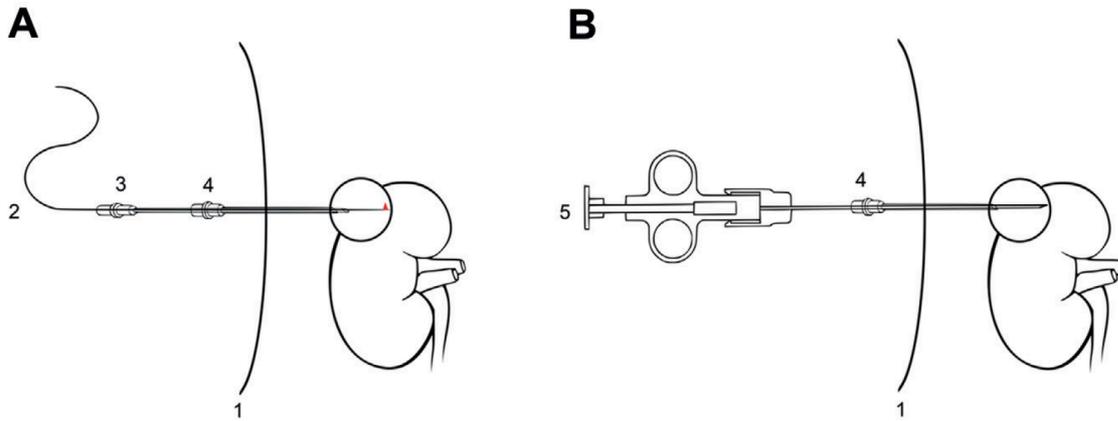
L'étude utilisait le système OCT commercialisé Illumien<sup>TM</sup> Optis<sup>TM</sup>, avec la sonde Dragonfly<sup>TM</sup> duo imaging. Le système Illumien Optis est basé sur les transformations de Fourier, les longueurs d'ondes optiques utilisées varient de 1280nm à 1350nm. Le Dragonfly Duo est une sonde utilisant une fibre à usage unique captant les informations dans un mouvement de rétractation. Son diamètre fait 0.9mm. La capture se fait de manière hélicoïdale, sur un angle de 90° et sur une longueur de rétractation de 54mm. Les informations OCT acquises consistent en 541 images transversales (mode B) avec une résolution axiale de 15µm et une résolution transversale de 20µm (52).

Les mesures OCT étaient réalisées en consultation par un radiologue interventionnel assisté d'un urologue. La tumeur rénale ciblée était visualisée par échographie ou scanner à la discrétion du radiologue interventionnel, se basant sur les caractéristiques de la tumeur et du patient. Après anesthésie locale, une aiguille introductrice de 15Gauges (Angiotech, Gainesville, Floride) était introduite jusqu'au contact de la capsule tumorale (figure 1, A, 4). A l'aide de cette aiguille, un trocart de 18Gauges (Cook Medical, Bloomington, Indiana) était mis en place, au contact de la tumeur (figure 1, A, 3). La profondeur de ponction dans la tumeur dépendait de la taille tumorale, pouvant varier de 1 à 5cm. Une fois le trocart correctement mis en place, la sonde OCT était introduite à l'intérieur du trocart (figure 1, A, 2). Une fois la sonde OCT en place, le trocart était retiré permettant le contact direct entre la sonde et le tissu tumoral à analyser. Un minimum de 3 acquisitions/rétractation était réalisé pour chaque tumeur.

Après avoir retiré la sonde OCT et le trocart d'approche, un pistolet à biopsie automatique de

16Gauge (Cook Medical) était introduit par l'aiguille introductrice afin de prélever des biopsies conventionnelles (figure 1, B, 5). Un minimum de deux carottes biopsiques était prélevé pour analyse histologique. Le matériel histologique de référence était acquis au moment du traitement curateur : pièce de néphrectomie en cas de chirurgie ou seconde série de biopsies en cas de cryothérapie.

Figure 1 : Schéma de la procédure OCT (A) et biopsie (B), les repères sont la paroi abdominale (1), la sonde OCT (2), le trocart de 18Gauge (3), l'aiguille introductrice co-axiale de 15Gauge (4) et le pistolet à biopsie automatique (5).



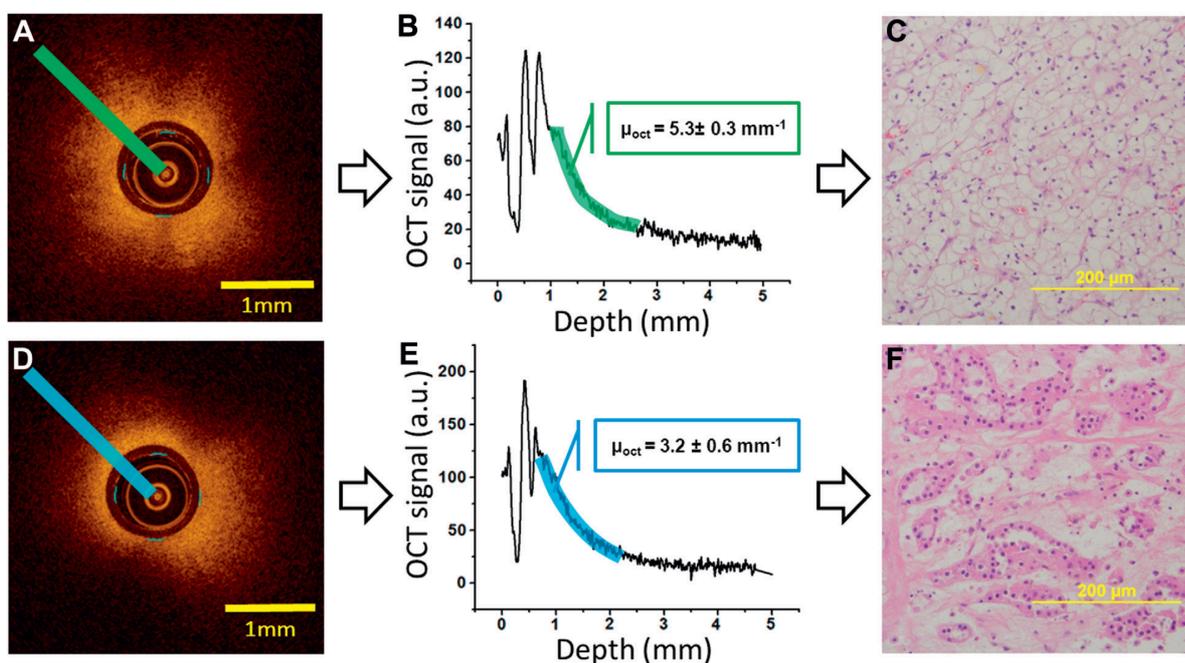
### C. ANALYSE OCT

La plateforme OCT contient un logiciel permettant l'affichage d'image OCT en temps réel. Cela permet une analyse qualitative des données OCT acquises pour chaque procédure. Pour l'analyse quantitative du coefficient d'atténuation  $\mu_{\text{OCT}}$ , les données étaient exportées au format TIFF vers un autre ordinateur. Les fichiers TIFF étaient analysés à l'aide du logiciel FIJI (ImageJ) pour analyse séquentielle de l'ensemble des images bidimensionnelles saisies (mode B) (figure 2, A). Une analyse visuelle des images OCT le long de la ligne de rétractation comparée aux images échographie, scanner et IRM permettait de définir une zone d'intérêt (ROI) à analyser sur l'ensemble des images OCT. L'identification de repère OCT tels que la graisse péri-rénale et la capsule rénale permettait de définir la limite proximale du tissu tumoral sur les images OCT. La longueur de la ROI était ensuite déduite par mesure de la longueur de la tumeur sur imagerie conventionnelle.

Au sein de la ROI, le  $\mu_{\text{OCT}}$  était évalué sur 5 différentes scans en mode B le long d'une ligne droite, ce qui consiste en 30 scans en mode A parallèles. Cette saisie se faisant de manière centrifuge depuis le centre de la sonde (figure 2). La moyenne des 5 mesures  $\mu_{\text{OCT}}$  était utilisée pour la

corrélation finale avec les données histologiques. Un outil Fiji développé par le laboratoire permettait de placer les informations le long de la ligne d'atténuation permettant d'introduire les données  $\mu_{\text{OCT}}$  sur le graphique acquis (figure 2, B). Afin d'obtenir une valeur  $\mu_{\text{OCT}}$  plus précise, le coefficient d'atténuation extrait était corrigé en tenant compte de l'index de réfraction du tissu, la fonction « point spread » et le système « roll-off » comme décrit par Muller et al (60). L'analyse d'atténuation OCT était effectuée par un chercheur dédié. Afin de prévenir les biais, ce chercheur réalisait l'analyse en aveugle des résultats histologiques.

Figure 2 : L'ensemble des données OCT sont chargées dans le logiciel FIJI pour être visualisées en bidimensionnel (A et D). Les données de chaque point situé sur la ligne irradiant vers l'extérieur depuis le centre de la sonde (A et D) sont reportées sur le graphe (B et E). A l'aide d'un outil développé spécifiquement, la pente du graphe est déterminée et représente le coefficient d'atténuation  $\mu_{\text{OCT}}$ . Dans cet exemple, la valeur  $\mu_{\text{OCT}}$  est donc de  $5.3\text{mm}^{-1}$  (B) et de  $3.2\text{mm}^{-1}$  (E), elle est corrélée aux analyses histologiques correspondantes de carcinome à cellules claires (C) et oncocytome (F)



#### D. ANALYSE HISTOLOGIQUE

Un anatomopathologiste expérimenté aux pathologies génito-urinaires analysait les prélèvements histologiques selon les protocoles du département d'anatomo-pathologie. Les premières étapes consistaient à fixer puis enrober le tissu. Le tissu était ensuite sectionné en tranche de  $3\mu\text{m}$  et monté sur lame. Une coloration à l'hématoxyline et éosine pour analyse histologique était systématique. Une analyse des marqueurs en immunohistologie était réalisé à la discrétion de l'anatomo-pathologiste. Les résultats histologiques des biopsies sont plus sujets aux imprécisions que les

prélèvements chirurgicaux issus de néphrectomies. Comme nous l'avons vu précédemment, la différenciation entre oncocytome et carcinome chromophile est particulièrement complexe à partir du matériel de biopsie (43). Dans le mesure du possible (patients traités chirurgicalement), cette cohorte pilote utilisait donc l'analyse histologique du tissu prélevé chirurgicalement comme référence de corrélation avec les données OCT.

## E. STATISTIQUES

Un test statistique de Mann-Whitney U, testant deux groupes non appariés de données numériques non normalement réparties, était utilisé pour comparer les différences des coefficients d'atténuation  $\mu_{\text{OCT}}$  entre le groupe tumeurs bénignes (oncocytomes) et tumeurs malignes. Le test de Kruskal-Wallis, évaluant 3 groupes non appariés de données numériques non normalement réparties, était utilisé pour comparer les  $\mu_{\text{OCT}}$  entre les trois sous-types de carcinomes rénaux : cellules claires, papillaire et chromophile. La différence était considérée comme significative lorsque  $p < 0.05$ . Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (PPV) et valeur prédictive négative (NPV) du  $\mu_{\text{OCT}}$  pour prédire l'histologie des tumeurs rénales étaient évaluées à l'aide d'une courbe ROC (62).

## IV. RESULTATS

Entre Aout 2013 et Avril 2015, 139 patients ont consulté le département pour tumeurs solides du rein prenant le contraste au scanner. Soixante-douze de ces patients ont eu des biopsies et furent inclus dans notre étude. Les inclusions sont résumées dans le schéma de la figure 3. Parmi ces 72 patients, des biopsies et mesures OCT ont été réalisées chez 66 patients. Dans 3 cas le matériel OCT a dysfonctionné, dans 2 cas une réévaluation a montré qu'il ne s'agissait pas d'une tumeur solide et qu'il ne pouvait être défini de trajet clair de ponction pour le prélèvement. Au moment de la publication de ces travaux, 43 patients inclus dans le protocole OCT avaient reçu un traitement curatif chirurgical (figure 3). Dans 3 cas, l'analyse histologique définitive ne correspondait au trois

sous-groupes histologiques définis dans l'étude (cellules claires, papillaire ou chromophile) rendant les données inutilisables pour l'étude (figure 3). Il en résulte donc un groupe de 40 patients inclus pour l'analyse de corrélation entre le  $\mu_{\text{OCT}}$  et les résultats histologiques de la pièce opératoire. Les 40 tumeurs incluses dans l'analyse se décomposaient ainsi : 4 oncocytomes, 25 carcinomes à cellules claires, 8 carcinomes papillaires et 3 carcinomes chromophobes. Le détail des caractéristiques de la population est présenté dans le tableau 1. Le  $\mu_{\text{OCT}}$  médian des oncocytomes était significativement inférieur à celui des carcinomes ( $3.38 \text{ mm}^{-1}$ , IQR 2.77-4.20 vs  $4.37 \text{ mm}^{-1}$ , IQR 4.17-4.96,  $p=0.043$ ; figure 4, A). L'analyse de la courbe ROC a montré une valeur seuil  $\mu_{\text{OCT}}$  de  $3.85 \text{ mm}^{-1}$  pour différencier les oncocytomes des carcinomes avec une sensibilité, une spécificité, une valeur prédictive positive et une valeur prédictive négative respectivement de 86%, 75%, 97% et 37% (figure 4, B). L'aire sous la courbe de la courbe ROC était de 0.81 (95% IC 0.66-0.92). L'analyse des différents sous-types histologiques des carcinomes a montré des  $\mu_{\text{OCT}}$  médian de  $4.36 \text{ mm}^{-1}$  (IQR 4.17-5.14) pour les cellules claires,  $4.79 \text{ mm}^{-1}$  (IQR 4.22-4.96) pour les papillaires et  $3.58 \text{ mm}^{-1}$  (IQR 2.82-4.52) pour les chromophobes. Le  $\mu_{\text{OCT}}$  médian était significativement inférieur pour les oncocytomes que les cellules claires ( $3.38$  vs  $4.36 \text{ mm}^{-1}$ ,  $p=0.049$ ) ainsi que pour les oncocytomes que pour les papillaires ( $3.38$  vs  $4.79 \text{ mm}^{-1}$ ,  $p=0.027$ ). En revanche, il n'y avait pas de différence significativement différente entre les oncocytomes et les chromophobes ( $3.38$  vs  $3.58 \text{ mm}^{-1}$ ,  $p=0.857$ ) (figure 5).

Dans deux cas, un fragment de la sonde s'est déchiré au moment de la ponction. Il fut ensuite demandé aux patients de bloquer leur respiration en inspiration profonde. Des mouvements excessifs du rein au moment de la ponction entraînent une courbure de la sonde pouvant entraîner une rupture dans la zone de contact avec le trocart. Dans les deux cas, des fragments de 1 à 2 mm de sonde restèrent dans le tissu n'entraînant pas de complication particulière. Un patient a rapporté une hématurie transitoire spontanément résolutive 4 heures après la ponction.

Figure 3 : Schéma de la sélection des patients. VHL : Von-Hippel-Lindau. BHD : Birt-Hogg-Dubé.

PA : analyse histologique.

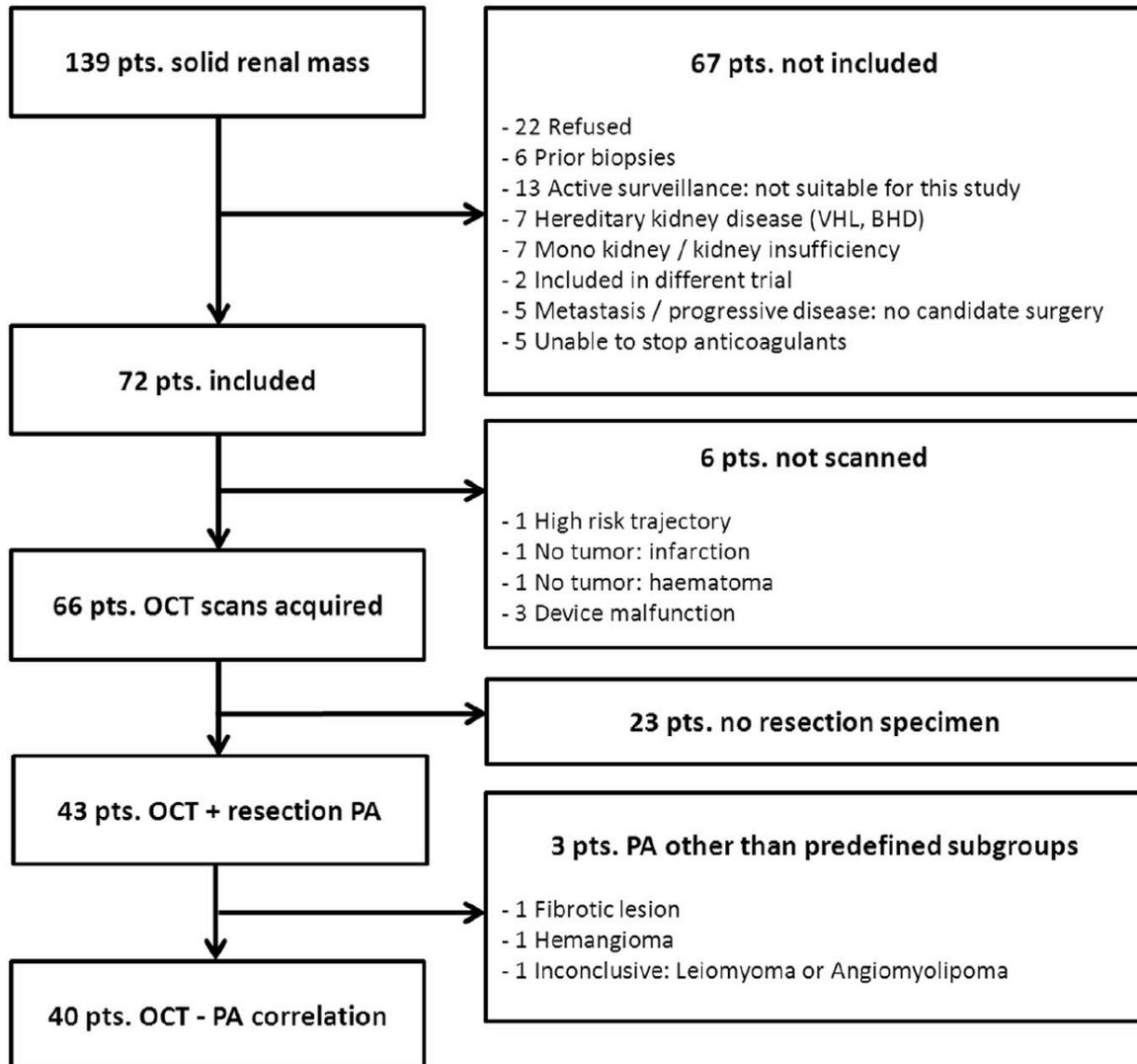


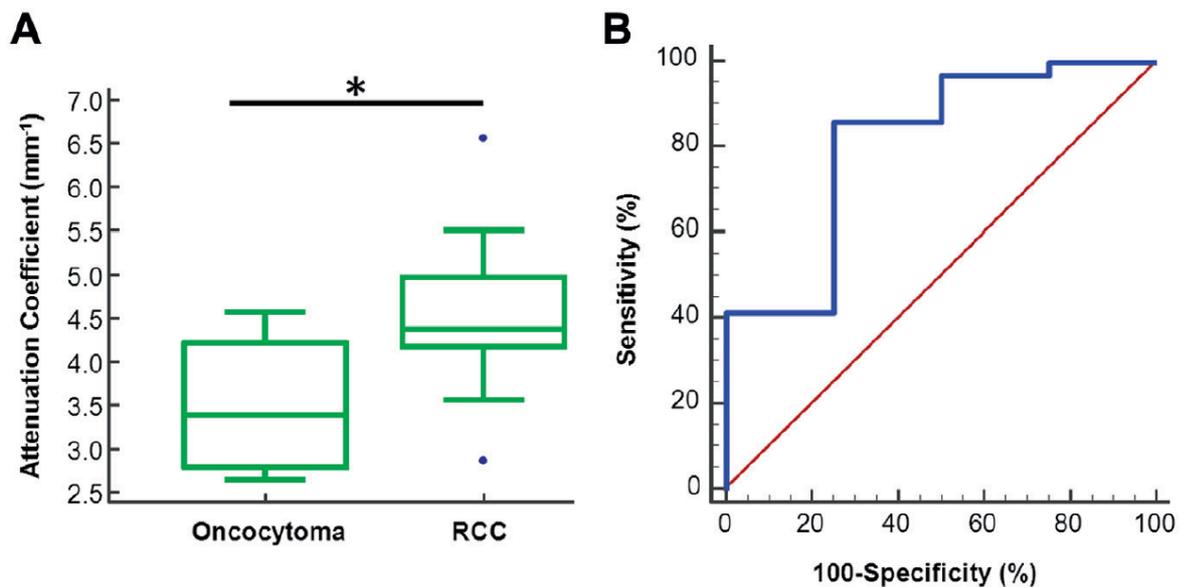
Tableau 1 : Caractéristique de la population

---

Mean pt age (range)	59	(32—83)
No. M/F	28/12	
Mean cm tumor size (IQR)	3.98	(2.55—4.78)
No. lt/rt side tumor	21/19	
No. surgery type:		
Open partial nephrectomy	7	
Open radical nephrectomy	2	
Laparoscopic partial nephrectomy	24	
Laparoscopic radical nephrectomy	7	
No. pathology results:		
ccRCC	25	
pRCC	8	
chRCC	3	
Oncocytoma	4	

---

Figure 4 : Boîte à moustache comparant le  $\mu_{\text{OCT}}$  de l'oncocytome et du carcinome rénal (A). Le  $\mu_{\text{OCT}}$  médian de l'oncocytome est significativement inférieur à celui du carcinome rénal (3.38  $\text{mm}^{-1}$  IQR 2.77-4.20 vs 4.37  $\text{mm}^{-1}$  IQR 4.17-4.96,  $p=0.043$ ). Le groupe carcinome rénal présente deux valeurs extrêmes du fait du regroupement de tous les sous-types histologiques ce qui entraîne un intervalle large de données  $\mu_{\text{OCT}}$ . Le seuil  $\mu_{\text{OCT}}$  de 3.85  $\text{mm}^{-1}$  permet d'obtenir une sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative respectives de 86%, 75%, 97% et 37% pour différencier les carcinomes rénaux des oncocytomes. L'aire sous la courbe ROC est de 0.81 (95% IC 0.66-0.92).



## V. DISCUSSION

Cette cohorte est la première étude à notre connaissance démontrant la faisabilité d'une mesure OCT percutanée d'une tumeur rénale. La quantification des coefficients d'atténuation  $\mu_{\text{OCT}}$  a montré que la technique OCT apporte des moyens supplémentaires pour différencier les oncocytomes des carcinomes, ces données ont été confirmées par l'analyse histologique définitive des pièces de néphrectomies.

Jusqu'à 20% des petites tumeurs rénales sont finalement bénignes sur l'analyse définitive des pièces opératoires. Bien que les biopsies ne soient pas encore acquises en routine clinique urologique, leur pratique augmente afin d'éviter le sur-traitement des tumeurs rénales. De plus, les biopsies sont clairement recommandées en cas de traitements ablatifs (radiofréquences ou cryothérapies) ou de surveillance active. Dans cette étude, nous avons corrélés les résultats OCT avec l'analyse histologiques des pièces opératoires. Cependant, dans les analyses à venir, les données OCT seront également comparées aux secondes biopsies pour les patients traités par cryothérapies.

Dans l'interprétation de ces résultats, il est important de noter le faible nombre d'oncocytomes, ce qui diminue la fiabilité des conclusions présentées. Il s'agit d'une limite de ces travaux. La différenciation entre oncocytome et carcinomes rénaux montre une sensibilité et une spécificité respectivement de 86% et 75% et une valeur prédictive positive de 97%. Une préoccupation est la valeur prédictive négative de 37% rendant une valeur négative peu fiable pour exclure un carcinome rénal. De plus, dans l'analyse des sous-types histologiques, il existe un chevauchement important des données des tumeurs oncocytomes et chromophobes ( $\mu_{\text{OCT}} = 3.38$  vs  $3.58 \text{ mm}^{-1}$ ,  $p=0.857$ ).

Nos travaux in vivo précédents utilisant la technique OCT sans ponction au cours d'interventions chirurgicales n'ont pas montré de différence significative  $\mu_{\text{OCT}}$  entre le tissu malin et le tissu bénin ; ces données n'étaient pas interprétables compte-tenu du faible nombre de cas inclus (18).

Cependant les valeurs  $\mu_{\text{OCT}}$  étaient supérieures à celles reportées dans ces travaux tant pour le tissu malin que pour le tissu bénin. Ces différences peuvent s'expliquer par la différente voie d'abord :

percutanée contre application externe de contact en peropérateur.

Après les deux cas de fragmentation de la sonde, le protocole a été modifié. Nous avons demandé aux patients de retenir leur respiration en inspiration profonde afin d'éviter les mouvements du rein et le trocart était rétracté sur une plus courte distance afin de maintenir son extrémité à l'intérieur du rein, limitant les mouvements de courbure de la sonde et donc l'angulation sur l'extrémité du trocart pouvant entraîner la rupture. Il n'y a pas eu d'autre incident après ces modifications.

Dans cette étude ; les mesures OCT étaient réalisées avant les prélèvements biopsiques afin d'éviter les manipulations du tissu avant analyse OCT. Cependant, il est possible que la procédure OCT entraîne une altération du tissu biopsié. Les données de la littérature montrent un taux de biopsies non contributives de 10 à 20% pour les tumeurs rénales et jusqu'à 30% pour les petites tumeurs du rein (50). Dans cette étude, le taux de biopsie non contributive était de 27% pour une taille tumorale moyenne de 3.98cm (IQR 2.55-4.78). Bien que ces résultats ne soient pas incompatibles avec les données de la littérature, il n'est pas exclu que les ponctions et manipulations précédentes la biopsie altèrent la qualité du tissu prélevé.

Bien que le trajet de ponction était contrôlé par imagerie, il n'est pas impossible que pour certaines mesures OCT du parenchyme rénal normal ait été scanné du fait d'un mauvais ciblage. Cela biaiserait les données OCT en abaissant la valeur  $\mu_{OCT}$  de la tumeur ponctionnée et donc la moyenne de son sous-groupe. Le résultat serait donc une sous-estimation des capacités de différenciation de la technique OCT pour différencier les groupes tumoraux. Par ailleurs, la ponction OCT présente les mêmes limitations techniques d'accès que pour les biopsies conventionnelles, notamment pour les tumeurs antérieures ou sous-diaphragmatiques.

Les résultats prometteurs de cette étude garantissent plusieurs applications potentielles. La bonne valeur prédictive positive pourrait permettre une détection rapide et précise des carcinomes rénaux et donc une meilleure sélection des patients par l'urologue ce qui représenterait une amélioration par rapport à l'utilisation du scanner ou de l'IRM. Par ailleurs, l'acquisition et l'analyse en temps réel des données pourraient permettre de re-ponctionner directement en cas de résultats non contributifs. Cela permettrait donc de réduire les procédures non contributives qui limitent

actuellement le développement des explorations pré-thérapeutiques des tumeurs rénales. Cette acquisition en temps réel permettrait également de réduire la prise en charge globale des tumeurs rénales. Afin d'arriver à ces objectifs, plusieurs étapes restent à franchir dans le développement de l'OCT percutanée. Les valeurs seuils  $\mu_{\text{OCT}}$  doivent être définies, c'est à dire quantifier précisément les valeurs moyennes pour chaque type tumoral. L'analyse des  $\mu_{\text{OCT}}$  doit être intégrée au logiciel de la plateforme afin de pouvoir obtenir cette valeur en temps réel, immédiatement après l'acquisition des images. Les résultats de cette étude démontrent le potentiel de l'OCT percutanée pour différencier les tumeurs rénales, ouvrant ainsi de nouvelles possibilités de recherche et développement.

## VI. CONCLUSION

Nous avons démontré la faisabilité de la tomographie en cohérence optique percutanée dans l'exploration des tumeurs rénales. Le  $\mu_{\text{OCT}}$  est significativement plus élevé dans le carcinome rénal que dans l'oncocytome avec une analyse de la courbe ROC montrant des résultats prometteurs pour leur différenciation. Cela démontre le potentiel de la technologie OCT percutanée pour la différenciation des tumeurs rénales. La poursuite de ce projet et de l'inclusion des patients permettra de définir plus précisément les valeurs seuils de  $\mu_{\text{OCT}}$  et à terme le développement d'analyse en temps réel permettant une différenciation instantanée des tumeurs rénales.

# CHAPITRE 3 : RECHERCHE DE MARQUEURS CIBLES POUR UNE

## APPLICATION EN IMAGERIE MOLECULAIRE

Ces travaux ont été publiés dans World Journal of Urology (63)

### **I. INTRODUCTION**

La prise en charge du carcinome rénal a beaucoup évolué au cours des dix dernières années. D'une prise en charge quasi-exclusivement chirurgicale dans les cancers localisés, il existe aujourd'hui un large éventail de traitements systémiques ayant démontré leur efficacité dans les stades métastatiques (64). L'anticipation fiable du risque oncologique lié au carcinome rénal est primordiale afin de pouvoir adapter le suivi et ajuster le traitement en cas de risque élevé. Bien que de nombreux marqueurs ont été décrit dans la littérature comme associé au pronostic du carcinome rénal, leur application en pratique clinique a souvent été limitée par une interprétation subjective des résultats d'immunohistochimie ou par leur faible impact une fois intégré dans des modèles prédictifs (65). Aucun marqueur n'est actuellement validé pour prédire le pronostic d'un carcinome rénale en pratique clinique (64).

### **II. HYPOTHESE ET OBJECTIF**

L'hypothèse de cette étude est qu'un certain nombre de marqueurs précédemment dans la littérature pourrait permettre de prédire le pronostic des carcinomes à cellules claires.

Le but de cette étude est donc de tester ces marqueurs en immunohistochimie sur un groupe de carcinomes rénaux à cellules claires et de comparer leur expression aux résultats carcinologiques.

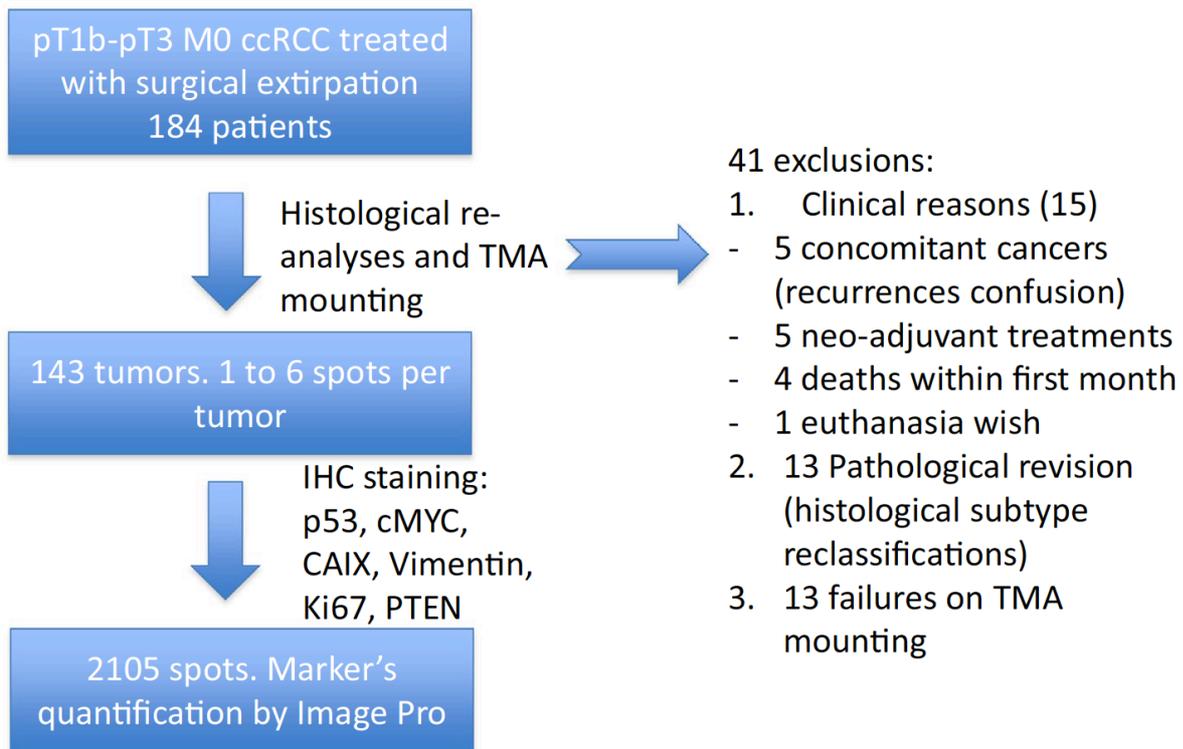
### III. MATERIEL ET METHODES

#### A. PATIENTS ET METHODES

De Janvier 1998 à Décembre 2009, 184 patients traités chirurgicalement (144 néphrectomies élargies, 40 néphrectomies partielles) pour des carcinomes rénaux à cellules claires non métastatiques pT1b-pT3 ont été sélectionnés pour l'étude. Les cancers non cN0M0 ont été exclus. Les tumeurs pT1a ont également été exclues du fait de la très faible incidence de métastase ou de récurrence locale dans le suivi post-opératoire (66). Afin d'homogénéiser la description de chaque cas, tous les cas ont été décrits selon la classification TNM de 2005 (67). Une révision histologique centralisée de tous les cas était effectuée par un anatomo-pathologiste dédié spécialisé en pathologie uro-génitale.

Les patients étaient exclus en cas de sous-type non à cellule claire lors de la révision histologique, en cas de cancer concomitant mettant en doute l'origine d'une éventuelle métastase, en cas de traitement néo adjuvant ou en cas de décès du patient dans le mois suivant la chirurgie sans lien avec le cancer (figure 1).

Figure 1 : Schéma d'inclusion et d'exclusion des patients



## B. IMMUNOHISTOCHEMIE

Pour chaque patient, le sous-type histologique et le grade de Fühman était confirmé par notre anatomo-pathologiste sur une lame colorée à l'hématoxyline et éosine (HE). En cas de différence dans le grade tumoral, le résultat de notre anatomo-pathologiste référent était retenu afin d'éviter une variabilité inter-observateur. Pour chaque tumeur, des régions caractéristiques de la tumeur étaient repérées sur la lame HE puis le bloc de paraffine était prélevé dans la région correspondante afin d'extraire la carotte pour la micromatrice tissulaire (TMA). De 1 à 6 carottes étaient prélevées pour chaque patient puis fixées dans le bloc paraffine de la TMA.

La TMA était ensuite sectionnée en lame de 3µm, une lame était colorée en HE pour l'analyse architecturale et six marqueurs étaient utilisées d'après leur association décrite dans la littérature avec le pronostic des carcinomes rénaux à cellules claires : Ki67 (DAKO clone MIB1) (68,69), C-myc (Abcam, Agilent Technologies) (70), anhydrase carbonique 9 (Abcam, clone ab15086) (71–73), vimentine (DAKO clone V9) (74–77) et PTEN (DAKO clone 6H2.1) (78).

## C. ANALYSE D'IMAGE

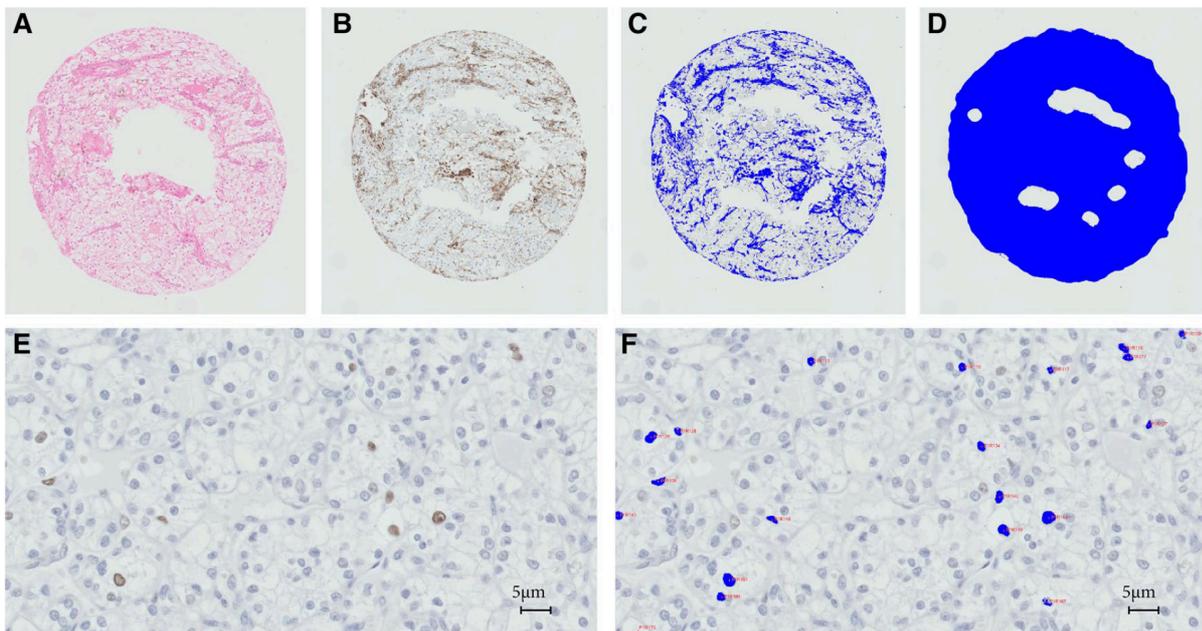
Les lames TMA étaient numérisées avec le scanner Philips IntelliSite Ultra Fast (Philips Digital Pathology Solutions, Best, Pays-Bas). Chaque carotte était ensuite identifiée manuellement dans l'interface utilisateur et sauvegardée au grossissement \*20 (2px/µm). Les images numérisées étaient analysées à l'aide du logiciel Image Pro Premier (vs 9.1, Media Cybernetics, Rockville, MD), déjà évalué pour des analyses de pathologie oncologique (79–83). Si nécessaire, des régions d'intérêt étaient définies afin d'exclure des zones de parenchyme normal, de fibrose, de nécrose kystique ou de tissu plié pouvant fausser l'analyse (834 régions d'intérêt sur 2105 points, 39%). A l'aide de l'option smart segmentation du logiciel, un réglage de segmentation était défini pour repérer le signal 3,3'-diaminobenzidine (DAB) puis un second pour repérer le signal total du tissu analysé. Les mêmes réglages étaient utilisés pour l'analyse de tous les points et de tous les marqueurs. Les marqueurs cytoplasmiques (CAIX, C-Myc, Vimentine et PTEN) étaient exprimés en pourcentage

de surface marquée par le DAB ( $100 \times \text{nombre de pixels identifiés DAB} / \text{nombre total de pixel dans la surface analysée}$ ). Les marqueurs nucléaires (Ki67 et p53) étaient exprimés en nombre de cellules marquées/mm<sup>2</sup>. Les particules DAB+ < 9 pixels<sup>2</sup> étaient considérées comme un bruit de fond.

L'option taille relative du logiciel était utilisée pour compter les noyaux agrégés (figure 2). Pour chaque patient, la valeur utilisée pour l'analyse statistique d'un marqueur était la valeur médiane de l'analyse des différents points.

Figure 2 : Analyse automatique des images. Les images A-D proviennent de la même carotte.

Coloration HE avec grossissement \*10, 1px/um (A), Coloration CAIX (B), Détection automatique du signal DAB (C), détection de toute la surface analysée (D). Les résultats sont exprimés en pourcentage de surface ayant réagi en coloration DAB (nombre de pixels bleus en C/nombre de pixels bleus en D). En bas : exemple de comptage automatique des cellules Ki67+. Détail de la coloration DAB des noyaux Ki67 (E) et comptage automatique des particules à partir du signal DAB (F). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules Ki67+/um<sup>2</sup>.



## D. STATISTIQUES

Des analyses en régression de Cox univariée et multivariée ont été utilisées pour identifier des prédicteurs indépendants de survie sans récurrence, de survie spécifique et de survie globale. Les variables analysées étaient l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle (IMC), le stade p, le grade, le score d'état général, CAIX, vimentine, PTEN, C-myc, p53, Ki67. Les stades ont été analysés en deux groupes pT1b et pT2-3 puisqu'il n'existait pas de différence de survie entre les groupes pT2 et pT3 dans notre cohorte. Les variables ont été intégrées dans le modèle multivarié de Cox lorsque  $p < 0.10$  dans l'analyse de Cox univariée. L'association était considérée comme significative lorsque  $p < 0.05$ . Nous avons définis au sein de notre cohorte les paramètres cliniques et anatomo-pathologiques pronostiques de la survie sans récurrence (SSR, temps entre la chirurgie et l'apparition de métastase ou de récurrence locale), de la survie spécifique au cancer (SS, temps entre la chirurgie et le décès spécifiquement lié au cancer) ou la survie globale (SG, temps entre la chirurgie et quelque cause de décès). Pour une plus grande pertinence clinique, nous avons transformé les variables continues des marqueurs associés de manière indépendante aux survies sur les analyses multivariées en variable catégorielle. Le point seuil permettant de diviser une valeur continue en valeur positive ou négative était obtenu par la méthode du plus petit p sur le test de log-rank (84). Dans un second temps, nous avons testé ces variables en analyse multivariée pour les trois survies. La corrélation entre les stades et grades tumoraux et la valeur de chaque marqueur était testée par un modèle de régression logistique binaire en traitant les données histologiques en variables à deux valeurs (grade : I-II ou III-IV et stade pT1b ou pT2-3). La corrélation entre les marqueurs significatifs était testée par un test de Spearman non paramétrique (hypothèse bilatérale). Deux analyses de sensibilité ont été effectuées en catégorisant les stades en pT1b, pT2 ou pT3 et en évaluant les marqueurs comme continu.

La discrimination des nouveaux marqueurs a été évaluée par l'index de concordance de Harell. Une correction bootstrap (150 échantillons) a été conduite pour éviter les biais de sur-ajustement. L'indice de concordance de Harell a été calculé pour les modèles incluant les paramètres cliniques et histologiques significatifs en analyse multivariée (modèle de référence), puis en incluant les

paramètres des nouveaux marqueurs. Une augmentation de l'indice C de Harell supérieure à 0.005 était considérée comme un critère de pertinence du modèle (85).

Les tracés d'étalonnage ont été explorés en comparant les modèles incluant les nouveaux marqueurs avec les autres modèles.

## IV. RESULTATS

### A. RESULTATS CLINIQUES DE LA COHORTE

Quarante et un patients ont été exclus de l'analyse (figure 1). Cent-quarante trois patients ont été inclus dans l'analyse. Les caractéristiques de la population sont résumées dans le tableau 1. Le suivi médian était de 62.9 mois (IQR 35.0–91.8). Quarante-six (32.3%) patients ont récidivé (2 récidives locales et 44 métastatiques), 24 (16.8%) patients sont décédés spécifiquement du cancer et 46 (32.2%) sont décédés d'une quelconque cause. La SSR de pT1b, pT2 et pT3 étaient respectivement de 90%, 51% et 62%. Les valeurs respectives pour la SS étaient 98%, 81% et 78%. Enfin pour la SG 91%, 78% et 67%.

Tableau 1 : Caractéristiques des patients (exclusivement carcinomes à cellules claires)

	Patients ( <i>n</i> = 143)
Age at treatment (year)	
Median (IQ)	65.5 (57–73)
Gender	
Male (%) / female (%)	91 (63.6) / 52 (36.4)
BMI [median (IQ)]	26.5 (24.4–28.8)
2002/2009 TNM pathological stage [ <i>n</i> <sub>o</sub> (%)]	
pT1b	48 (33 %) / 48 (33 %)
pT2	31 (22 %) / pT2a 18 (13 %) – pT2b 13 (9 %)
pT3a	29 (21 %) / 42 (29 %)
pT3b	35 (24 %) / 20 (14 %)
pT4*	– / 2 (1.4 %)
Tumor size (mm)	
Median (IQ)	66 (50–100)
Fuhrman grade—no (%)	
I	49 (34 %)
II	60 (42 %)
III	28 (20 %)
IV	6 (4 %)
Follow-up (in months)	
Median (IQ)	62.9 (35.0–91.8)
Recurrence	
<i>N</i> <sub>o</sub> (%)	46 (32.2 %)
Median time (in months) (IQ)	14.4 (5.0–30.5)
RCC-specific death	
<i>N</i> <sub>o</sub> (%)	24 (16.8 %)
Median time (in months) (IQ)	33.9 (17.7–66.1)
All-cause death	
<i>N</i> <sub>o</sub> (%)	46 (32.2 %)
Median time (in months) (IQ)	33.9 (17.7–66.1)

*BMI* body mass index, *IQ* interquartile (25–75)

\* pT3b cases according to 2002 TNM became pT4 in 2009 TNM because contiguous extension into ipsilateral adrenal gland

## B. FACTEURS PREDICTIFS DES RESULTATS CLINIQUES

L'analyse univariée de la SSR est présentée dans le tableau 2. L'IMC ( $p=0.002$ ), le stade ( $p<0.001$ ), le grade ( $p=0.003$ ) et la vimentine ( $p=0.003$ ) étaient des facteurs prédictifs de récurrence. Compte-tenu de 15 valeurs manquantes dans la population, nous avons décidé de réaliser les analyses sans l'IMC, les résultats étaient comparables avec ou sans cette variable. L'analyse Cox multivariée pour la SSR est présentée dans le tableau 2. Dans les premières analyses, les marqueurs étaient traités comme des valeurs continues. Le risque de récurrence était donc associé de manière significative avec un IMC plus bas, un stade et un grade plus péjoratif, une expression CAIX plus faible et une expression de la vimentine plus forte. Le décès spécifique était associé à un âge plus grand, un grade plus péjoratif, une expression CAIX plus faible et vimentine plus forte. Le risque de décès pour quelque cause était associé à l'âge plus grand, un grade plus péjoratif et une forte expression de la vimentine.

Ni le stade ni le grade n'étaient corrélés à l'expression de la vimentine (stade  $p=0.239$ , grade  $p=0.660$ ) ou du CAIX (stade  $p=0.608$ , grade  $p=0.660$ ). Les expressions de la vimentine et du CAIX n'étaient pas corrélées ( $p=0.443$ ). Ces deux variables pouvaient donc être intégrées dans une variable catégorielle unique CAIX-/Vimentine+ permettant d'obtenir un test plus discriminant. Le meilleur seuil permettant de séparer la sous-expression de CAIX était de 30%, le meilleur seuil permettant de séparer la sur-expression de la vimentine était de 50%.

Nous avons donc construit la variable CAIX-/Vimentine+, les patients étaient considérés comme positifs lorsque la même tumeur présentait à la fois moins de 30% d'expression de CAIX et plus de 50% d'expression de vimentine (groupe 1), ils étaient considérés comme négatifs dans toute autre situation (groupe 2). Trente-neuf (27.3%) patients appartenaient au groupe 1, 103 (72.0%) au groupe 2 et 1 (0.7%) avait une valeur manquante (vimentine). En analyse multivariée, le groupe 1 avait un risque plus élevé de récurrence ( $p<0.001$ , HR=3.6) (tableau 2), décès spécifique ( $p<0.001$ , HR 4.6) et de décès de quelque cause ( $p=0.010$ , HR=2.4).

**Tableau 2 :** Survie sans récurrence. Analyse univariée et multivariée

Variable	Univariate			Multivariate		
	<i>p</i>	HR	HR-95 % CI	<i>p</i>	HR	HR-95 % CI
<b>Clinical features</b>						
Age	0.53	1.01	0.98–1.03	–	–	–
Gender (M vs F)	0.88	1.05	0.58–1.91	–	–	–
BMI	0.002	0.89	0.82–96	0.021	0.912	0.844–0.986
ASA (3–4 vs 1–2)	0.463	1.31	0.642–2.653	–	–	–
<b>Pathological features</b>						
Stage (T2–3 vs T1b)	<0.001	4.9	1.9–12.4	0.004	4.531	1.598–12.845
Grade (III–IV vs I–II)	0.003	2.5	1.4–4.6	0.000	3.291	1.688–6.415
<b>Immunohistological markers</b>						
CAIX	0.07	0.98	0.96–1.00	0.013	0.971	0.949–0.994
Vimentin	0.03	1.027	1.003–1.052	0.007	1.035	1.009–1.062
PTEN	0.41	1.01	0.99–1.04	–	–	–
CMYC	0.17	1.01	0.99–1.03	–	–	–
p53	0.47	1.00	0.99–1.003	–	–	–
Ki67	0.45	1.00	1.00–1.001	–	–	–
CAIX-/Vimentin+ (categorical, CAIX-/Vimentin+ vs non-CAIX-/Vimentin+)	0.001	2.84	1.57–5.13	0.000	3.435	1.789–6.596

## C. CORRELATION ET CALIBRATION

La différence entre l'indice C du modèle de référence et celui des modèles incluant les nouveaux marqueurs était toujours supérieure à 0.005. Cela s'est confirmé pour les trois survies : sans récurrence (+0.03), spécifique (+0.02) et globale (+0.01). Les tracés d'étalonnage comparables entre le modèle de référence et le modèle incluant la variable CAIX+/Vimentine- prouvent que le modèle a peu perdu en calibration tout en augmentant sa discrimination.

## V. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons démontré sur une cohorte avec un long suivi, l'effet négatif pour les résultats cliniques d'une sous-expression de CAIX et d'une surexpression de la Vimentine sur le tissu tumoral réséqué pour des carcinomes rénaux à cellules claires non métastatiques. Ces associations étaient assez robustes pour être considérées comme des facteurs prédictifs indépendants de récurrence, de décès spécifique et de décès pour quelque cause avec une précision plus élevée que les modèles n'incluant que les données clinico-pathologiques.

CAIX est une protéine faisant partie de la famille des anhydrases carboniques, elle a été décrite comme jouant un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire en cas d'hypoxie, dans l'oncogenèse et dans la progression tumorale (86). CAIX est exprimé dans environ 85% des carcinomes rénaux à cellules claires mais pas dans les autres sous-types histologiques. L'association négative entre une sous-expression de CAIX et les résultats cliniques dans le carcinome rénal à cellules claires a été rapportée dans d'autres études (71,72). Cette association a également été rapportée pour d'autres cancers comme le cancer du col utérin (87), de l'oesophage (88) et du cancer colo-rectal (89). L'intérêt du CAIX pour le diagnostic, le pronostic et le traitement a été rapporté dans plusieurs études (90).

La Vimentine est une protéine filament intermédiaire. Elle est exprimée de manière physiologique par les cellules mésenchymateuses. Dans l'oncogenèse, la Vimentine joue un rôle dans la transition

épithélio-mésenchymateuse conférant des propriétés de migration et d'invasion aux cellules tumorales (91). La Vimentine est exprimée dans plus de 87% des carcinomes rénaux à cellules claires (77). L'impact délétère de l'expression de la Vimentine sur les résultats cliniques des carcinomes rénaux a également été rapporté dans plusieurs études précédentes (74–76).

Plusieurs études ont rapporté le potentiel de marqueurs immunohistochimiques pour prédire les résultats cliniques dans le carcinome rénal. Kim et al (74) ont établi un nomogramme à partir d'une cohorte de 318 patients présentant un carcinome rénal à cellules claires, tout stades confondus, y compris métastatique. Les marqueurs immunohistochimiques inclus dans leur modèle comprenaient le p53, CAIX et la Vimentine. Avec le rôle de la sous-expression de CAIX et de la surexpression de la Vimentine pour prédire le pronostic des carcinomes rénaux à cellules claires, leur modèle est assez proche du notre bien que nous n'ayons pas trouvé d'association avec p53. D'autres études ont démontré l'effet délétère d'une sous-expression de CAIX (92,93). Klatte et al ont évalué différents marqueurs dans leur hypothèse de base et ont finalement rapporté un modèle intégrant Ki-67, p53, VEGFR-1 épithélial et VEGFR-D épithélial. Dans leur modèle, CAIX n'était pas prédictif des résultats cliniques. Cependant nous pouvons critiquer une cohorte sous-dimensionnée avec 170 patients inclus pour plus de 20 marqueurs testés ce qui représente un risque élevé de biais dans l'analyse statistique (94). Pour cette raison, nous avons inclus les marqueurs testés par pallier.

L'immunohistochimie est une technique puissante d'analyse de l'expression protéique. Le problème est la subjectivité dans l'interprétation des résultats (65). Les évaluations précédentes des marqueurs immunohistochimiques citées précédemment sont basées sur une lecture « manuelle ». Il s'agit d'une mesure semi-quantitative des résultats qui est donc opérateur-dépendantes. La méthode change d'une étude à l'autre et les auteurs pondèrent souvent leur quantification par l'intensité du signal DAB, ce qui est probablement un facteur d'erreur du fait que le marquage immunohistochimique n'est pas une méthode stoechiométrique (95). L'analyse automatique des images tend à pallier cet inconvénient. Dans cette étude nous avons réalisé les analyses à l'aide du logiciel Image Pro Plus. Les réglages utilisés pourraient être réutilisés sur d'autre cohorte pour une validation externe sans biais d'interprétation. Ce point rend notre méthodologie plus reproductible

que les précédentes études. La fiabilité de ce logiciel a été comparée à une évaluation visuelle de l'expression de la survivine dans le cancer rectal (79). Les auteurs ont conclu à une bonne concordance entre les deux méthodes et un avantage du logiciel en terme de sensibilité augmenté pour la discrimination, et une plus grande fiabilité et reproductibilité dans la mesure de l'expression protéique. Le logiciel a été testé en oncologie pour évaluer l'association entre l'expression immunohistochimique de marqueurs, les caractéristiques clinico-pathologiques et les résultats oncologiques dans le cancer de l'endomètre (80), du poumon non à petites cellules (81), du larynx (82) et colo-rectal (83). A notre connaissance, cette étude est la première application dans le carcinome rénal à cellules claires.

Une autre limitation de l'immunohistochimie est de définir le seuil permettant de différencier le groupe à risque ou non de récurrence en fonction de l'expression du marqueur. Nous avons ici essayé de rationaliser ce seuil en utilisant l'analyse automatique d'image plutôt qu'une analyse visuelle afin d'obtenir un pourcentage précis plutôt qu'une donnée semi-quantitative subjective. Nous avons ensuite utilisé la méthode du plus petit p des tests log-rank pour définir le meilleur seuil. Dans notre série, 50% pour la Vimentine et 30% pour le CAIX semblaient être les valeurs seuils pertinentes pour différencier les patients à risque ou non. D'autres seuils ont précédemment été rapportés, souvent choisis de manière arbitraire. Le but de notre modèle était d'identifier le groupe de patient à risque de récurrence, indépendamment de leur stade TNM. Afin de limiter le nombre de groupe (patients à haut risque vs bas risque), nous avons combiné le groupe CAIX-/Vimentine+.

Malgré un long suivi de notre cohorte et des résultats robustes confirmés sur les trois analyses de survies et sur l'analyse de sensibilité, notre étude présente quelques limitations. Comme dans toutes les études rétrospectives, il existe un risque de biais de sélection. Au cours de la période d'étude de 11 ans, le suivi variait et quelques différences existaient entre les centres participants. Au cours de cette période, l'avènement des thérapies ciblées a entraîné une augmentation de la survie spécifique et globale des carcinomes rénaux métastatiques. L'exclusion des pT1a a été considérée compte-tenu de la faible prévalence d'évènements métastatiques. Nous ne pouvons cependant pas nier l'intérêt de marqueurs également dans la population pT1a, leur étude nécessiterait cependant une cohorte

beaucoup plus grande. Cette étude est basée sur l'utilisation de TMA avec parfois des délimitations de régions d'intérêt au lieu de l'analyse de la totalité de la surface tumorale réséquée. Ce point pourrait-être une source de variabilité intra/inter observateur. Quelques données telles que l'invasion lympho-vasculaire ou la nécrose n'étaient pas évaluées et n'étaient pas systématiquement rapportées dans les comptes-rendus. Cependant, la classification TNM reste le seul système pronostique universel utilisé en pratique clinique. La taille de notre cohorte était trop petite pour la diviser et tester une cohorte de validation. Bien que cette étude soit déjà une validation de résultats précédemment obtenus, les résultats spécifiques obtenus nécessitent une validation externe et dans l'attente ne peuvent être considérés que comme exploratoires.

## VI. CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons décrit le potentiel des marqueurs immunohistochimiques (CAIX et Vimentine) pour prédire le pronostic des carcinomes rénaux à cellules claires localisés (pT1b-pT3) traités chirurgicalement. Nous décrivons une technique fiable et reproductible pour évaluer l'expression de ces marqueurs permettant une validation externe et une potentielle application en pratique clinique de routine.

# Chapitre 4 EVALUATION DE L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE MOLECULAIRE POUR PREDIRE LA REPOSE AUX THERAPIES CIBLEES DANS LE CANCER DU REIN

Travaux publiés dans Contrast Media & Molecular Imaging (96)

## I. INTRODUCTION

Le carcinome rénal est un cancer chimio et radio-résistant, sa prise en charge thérapeutique a longtemps été limitée à l'extirpation chirurgicale. Le développement des thérapies ciblées au cours des dix dernières années a permis une amélioration forte de la survie des patients au stade métastatique. Le premier essai clinique ouvrant une autorisation de mise sur le marché de thérapie ciblée dans le cancer du rein a été publié en 2007 avec la démonstration de la supériorité du Sunitinib sur l'interféron- $\alpha$  en terme de survie sans progression et de taux de réponse (6). Depuis, de nombreux nouveaux agents ont été validés, ciblant le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) : Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib, Bevacizumab, Axitinib ou la voie impliquant la cible mammalienne de la Rapamycine (mTOR) : Temsirolimus et Everolimus. Grâce à ce nouvel arsenal thérapeutique, les patients peuvent recevoir plusieurs lignes de traitements au cours du suivi de leur pathologie. Pour un meilleur contrôle de la maladie, il serait primordial de pouvoir évaluer le plus précocement possible la réponse tumorale à un agent afin de décider si son administration doit être maintenue ou changer pour un autre. Suivre la réponse tumorale des modèles tumoraux précliniques permet d'améliorer notre compréhension du bénéfice de chaque traitement. L'échographie par agent de contraste (DCE-US) est utilisée depuis de nombreuses années dans l'évaluation de la réponse tumorale (97–100). Récemment, l'imagerie moléculaire s'est développée en recherche préclinique pour l'étude de l'inflammation et de la néo-angiogenèse ouvrant un large champ d'applications (101–104). Cette technique émergente se base

sur le principe d'un suivi affiné du cancer en attachant à l'agent de contraste d'imagerie des molécules ciblant des voies impliquées dans le développement tumoral (105). Cette combinaison du signal d'imagerie et de l'expression moléculaire permet un suivi plus rapide et plus précis de la réponse thérapeutique tumorale.

Plusieurs études précliniques ont évalué l'intérêt potentiel de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) moléculaire ciblant le marqueur  $\alpha\beta3$  afin de suivre la néo angiogenèse dans le mélanome, le carcinome hépatocellulaire ou les artériopathies périphériques (106–108). Le but de cette étude était de proposer un protocole d'imagerie multimodale comprenant de l'échographie de contraste et de l'IRM qui apporte des informations complémentaires sur le statut de la tumeur.

## II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS

L'hypothèse de cette étude est la supériorité de l'IRM moléculaire pour prédire la réponse aux agents ciblés dans le cancer du rein par rapport à l'échographie de contraste.

L'objectif de cette étude était de comparer les méthodes d'imagerie pour prédire la réponse précoce aux thérapies ciblées validées dans le cancer du rein. Nous avons comparé la réponse aux trois agents suivants : Sunitinib, Bevacizumab et Everolimus en utilisant l'échographie de contraste et l'IRM moléculaire ciblant le  $\alpha\beta3$ , une intégrine de l'endothélium impliquée dans la néo angiogenèse.

## III. MATERIEL ET METHODES

Toutes les expériences ont été conduites en accord avec la convention européenne pour la protection des animaux vertébrés utilisés en recherche expérimentale et ont été validées par le comité de recherche animale, CEEA-26 et CEEA-44 (enregistré par le ministère de la recherche français).

L'agent de contraste moléculaire P04000 était fourni par la société Guerbet (Aulnay-sous-Bois, France) : dépôt de brevet US 2015/0320889 A1 intitulé "vectorised magnetic emulsion" datant du 12 Novembre 2015.

## **A. SOURIS ET MODELE TUMORAL**

Vingt-quatre souris nues immunodéficientes (âgées de 6-8 semaines) étaient prises en charge dans l'animalerie de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) en accord avec les protocoles institutionnels pour le bien-être animal. Les cellules tumorales rénales humaines A498 (ATCCHTB-44, American Type Culture Collection, Manassas, USA) étaient cultivées dans le milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) supplémenté par du FBS 10% (sérum bovin fœtal). L'expérimentation commençait 30 jours après l'inoculation sous-cutanée dans le flanc droit des souris de  $3 \times 10^6$  cellules dans 100uL de matrice Corning Matrigel (Corning, Tewksbury, USA).

## **B. TRAITEMENT**

Les souris étaient randomisées en 4 groupes de 6 souris. Le groupe contrôle recevait une solution saline quotidienne. Les groupes traités recevaient du Sunitinib (SUTENT, Pfizer, New York City, New York, USA) à la dose de 40mg/kg, de l'Everolimus (AFINITOR, Novartis, Basel, Suisse) à la dose de 10mg/kg ou du Bevacizumab (AVASTIN, Genentech/Roche, Basel, Suisse) à la dose de 5mg/kg. Tous les traitements étaient administrés quotidiennement pendant 4 jours par voie orale en gavage à l'aide de canules souples sauf le Bevacizumab administré en intrapéritonéal 2 jours consécutifs.

## **C. PROTOCOLES D'IMAGERIE**

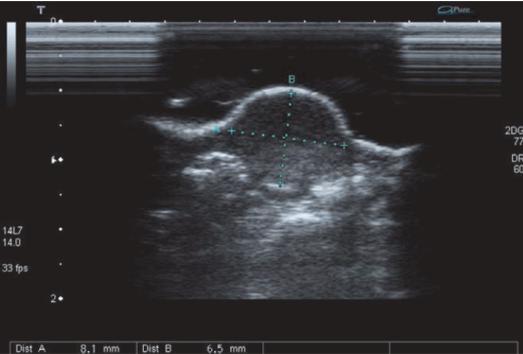
L'évaluation de l'efficacité thérapeutique était basée sur deux techniques, l'échographie de contraste ou l'IRM moléculaire à l'initiation du traitement (J0) et 4 jours après l'initiation du traitement (J4). A chaque session d'imagerie, l'animal était anesthésié à l'aide d'isoflurane et la

température corporelle était maintenue constante au cours de la procédure. Les paramètres d'acquisitions optimisés sont restés les mêmes pour toutes les procédures d'échographie ou d'IRM. Les images étaient tout d'abord scannées en échographie bidimensionnelle à l'aide de l'appareil Aplio (Toshiba, France) pour mesurer le volume tumoral en mode B (Figure 1-a) et le nombre de vaisseaux intra-tumoraux à l'aide du mode doppler pulsé (Figure 1- b) avec une sonde de 14MHz (PLT-1204AT, Toshiba, France). Les procédures et techniques d'imagerie complète ont été décrites précédemment (109,110). Le nombre de vaisseaux tumoraux au sein du volume tumoral était défini comme le nombre moyen de vaisseaux évalués dans les plans longitudinal et axial. Ensuite, l'évaluation de la micro vascularisation tumorale était réalisée à l'aide d'une sonde spécifique (émission à 2.6MHz et réception à 5.2 MHz) (PLT-604AT, Toshiba, France) détectant le contraste des microbulles après injection d'un bolus de 100uL de Sonovue (Bracco, Italie). La prise de contraste était enregistrée pendant 3 minutes puis quantifiée sur toute la section tumorale à l'aide d'un logiciel spécifique (CHI-Q, Toshiba, France). Deux paramètres de perfusion semi-quantitatifs étaient déduits à partir des courbes temps-intensité : l'intensité maximale du rehaussement et l'aire sous la courbe comme décrit précédemment (110).

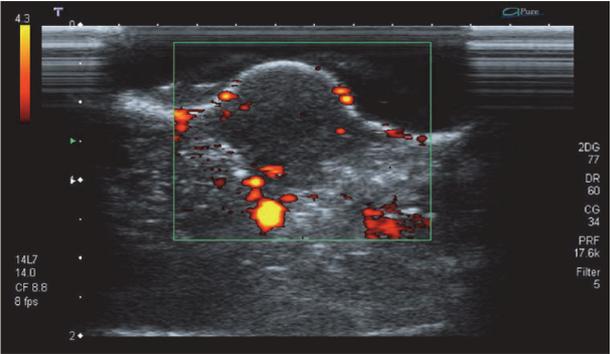
L'imagerie par résonance magnétique était réalisée à l'aide d'un appareil clinique de 1.5Tesla (Philips Achieva, CIERM) de 60cm de calibre et une bobine conventionnelle de 23mm de diamètre en réception. L'agent de contraste utilisé était le P04000 (Chematech/Guerbet, France), un agent de contraste ciblant l'intégrine  $\alpha\beta3$  surexprimé dans les néo-vaisseaux. P04000 est une nanoémulsion fonctionnant avec le tri peptide RGD liant  $\alpha\beta3$  et contenant des particules d'oxyde de fer profilées pour les séquences T2\* w MR (imagerie à susceptibilité pondérée). Les mesures des taux de relaxation R2\* étaient effectuées par une séquence écho multi écho 3D gradient pondéré en T2\*, permettant une sensibilité aux USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxyde contrast agent) induisant des effets de relaxation apparent. Le DSC-MR (dynamic susceptibility contrast- magnetic resonance) (figure 2) était réalisé durant une heure suivant l'injection de produit de contraste, par la répétition d'un mapping T2\* (3D 0.5mm séquence isotropique TR/ TE/ dTE = 90/5.9/9.7 msec, 6 échos, 0.3\*0.3\*0.5mm3 taille de reconstruction voxel, 220Hz/pixel, et Tacq = 4.2min), avant et

après injection de 100 umol Fe/kg de nanoémulsion USPIO par souris. Les images étaient traitées avec le logiciel Matlab (2011B, Mathworks, Natick, MA, USA). Pour reconstruire les cartes des taux de relaxation  $R2^*$  ( $=1/T2^*$ ), les 6 signaux écho  $S(TE)$  étaient ajustés au niveau des voxels à l'aide d'un algorithme non linéaire basé sur la méthode des moindres carrés vers une courbe décroissante exponentielle à deux paramètres, basé sur l'équation suivante :  $S(TE) = A * e^{-TE * R2^*}$  avec A et  $R2^*$  les paramètres inconnus. Les moyennes  $\Delta R2^*$  pré et post variations ( $R2^*$  pre –  $R2^*$  post) étaient suivies tout au long d'une heure afin de quantifier la fixation de l'agent de contraste au marqueur cible. Effectivement, dans un modèle simplifié,  $R2^*$  augmente linéairement avec la quantité d'agent de contraste de telle sorte que  $\Delta R2^*$  est directement proportionnel à la fixation d'agent de contraste.

Figure 1 : Volume tumoral évalué en échographie mode-B (a). Evaluation du nombre de vaisseaux intra-tumoraux à l'aide de l'imagerie doppler (b)

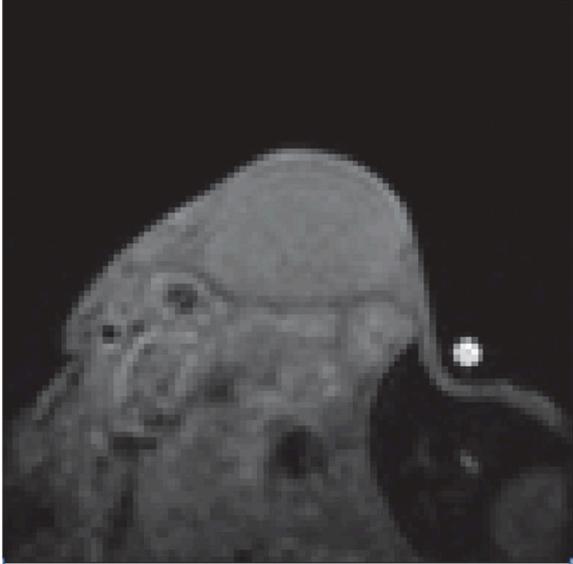


(a)

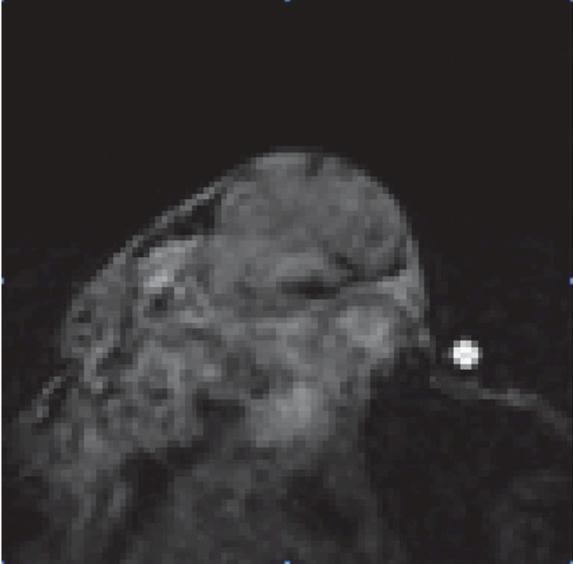


(b)

Figure 2 : Mesure de la susceptibilité de contraste dynamique en résonance magnétique (DSC-MR) durant 1 heure par répétition des acquisitions  $T2^*$ . Acquisition pré-injection (a) et une heure après injection (b)



(a)

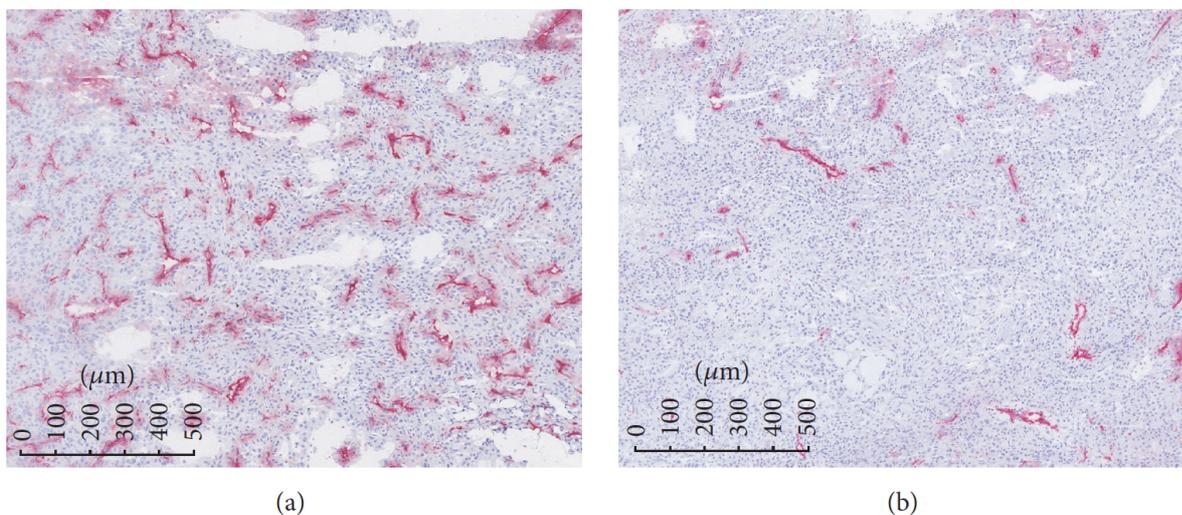


(b)

#### D. IMMUNOHISTOCHIMIE

Les analyses d'immunohistochimie étaient réalisées sur les tumeurs issues des groupes traités et contrôle à J4, après la session d'imagerie. Le tissu tumoral était d'abord enrobé dans un milieu gélifié (CryomatrixOCT compound, Thermo Fisher Scientific, USA) puis congelé dans de l'azote liquide. Les échantillons étaient ensuite coupés en tranche de 7-8µm d'épaisseur, aussi près possible de la plus large tranche de section tumorale correspondant à l'image acquise en écho de contraste et IRM. Une coloration à l'hématoxyline et éosine était effectuée pour vérifier l'architecture tumorale. Deux tranches étaient marquées au CD31 (anticorps monoclonaux rat anti-souris CD31 1 : 200, clone mec13-3, BD Pharmingen, USA) afin de détecter les cellules endothéliales (figure 3). La totalité de la tranche tumorale était numérisée pour chaque animal à l'aide du scanner Nanozoomer (Hamamatsu). La quantification des vaisseaux marqués au CD31 était réalisée sur l'analyse de la tranche tumorale complète en utilisant le logiciel Calopix (Tribvn, France).

Figure 3 : Marquage CD31 des tranches tumorales (Grossissement \*20) dans le groupe contrôle (a) et dans le groupe Bevacizumab (b)



## E. ANALYSES STATISTIQUES

Du fait du nombre limité d'échantillons par groupe, tous les tests de cette étude étaient non paramétriques. Les données entre les différents groupes de souris étaient comparées à l'aide des tests de Wilcoxon ou de Kruskal-Wallis. Les données au sein d'un même groupe étaient comparées avec un test de Wilcoxon pour échantillons appariés.

## IV. RESULTATS

Six souris par groupe étaient évaluées par échographie de contraste et IRM moléculaire à J0 et J4. La figure 4 représente l'évolution du volume tumoral (a) et de la densité vasculaire intra-tumorale (b) entre J0 et J4 mesurée par écho-doppler pour les 4 groupes. Il n'existait pas de différence significative entre les 4 groupes à J0 alors qu'à J4, le groupe contrôle présentait des volumes significativement supérieurs aux groupes traités ( $p=0.01$ ). Le volume tumoral est resté stable dans le groupe Bevacizumab alors qu'il a légèrement augmenté dans les groupes Everolimus et Sunitinib. La densité vasculaire intra-tumorale évaluée en doppler n'était pas significativement différente

entre les 4 groupes à J0 alors qu'elle était significativement plus faible dans les groupes traités que dans le groupe contrôle à J4 ( $p=0.008$ ). Le groupe Bevacizumab présentait un nombre de vaisseaux plus faible à J4 mais cette différence intra-groupe n'était pas significative.

Les paramètres de perfusion, le pic d'intensité et l'aire sous la courbe sont représentés sur la figure 5. Ces deux paramètres ont été quantifiés car ils reflètent les modifications de rehaussement au cours du traitement et il a été démontré qu'ils représentent un critère valide de réponse thérapeutique dans des études préclinique et clinique (109,111). Il n'existait pas de différence significative entre le pic d'intensité ( $p=0.9$ ) et l'aire sous la courbe ( $p=0.9$ ) à J0 entre les différents groupes. Cela témoigne de groupe homogène pour la micro vascularisation tumorale pré traitement et les bolus d'agent de contraste injectés entre les différentes souris. A J4, les deux paramètres présentaient des valeurs moyennes plus élevées qu'à J0 dans le groupe contrôle et le groupe Everolimus mais ces variations n'étaient pas significatives. A l'inverse, ces valeurs étaient diminuées dans les groupes Sunitinib et Bevacizumab. Cette baisse n'était cependant significative que dans le groupe Bevacizumab : Pic Intensité ( $p=0.03$ ) et Aire sous la Courbe ( $p=0.04$ ). A J4, les valeurs du groupe Bevacizumab étaient significativement différentes du groupe contrôle (Pic Intensité  $p=0.004$ , Aire sous la Courbe  $p=0.008$ ) et du groupe Everolimus (Pic Intensité  $p=0.006$ , Aire sous la Courbe  $p=0.008$ ). Ces résultats sont cohérents avec les données d'un essai clinique qui a mis en évidence la modification de la vascularisation tumorale dès 3 jours après administration de Bevacizumab chez de patients atteints de carcinome hépatocellulaire, ces données précoces pourraient être prédictive de la réponse tumorale à deux mois en terme de survie sans progression et survie globale (112).

En plus de l'échographie de contraste, l'efficacité thérapeutique était donc également évaluée en IRM moléculaire par la mesure de  $\Delta R2^*$  une heure après injection de l'agent de contraste P04000 permettant donc de déduire la fixation au récepteur  $\alpha v\beta 3$ . Les profils des valeurs  $\Delta R2^*$  moyennes pour chaque groupe en fonction du temps sont représentées sur la figure 6 ( $n=6$  souris par groupe) pour J0 (a) et J4 (b). Les valeurs moyennes +/- déviations standards de  $\Delta R2^*$  ( $s^{-1}$ ) mesurées à 1 heure sont reportées dans le tableau 1. Comme pour les mesures d'échographie de contraste, il

n'existait pas de différence significative à J0 entre les 4 groupes ( $p=0.99$ ) ou entre les souris de chaque groupe confirmant une bonne homogénéité de mesure et des bolus d'agent de contraste injectés.

À J4,  $\Delta R2^*$  était significativement différent entre les 4 groupes ( $p=0.04$ ). Le groupe Everolimus présentait des valeurs à J4 diminuées par rapport à J0. Les groupes Everolimus ( $p=0.009$ ) et Bevacizumab ( $0.048$ ) présentaient des valeurs significativement plus basses à J4 que le groupe contrôle.

La micro vascularisation tumorale déduite de la quantification des vaisseaux marqués CD-31 en immunohistochimie était exprimée en pourcentage de surface marquée rapportée au pourcentage de la surface totale. Il n'existait pas de différence entre le groupe Everolimus ( $2.14\% \pm 0.40\%$ ) et le groupe contrôle ( $2.72\% \pm 0.41\%$ ). Ce paramètre était par contre significativement diminué ( $p<0.01$ ) dans les groupes Sunitinib ( $1.28\% \pm 0.05\%$ ) et Bevacizumab ( $1.13\% \pm 0.52\%$ ). Il n'existait pas de corrélation significative entre la densité micro vasculaire et les données d'IRM moléculaire. En revanche, il existait une corrélation significative entre la densité micro vasculaire et les données d'échographie moléculaire pour le Pic d'Intensité ( $R= 0.87$ ,  $p= 0.0003$ , figure 7-a) et pour l'Aire sous la Courbe ( $R= 0.81$ ,  $p= 0.0013$ , figure 7-b).

Figure 4 : Volume tumoral évalué par échographie à J0 et à J4 après initiation du traitement. Nombre de vaisseaux intra tumoraux évalué par imagerie doppler pulsé à J0 et à J4. Valeurs moyennes +/- déviations standards \*p<0.01.

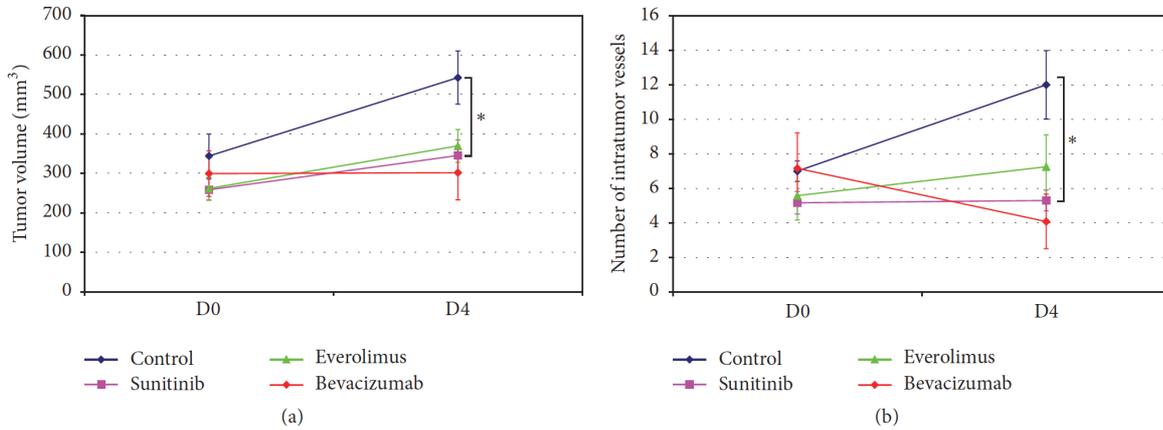


Figure 5 : Valeurs moyennes +/- déviations standards (a.u., unités arbitraires) pour le Pic d'Intensité et l'Aire sous la Courbe (AUC) des 4 groupes à J0 et J4 après initiation du traitement. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

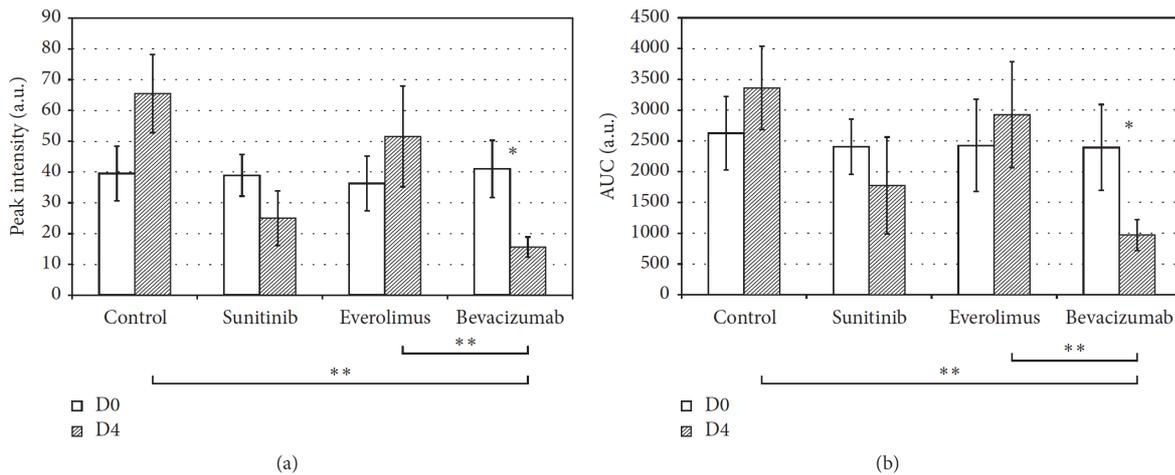


Figure 6 : Profils de  $\Delta R2^*$  (moyennes +/- déviations standards) au cours du temps au cours de la première heure suivant l'injection de l'agent de contraste P04000 pour les 4 groupes à J0 (a) puis J4 après initiation du traitement (b).

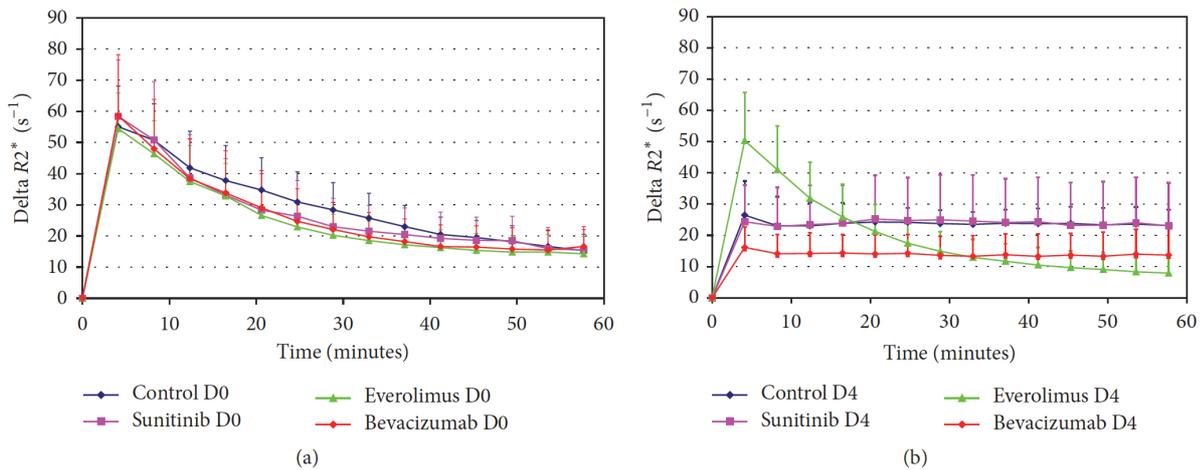
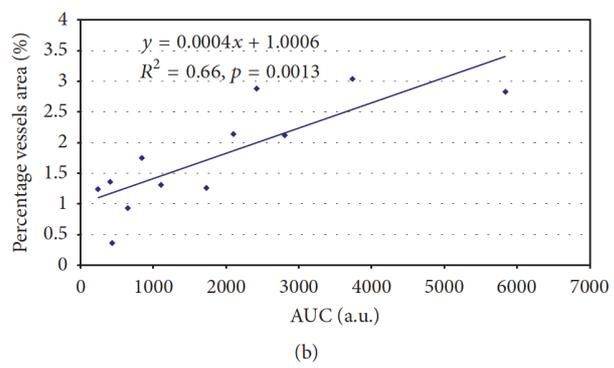
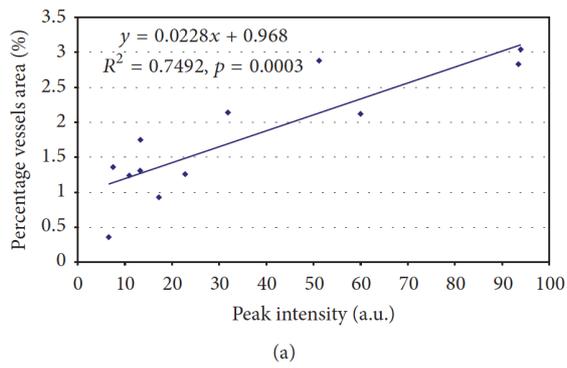


Tableau 1 : Valeurs moyennes +/- déviations standards de  $\Delta R2^*$  ( $s^{-1}$ ) à 1 heure post injection pour les 4 groupes à J0 et J4 après initiation du traitement

	$\Delta R2^*$ ( $s^{-1}$ )	
	D0	D4
Control	$15.3 \pm 5.2$	$23.1 \pm 5.1$
Sunitinib	$15.4 \pm 6.7$	$23.0 \pm 13.8$
Everolimus	$14.3 \pm 5.6$	$7.9 \pm 4.8$
Bevacizumab	$16.6 \pm 6.3$	$13.6 \pm 8.9$

Figure 7 : Corrélation entre la densité micro vasculaire en immunohistochimie par marquage CD-31 (%) et les paramètres d'échographie moléculaire : pic d'intensité (PI, a.u., unités arbitraires, a) et aire sous la courbe (AUC, b). Les données de l'équation de régression linéaire avec coefficient de détermination  $R^2$  et p sont indiqués.



## V. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons démontré, sur un modèle expérimental *in vivo*, la capacité de l'IRM métabolique ciblant le marqueur  $\alpha v\beta 3$  à détecter la réponse micro vasculaire tumorale à l'Everolimus et au Bevacizumab alors que l'échographie de contraste ne permet de détecter que la réponse au Bevacizumab.

La néo angiogenèse est une caractéristique primordiale du développement du cancer. Elle est la cible plus ou moins directe des thérapies ciblées systémiques utilisées dans le cancer du rein métastatique. La capacité de l'échographie de contraste à prédire la réponse aux traitements anti-angiogéniques dans le cancer du rein métastatique a déjà été explorée dans plusieurs essais cliniques. Ces essais ont mis en évidence le potentiel de cette technique à différencier les patients répondeurs vs. non répondeurs à un stade plus précoce que les autres techniques d'imagerie conventionnelles (113). L'IRM avec agent de contraste a également été étudié,  $K_{trans}$  est généralement le paramètre analysé (114–116). Ce paramètre a été rapporté dans un essai clinique randomisé comme un marqueur pharmacodynamique de la réponse au Sorafenib (114). Cependant, ces essais cliniques n'ont évalué que la réponse aux traitements anti-angiogéniques, c'est à dire le Bevacizumab ou les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI): Sunitinib ou le Sorafenib.

Contrairement au Bevacizumab ou au TKI, les traitements mTOR ne ciblent pas directement la voie VEGF mais interagissent indirectement sur l'angiogenèse par le biais la traduction des ARNm du Facteur Induit par l'Hypoxie (117). Ils sont indiqués dans les cancers du rein métastatiques de mauvais pronostic (Temsirrolimus) ou après échec des TKI (Everolimus) (64). Une évaluation précoce de leur efficacité serait particulièrement bénéfique en pratique clinique afin d'éviter des traitements inefficaces pour le patient et donc une perte de temps et des surcoûts inutiles.

L'intégrine endothéliale  $\alpha v\beta 3$  interagit avec VEGFR2 dans le déroulement de la néo angiogenèse après activation en amont par les cellules tumorales (118). Elle joue également un rôle dans le développement de la capacité d'ancrage des cellules tumorales, une caractéristique primordiale dans

la progression tumorale (119). En 1998, Sipkins et al ont pour la première fois décrivent le monitoring de la néo angiogenèse tumorale in-vivo en par IRM utilisant un produit de contraste ciblant le  $\alpha v\beta 3$  (120). A notre connaissance, l'IRM moléculaire en général et cette technique plus particulièrement, n'avaient jamais été explorés dans l'évaluation des réponses aux thérapies systémiques dans le cancer du rein. Nous avons montré dans cette étude que la différence dans le taux décroissance par seconde ( $\Delta R2 * s^{-1}$ ) avant et après injection de l'agent de contraste ciblant le  $\alpha v\beta 3$  était significativement diminuée dans les groupes Bevacizumab et Everolimus par rapport au groupe placebo. Ce résultat était mesuré à peine 4 jours après initiation du traitement et était corrélé au taux de croissance tumoral. Ce résultat suggère une modification précoce de la maturation vasculaire après administration de ces agents. L'atténuation du signal après injection de cet agent de contraste ciblé pourrait être un marqueur potentiel, en association avec  $K_{trans}$  pour prédire de manière précoce la réponse tumorale à l'introduction de ces nouveaux traitements ciblés. L'IRM présente plusieurs avantages comme technique d'imagerie : absence de rayons ionisants, les séquences injectées peuvent être combinées à l'analyse de la mobilité des molécules d'eau (diffusion), et la spectrométrie par résonance magnétique permet l'évaluation de la composition chimique des tissus et de repérer les régions hypoxiques (121). Ces réglages multiparamétriques permettent l'obtention d'informations multiples sur la tumeur à partir d'un seul examen. Cependant, l'IRM est plus chronophage que le scanner et l'échographie, ce qui implique un accès plus limité à cette technique. La standardisation des procédures est compliquée. Enfin, la corrélation entre le signal d'imagerie et la concentration en marqueur n'est pas aussi évident qu'avec les données du scanner (122).

Un intérêt particulier de cette étude est la détection précoce du signal d'imagerie 4 jours après l'initiation du traitement. En pratique clinique, la réponse tumorale au traitement repose largement sur l'évaluation de la taille tumorale selon les critères d'évaluation des tumeurs solides (RECIST) (123). Ce critère consensuel est basé sur la mesure du diamètre le plus large de la tumeur (ou de la métastase). La réponse peut être complète (disparition de la maladie), partielle (plus de 30% de diminution), montrer une maladie progressive (plus de 20% d'augmentation) ou stable (entre les

deux). Le problème est le délai entre l'induction du traitement et son effet sur la morphologie tumorale et la diminution de la masse. Durant cet intervalle, il est impossible pour le clinicien se fiant aux critères RECIST de différencier les répondeurs des non répondeurs. De plus, la fibrose et la nécrose induite par les thérapies ciblées n'entraînent pas forcément de diminution de la taille tumorale alors qu'elles ne peuvent pas être considérées comme de la tumeur active. Les modifications métaboliques induites par les agents ciblés dans la tumeur, et plus particulièrement dans les voies de la néo angiogenèse et de leurs signaux d'induction précèdent les modifications de taille. Cette détection plus précoce de la réponse thérapeutique pourrait permettre une amélioration du traitement personnalisé des patients qui bénéficieraient d'un changement immédiat de leur stratégie thérapeutique. Un autre bénéfice attendu de cette technique est un impact financier positif lié à l'économie de l'administration de traitements coûteux inefficaces. Bien que non évalué dans le cadre de cette étude, le suivi de la modification du signal lié à  $\alpha\beta 3$  corrélé aux modifications de taille tumorale permettrait d'évaluer le potentiel de ce marqueur à détecter une résistance au traitement.

Cette étude présente plusieurs limites : s'agissant d'un essai préclinique, le nombre de souris inclus dans la cohorte est limité. Par ailleurs, nous avons utilisé un modèle in vivo par xénogreffe sous-cutané de la lignée cellulaire A498. Bien que ce modèle soit fréquemment utilisé, des variations avec les résultats d'essais cliniques en aval ont souvent été décrites. Des conclusions définitives nécessitent donc évidemment des validations cliniques.

## VI. CONCLUSION

Nous avons décrit dans cette étude une détection précoce des modifications de la voie de la néo angiogenèse après induction de thérapies ciblées grâce à l'échographie de contraste et à l'IRM moléculaire ciblant le marqueur  $\alpha\beta 3$ . Ces résultats devraient encourager le développement d'essais cliniques afin de mieux évaluer le potentiel de ces techniques d'IRM moléculaire.



# **CHAPITRE 5 : ECHOGRAPHIE MOLECULAIRE DANS LE CANCER DU REIN – SURVEILLANCE D’UN TRAITEMENT CIBLANT LE VEGFR PAR DES MICROBULLES CIBLEES DANS UN MODELE PRECLINIQUE MURIN DE XENOGREFFES ISSUES DE PATIENTS**

## **I. INTRODUCTION**

Le développement récent d’un large arsenal thérapeutique pour la prise en charge systémique des cancers du rein métastatique impose l’utilisation de marqueurs fiables, robustes et simples d’accès afin d’apprécier au mieux la réponse du patient à l’instauration d’un nouveau traitement. Cette évaluation pourrait permettre de minimiser les risques d’effets secondaires mais également de minimiser les coûts et la perte de temps liée à un traitement inefficace et pouvoir ainsi proposer un nouveau choix thérapeutique.

Les traitements systémiques ciblant la voie VEGFR tel que le Sunitinib sont recommandés en première ligne pour la prise en charge des carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques (11). Il n’existe actuellement aucun marqueur validé permettant de prédire la réponse aux thérapies ciblant le VEGFR dans le carcinome rénal. L’évaluation de la réponse thérapeutique est basée sur l’évolution du volume tumoral en scanner selon les critères RECIST (124).

L’échographie est une technique d’imagerie simple d’utilisation, relativement peu coûteuse, transportable, sans rayons ionisants et permettant une analyse instantanée des tumeurs.

L’échographie de contraste basée sur l’injection de microbulles a démontré son intérêt potentiel pour prédire la réponse des carcinomes rénaux métastatiques au Sunitinib dans des essais cliniques (99,111). Plusieurs études se sont intéressées à l’échographie moléculaire ciblant le VEGFR-2 pour prédire la réponse aux thérapies ciblées (125–134). Cependant, à notre connaissance, aucune recherche n’a été faite sur les marqueurs FSHR et VEGFR-1 en échographie moléculaire.

## II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS

L'hypothèse de cette étude est que les modifications moléculaires consécutives à l'introduction d'un traitement ciblant le VEGFR apparaissent avant les modifications vasculaires et morphologiques.

Les signaux d'échographie moléculaire ciblant les marqueurs FSHR et VEGFR-1 devraient donc être significativement inférieurs dans des groupes traités par Sunitinib par rapport à des groupes contrôles.

L'objectif est de démontrer une expression différentielle des marqueurs FSHR et VEGFR-1 entre des groupes traités par Sunitinib et des groupes contrôle au cours du suivi longitudinal d'un traitement de 4 semaines. Nous avons utilisé des modèles murins de modèle de cancer du rein à cellules claires par greffe tumorale dérivée des patients (PdX).

## III. MATERIEL ET METHODES

### A. ANIMAUX

Le protocole d'expérimentation animale a été approuvé par le CEEA26 (Comité Ethique en Expérimentation Animale) et le Ministère de l'Agriculture (n° registre : APAFIS#8963-2017022014433962) et réalisé selon les conditions établies par la Communauté Européenne (Directive 2010/63/UE). Trente-trois souris femelles

Balb/c Rag2-/- $\gamma$ c-/-, fortement immunodéficientes, ont été choisis afin de permettre un taux de croissance tumorale des xénogreffes maximal. Les souris proviennent et ont été hébergées au sein de l'animalerie de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France).

### B. MODELE DE CARCINOME RENAL PAR XENOGRFFE DERIVEE DE PATIENTS (PdX)

La méthode de transplantation tumorale du patient vers les souris immunodéficientes selon la technique de greffe de tranches tissulaires a été exhaustivement décrite dans des travaux précédents

(135). En résumé, une carotte de 8mm de diamètre était prélevée dans une zone non kystique et non nécrotique d'une tumeur rénale fraîche juste après extirpation chirurgicale. La carotte était ensuite sectionnée en tranches homogènes de 300µm d'épaisseur à l'aide d'un appareil spécifique (Krumdieck tissue slicer, Alabama Research). Chaque tranche était ensuite implantée sous la capsule rénale gauche d'une souris sous anesthésie et sous condition stérile. La prise de greffe était ensuite suivie par échographie hebdomadaire puis, lorsque le greffon apparaissait dans la majorité de la cohorte, une IRM était réalisée afin de mesurer précisément le volume tumoral. Une seconde IRM était réalisée en fin de protocole, après 4 semaines de traitement par Sunitinib, juste avant le sacrifice des souris de la cohorte.

### **C. PROTOCOLE DE TRAITEMENT**

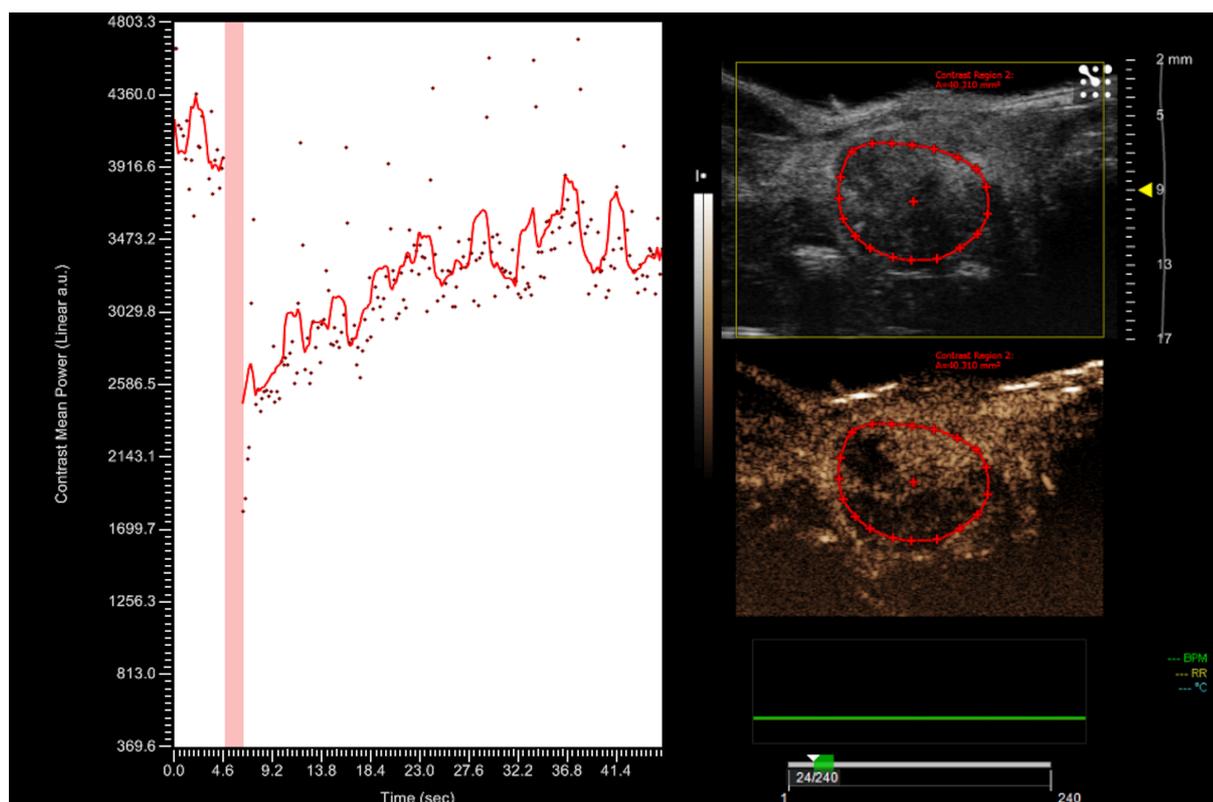
Le protocole démarrait lorsque le greffon tumoral était mesurable en IRM et en échographie. Chaque cohorte était alors divisé en deux groupes homogènes : un premier groupe recevant une solution témoin (méthocel 0,5%, solution de dilution) et le second recevant du Sunitinib (Sutent, Pfizer, NY, Etats-Unis) à la dose de 80mg/kg. Le Sunitinib et le témoin étaient administrés par voie orale, en gavage, 5 jours par semaine pendant 4 semaines.

### **D. ECHOGRAPHIE MOLECULAIRE ET QUANTIFICATION DES MARQUEURS**

Les sessions d'imagerie étaient réalisées sur un système dédié au petit animal (VEVO®2100, VisualSonics, Canada), à l'aide d'une sonde linéaire de fréquence centrale 21MHz (MS-250, VisualSonics, résolution latérale et axiale respectives de 165 et 75µm). Avant chaque session d'imagerie, les souris étaient anesthésiées par inhalation d'isoflurane 2%. Au cours de l'acquisition, la température corporelle était mesurée et maintenue constante à l'aide d'un plateau chauffant (Bioseb, France). Les volumes tumoraux étaient évalués en mode-B 2 dimensions (2D) comme décrit dans la littérature (109,110). L'échographie moléculaire et la quantification des marqueurs étaient réalisées sur la coupe transverse la plus large de chaque tumeur en 2D (Figure 1). Les agents de contraste (MicroMarker, Visualsonics, Canada) étaient injectés au volume de 50µL dans la veine

rétro-orbitaire. Trois injections successives ont été réalisées : microbulles non ciblées, microbulles ciblant le VEGFR-1 ou le FSHR. Chaque ampoule d'agent de contraste ciblé (Target-Ready) était préparée en ajoutant 20mg d'anticorps biotinilé (VEGFR-1 ou FSHR) dans 1mL de solution saline (NaCl 0,9%). Un intervalle de 30 minutes entre chaque injection d'agent de contraste permettait une résorption complète des microbulles injectées précédemment dans le système vasculaire comme décrit dans des précédentes études (136). L'intensité du signal de l'agent de contraste était enregistré au cours du temps. Le signal d'échographie moléculaire était enregistré 10 minutes après le bolus d'injection permettant ainsi aux microbulles ciblées de se fixer sur le marqueur de la surface endothéliale vasculaire. Le signal du biomarqueur était estimé à l'aide du logiciel VEVO®2100 permettant une quantification sur toute la surface tumorale analysée. Le résultat exprimé (en unités arbitraires) était le rehaussement ciblé différentiel (DTE). Cette valeur indique la quantité de microbulles adhérentes au marqueur sur la surface vasculaire endothéliale de la zone étudiée. Le DTE est calculé en faisant la différence du signal de l'agent de contraste avant (signal lié aux microbulles circulantes et adhérentes) et après (signal lié uniquement aux microbulles circulantes) l'émission d'un signal de forte puissance acoustique permettant la destruction des microbulles dans le plan d'examen (Figure 1), comme précédemment décrit (136). L'estimation échographique des volumes tumoraux et le signal d'imagerie moléculaire étaient mesurés dans les deux groupes contrôle et Sunitinib à l'initiation du traitement (J0) puis à 7, 14 et 28 jours après l'initiation.

Figure 1 : Exemple d'échographie moléculaire pour la mesure de l'expression du marqueur FSHR à J14. Le mode B en 2 dimensions (en haut à droite) permet l'estimation du volume tumoral par mesure des dimensions de la tumeur dans les plans longitudinal et transversal (longueur, largeur, épaisseur). La prise de contraste (intensité du signal en mode harmonique en fonction du temps) est enregistrée dès l'injection des agents de contraste puis 10 minutes après injection pour estimation du marqueur ciblant le FSHR (en bas à droite). Après contournage de la région d'intérêt correspondant aux limites tumorales, le logiciel VEVO LAB permet la quantification du signal sur toute la durée de l'analyse. Le rehaussement ciblé différentiel est estimé par la différence de signal avant et après le burst de destruction (colonne verticale sur le graphe). Cette différence revient à soustraire le signal lié aux microbulles circulantes et ainsi déduire le signal lié aux microbulles fixées au marqueur FSHR.



## E. ANALYSES STATISTIQUES

Nous avons modélisé les taux de croissance des tumeurs à partir des 4 points de mesures J0, J7, J14 et J28. Nous avons utilisé un modèle exponentielle  $V_i(t) = V_i^0 \exp(a_i t)$ . S'agissant d'un modèle linéaire généralisé, nous avons estimé les coefficients de croissance  $a_i$  et la valeur origine  $V_i^0$  par la méthode des moindres carrés. L'ajustement du modèle était estimé par calcul du R2 et du R2 ajusté. L'efficacité du Sunitinib était évaluée par un test de Student comparant les moyennes des taux de croissances  $a_i$  entre les groupes traités par Sunitinib et les groupes traités par la solution contrôle. La différence était considérée comme significative et donc le traitement efficace lorsque  $p < 0.05$ .

Au sein des groupes traités par le Sunitinib nous avons défini les souris répondeuses et non répondeuses en fonction des taux de croissance. Nous avons ainsi défini une souris comme non répondeuse lorsque son taux de croissance n'était pas significativement différent du groupe non traité.

Nous avons ensuite étudié (analyse principale) l'expression différentielle des marqueurs FSHR et VEGFR-1 en échographie moléculaire en comparant sur chaque point de mesure les DTE entre les groupes traités par Sunitinib et contrôle puis entre les souris répondeuses et non répondeuses.

En analyse secondaire, nous avons comparé les expressions longitudinales des marqueurs entre les souris répondeuses et non répondeuses. S'agissant d'une analyse a posteriori, les groupes initiaux ne sont pas homogènes. Les expressions des marqueurs ont donc été normalisées aux valeurs J0 afin de pouvoir comparer les groupes.

## IV. RESULTATS

### A. COHORTES ET CROISSANCE TUMORALE

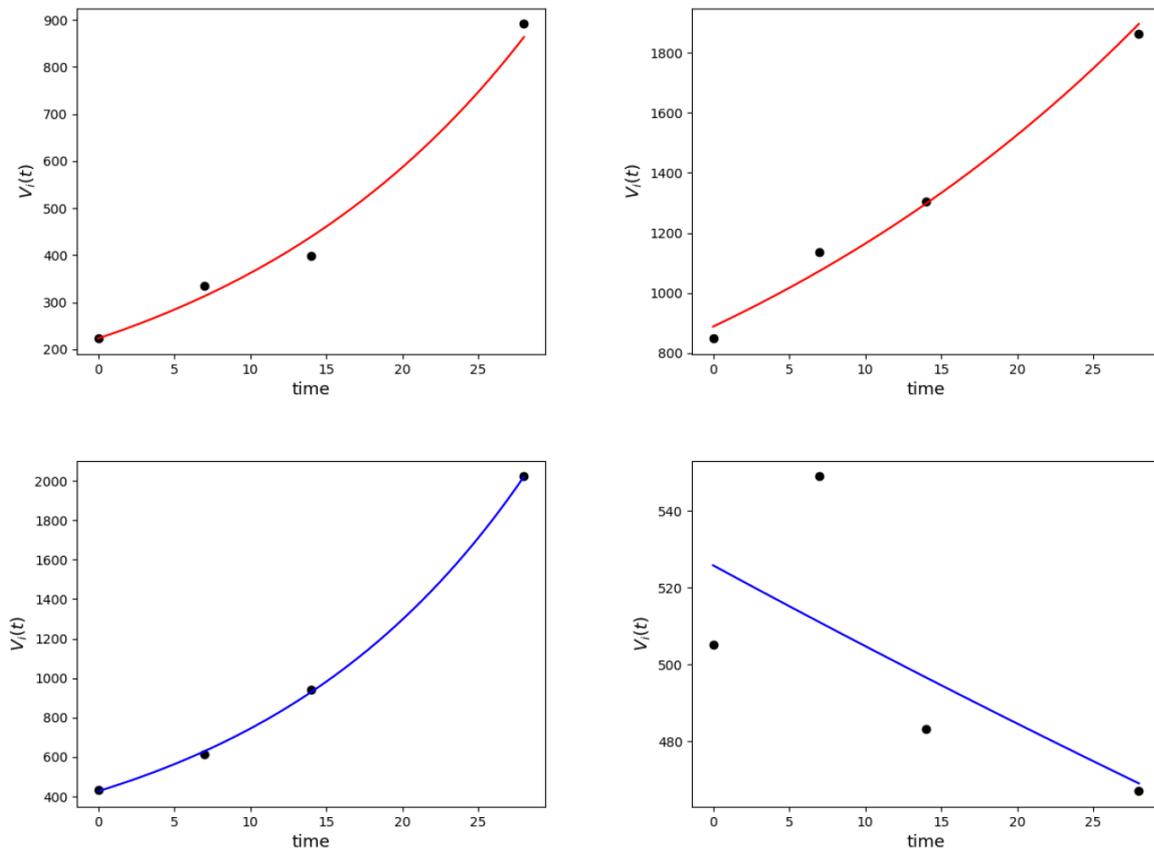
Trois tumeurs rénales ont été prélevées après extirpation chirurgicale (néphrectomies élargies) afin de former trois cohortes expérimentales. Au total 33 souris ont été greffées et incluses dans le protocole. Les caractéristiques des tumeurs et des cohortes sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des tumeurs prélevées et des cohortes transplantées

Cohorte	TUMEUR DU PATIENT					COHORTE TRANSPLANTEE			
	Stade T	Stade N	Stade M	Grade de Fürman	Type histologique	Taille de la cohorte n=	Taux de croissance moyen groupe <b>Sunitinib</b>	Taux de croissance moyen groupe <b>contrôle</b>	p-valeur
1	1b	1	1	4	Cellules claires	12	0.009	0.033	0.006
2	4	0	1	4	Cellules claires Rhabdoïde 50% Sarcomatoïde 15%	14	0.003	0.045	0.031
3	3a	2	1	4	Cellules claires Rhabdoïde 50%	7	0.025	0.038	0.183

Le modèle de régression a montré un bon ajustement entre le modèle de régression simulé et les points de mesure des volumes tumoraux ( $R^2$  moyen 0.72, moyenne des  $R^2$  ajustés 0.58), le modèle de croissance s'avère bien plus performant pour les souris non traitées ( $R^2$  moyen 0.9) il l'est naturellement moins lorsque la croissance se stabilise après instauration du traitement ciblé. La figure 2 montre les exemples de courbes modélisées et les points de mesures pour 4 souris.

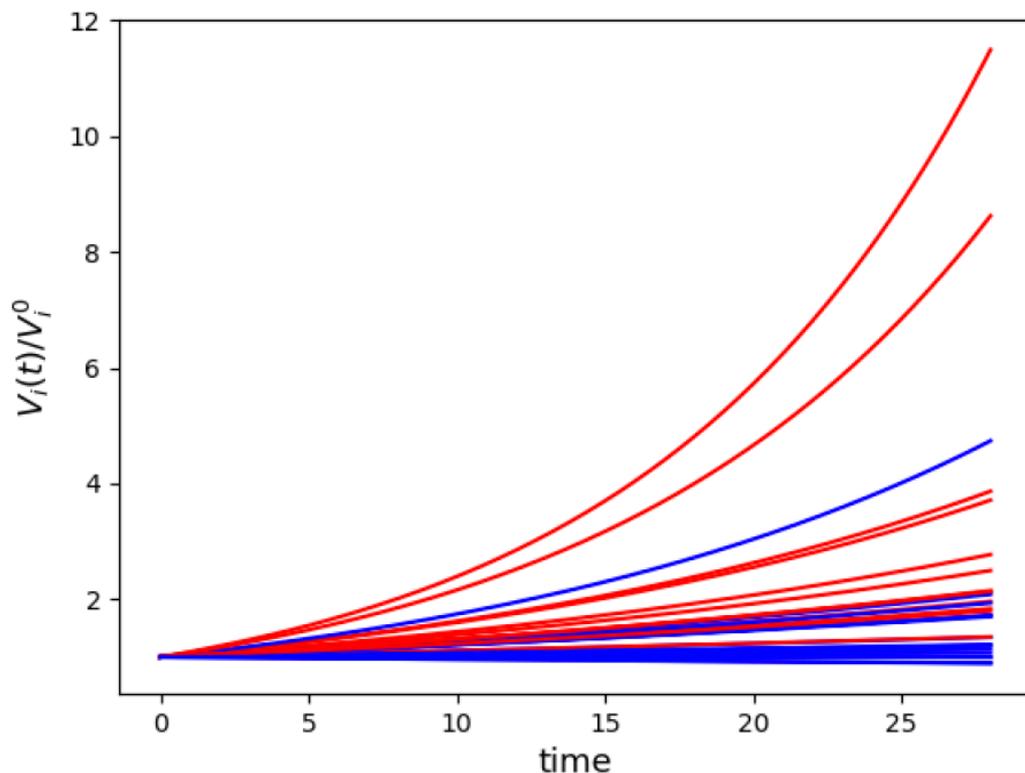
Figure 2 : Courbes des volumes tumoraux en fonction du temps. Exemples des courbes de régression du modèle de croissance tumorale pour 4 souris. Les points noirs représentent les mesures de volume écho et les courbes représentent les modèles de régressions simulés. Les courbes en rouge (en haut) correspondent à des souris traitées par la solution contrôle et les courbes en bleue (en bas) correspondent à des souris traitées par Sunitinib. Les taux de croissance respectifs sont de 0.048 ; 0.027 ; 0.050 et  $-0.0041$ . La première souris sous Sunitinib est clairement non répondeuse (en bas à gauche) alors que la seconde l'est (en bas à droite).



## **B. REPONSE AU SUNITINIB**

L'hypothèse des taux de croissance égaux entre les groupes Sunitinib et les groupes contrôles a été rejetée avec une valeur p de 0,009 indiquant donc une efficacité du Sunitinib par rapport au contrôle. La figure 3 montre les courbes de croissances tumorales de chaque souris, on remarque donc une croissance globalement plus forte pour les souris traitées par la solution contrôle (rouge) par rapport aux souris traitées par Sunitinib (bleu) témoignant de l'efficacité globale du Sunitinib.

Figure 3 : Evolution tumorale pour l'ensemble des souris. Les volumes sont normalisés sur le volume initial estimé par le modèle ( $V_i(t)/V_i(0)$ ). En rouge, les souris sous solution contrôle, en bleu, les souris sous Sunitinib. On note clairement la croissance plus faible pour la plupart des souris sous Sunitinib.



Selon les critères morphologiques de taille tumorale RECIST, nous avons noté qu'aucun cas ne permet de conclure à une réponse (rémission) sur la période de 28 jours étudiée. La plupart des cas traités par Sunitinib ont une croissance stabilisée ou ralentie par rapport aux groupes contrôles. Sur la période d'étude, le suivi morphologique tumoral ne permet donc pas de distinguer l'efficacité du traitement par Sunitinib.

Selon notre définition statistique de la réponse au Sunitinib basée sur les taux de croissances tumorales, 4 souris pouvaient être considérées comme non répondeuses (1 de la cohorte 2 et 3 de la cohorte 3).

### C. ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES MARQUEURS

L'analyse de l'expression différentielle entre le groupe Sunitinib et le groupe traité est résumée dans

le tableau 2. On voit que pour les marqueurs FSHR et VEGFR-1, il existe une différence d'expression statistiquement significative entre les deux groupes en tout point du suivi post introduction du traitement. Cela signifie donc que l'expression de ces deux biomarqueurs est bien atténuée lorsque la tumeur est traitée par le Sunitinib est que cette atténuation est mesurable par la technique d'échographie moléculaire dès la première mesure post-traitement (J7). Cette différence d'expression est maintenue tout au long des trois mesures post-traitement. Cela confirme la robustesse des résultats.

Nous avons ensuite testé l'expression différentielle des marqueurs entre les souris répondeuses et non répondeuses (en normalisant les expressions à J0). Nous avons constaté une différence significative d'expression dès J7 pour le marqueur VEGFR-1 (p-valeur J7 : 0.018 ; J14 : 0.032 ; J28 : 0.048), en revanche, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative avec les microbulles non ciblées (p-valeur J7 : 0.801 ; J14 : 0.604 ; J28 : 0.690) ou le marqueur FSHR (p-valeur J7 : 0.920 ; J14 : 0.706 ; J28 : 0.419).

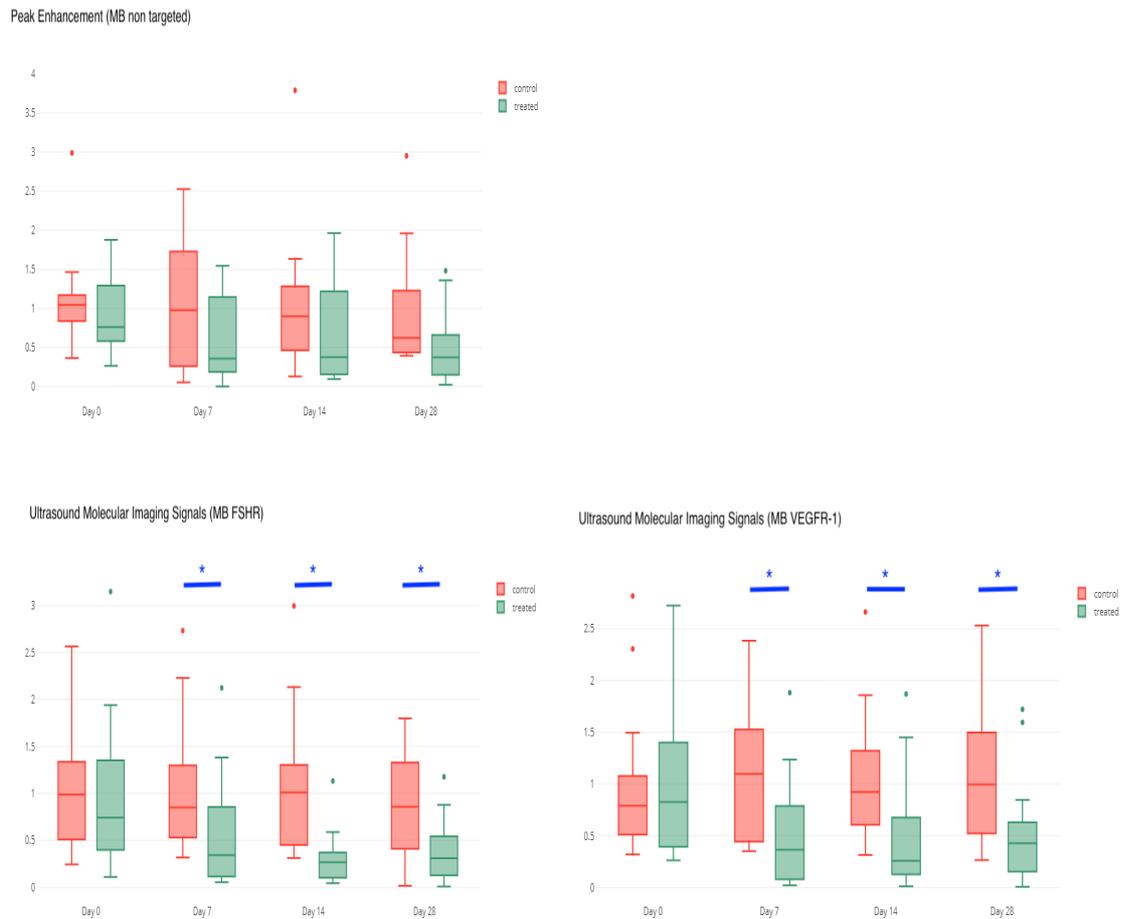
Tableau 2 : Analyse de l'expression différentielle des marqueurs FSHR et VEGFR-1 mesurée en échographie moléculaire aux différents temps de mesure (J0, J7, J14 et J28). On note que la différence est significative pour les deux marqueurs dès J7, le premier point de mesure après initiation du traitement.

Variable	p-val
VEGFR1[0]	0.98
VEGFR1[7]	0.021
VEGFR1[14]	0.038
VEGFR1[28]	0.028
FSHR[0]	0.98
FSHR[7]	0.046
FSHR[14]	0.0012
FSHR1[28]	0.0098

Ces résultats ont donc montré que la réponse au Sunitinib ne pouvait pas être évaluée par le suivi de volumes tumoraux sur la période de l'étude, on pouvait toutefois noter une différence dans les taux de croissances tumorales pour la plupart des souris traitées. Ces taux de croissance ne pouvaient être modélisés qu'après 3 points de mesure donc en fin d'expérimentation (J28). En revanche, on note une différence significative d'expression des marqueurs FSHR et VEGFR-1 en échographie moléculaire dès les premiers points de mesure (J7), confirmant ainsi notre hypothèse de départ. On note également la capacité du marqueur VEGFR-1 à différencier les souris répondeuses des souris

non répondeuses dès J7 et tout au long du suivi. La figure 4 résume les différences d'expression des trois différents marqueurs au cours du suivi longitudinal des cohortes

**Figure 4 :** Boîtes à moustaches résumant la quantification du signal d'imagerie moléculaire avec les microbulles ciblant le VEGFR-1, le FSHR ainsi que la quantification du signal des microbulles non ciblées chez les souris traitées par Sunitinib (vert) ou par solution contrôle (rouge). Boîte : quartiles 25 et 75, ligne interne de la boîte : médiane, moustaches : 5<sup>e</sup> et 95<sup>e</sup> percentiles en excluant les valeurs aberrantes (points). \*= $p < 0.05$  entre le groupe traité et le groupe contrôle



## V. DISCUSSION

Les résultats de cette étude démontrent que l'échographie moléculaire ciblant le VEGFR-1 ou le FSHR permettent un suivi longitudinal non invasif du traitement par Sunitinib dans le carcinome rénal. Ces résultats ont été obtenus sur un modèle PdX murin de carcinome rénale à cellules claires. Le Sunitinib est un Inhibiteur de Tyrosine Kinase (TKI) ciblant la voie VEGFR et validé pour le traitement des carcinomes rénaux métastatiques en première et deuxième ligne. Malgré une efficacité démontrée, de nombreux patients ne répondent pas au Sunitinib ou progressent secondairement. Ainsi, dans l'essai EFFECT, la survie médiane sans progression des patients dans le groupe Sunitinib était de 9,9 mois (11). Par conséquent, il paraît primordial de développer un marqueur permettant d'apprécier la réponse au Sunitinib de manière initiale puis longitudinale tout au long du traitement. Pour que ce marqueur puisse se développer en pratique clinique, en plus de son efficacité, il devra être peu coûteux, facile d'utilisation et non invasif. Notre étude démontre qu'un marqueur moléculaire présente le potentiel d'une détection plus précoce et plus fiable d'une non réponse au traitement par rapport à la méthode de référence actuelle qui est le suivi par scanner du volume tumoral. Effectivement, l'involution ou l'expansion tumorale est souvent retardée après l'introduction du traitement et un volume résiduel n'est pas toujours synonyme de tumeur active, notamment en cas de fibrose, de zones kystiques et/ou nécrotiques. Un tel marqueur permettrait une substitution thérapeutique plus précoce vers une autre classe de traitement potentiellement active telle que l'immunothérapie. Cette adaptation plus réactive permettrait de réduire les risques d'effets secondaires et des coûts inutiles liés au traitement par TKI.

L'imagerie moléculaire, contrairement à l'analyse histologiques et moléculaires d'une biopsie permet l'analyse de la tumeur et de ses marqueurs dans sa globalité et pallie ainsi la difficulté que présente les tumeurs rénales du fait de leur grande hétérogénéité (19).

L'échographie présente de nombreux avantages comparativement aux autres techniques applicables à l'imagerie moléculaire : elle est largement disponible, facile à transporter (permettant une utilisation au lit du patient ou en consultation), rapide, relativement peu coûteuse et n'émet pas de

rayons ionisants. C'est pour ces raisons que nous pensons que le développement de techniques d'imagerie moléculaire par échographie présente le meilleur potentiel pour la pratique clinique. Nous pensons que le modèle PdX utilisé dans cette étude est un modèle plus pertinent qui apporte une valeur importante aux expérimentations comparativement à la plupart des études d'imagerie moléculaire basées sur des xénogreffes de lignées cellulaires. En effet, il a été démontré que ce modèle reproduit de manière fiable la tumeur d'origine du patient et ce, sur plusieurs passages. Contrairement aux xénogreffes de lignées cellulaires, le microenvironnement tumoral et plus spécifiquement la micro vascularisation péri tumorale sont implantés avec les cellules tumorales en respectant leur architecture. Il a été démontré que les tumeurs portées par les souris immunodéficientes dans ce modèle continuent de porter une micro vascularisation de phénotype humain sur plusieurs générations de transplantations (135). De ce fait, ce modèle est particulièrement adapté à l'étude d'un marqueur tumoral d'expression endo-vasculaire en imagerie moléculaire. Cependant, la supériorité de ce modèle à représenter une tumeur et son microenvironnement s'accompagne d'une plus grande variabilité de croissance tumorale entre chaque souris d'une cohorte et une plus grande complexité de manipulation des cohortes. Plusieurs études ont démontré la validité des techniques d'imagerie moléculaire en oncologie dans des modèles précliniques pour étudier la réponse au TKI dans le cancer colorectal (125,127,129,133), hépatocellulaire (126), épidermoïde (128) pancréatique (130). Dans leur étude, Streeter *et al* ont comparé les signaux d'échographie moléculaire entre deux groupes de modèles PdX murins : un tissu tumoral répondant vs un tissu tumoral ne répondant pas au traitement ciblé MLN8237. L'origine tumorale de ce tissu n'était cependant pas précisée. Les microbulles ciblaient l'intégrine  $\alpha\beta_3$ , décrite dans le précédent chapitre et connue pour être associée à la néo angiogenèse. Ils ont ainsi démontré que le signal d'imagerie moléculaire était significativement différent entre les groupes traités et non traités dans la cohorte du tissu tumoral répondant au traitement ciblé. Ce résultat était obtenu dès le 2<sup>nd</sup> jour de l'étude alors qu'aucune différence de volume tumoral n'a pu être observé jusqu'à la fin de l'étude, au 14<sup>e</sup> jour (131). Récemment, deux essais cliniques ont évalué chez des patients l'échographie moléculaire ciblant le VEGFR-2 dans les

cancers de l'ovaire, du sein (137) et de la prostate (138). A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée au suivi de la réponse thérapeutique par échographie moléculaire dans le cancer du rein. Rojas *et al* ont suivi des cohortes de souris, greffées par des cellules de carcinomes rénaux traitées soit par Sunitinib, soit par GSI, un inhibiteur de la voie Notch. Ils ont ainsi démontré que l'échographie moléculaire pouvait détecter une progression tumorale et des changements fonctionnels tumoraux avant que les modifications de volume tumoral n'apparaissent (134). Nos résultats confirment donc en partie cette étude.

A notre connaissance, cette étude est la première à étudier le ciblage du FSHR et du VEGFR-1 en échographie moléculaire. Le VEGFR-1 est décrit dans la littérature comme présentant également un rôle clé dans la néo-angiogenèse et représente également une cible du Sunitinib. Il n'a pourtant paradoxalement jamais été étudié à notre connaissance comme marqueur de réponse en imagerie moléculaire. Le choix du FSHR est basé sur une étude princeps de Radu *et al* en 2010 qui a démontré l'expression sélective à la surface de l'endothélium vasculaire des vaisseaux tumoraux pour de nombreux cancers, y compris le carcinome rénal (139). Ce marqueur apparaît donc comme le candidat parfait pour l'échographie moléculaire puisque l'agent de contraste vecteur, les microbulles, ne circulent que dans la lumière des vaisseaux. Une étude plus récente a comparé par immunofluorescence l'expression du FSHR sur des pièces de néphrectomies de patients secondairement traités par Sunitinib pour un stade métastatique. Les auteurs ont démontré que le niveau d'expression du FSHR était corrélé à la réponse au Sunitinib (140). Enfin, un radiotracer conjuguant la sonde ciblant le FSHR associée au traceur (18)F a été développé et évalué *in vivo* sur des modèles murins de cancer de la prostate par xénogreffe de cellules PC3. Les auteurs ont ainsi décrit la faisabilité de la technique sans évaluation de la réponse thérapeutique ni suivi longitudinal de la cohorte (141). Les résultats de notre étude démontrent l'expression différentielle de FSHR et de VEGFR-1 entre les groupes traités et contrôle mesurée par la technique non-invasive d'échographie moléculaire dès les premières mesures après initiation de traitement (J7). Nous avons également démontré la capacité du marqueur VEGFR-1 à différencier les tumeurs répondant au Sunitinib des tumeurs résistantes dès les premières mesures post-initiation du traitement. Dans ce

sens, ces résultats semblent particulièrement innovants et devraient encourager des recherches translationnelles pour des applications cliniques potentielles permettant l'amélioration de la prise en charge des patients.

Ces résultats présentent tout de même certaines limites que nous devons décrire. S'agissant d'une étude préclinique, la taille des cohortes était limitée. Nous avons pu démontrer des différences d'expression entre les groupes traités et non traités pour les deux marqueurs FSHR et VEGFR-1, en revanche nous n'avons pu mettre en évidence des différences entre les répondeurs et non répondeurs que pour le VEGFR-1. Cette différence est un point secondaire de notre analyse et elle est sujette à plusieurs biais compte tenu du nombre limité de souris dans le groupe non répondeur et de l'analyse à posteriori avec des signaux à J0 très hétérogènes (corrigé par normalisation à J0). Il est difficile de dire par ailleurs si les résultats non significatifs pour le FSHR sont liés au faible nombre de souris ou aux caractéristiques même du marqueur. Bien que nos résultats soient tout à fait inédits, nous ne pouvons utiliser ce type de vecteur directement pour une utilisation clinique. Dans nos expériences, la conjugaison de l'anticorps aux microbulles se faisait par le couple streptavidine-biotine. Cette technique simple d'utilisation est adaptée à l'exploration de nouvelles sondes dans des essais précliniques, cependant ce complexe présente un risque anaphylactique important chez l'humain. Il convient donc de développer un agent associant les couples FSHR ou VEGFR-1 aux microbulles avec des techniques de liaisons alternatives. Cette méthode a déjà été développée pour le marqueur VEGFR-2. Il s'agit de l'agent BR55 déjà utilisé dans des essais cliniques (137,138). Le développement de tels traceurs pour les nouvelles sondes VEGFR-1 ou FSHR ne devrait donc pas poser de problème technique. L'acquisition du signal d'échographie moléculaire se faisait en deux dimensions, ce qui imposait de sélectionner un plan tumoral, il est possible que l'expression du marqueur fluctue le long de l'axe perpendiculaire à ce plan compte tenu de l'hétérogénéité décrite des tumeurs rénales (19). Cette limite pourrait être palliée par une analyse tumorale complète avec une acquisition en 3 dimensions.

## VI. CONCLUSION

En conclusion, notre étude démontre que l'échographie moléculaire ciblant les marqueurs FSHR et VEGFR-1 présente un réel potentiel pour le suivi des patients présentant un carcinome rénal à cellules claires métastatique traité par un TKI tel que le Sunitinib. Cette technique non invasive et simple d'utilisation présenterait un intérêt majeur en pratique clinique en détectant précocement les patients non répondeurs au Sunitinib. Cela préviendrait ainsi la poursuite inutile d'un traitement potentiellement morbide en permettant la substitution plus rapide d'une nouvelle classe thérapeutique potentiellement plus efficace. Ces résultats devraient encourager de nouvelles explorations afin de définir l'intérêt du ciblage moléculaire en échographie dans d'autres types de cancers et la validité de nos résultats sur le cancer du rein dans des essais cliniques.

## CONCLUSION

Ces travaux centrés sur le diagnostic de la tumeur rénale proposent des solutions pour les enjeux cliniques actuels auxquels nous confronte cette maladie : la caractérisation des petites tumeurs rénales afin d'éviter le sur-traitement de tumeurs bénignes ou indolentes et l'identification précoce de la réponse aux traitements ciblés dans les tumeurs métastatiques afin d'adapter au mieux le traitement systémique.

Pour les petites tumeurs rénales, nous retiendrons donc avec le chapitre 1 que les tumeurs complexes représentent la place la plus pertinente des biopsies de tumeurs rénales lorsque nous sommes confrontés à une petite tumeur rénale susceptible d'être traitée chirurgicalement. En effet ces tumeurs sont à la fois de plus grand risque chirurgical et de meilleur rendement en terme de biopsie contributive. En d'autre terme, la biopsie d'une tumeur complexe est plus fortement susceptible de caractériser une tumeur bénigne et donc d'éviter une chirurgie qui exposerait fortement au risque de complication inutile. Dans la chapitre 2, les résultats de la cohorte pilote nous démontre l'intérêt potentiel d'une nouvelle technique d'imagerie : la tomographie en cohérence optique percutanée. Ces résultats démontrent la capacité de cette technique pour différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes. Le potentiel retour d'information instantanée de cette technique d'imagerie pourrait permettre de repositionner immédiatement le point de ponction en cas de biopsie non contributive et ainsi d'éviter le retard de prise en charge associé actuellement à l'analyse histologique d'une biopsie classique.

Dans le chapitre 3 nous avons identifié deux marqueurs prédictifs indépendants de la survie dans le cancer du rein à cellules claires le CAIX et la Vimentine. Ces marqueurs pourraient être des candidats potentiels d'imagerie moléculaire et plusieurs études s'intéressent d'ailleurs actuellement à l'utilisation du CAIX comme sonde associée à des marqueurs radioactifs pour des PET-scan (142–144). Nous n'avons cependant pas utilisé ces marqueurs dans nos travaux car nous avons fait le choix de l'échographie comme plateforme d'imagerie pour la simplicité de son utilisation

clinique. Les agents de contraste en échographie sont des microbulles qui ne circulent que dans les vaisseaux sanguins. Or les deux marqueurs cités sont des marqueurs exprimés dans le cytoplasme ou la membrane des cellules tumorales et ne pourraient donc pas être atteints par ce vecteur.

Nous nous sommes ensuite spécifiquement intéressés au potentiel apport de l'imagerie moléculaire dans les traitements systémiques du cancer du rein métastatique. Dans le chapitre 4, nous avons démontré la capacité de l'IRM moléculaire ciblant le marqueur  $\alpha\beta3$ , exprimé à la surface de l'endothélium vasculaire, à mettre en évidence les modifications précoces de la néo-angiogenèse induites par les traitements ciblant la voie VEGFR. Dans le chapitre 5, nous avons démontré le potentiel de l'échographie moléculaire à mettre en évidence les modifications induites au sein du tissu tumoral au cours d'un traitement par Sunitinib. Nous avons utilisé deux types de sondes : le VEGFR-1, dont les résultats similaires avaient précédemment été décrits dans la littérature pour le VEGFR-2 et le FSHR qui est donc une nouvelle sonde innovante potentielle pour l'imagerie moléculaire en oncologie.

Ces résultats prometteurs restent exploratoires, notamment l'application clinique des techniques d'imagerie moléculaire décrites dans ces travaux nécessite le développement de sondes utilisables sans risque chez l'homme et la validation dans des essais cliniques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Projection de l'incidence et de la mortalité en France métropolitaine en 2017 - Rapport technique - Ref : RAINCMETRO17 | Institut National Du Cancer [Internet]. [cited 2018 May 16]. Available from: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Projection-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-en-France-metropolitaine-en-2017-Rapport-technique>
2. Volpe A, Panzarella T, Rendon RA, Haider MA, Kondylis FI, Jewett MAS. The natural history of incidentally detected small renal masses. *Cancer*. 2004 Feb 15;100(4):738–45.
3. Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF, Chow W-H. Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2002 Apr;11(2):171–8.
4. Johnson DC, Vukina J, Smith AB, Meyer A-M, Wheeler SB, Kuo T-M, et al. Preoperatively misclassified, surgically removed benign renal masses: a systematic review of surgical series and United States population level burden estimate. *J Urol*. 2015 Jan;193(1):30–5.
5. Kunkle DA, Egleston BL, Uzzo RG. Excise, ablate or observe: the small renal mass dilemma--a meta-analysis and review. *J Urol*. 2008 Apr;179(4):1227–33; discussion 1233–4.
6. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 Jan 11;356(2):115–24.
7. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 May 31;356(22):2271–81.
8. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008 Aug 9;372(9637):449–56.
9. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1803–13.
10. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Apr 5;378(14):1277–90.
11. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol*. 2010 Sep;58(3):398–406.
12. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5794–9.
13. Jayson M, Sanders H. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology*. 1998 Feb;51(2):203–5.

14. Israel GM, Bosniak MA. How I do it: evaluating renal masses. *Radiology*. 2005 Aug;236(2):441–50.
15. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *Eur Urol*. 2016 Apr;69(4):660–73.
16. Tan KM, Shishkov M, Chee A, Applegate MB, Bouma BE, Suter MJ. Flexible transbronchial optical frequency domain imaging smart needle for biopsy guidance. *Biomed Opt Express*. 2012 Aug 1;3(8):1947–54.
17. Xiong Y-Q, Mo Y, Wen Y-Q, Cheng M-J, Huo S-T, Chen X-J, et al. Optical coherence tomography for the diagnosis of malignant skin tumors: a meta-analysis. *J Biomed Opt*. 2018 Feb;23(2):1–10.
18. Barwari K, de Bruin DM, Faber DJ, van Leeuwen TG, de la Rosette JJ, Laguna MP. Differentiation between normal renal tissue and renal tumours using functional optical coherence tomography: a phase I in vivo human study. *BJU Int*. 2012 Oct;110(8 Pt B):E415–20.
19. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883–92.
20. Ingels A, Barret E, Sanchez-Salas R, Galiano M, Rozet F, Lenoir S, et al. Percutaneous Renal Biopsies for Small Renal Masses: Complex Tumors on Nephrometry Should Be the First Targets. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Feb 21;
21. Nakatani T, Yoshida N, Iwata H, Kuratsukuri K, Uchida J, Kawashima H, et al. Clinicopathological study of renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2003 Jun;10(3):679–85.
22. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Solid renal tumors: an analysis of pathological features related to tumor size. *J Urol*. 2003 Dec;170(6 Pt 1):2217–20.
23. Nguyen MM, Gill IS. Effect of renal cancer size on the prevalence of metastasis at diagnosis and mortality. *J Urol*. 2009 Mar;181(3):1020–7; discussion 1027.
24. Lowrance W., Larson S., Anis-Alibozek A., et al. Real-world presurgical characteristics and postsurgical morbidity of 10,404 Americans undergoing nephrectomy for renal tumors. *International Kidney Cancer Symposium, Chicago, Illinois*; 2011 Oct.
25. Schmidbauer J, Remzi M, Memarsadeghi M, Haitel A, Klingler HC, Katzenbeisser D, et al. Diagnostic accuracy of computed tomography-guided percutaneous biopsy of renal masses. *Eur Urol*. 2008 May;53(5):1003–11.
26. Lechevallier E, André M, Barriol D, Daniel L, Eghazarian C, De Fromont M, et al. Fine-needle percutaneous biopsy of renal masses with helical CT guidance. *Radiology*. 2000 Aug;216(2):506–10.
27. Neuzillet Y, Lechevallier E, Andre M, Daniel L, Coulange C. Accuracy and clinical role of fine needle percutaneous biopsy with computerized tomography guidance of small (less than 4.0 cm) renal masses. *J Urol*. 2004 May;171(5):1802–5.
28. Volpe A, Finelli A, Gill IS, Jewett MAS, Martignoni G, Polascik TJ, et al. Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. *Eur Urol*. 2012

Sep;62(3):491–504.

29. Phé V, Yates DR, Renard-Penna R, Cussenot O, Rouprêt M. Is there a contemporary role for percutaneous needle biopsy in the era of small renal masses? *BJU Int.* 2012 Mar;109(6):867–72.
30. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *Eur Urol.* 2015 Aug 28;
31. Kane CJ, Mallin K, Ritchey J, Cooperberg MR, Carroll PR. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer.* 2008 Jul 1;113(1):78–83.
32. Smith PA, Marshall FF, Fishman EK. Spiral computed tomography evaluation of the kidneys: state of the art. *Urology.* 1998 Jan;51(1):3–11.
33. Remzi M, Ozsoy M, Klingler H-C, Susani M, Waldert M, Seitz C, et al. Are small renal tumors harmless? Analysis of histopathological features according to tumors 4 cm or less in diameter. *J Urol.* 2006 Sep;176(3):896–9.
34. Kutikov A, Uzzo RG. The R.E.N.A.L. nephrometry score: a comprehensive standardized system for quantitating renal tumor size, location and depth. *J Urol.* 2009 Sep;182(3):844–53.
35. Rosevear HM, Gellhaus PT, Lightfoot AJ, Kresowik TP, Joudi FN, Tracy CR. Utility of the RENAL nephrometry scoring system in the real world: predicting surgeon operative preference and complication risk. *BJU Int.* 2012 Mar;109(5):700–5.
36. Kutikov A, Smaldone MC, Egleston BL, Manley BJ, Canter DJ, Simhan J, et al. Anatomic features of enhancing renal masses predict malignant and high-grade pathology: a preoperative nomogram using the RENAL Nephrometry score. *Eur Urol.* 2011 Aug;60(2):241–8.
37. Stroup SP, Palazzi K, Kopp RP, Mehrazin R, Santomauro M, Cohen SA, et al. RENAL nephrometry score is associated with operative approach for partial nephrectomy and urine leak. *Urology.* 2012 Jul;80(1):151–6.
38. Mehrazin R, Palazzi KL, Kopp RP, Colangelo CJ, Stroup SP, Masterson JH, et al. Impact of tumour morphology on renal function decline after partial nephrectomy. *BJU Int.* 2013 Jun;111(8):E374–82.
39. Schmit GD, Thompson RH, Kurup AN, Weisbrod AJ, Boorjian SA, Carter RE, et al. Usefulness of R.E.N.A.L. nephrometry scoring system for predicting outcomes and complications of percutaneous ablation of 751 renal tumors. *J Urol.* 2013 Jan;189(1):30–5.
40. Seideman CA, Gahan J, Weaver M, Olweny EO, Richter M, Chan D, et al. Renal tumour nephrometry score does not correlate with the risk of radiofrequency ablation complications. *BJU Int.* 2013 Dec;112(8):1121–4.
41. Okhunov Z, Shapiro EY, Moreira DM, Lipsky MJ, Hillelsohn J, Badani K, et al. R.E.N.A.L. nephrometry score accurately predicts complications following laparoscopic renal cryoablation. *J Urol.* 2012 Nov;188(5):1796–800.
42. Blute ML Jr, Okhunov Z, Moreira DM, George AK, Sunday S, Lobko II, et al. Image-guided percutaneous renal cryoablation: preoperative risk factors for recurrence and complications. *BJU Int.* 2013 Apr;111(4 Pt B):E181–5.

43. Samplaski MK, Zhou M, Lane BR, Herts B, Campbell SC. Renal mass sampling: an enlightened perspective. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc.* 2011 Jan;18(1):5–19.
44. Wagstaff PG, Ingels A, de Bruin DM, Buijs M, Zondervan PJ, Savci Heijink CD, et al. Percutaneous Needle Based Optical Coherence Tomography for the Differentiation of Renal Masses: a Pilot Cohort. *J Urol.* 2015 Dec 21;
45. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Oct;60(5):277–300.
46. Gandaglia G, Ravi P, Abdollah F, Abd-El-Barr A-E-RM, Becker A, Popa I, et al. Contemporary incidence and mortality rates of kidney cancer in the United States. *Can Urol Assoc J J Assoc Urol Can.* 2014 Jul;8(7-8):247–52.
47. Laguna MP, Algaba F, Cadeddu J, Clayman R, Gill I, Gueglio G, et al. Current patterns of presentation and treatment of renal masses: a clinical research office of the endourological society prospective study. *J Endourol.* 2014 Jul;28(7):861–70.
48. Hecht EM, Israel GM, Krinsky GA, Hahn WY, Kim DC, Belitskaya-Levy I, et al. Renal masses: quantitative analysis of enhancement with signal intensity measurements versus qualitative analysis of enhancement with image subtraction for diagnosing malignancy at MR imaging. *Radiology.* 2004 Aug;232(2):373–8.
49. Millet I, Doyon FC, Hoa D, Thuret R, Merigeaud S, Serre I, et al. Characterization of small solid renal lesions: can benign and malignant tumors be differentiated with CT? *AJR Am J Roentgenol.* 2011 Oct;197(4):887–96.
50. Volpe A, Cadeddu JA, Cestari A, Gill IS, Jewett MAS, Joniau S, et al. Contemporary management of small renal masses. *Eur Urol.* 2011 Sep;60(3):501–15.
51. Wagstaff PGK, Zondervan PJ, de la Rosette JJMCH, Laguna MP. The role of imaging in the active surveillance of small renal masses. *Curr Urol Rep.* 2014 Mar;15(3):386.
52. Wagstaff PG, Swaan A, Ingels A, Zondervan PJ, van Delden OM, Faber DJ, et al. In vivo, percutaneous, needle based, optical coherence tomography of renal masses. *J Vis Exp JoVE.* 2015;(97).
53. Grundeken MJ, Garcia-Garcia HM, Kraak RP, Woudstra P, de Bruin DM, van Leeuwen TG, et al. Side branch healing patterns of the Tryton dedicated bifurcation stent: a 1-year optical coherence tomography follow-up study. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2014 Dec;30(8):1445–56.
54. Mourant JR, Freyer JP, Hielscher AH, Eick AA, Shen D, Johnson TM. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. *Appl Opt.* 1998 Jun 1;37(16):3586–93.
55. Xie T, Zeidel M, Pan Y. Detection of tumorigenesis in urinary bladder with optical coherence tomography: optical characterization of morphological changes. *Opt Express.* 2002 Dec 2;10(24):1431–43.
56. Vakoc BJ, Fukumura D, Jain RK, Bouma BE. Cancer imaging by optical coherence tomography: preclinical progress and clinical potential. *Nat Rev Cancer.* 2012 May;12(5):363–8.
57. Cauberg ECC, de Bruin DM, Faber DJ, de Reijke TM, Visser M, de la Rosette JJMCH, et al. Quantitative measurement of attenuation coefficients of bladder biopsies using optical

- coherence tomography for grading urothelial carcinoma of the bladder. *J Biomed Opt.* 2010 Dec;15(6):066013.
58. Bus MTJ, Muller BG, de Bruin DM, Faber DJ, Kamphuis GM, van Leeuwen TG, et al. Volumetric in vivo visualization of upper urinary tract tumors using optical coherence tomography: a pilot study. *J Urol.* 2013 Dec;190(6):2236–42.
  59. Wessels R, de Bruin DM, Faber DJ, van Boven HH, Vincent AD, van Leeuwen TG, et al. Optical coherence tomography in vulvar intraepithelial neoplasia. *J Biomed Opt.* 2012 Nov;17(11):116022.
  60. Muller BG, de Bruin DM, van den Bos W, Brandt MJ, Velu JF, Bus MTJ, et al. Prostate cancer diagnosis: the feasibility of needle-based optical coherence tomography. *J Med Imaging Bellingham Wash.* 2015 Jul;2(3):037501.
  61. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD Initiative. *Radiology.* 2003 Jan;226(1):24–8.
  62. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.* 1993 Apr;39(4):561–77.
  63. Ingels A, Hew M, Algaba F, de Boer OJ, van Moorselaar RJA, Horenblas S, et al. Vimentin over-expression and carbonic anhydrase IX under-expression are independent predictors of recurrence, specific and overall survival in non-metastatic clear-cell renal carcinoma: a validation study. *World J Urol.* 2016 May 20;
  64. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol.* 2015 May;67(5):913–24.
  65. Rüdiger T, Höfler H, Kreipe H-H, Nizze H, Pfeifer U, Stein H, et al. Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol.* 2002 Jul;26(7):873–82.
  66. Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FK-H, Trinh Q-D, Perrotte P, Ficarra V, et al. Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Apr 10;25(11):1316–22.
  67. Sobin LH, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer.* 2010 Nov 15;116(22):5336–9.
  68. Sakai I, Miyake H, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in renal cell carcinoma: impact on clinicopathological outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int.* 2009 Oct;104(7):942–6.
  69. Gayed BA, Youssef RF, Bagrodia A, Darwish OM, Kapur P, Sagalowsky A, et al. Ki67 is an independent predictor of oncological outcomes in patients with localized clear-cell renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2014 Apr;113(4):668–73.
  70. Tang S-W, Chang W-H, Su Y-C, Chen Y-C, Lai Y-H, Wu P-T, et al. MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2009 Jan 8;273(1):35–43.
  71. Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J. CA9 gene expression in conventional

renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24(3):149–55.

72. Bui MHT, Seligson D, Han K, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Feb;9(2):802–11.
73. Luong-Player A, Liu H, Wang HL, Lin F. Immunohistochemical reevaluation of carbonic anhydrase IX (CA IX) expression in tumors and normal tissues. *Am J Clin Pathol*. 2014 Feb;141(2):219–25.
74. Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MHT, Yu H, et al. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5464–71.
75. Sabo E, Miselevich I, Bejar J, Segenreich M, Wald M, Moskovitz B, et al. The role of vimentin expression in predicting the long-term outcome of patients with localized renal cell carcinoma. *Br J Urol*. 1997 Dec;80(6):864–8.
76. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 1999 Apr;154(4):981–6.
77. Skinnider BF, Folpe AL, Hennigar RA, Lim SD, Cohen C, Tamboli P, et al. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jun;29(6):747–54.
78. Shin Lee J, Seok Kim H, Bok Kim Y, Cheol Lee M, Soo Park C. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol*. 2003 Nov;84(3):166–72.
79. Wang C-J, Zhou Z-G, Holmqvist A, Zhang H, Li Y, Adell G, et al. Survivin expression quantified by Image Pro-Plus compared with visual assessment. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM Off Publ Soc Appl Immunohistochem*. 2009 Dec;17(6):530–5.
80. Gu J, Liang Y, Qiao L, Li X, Li X, Lu Y, et al. Expression analysis of URI/RMP gene in endometrioid adenocarcinoma by tissue microarray immunohistochemistry. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(11):2396–403.
81. Zhang X, Wang H, Wang J. Expression of HMGB1 and NF- $\kappa$ B p65 and its significance in non-small cell lung cancer. *Contemp Oncol Pozn Pol*. 2013;17(4):350–5.
82. Lu JG, Li Y, Li L, Kan X. Overexpression of osteopontin and integrin  $\alpha$ v in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas associated with differentiation and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Nov;137(11):1613–8.
83. Shi H, Hayes M, Kirana C, Miller R, Keating J, Macartney-Coxson D, et al. TUFM is a potential new prognostic indicator for colorectal carcinoma. *Pathology (Phila)*. 2012 Oct;44(6):506–12.
84. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*. 2012;7(12):e51862.

85. Nguyen CT, Kattan MW. How to tell if a new marker improves prediction. *Eur Urol*. 2011 Aug;60(2):226–8; discussion 228–30.
86. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):905–19.
87. Brewer CA, Liao SY, Wilczynski SP, Pastorekova S, Pastorek J, Zavada J, et al. A study of biomarkers in cervical carcinoma and clinical correlation of the novel biomarker MN. *Gynecol Oncol*. 1996 Dec;63(3):337–44.
88. Turner JR, Odze RD, Crum CP, Resnick MB. MN antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic esophagus: a clinicopathological study of a new cancer-associated biomarker. *Hum Pathol*. 1997 Jun;28(6):740–4.
89. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Haukipuro K, Pastoreková S, Pastorek J, et al. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol*. 1998 Jul;153(1):279–85.
90. Stillebroer AB, Mulders PFA, Boerman OC, Oyen WJG, Oosterwijk E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur Urol*. 2010 Jul;58(1):75–83.
91. Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, Ben-Yaakov K, Shaked M, Seger R, et al. Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol*. 2006 Dec 15;364(5):938–44.
92. Sandlund J, Oosterwijk E, Grankvist K, Oosterwijk-Wakka J, Ljungberg B, Rasmuson T. Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2007 Sep;100(3):556–60.
93. Patard J-J, Fergelot P, Karakiewicz PI, Klatte T, Trinh Q-D, Rioux-Leclercq N, et al. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008 Jul 15;123(2):395–400.
94. Klatte T, Seligson DB, LaRochelle J, Shuch B, Said JW, Riggs SB, et al. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2009 Mar;18(3):894–900.
95. True L, Feng Z. Immunohistochemical Validation of Expression Microarray Results. *J Mol Diagn*. 2005 May;7(2):149–51.
96. Leguerney I, de Rochefort L, Poirier-Quinot M, Ingels A, Violas X, Robin S, et al. Molecular Imaging to Predict Response to Targeted Therapies in Renal Cell Carcinoma. *Contrast Media Mol Imaging*. 2017;2017:7498538.
97. Claudon M, Dietrich CF, Choi BI, Cosgrove DO, Kudo M, Nolsøe CP, et al. Guidelines and good clinical practice recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the liver - update 2012: A WFUMB-EFSUMB initiative in cooperation with representatives of AFSUMB, AIUM, ASUM, FLAUS and ICUS. *Ultrasound Med Biol*. 2013 Feb;39(2):187–210.

98. Dietrich CF, Averkiou MA, Correas J-M, Lassau N, Leen E, Piscaglia F. An EFSUMB introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for quantification of tumour perfusion. *Ultraschall Med Stuttg Ger* 1980. 2012 Aug;33(4):344–51.
99. Lassau N, Koscielny S, Albiges L, Chami L, Benatsou B, Chebil M, et al. Metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib: early evaluation of treatment response using dynamic contrast-enhanced ultrasonography. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Feb 15;16(4):1216–25.
100. O'Connor JPB, Aboagye EO, Adams JE, Aerts HJWL, Barrington SF, Beer AJ, et al. Imaging biomarker roadmap for cancer studies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(3):169–86.
101. Deshpande N, Pysz MA, Willmann JK. Molecular ultrasound assessment of tumor angiogenesis. *Angiogenesis*. 2010 Jun;13(2):175–88.
102. Kiessling F, Fokong S, Koczera P, Lederle W, Lammers T. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2012 Mar;53(3):345–8.
103. McAteer MA, Choudhury RP. Targeted molecular imaging of vascular inflammation in cardiovascular disease using nano- and micro-sized agents. *Vascul Pharmacol*. 2013 Jan;58(1-2):31–8.
104. Smith AH, Fujii H, Kuliszewski MA, Leong-Poi H. Contrast ultrasound and targeted microbubbles: diagnostic and therapeutic applications for angiogenesis. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011 Aug;4(4):404–15.
105. Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, Klibanov AL, Kaul S, Shaffrey ME, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation*. 2003 Jul 22;108(3):336–41.
106. Schmieder AH, Winter PM, Caruthers SD, Harris TD, Williams TA, Allen JS, et al. Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with alphanubeta3-targeted paramagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2005 Mar;53(3):621–7.
107. Huo T, Du X, Zhang S, Liu X, Li X. Gd-EDDA/HYNIC-RGD as an MR molecular probe imaging integrin alphanubeta3 receptor-expressed tumor-MR molecular imaging of angiogenesis. *Eur J Radiol*. 2010 Feb;73(2):420–7.
108. Winter PM, Caruthers SD, Allen JS, Cai K, Williams TA, Lanza GM, et al. Molecular imaging of angiogenic therapy in peripheral vascular disease with alphanubeta3-integrin-targeted nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2010 Aug;64(2):369–76.
109. Leguerney I, Lassau N, Koscielny S, Rodrigues M, Massard C, Rouffiac V, et al. Combining functional imaging and interstitial pressure measurements to evaluate two anti-angiogenic treatments. *Invest New Drugs*. 2012 Feb;30(1):144–56.
110. Lavisse S, Lejeune P, Rouffiac V, Elie N, Bribes E, Demers B, et al. Early quantitative evaluation of a tumor vasculature disruptive agent AVE8062 using dynamic contrast-enhanced ultrasonography. *Invest Radiol*. 2008 Feb;43(2):100–11.
111. Lassau N, Bonastre J, Kind M, Vilgrain V, Lacroix J, Cuiet M, et al. Validation of dynamic contrast-enhanced ultrasound in predicting outcomes of antiangiogenic therapy for solid tumors: the French multicenter support for innovative and expensive techniques study. *Invest Radiol*. 2014 Dec;49(12):794–800.

112. Lassau N, Koscielny S, Chami L, Chebil M, Benatsou B, Roche A, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: early evaluation of response to bevacizumab therapy at dynamic contrast-enhanced US with quantification--preliminary results. *Radiology*. 2011 Jan;258(1):291–300.
113. Lassau N, Cosgrove D, Armand J-P. Early evaluation of targeted drugs using dynamic contrast-enhanced ultrasonography for personalized medicine. *Future Oncol Lond Engl*. 2012 Oct;8(10):1215–8.
114. Hahn OM, Yang C, Medved M, Karczmar G, Kistner E, Karrison T, et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging pharmacodynamic biomarker study of sorafenib in metastatic renal carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4572–8.
115. Howe FA, Robinson SP, McIntyre DJ, Stubbs M, Griffiths JR. Issues in flow and oxygenation dependent contrast (FLOOD) imaging of tumours. *NMR Biomed*. 2001 Dec;14(7-8):497–506.
116. Padhani AR, Leach MO. Antivascular cancer treatments: functional assessments by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Abdom Imaging*. 2005 Jun;30(3):324–41.
117. Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem*. 2008 Dec 12;283(50):34495–9.
118. Ravelli C, Mitola S, Corsini M, Presta M. Involvement of  $\alpha\beta3$  integrin in gremlin-induced angiogenesis. *Angiogenesis*. 2013 Jan;16(1):235–43.
119. Desgrosellier JS, Barnes LA, Shields DJ, Huang M, Lau SK, Prévost N, et al. An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med*. 2009 Oct;15(10):1163–9.
120. Sipkins DA, Cheresch DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, Li KC. Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat Med*. 1998 May;4(5):623–6.
121. Bex A, Fournier L, Lassau N, Mulders P, Nathan P, Oyen WJG, et al. Assessing the response to targeted therapies in renal cell carcinoma: technical insights and practical considerations. *Eur Urol*. 2014 Apr;65(4):766–77.
122. Kang HC, Tan K-S, Keefe SM, Heitjan DF, Siegelman ES, Flaherty KT, et al. MRI assessment of early tumor response in metastatic renal cell carcinoma patients treated with sorafenib. *AJR Am J Roentgenol*. 2013 Jan;200(1):120–6.
123. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Feb 2;92(3):205–16.
124. Nishino M, Jagannathan JP, Ramaiya NH, Van den Abbeele AD. Revised RECIST guideline version 1.1: What oncologists want to know and what radiologists need to know. *AJR Am J Roentgenol*. 2010 Aug;195(2):281–9.
125. Wang H, Lutz AM, Hristov D, Tian L, Willmann JK. Intra-Animal Comparison between Three-dimensional Molecularly Targeted US and Three-dimensional Dynamic Contrast-

- enhanced US for Early Antiangiogenic Treatment Assessment in Colon Cancer. *Radiology*. 2017 Feb;282(2):443–52.
126. Baron Toaldo M, Salvatore V, Marinelli S, Palamà C, Milazzo M, Croci L, et al. Use of VEGFR-2 targeted ultrasound contrast agent for the early evaluation of response to sorafenib in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging*. 2015 Feb;17(1):29–37.
  127. Eschbach RS, Clevert D-A, Hirner-Eppeneder H, Ingrisich M, Moser M, Schuster J, et al. Contrast-Enhanced Ultrasound with VEGFR2-Targeted Microbubbles for Monitoring Regorafenib Therapy Effects in Experimental Colorectal Adenocarcinomas in Rats with DCE-MRI and Immunohistochemical Validation. *PloS One*. 2017;12(1):e0169323.
  128. Baetke SC, Rix A, Tranquart F, Schneider R, Lammers T, Kiessling F, et al. Squamous Cell Carcinoma Xenografts: Use of VEGFR2-targeted Microbubbles for Combined Functional and Molecular US to Monitor Antiangiogenic Therapy Effects. *Radiology*. 2016 Feb;278(2):430–40.
  129. Wang H, Kaneko OF, Tian L, Hristov D, Willmann JK. Three-dimensional ultrasound molecular imaging of angiogenesis in colon cancer using a clinical matrix array ultrasound transducer. *Invest Radiol*. 2015 May;50(5):322–9.
  130. Pysz MA, Machtaler SB, Seeley ES, Lee JJ, Brentnall TA, Rosenberg J, et al. Vascular endothelial growth factor receptor type 2-targeted contrast-enhanced US of pancreatic cancer neovasculature in a genetically engineered mouse model: potential for earlier detection. *Radiology*. 2015 Mar;274(3):790–9.
  131. Streeter JE, Herrera-Loeza SG, Neel NF, Yeh JJ, Dayton PA. A comparative evaluation of ultrasound molecular imaging, perfusion imaging, and volume measurements in evaluating response to therapy in patient-derived xenografts. *Technol Cancer Res Treat*. 2013 Aug;12(4):311–21.
  132. Sirsi SR, Flexman ML, Vlachos F, Huang J, Hernandez SL, Kim HK, et al. Contrast ultrasound imaging for identification of early responder tumor models to anti-angiogenic therapy. *Ultrasound Med Biol*. 2012 Jun;38(6):1019–29.
  133. Zhou J, Wang H, Zhang H, Lutz AM, Tian L, Hristov D, et al. VEGFR2-Targeted Three-Dimensional Ultrasound Imaging Can Predict Responses to Antiangiogenic Therapy in Preclinical Models of Colon Cancer. *Cancer Res*. 2016 15;76(14):4081–9.
  134. Rojas JD, Lin F, Chiang Y-C, Chytil A, Chong DC, Bautch VL, et al. Ultrasound Molecular Imaging of VEGFR-2 in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma Tracks Disease Response to Antiangiogenic and Notch-Inhibition Therapy. *Theranostics*. 2018;8(1):141–55.
  135. Thong AE, Zhao H, Ingels A, Valta MP, Nolley R, Santos J, et al. Tissue slice grafts of human renal cell carcinoma: An authentic preclinical model with high engraftment rate and metastatic potential. *Urol Oncol*. 2013 Aug 1;
  136. Leguerney I, Scoazec J-Y, Gadot N, Robin N, Pénault-Llorca F, Victorin S, et al. Molecular ultrasound imaging using contrast agents targeting endoglin, vascular endothelial growth factor receptor 2 and integrin. *Ultrasound Med Biol*. 2015 Jan;41(1):197–207.
  137. Willmann JK, Bonomo L, Carla Testa A, Rinaldi P, Rindi G, Valluru KS, et al. Ultrasound Molecular Imaging With BR55 in Patients With Breast and Ovarian Lesions: First-in-Human

Results. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Jul 1;35(19):2133–40.

138. Smeenge M, Tranquart F, Mannaerts CK, de Reijke TM, van de Vijver MJ, Laguna MP, et al. First-in-Human Ultrasound Molecular Imaging With a VEGFR2-Specific Ultrasound Molecular Contrast Agent (BR55) in Prostate Cancer: A Safety and Feasibility Pilot Study. *Invest Radiol*. 2017;52(7):419–27.
139. Radu A, Pichon C, Camparo P, Antoine M, Allory Y, Couvelard A, et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels. *N Engl J Med*. 2010 Oct 21;363(17):1621–30.
140. Siraj MA, Pichon C, Radu A, Ghinea N. Endothelial follicle stimulating hormone receptor in primary kidney cancer correlates with subsequent response to sunitinib. *J Cell Mol Med*. 2012 Sep;16(9):2010–6.
141. Xu Y, Pan D, Zhu C, Xu Q, Wang L, Chen F, et al. Pilot study of a novel (18)F-labeled FSHR probe for tumor imaging. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging*. 2014 Aug;16(4):578–85.
142. Minn I, Koo SM, Lee HS, Brummet M, Rowe SP, Gorin MA, et al. [64Cu]XYIMSR-06: A dual-motif CAIX ligand for PET imaging of clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Aug 30;7(35):56471–9.
143. Yang X, Minn I, Rowe SP, Banerjee SR, Gorin MA, Brummet M, et al. Imaging of carbonic anhydrase IX with an 111In-labeled dual-motif inhibitor. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;6(32):33733–42.
144. Honarvar H, Garousi J, Gunneriusson E, Höidén-Guthenberg I, Altai M, Widström C, et al. Imaging of CAIX-expressing xenografts in vivo using 99mTc-HEHEHE-ZCAIX:1 affibody molecule. *Int J Oncol*. 2015 Feb;46(2):513–20.





**Titre :** Développement de techniques d'imageries pour le diagnostic et le pronostic des tumeurs du rein

**Mots clés :** Cancer du rein, tomographie en cohérence optique, imagerie moléculaire, thérapie ciblée

**Résumé :** Le but du projet est le développement de nouvelles techniques d'imagerie pour le diagnostic et le traitement du cancer du rein. Nous avons évalué différentes techniques comprenant la tomographie en cohérence optique et l'imagerie moléculaire. Nous avons évalué différents marqueurs potentiels pour l'imagerie moléculaire en étudiant l'expression de différents marqueurs dans le cancer du rein et leur association avec le pronostic de la maladie. Enfin, nous avons évalué deux techniques d'imagerie moléculaire sur des modèles précliniques : l'Imagerie par Résonance Magnétique moléculaire et l'échographie moléculaire.

**Title:** Imaging techniques development for renal tumor diagnostic and prognostic

**Keywords:** Kidney Cancer, Optical Coherence Tomography, molecular imaging, targeted therapies

**Abstract:** The aim of this project is the development of new imaging techniques for renal cancer diagnostic and treatment. We have assessed several techniques including optical coherence tomography and molecular imaging. We assessed a series of potential markers for molecular imaging by measuring some pre-defined Markers expressions by immunohistochemistry in renal cell carcinoma and their association with disease's prognostic. Finally, we assessed two molecular imaging techniques in pre-clinical models: Molecular Magnetic Resonance Imaging and Molecular Ultrasound Imaging.

**Université Paris-Saclay**

Espace Technologique / Immeuble Discovery  
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

