



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ – LILLE2

FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année 2014

THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN MÉDECINE

CARCINOME RÉNAL À CELLULES CHROMOPHOBES :

Étude clinico-pathologique d'une série de 77 cas et caractérisation morphologique et cytogénétique des cas métastatiques

Présentée et soutenue publiquement le 5 juin 2014 à 16h au Pôle
Recherche de la Faculté de Médecine

Par Juliette Beaujot

JURY :

Président : Madame le Professeur Marie-Christine COPIN

Assesseurs : Monsieur le Professeur Arnauld VILLERS

Madame le Docteur Catherine ROCHE-LESTIENNE

Directeur : Monsieur le Professeur Xavier LEROY

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

Table des matières

I - Introduction	3
1-Historique	3
2- Epidémiologie	4
3- Facteurs de risques	5
4- Critères diagnostiques	5
a- Présentation clinique	5
b- Données radiologiques.....	6
c- Données histopathologiques	6
d- Données immunohistochimiques.....	12
e- Données de microscopie électronique.....	12
f- Données cytogénétiques.....	14
5- Pathogénie	15
6- Données moléculaires.....	16
7- Facteurs pronostiques.....	16
8- Forme familiale : le syndrome de Birt-Hogg-Dubé	18
9- Prise en charge thérapeutique.....	19
II - Objectif de l'étude	21
III - Matériel et méthodes.....	22
1- Recueil des données épidémiologiques et histopathologiques.....	22

2-	Sélection des échantillons de tissus	22
3-	Examen histopathologique	23
4-	Immunohistochimie.....	25
5-	Cytométrie en flux (CMF).....	27
6-	Analyse Comparative sur Puce à ADN (ACPA ou CGH-Array)	28
7-	Analyse statistique.....	31
IV -	Résultats.....	32
1-	Caractéristiques des carcinomes à cellules chromophobes pris en charge au CHRU de Lille de 2002 à 2013.....	32
a-	Epidémiologie	32
b-	Données histopathologiques	33
2-	Etude comparative des 6 tumeurs métastatiques versus 10 tumeurs non métastatiques.....	34
a-	Données épidémiologiques	34
b-	Données histopathologiques	34
c-	Étude immunohistochimique	40
d-	Cytométrie en flux (CMF).....	42
e-	Analyse Comparative sur Puce à ADN (ACPA ou CGH-Array).....	42
V-	Discussion	46
VI-	Conclusion.....	61
VII-	Bibliographie	62

I - Introduction

Les carcinomes à cellules chromophobes (CCCh) représentent 5 à 10% des tumeurs rénales et correspondent au troisième sous-type histologique en fréquence, après les carcinomes à cellules claires et les carcinomes papillaires. Ils sont décrits depuis une trentaine d'années et sont actuellement bien caractérisés sur le plan histopathologique, immunohistochimique, ultrastructurale et cytogénétique.

1-Historique

C'est Thoenes *et al* qui a décrit pour la première fois les CCCh, en 1985 (1). A cette date, les carcinomes rénaux étaient classés selon leurs caractéristiques cytoplasmiques, basées principalement sur leur morphologie et l'affinité tinctoriale du cytoplasme avec les colorations de l'Hématoxyline-Eosine (HE) et du bleu Alcian en microscopie optique. Ainsi, les tumeurs épithéliales étaient classées en adénome ou carcinome avec 4 types cellulaires décrits : les cellules claires, les cellules basophiles, les cellules éosinophiles et les cellules oncocytaires. Dans une série de plus de 500 tumeurs rénales épithéliales, 12 étaient restées inclassables selon les critères alors en vigueur. Ces 12 tumeurs ont alors été étudiées par Thoenes *et al* (1) en microscopie optique avec différentes colorations et en microscopie électronique afin de mieux caractériser cette population de tumeur dont les cellules ne se coloraient pas avec les colorations classiques. Ces cellules ont alors été dénommées «cellules chromophobes ». Les caractéristiques morphologiques de cette série de 12 tumeurs étaient les suivantes : architecture solide principalement et acineuse pour un des cas, cellules de grande taille, polygonales, aux cytoplasmes abondants, légèrement opaques ou finement réticulés mais pas clairs sur la coloration de l'HE et

aux noyaux anisocaryotiques avec des contours irréguliers. Dans quelques cas, une proportion de cellules aux cytoplasmes éosinophiles, modérément abondants était décrite. L'ensemble des tumeurs présentait une coloration cytoplasmique diffuse et forte, de couleur bleue, avec la coloration au fer colloïdale de Hale. La coloration du Bleu Alcian n'était que faible. L'étude en microscopie électronique révélait la présence de nombreuses fines structures vésiculaires intra-cytoplasmiques, dispersées ou parfois regroupées entre elles, mesurant de 150 à 300 nm. Ces vésicules comportaient elles-mêmes une vésicule internalisée formée à partir d'une invagination cytoplasmique de la membrane vésiculaire. Par la suite, d'autres études ultrastructurales (2–4) ont confirmé la présence de ces vésicules, ainsi que de mitochondries en quantité variable situées à proximité de la membrane cytoplasmique, comme étant assez spécifique de CCCh.

2- Epidémiologie

En France en 2011, l'Institut National du Cancer rapporte 11000 nouveaux cas de cancer du rein, soit près de 3% de l'ensemble des cancers, ceci correspondant au 6^{ème} rang par incidence et au 7^{ème} rang de mortalité (2,6% des décès par cancer).

Selon les séries, les CCCh représentent 5 à 10% des tumeurs rénales. Ils sont généralement diagnostiqués durant la cinquième décennie. Contrairement au carcinome à cellules claires, les carcinomes à cellules chromophobes sont d'excellent pronostic. Une récente série de 203 CCCh (5) rapporte que la survie sans progression est de 96,3% et 93,6% à respectivement 5 et 10 ans de suivi. Les cas de récurrence après traitement chirurgical, de récurrence ou d'évolution métastatique sont rares. Ces dernières décennies, plusieurs équipes ont fait part de leur expérience en publiant des séries de CCCh et deux récentes revues de la littérature (6,7) ont repris

l'ensemble des données liées aux formes évolutives : 6 à 7% des patients présentent une récurrence de la maladie ou une évolution métastatique et 6% des patients meurent de leur maladie.

La plupart de ces cancers sont diagnostiqués au stade I et II de la maladie (6,8,9), c'est-à-dire à un stade localisé, sans extension aux ganglions lymphatiques ou aux organes à distance.

3- Facteurs de risques

La consommation tabagique, l'obésité sévère, l'exposition professionnelle au trichloroéthylène sont des facteurs de risque de carcinome rénal, en général, mis en évidence sur des séries constituées essentiellement de patients porteurs de carcinome à cellules claires (10,11). Une récente étude a comparé les facteurs de risque au sous-type histologique des carcinomes rénaux, et confirme que la consommation tabagique et l'obésité sont des facteurs de risques de CCCh (12).

4- Critères diagnostiques

a- Présentation clinique

Comme pour toutes les tumeurs rénales, les CCCh sont souvent cliniquement asymptomatiques et de découverte fortuite, au décours d'une imagerie abdominale pour diverses indications. Les signes d'appel cliniques sont l'hématurie macroscopique, la douleur lombaire et le syndrome de masse dans la fosse lombaire. La présence de signes cliniques est souvent synonyme de tumeur plus volumineuse et évoluée.

b- Données radiologiques

Les tumeurs rénales sont bien souvent de découverte fortuite sur une imagerie abdominale. En échographie, les CCCh sont hypoéchogènes de manière uniforme, comme la majorité des tumeurs rénales. Depuis une quinzaine d'année, les progrès de l'imagerie ont surtout eu lieu dans l'amélioration des techniques de tomodensitométrie et de l'imagerie par résonance magnétique.

En tomodensitométrie, les CCCh montrent une prise de contraste homogène alors que les carcinomes à cellules claires, les carcinomes papillaires et les carcinomes des tubes collecteurs présentent une prise de contraste périphérique hétérogène. De plus, les CCCh seraient assez fréquemment le siège de calcifications, contrairement aux carcinomes à cellules claires (13).

L'imagerie par résonance magnétique retrouve globalement les mêmes caractéristiques que les carcinomes à cellules claires, à savoir une lésion en hyposignal T1. Cependant, les CCCh, même de grande taille, ne présentent que très rarement des remaniements nécrotiques (14).

Plus récemment, les données de l'imagerie par résonance magnétique dynamique montrent que les CCCh ont un index de rehaussement intermédiaire aux phases corticomédullaire et néphrographique, alors que les carcinomes à cellules claires ont un index élevé et les carcinomes papillaires ont un index bas (15).

c- Données histopathologiques

Depuis la première observation de Thoenes *et al*, les critères de diagnostic anatomopathologique se sont précisés.

Sur le plan macroscopique, il s'agit de tumeur unifocale, bien limitée mais non encapsulée, charnue, parfois lobulée, de couleur grise, beige à brune ou jaune (6–8). Les remaniements hémorragiques ou nécrotiques sont observés dans environ 15% des cas (8). Il n'y a habituellement pas de fibrose centrale stellaire comme dans les oncocytomes (Figure 1).

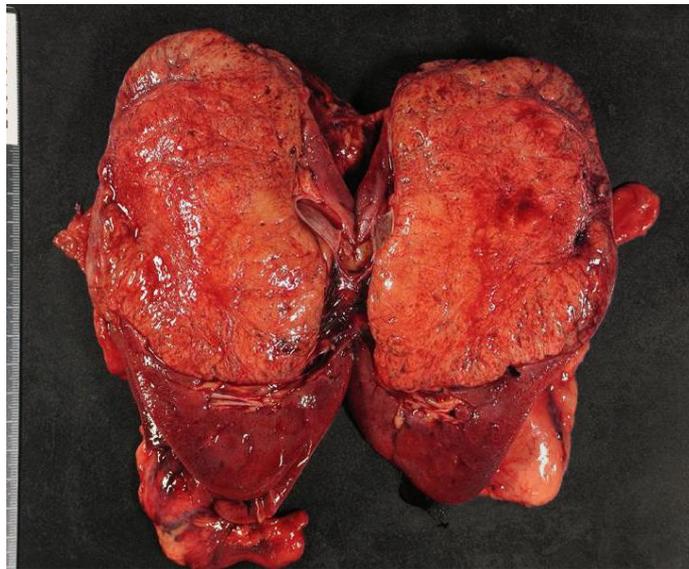


Figure 1- Aspect macroscopique d'un CCCh: lésion bien limitée, de couleur brun-beige, lobulée

Sur le plan microscopique, l'architecture tumorale est le plus souvent faite de larges alvéoles de cellules séparées par de fines cloisons fibrovasculaires, mais aussi de nids de cellules, de travées, de nappes solides, de tubules ou de papilles (1,5–7,16).

Dans les CCCh, 2 types de cellules tumorales sont décrites : les cellules d'aspect « classique » et les cellules d'aspect « éosinophile ». Les secteurs dits « classiques » sont constitués de cellules de grande taille, aux contours quadrangulaires, avec une membrane cytoplasmique bien dessinée. Leur cyoplasme est clarifié, microbuleux, réticulé. Leurs noyaux possèdent des contours irréguliers, parfois très anguleux ou avec un aspect chiffonné, incisuré, sans nucléole proéminent. Un halo clair péri-nucléaire est fréquemment observé, ainsi que des binucléations. Les secteurs dits « éosinophiles » sont constitués de cellules de plus petite taille avec des contours membranaires plus arrondis, un cytoplasme éosinophile, modérément abondant et un noyau plus régulier que dans la forme classique. Ainsi, trois variants de CCCh sont décrits :

- le variant classique, possédant plus de 80% de cellules classiques (Figure 2)
- le variant éosinophile, possédant plus de 80% de cellules éosinophiles (Figure 3)
- le variant mixte, possédant plus de 20% des deux types de cellules (Figure 4)

Plus récemment, une équipe japonaise a proposé un nouveau variant de CCCh appelé variant « oncocytaire » qui présente une cytologie d'oncocytome, avec de grandes cellules éosinophiles et des noyaux de petite taille, arrondis, mais des caractéristiques immunohistochimiques et cytogénétiques de CCCh (17,18). Ce variant n'est cependant pas encore reconnu par les sociétés internationales d'uropathologie.

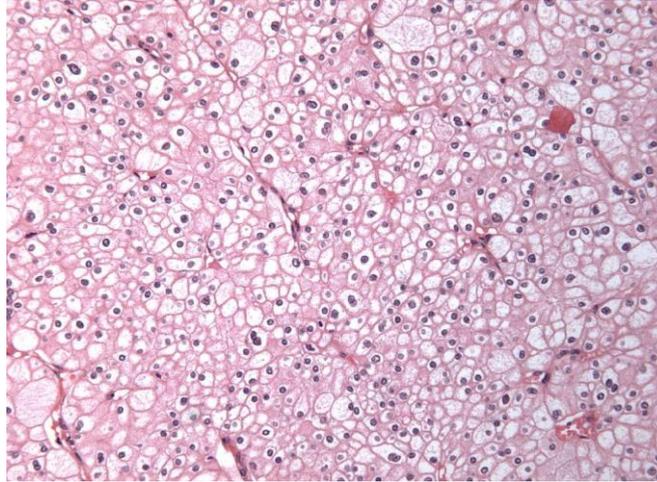


Figure 2- Variant classique de CCCh

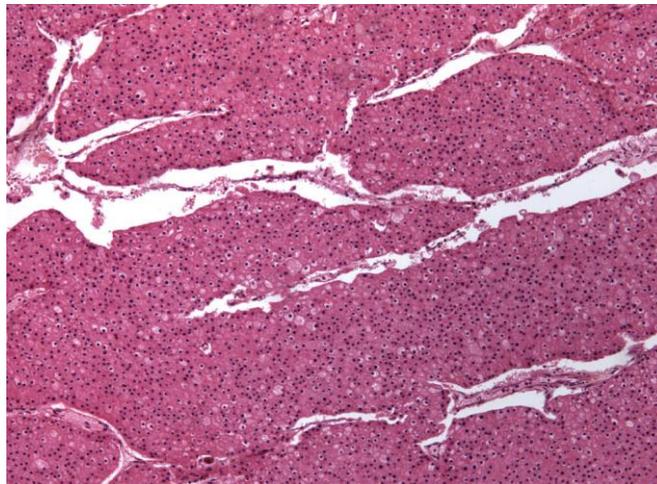


Figure 3- Variant éosinophile de CCCh

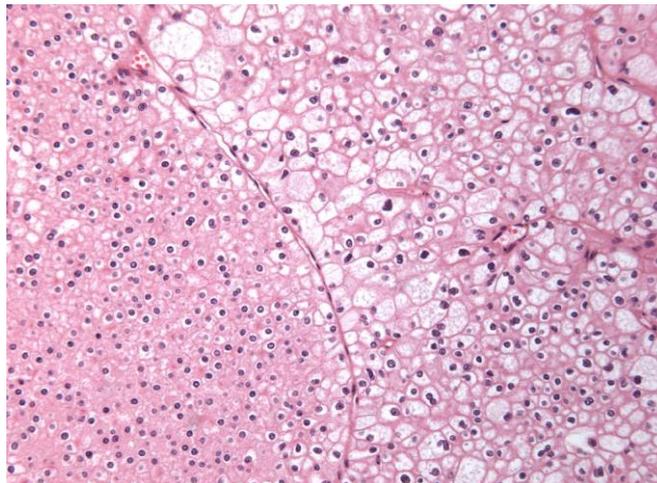


Figure 4- Variant mixte de CCCh associant un secteur dit "classique" (à droite) et un secteur dit "éosinophile" (à gauche).

Comme pour tous les carcinomes rénaux, les CCCh peuvent présenter un contingent sarcomatoïde. Comme son nom l'indique, ce contingent ressemble à une prolifération sarcomateuse et est défini par une augmentation de la densité cellulaire, des cellules fusiformes et atypiques agencées en faisceaux. Tous carcinomes rénaux confondus, sa prévalence serait d'environ 5% (19) et sa présence est associée à un mauvais pronostic avec une médiane de survie de 4 à 9 mois après que le diagnostic ait été posé (19,20). Selon certains auteurs, les CCCh seraient les carcinomes rénaux les plus fréquemment associés à un contingent sarcomatoïde avec une prévalence d'environ 8% (6,21–23). Cependant, d'autres séries, dont les deux plus grandes séries de CCCh (291 et 203 cas) ne retrouvent qu'environ 2% de tumeurs avec un contingent sarcomatoïde (5,8,9,24).

Jusqu'à la fin de l'année 2013, le grade nucléaire de Führman était appliqué aux CCCh, mais la conférence de consensus de l'International Society of Urological Pathology (ISUP) de Vancouver de 2013 a recommandé de ne plus l'utiliser pour ce type de carcinome (25). Le grade nucléaire de Führman, décrit en 1982, soit avant même la reconnaissance des CCCh, s'établit sur la taille nucléaire, la forme nucléaire et la proéminence du nucléole (26) (Tableau 1). Plusieurs études ont montré que ce grade n'était pas lié à la survie des patients atteints de CCCh (27,28), contrairement aux carcinomes à cellules claires. En effet, les CCCh présentant volontiers des noyaux aux contours irréguliers, ce grade n'est pas adapté.

	Taille du noyau	Contours du noyau	Nucléoles	Cellules monstrueuses
Grade 1	10 mm	Réguliers	Absents ou imperceptibles	0
Grade 2	15 mm	Discrètes irrégularités	Visibles au grossissement x 400	0
Grade 3	20 mm	Nettement irréguliers	Visibles au grossissement x 100	0
Grade 4	Idem grade 3	Idem grade 3	Idem grade 3	Cellules monstrueuses multilobées

Tableau 1- Critères du grade nucléaire de Führman

Plusieurs équipes ont proposé d'autres systèmes de grade tumoral. Le grade nucléolaire, basé uniquement sur la taille nucléolaire, selon les critères de Führman, est montré comme un facteur indépendant de survie (29,30), mais uniquement pour les carcinomes à cellules claires et les carcinomes papillaires. En 2010, Paner *et al* proposent un grade basé sur la densité nucléaire et l'anaplasie, en 3 catégories (31). Przybycin *et al* proposent en 2011 un grade nucléaire modifié en 4 catégories qui ne tient pas compte des foyers de cellules avec un noyau hyperchromatique, polylobé, sans nucléole, ainsi que des zones où les noyaux se chevauchent (5). Cependant ces grades n'ont pas été validés par les sociétés internationales d'uropathologie comme étant significativement indépendant du stade tumoral.

Les cellules tumorales des CCCh sont classiquement colorées par la préparation au fer colloïdal de Hale : les cytoplasmes sont colorés de manière diffuse d'une couleur bleue, contrairement aux cellules des oncocytomes pour lesquelles la coloration de Hale montre un marquage de la région apicale de la cellule. Cette coloration met en évidence des muco-polysaccharides acides sulfatés, mais le mécanisme chimique exact est encore imprécis.

d- Données immunohistochimiques

Les CCCh expriment la Cytokératine-7 (CK7), avec un marquage cytoplasmique et un renforcement membranaire du cadre cytoplasmique, de l'ensemble ou d'une partie des cellules tumorales. La CK7 est le meilleur marqueur pour différencier les CCCh des oncocytomes dont la morphologie peut être proche des variants éosinophiles. Dans les oncocytomes, la CK7 est exprimée de manière très focale. Récemment, l'équipe de Jain *et al* (32) décrit un nouveau marqueur immunohistochimique, l'Amylase α -1A (AMY1A), qui est positive dans 100% des oncocytomes de leur étude et négative dans 96% des CCCh. D'autres marqueurs ont également été testés ces dernières années pour distinguer ces 2 entités, comme LMP2, parvalbumine, MOC-31, caveolin-1, S100A1, claudin-7 et 8, MAGE-A3/4 et NYES0-1, utilisés seuls ou en combinaisons, mais aucun ne semble totalement spécifique à l'un ou à l'autre diagnostic (33–39).

Les CCCh expriment également le CD117, l'EMA et l'E-Cadhérine de manière diffuse. Le CD10 et la vimentine ne sont généralement pas exprimés, contrairement aux carcinomes à cellules claires (25,40,41).

e- Données de microscopie électronique

Thoenes *et al* ont fait la première description ultrastructurale des CCCh en 1985, en caractérisant ces tumeurs par la présence de multiples vésicules intracytoplasmiques de 150 à 300 nm, contenant elles-mêmes une vésicule internalisée secondairement à une invagination de la membrane vésiculaire (1). Ces vésicules ont ensuite été décrites par d'autres auteurs, dans plusieurs autres sous types tumoraux, mais jamais en quantité aussi importante que dans les CCCh (Figure 5). De plus, dans les

CCCh, elles sont associées à des mitochondries en nombres variables et en position périphérique dans le cytoplasme, au sein desquelles des cristaux tubulo-vésiculeux étaient observés (42–44). Les variants éosinophiles de CCCh comportent des mitochondries en plus grand nombre par rapport aux variants classiques (45).

La nature exacte de ces vésicules n'est pas connue, cependant une composante mucopolysaccharidique intra-vésiculaire ou extra-vésiculaire est supposée par certains auteurs, ainsi qu'une origine mitochondriale (46,47).

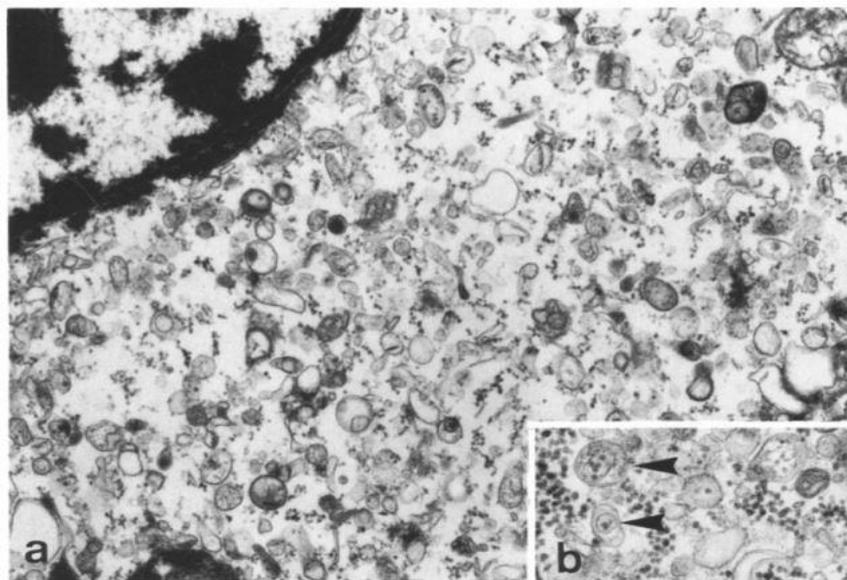


Figure 5- a) Vésicules intracytoplasmiques périnucléaires d'un CCCh. b) vésicules internalisées bien visibles.

Source: Stöker *et al* (3)

f- Données cytogénétiques

Des pertes chromosomiques non aléatoires et récurrentes ont été décrites dans les CCCh (48–52). Ces anomalies chromosomiques ont d'abord été démontrées par la cytogénétique conventionnelle (caryotype conventionnel) (Figure 6), puis dans les années 90 par le développement de la cytogénétique moléculaire (hybridation in situ par fluorescence, analyse de microsatellite, hybridation génomique comparative sur métaphase, puis sur puce à ADN et SNP-Array). Ces anomalies récurrentes concernent la perte des chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 et 21. Aujourd'hui, ces anomalies sont considérées comme étant spécifiques du diagnostic de carcinome à cellules chromophobes et leur mise en évidence peut s'avérer utile dans les cas de diagnostic histopathologique incertain. Ces anomalies sont également retrouvées dans les formes pédiatriques de CCCh (53).

Ces pertes chromosomiques jouent probablement un rôle dans la tumorigenèse et dans l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, mais cela n'est pas encore clairement défini.

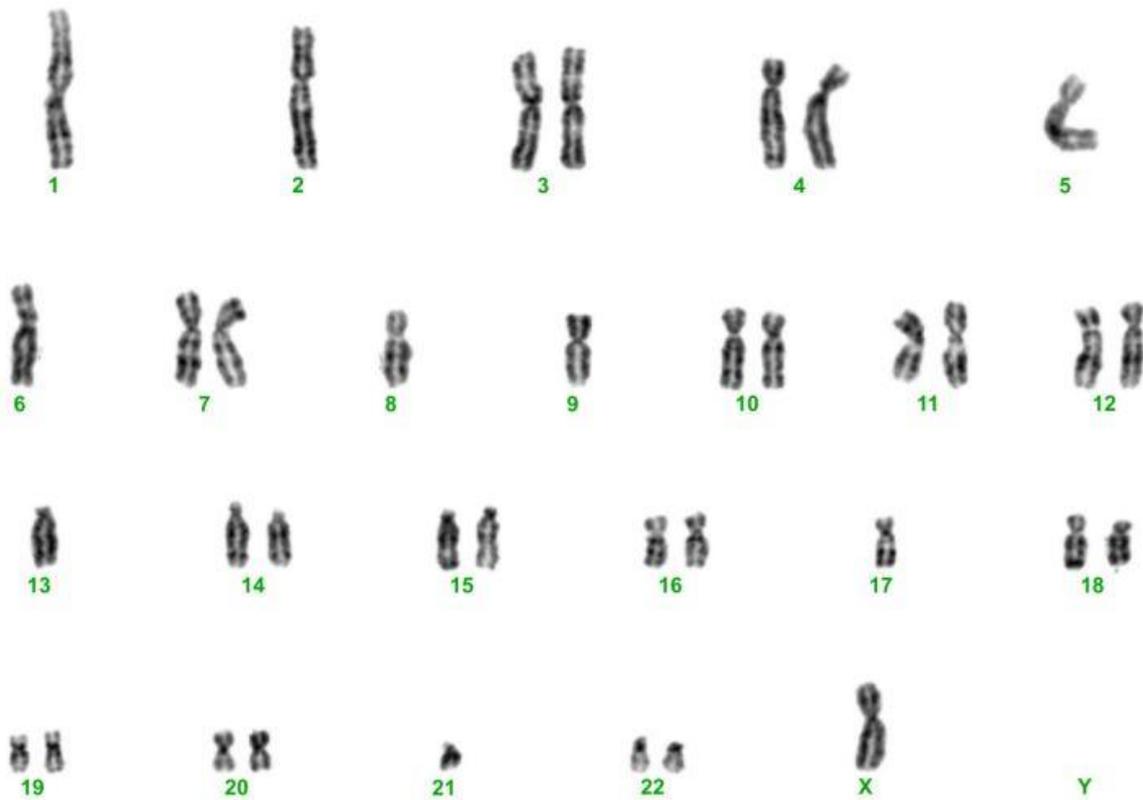


Figure 6- Caryotype conventionnel d'un CCCh d'une adolescente de 17 ans. Caryotype hypodiploïde avec perte des chromosomes 1, 2, 5, 6, 8, 9, 13, 17, 21 et X. Source: Soller *et al* (39)

5- Pathogénie

Les cellules à l'origine des CCCh pourraient être les cellules intercalaires des tubes collecteurs corticaux. C'est Störkel *et al* qui fait cette hypothèse en 1989, suite à l'analyse ultrastructurale et immunohistochimique d'une série de 10 CCCh et de parenchyme rénal non tumoral (3). Ils montraient que les cellules intercalaires des tubes collecteurs comportaient des vésicules intracytoplasmiques, en position apicale, identiques à celles observées dans les CCCh. De plus, ces cellules possédaient globalement le même profil immunohistochimique, à savoir un marquage membranaire avec renfort apical pour l'anticorps anti-EMA.

6- Données moléculaires

Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la tumorigenèse des CCCh ne sont pas entièrement connus à l'heure actuelle.

Récemment, Chaux *et al* (54) ont étudié l'implication de la voie de signalisation de mTOR (mammalian target of rapamycin) dans les CCCh. mTOR est une enzyme qui intervient dans la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la mobilité cellulaire, la survie cellulaire, la synthèse protéique et la transcription. Lorsqu'elle est anormalement activée, elle prend alors un rôle d'oncogène (55). Chaux *et al* démontrent que, dans les CCCh, l'expression immunohistochimique de la molécule PTEN, en amont de mTOR, est diminuée dans les cellules tumorales et que l'expression des molécules en aval, phospho-S6 et 4EBP1 sont au contraire augmentées. Cela impliquerait donc une activation de la voie de signalisation de mTOR. Contrairement aux carcinomes à cellules claires et aux carcinomes papillaires du rein, l'expression de la molécule HIF-1 α n'était pas significativement augmentée par rapport au tissu sain dans cette étude.

Ces données sont confortées par la bonne réponse thérapeutique de patients atteints de CCCh métastatiques sous inhibiteur de mTOR (temsirolimus).

7- Facteurs pronostiques

Différents facteurs pronostiques indépendants liés à la survie sans progression ou lié à survie spécifique de la maladie ont été rapportés par de nombreux auteurs. Il s'agit du stade tumoral (figure 7), d'une taille tumorale >7cm, de la présence de nécrose tumorale et la présence d'un contingent sarcomatoïde (5,6,8,9,56). Pour Przybycin *et al*, les embolus tumoraux seraient un facteur de moins bon pronostic (5). Pour Paner

et al, le grade nucléaire qu'ils proposent serait également un facteur pronostique de qualité (31).

En cas de maladie métastatique, les CCCh ont un meilleur pronostic que les carcinomes papillaires métastatiques et un pronostic globalement similaire aux carcinomes à cellules claires métastatiques, avec une médiane de survie d'environ 29 mois (57).

<p>T – TUMEUR PRIMITIVE TX – Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive T0 – Pas de signe de tumeur primitive T1 – Tumeur intrarénale ≤ 7 cm dans son plus grand diamètre T1a – tumeur ≤ 4 cm T1b – tumeur > 4 cm et ≤ 7cm T2 – Tumeur intrarénale > 7 cm dans son plus grand diamètre, limitée au rein T2a – tumeur > 7 cm et ≤ 10 cm T2b – tumeur > 10 cm, limitée au rein T3 – Tumeur étendue aux veines majeures ou aux tissus périrénaux mais sans envahissement de la glande surrénale ipsilatérale ni dépassement du fascia de Gérota T3a – Tumeur macroscopiquement étendue à la veine rénale ou à ses branches segmentaires (contenant des muscles) ou tumeur envahissant la graisse péri rénale et/ou le tissu adipeux du sinus rénal (hile rénal) mais sans dépassement du fascia de Gérota T3b – Tumeur macroscopiquement étendue à la veine cave au-dessous du diaphragme T3c – Tumeur macroscopiquement étendue à la veine cave au-dessus du diaphragme ou envahissant la paroi de la veine cave T4 – Tumeur étendue au-delà du fascia de Gérota (y compris l'extension par contiguïté à la glande surrénale ipsilatérale)</p> <p>N – ADÉNOPATHIES RÉGIONALES NX – Renseignements insuffisants pour classer l'atteinte des ganglions lymphatiques N0 – Pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux N1 – Atteinte d'un seul ganglion lymphatique régional N2 – Atteinte de plus d'un ganglion lymphatique régional</p> <p>M – MÉTASTASES À DISTANCE M0 – Pas de métastases à distance M1 – Métastases à distance</p>

Figure 7- Classification TNM des carcinomes rénaux, 2009 (UICC). Source: HAS, INCA

8- Forme familiale : le syndrome de Birt-Hogg-Dubé

Le syndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD) est rare et touche environ 200 familles dans le monde (58,59). Cette maladie est une génodermatose autosomique dominante, secondaire à une mutation du gène FLCN, situé sur le chromosome 17 en position 17p11.2, codant pour la folliculine (60). Le rôle de la folliculine n'est pas encore parfaitement connu, mais cette protéine aurait un rôle suppresseur de tumeur (61) et interviendrait dans la voie de signalisation mTOR-AMPK (62,63).

Cliniquement, ce syndrome se manifeste par des tumeurs cutanées bénignes (fibrofolliculome, trichodiscome), des kystes pulmonaires associés à des pneumothorax récidivants et des tumeurs rénales, souvent bilatérales et multiples (64). La prévalence des tumeurs rénales chez les patients porteurs d'une mutation sur le gène FLCN est assez large d'une étude à l'autre et s'étend de 6,5 à 34% (58,65,66):

- 50% de ces tumeurs sont représentées par des tumeurs hybrides, tumeur associant un contingent de cellules possédant les caractéristiques morphologiques des CCCh et un second contingent de cellules typiques d'oncocytome. Ces 2 contingents cellulaires sont alors très étroitement mêlés (Figure 8).
- 30% des tumeurs sont des CCCh
- 10% sont des carcinomes à cellules claires
- Description de rares carcinomes papillaires

Les tumeurs hybrides auraient un pronostic qui se rapproche plus de celui des oncocytomes que des CCCh (67).

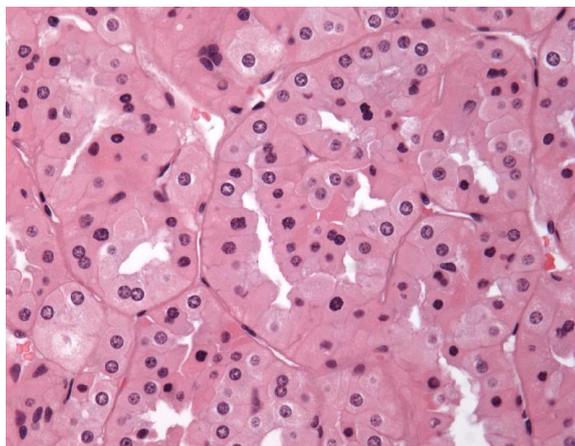


Figure 8- Aspect morphologique d'une tumeur hybride, associant des aspects de CCCh et d'oncocytome

9- Prise en charge thérapeutique

Dans la grande majorité des cas, les CCCh sont découverts à un stade précoce et localisé de la maladie (pT1 ou pT2). Ainsi, un traitement chirurgical par néphrectomie partielle ou élargie, selon la taille, la localisation tumorale, l'envahissement du hile rénal, suivi d'une surveillance annuelle clinique et radiologique est bien souvent suffisant. En effet, la survie sans progression à 5 ans après résection chirurgicale pour des tumeurs localisées est de 83% et la survie spécifique liée à la maladie est de 89% (68).

Malgré les avancées thérapeutiques dans le domaine des carcinomes à cellules claires métastatiques ces 10 dernières années, il n'existe aujourd'hui toujours pas de consensus quant à la prise en charge thérapeutique des formes métastatiques de CCCh. Plusieurs essais thérapeutiques faisant intervenir des thérapies ciblées sont en cours.

Un essai de phase III comparant le temsirolimus (inhibiteur de mTOR) et l'interferon alpha dans les carcinomes rénaux de stade avancé a été mené par Hudes *et al* (69). Il montrait que quel que soit le type histologique, tous les carcinomes rénaux

semblaient répondre de manière équivalente au temsirolimus : les carcinomes non à cellules claires avaient une survie globale de 11,6 mois versus 10,7 mois pour les carcinomes à cellules claires. Le traitement par interféron alpha avait une réponse moindre dans le groupe des carcinomes non à cellules claires (4,3 mois de survie globale) par rapport au groupe de carcinomes à cellules claires (8,2 mois de survie globale). Cependant, dans cette étude, les CCCh représentaient à peine 20% de l'effectif du groupe carcinome non à cellules claires et 3% de l'effectif total. Une récente étude de cas a rapporté une survie sans progression de 20 mois sous temsirolimus chez une patiente de 36 ans avec un CCCh métastatique, après échec du sunitinib (70).

Les inhibiteurs de tyrosine kinase ont également fait l'objet d'études : Choueiri *et al* a suivi 7 patients porteurs de CCCh métastatiques sous sunitinib et 5 autres patients sous sorafenib. 1 seul des 7 patients sous sunitinib et 2 des 5 patients sous sorafenib ont présenté une réponse partielle, soit une réponse partielle pour 25% de l'effectif. Les patients sous sorafenib semblaient avoir une médiane de survie sans progression plus prolongée (27,5 mois) par rapport à ceux sous sunitinib (71).

Le gène C-Kit semble surexprimé dans les CCCh, sans que les mécanismes de régulation soient identifiés. Aucune mutation activatrice du gène C-Kit n'a été identifié (72–74). Cependant, C-Kit pourrait ainsi être une nouvelle piste thérapeutique avec des inhibiteurs de C-Kit, tel que l'imatinib, le dasatinib ou le nilotinib. Aucune étude avec ses molécules n'a été effectuée pour le moment.

II - Objectif de l'étude

Les carcinomes à cellules chromophobes métastatiques étant rares, peu d'études ont été menées sur le sujet. Notre objectif était de mieux caractériser les cas métastatiques de CCCh et de mettre en évidence de nouveaux facteurs pronostiques basés sur l'index mitotique, l'évaluation de la prolifération cellulaire, la ploïdie et le profil cytogénétique par CGH-Array.

Notre travail a porté sur l'ensemble des CCCh diagnostiqués et traités au CHRU de Lille de 2002 à 2013, à partir desquels les cas métastatiques ont été extraits et comparés à des cas non métastatiques.

III - Matériel et méthodes

1- Recueil des données épidémiologiques et histopathologiques

C'est à l'aide des logiciels Diamic (Infologic-santé), base de données anatomopathologiques, et Sillage, dossier patient informatisé du CHRU de Lille, que l'ensemble des données épidémiologiques et histopathologiques ont été extraites. Nous avons recensé l'ensemble des CCCh diagnostiqués sur pièce opératoire entre 2002 et 2013, pour lesquels les patients ont été opérés dans le service d'Urologie (Pr Arnaud Villers) du CHRU de Lille. Nous avons recueilli les données concernant l'âge, le sexe, la latéralité, le caractère unifocal ou multifocal, la taille tumorale, la présence de nécrose tumorale, d'embolies tumorales, d'un contingent de carcinome sarcomatoïde, de métastases ganglionnaires ou à distance et enfin du stade pTNM.

2- Sélection des échantillons de tissus

Dans un second temps, avec l'aide des Docteurs Hennon et Flamand du service d'Urologie, après interrogation de la base de données des cancers du rein du CHRU de Lille, nous avons extrait de cette série les patients métastatiques (au nombre de 6) et sélectionné 10 autres patients sans évolution métastatique, choisis en fonction de la disponibilité et de la qualité du matériel congelé dans le cadre de la Tumorotheque du C2RC de l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille.

Les 16 cas de CCCh, provenant de 16 patients différents, ont tous été fixés par le formaldéhyde puis inclus en paraffine. Pour l'ensemble des 16 cas, les blocs de paraffine étaient disponibles mais seulement 15 d'entre eux présentaient du matériel tumoral congelé utilisable. En effet, pour l'un des 6 cas métastatiques, le matériel congelé était uniquement constitué de nécrose tumorale.

3- Examen histopathologique

Les lames colorées par l'Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) des 16 tumeurs sélectionnées ont permis un examen précis de l'architecture tumorale, de la morphologie nucléaire, et ainsi de l'établissement du grade nucléaire de Führman et du grade nucléaire de Paner, après relecture par deux pathologistes. La présence d'un contingent de carcinome sarcomatoïde, de nécrose tumorale et d'emboles tumoraux a été évaluée. Un compte mitotique sur 10 champs au grossissement x400, soit sur 3 mm², a été effectué dans les zones les plus riches en mitoses.

Le grade nucléaire de Paner a été évalué selon les critères établis par Paner *et al* (31):

- Grade 1: CCCh avec irrégularités nucléaires classiquement décrites, sans les critères d'augmentation de la densité nucléaire et d'anaplasie correspondant aux grades 2 et 3 (Figure 9).
- Grade 2: augmentation de la densité nucléaire, définie par des secteurs où les cellules présentent une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique visible à l'objectif x10 et avec des noyaux en contact direct les uns avec les autres à l'objectif x40. Il doit s'y associer un pléomorphisme nucléaire défini par une variation de taille de noyau du simple au triple et des irrégularités chromatiniennes (Figure 10).
- Grade 3: Présence d'une anaplasie franche (noyaux polylobés, cellules géantes) (Figure 11) ou d'un contingent sarcomatoïde.

Pour établir ce grade, les critères nucléaires doivent être présents dans au moins 2 aires distinctes d'une même tumeur. Le grade le plus important doit être retenu.

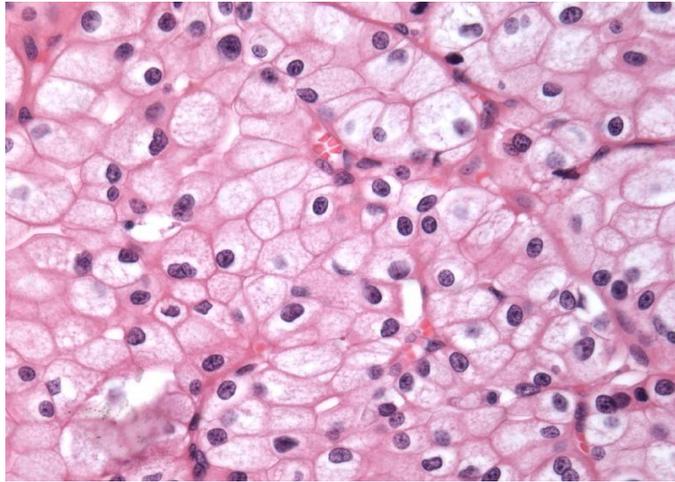


Figure 9- Grade 1 de Paner

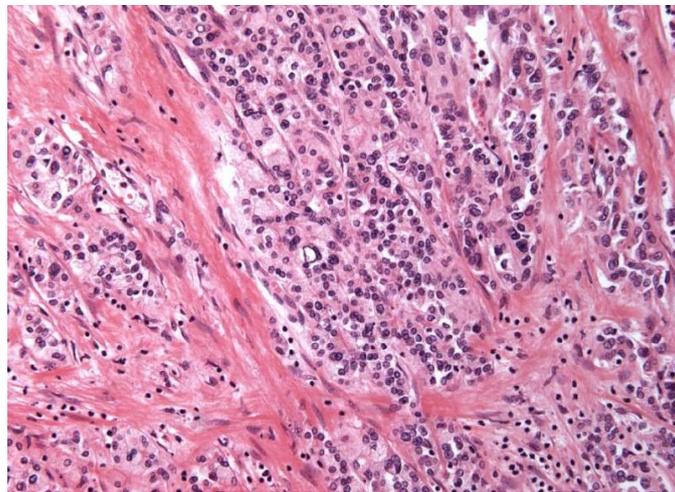


Figure 10- Grade 2 de Paner

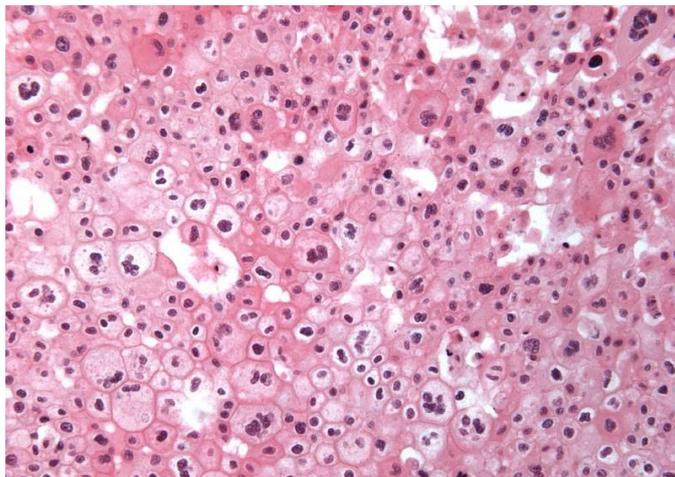


Figure 11- Grade 3 de Paner

4- Immunohistochimie

Technique

Des coupes tissulaires de 4 µm étaient réalisées à partir des blocs de tissus inclus en paraffine des 16 tumeurs sélectionnées. Elles ont été étalées sur lames silanées (DakoFlex) et séchées à l'étuve à 56°C pendant 12 heures. Les étapes de déparaffinage, de prétraitement, de blocage de l'activité peroxydase endogène, d'incubation, d'amplification et de révélation étaient automatisées (automate Ventana Benchmark XT et ultra), assurant ainsi des résultats homogènes.

L'utilisation des anticorps anti-Ki67 (clone Mib-1, Dako) et anti-c-MET (clone SP44, Ventana) nécessitait un prétraitement des coupes tissulaires dans un tampon EDTA légèrement basique (CC1) afin d'hydrolyser les liaisons covalentes formées par le formaldéhyde dans les tissus.

Le blocage de la peroxydase endogène était réalisé à l'aide d'eau oxygénée, mise directement en contact avec les coupes tissulaires durant 8 minutes. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire. Puis des anticorps secondaires biotinylés détectaient la présence ou non de l'anticorps primaire. La révélation de la réaction des anticorps primaires et secondaires se fait par le biais d'un chromogène, le diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB + H₂O₂), appliqué durant 8 minutes sur la lame. Le DAB produit un précipité de couleur brune.

Pour mieux apprécier la morphologie du tissu examiné, les coupes tissulaires étaient ensuite contre-colorées par de l'hématoxyline associée à du Bluing Reagent (solution de carbonate de lithium et de carbonate de sodium), permettant d'obtenir ainsi une légère coloration bleu clair. Puis les coupes étaient deshydratées et passaient dans le xylène. Pour finir, les lamelles étaient montées à l'Eukitt (Labonord©).

Interprétation

Pour l'évaluation de l'index de prolifération, nous avons compté les noyaux marqués par l'anticorps anti-Ki67 dans les foyers de « hot spot » sur 2000 cellules et nous avons évalué au faible grossissement la moyenne des noyaux marqués sur l'ensemble de la lame.

L'anticorps anti-c-MET est utilisé à la recherche d'une amplification du gène *c-MET*.

Il s'interprète en fonction de l'intensité et du pourcentage de cellules marquées :

- Score 0 : absence de marquage ou marquage douteux ou <50% de cellules marquées.
- Score 1+ : ≥50% de cellules marquées avec une intensité faible ou marquage cytoplasmique et/ou membranaire d'intensité modérée ou forte mais représentant <50% des cellules tumorales
- Score 2+ : ≥50% de cellules marquées avec une intensité modérée ou marquage cytoplasmique et/ ou membranaire d'intensité forte mais représentant <50% des cellules tumorales
- Score 3+ : ≥50% de cellules marquées avec une intensité forte, membranaire et/ou cytoplasmique.

Les scores 0 et 1+ sont considérés comme négatifs et les scores 2+ et 3+ comme positifs. Les cas positifs doivent faire l'objet d'une étude par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) afin de rechercher une amplification du gène *MET*.

5- Cytométrie en flux (CMF)

A partir des 16 tumeurs sélectionnées, des blocs de paraffine comportant une majorité de tissu tumoral et un peu de tissu sain ont été choisis. Cinq coupes de 50µm ont été déparaffinées puis réhydratées. Les tissus ont été dilacérés mécaniquement à l'aide d'un scalpel et chimiquement par de la pepsine durant 2 heures, pour obtenir une suspension cellulaire. Les cellules ont ensuite été soumises à une RNase dans une solution tampon (Isoflow) durant 1 heure. Les noyaux ont été ensuite colorés par de l'iodure de propidium. Le calibrage de l'automate de lecture se fait avec une solution de thymocytes de veau. La lecture se fait par l'automate Navios de Beckman Coulter (Bréa, Etats Unis). 10000 à 20000 noyaux ont été comptés pour déterminer la ploïdie de l'ADN, sur 2 blocs tumoraux différents par tumeur.

L'apparition d'un troisième pic sur l'histogramme, différent des pics correspondants aux phases G₁G₀ et G₂M, était considéré comme aneuploïde. Les tumeurs qui présentaient une augmentation de plus de 15% du pic G₂M associé à un petit pic octoploïde étaient considérées comme tétraploïdes. Un index d'ADN à 1,0 +/- 0,1 était considéré diploïde. Les index d'ADN compris entre 0,81 et 0,89 et entre 1,11 et 1,19 étaient considérés comme péri-diploïde de type hypodiploïde ou hyperdiploïde. L'hypodiploïdie est définie par un index d'ADN < 0,8 et l'hyperdiploïdie par un index d'ADN > 1,2. Tous les échantillons avaient un coefficient de variation (CV) < 8. Les histogrammes obtenus étaient interprétés en fonction du pourcentage de cellules tumorales du prélèvement par le Pr Pierre Gosset.

6- Analyse Comparative sur Puce à ADN (ACPA ou CGH-Array)

La CGH-Array (Array Comparative Genomic Hybridization), encore dénommée ACPA pour Analyse Comparative sur Puce à ADN, est une technique de cytogénétique moléculaire permettant d'obtenir un caryotype moléculaire.

13 échantillons tumoraux congelés et 3 échantillons tumoraux fixés par le formaldéhyde et issus de blocs de paraffine ont été utilisés pour une analyse pangénomique. La technique a été réalisée par l'équipe de la plateforme Pucés à ADN de l'Institut de Génétique Médicale du CHRU de Lille. Les résultats ont été interprétés par les Drs Andrieux et Roche-Lestienne.

L'ensemble de la technique est illustré par la figure 12.

Extraction et fragmentation de l'ADN

Les ADN extraits à partir des prélèvements congelés font l'objet d'une digestion enzymatique par des enzymes de restriction AluI et RsaI afin d'obtenir des fragments d'ADN allant de 200 pb à 500 pb. L'ADN des prélèvements issus de bloc de paraffine est déjà fragmenté par la fixation au formaldéhyde et ne bénéficie donc pas de l'étape de digestion. La digestion enzymatique s'effectue durant 2h à 37°C. Les enzymes sont ensuite inactivées par une incubation de 20 minutes à 65°C.

Marquage et purification des échantillons

L'ADN extrait à partir des échantillons de patients est marqué (incorporation d'un dUTP marqué) par de la Cyanine-5, fluorochrome émettant dans une couleur rouge. Un ADN de référence, féminin ou masculin (PROMEGA™), est marqué par de la Cyanine-3, fluorochrome émettant dans une couleur verte. Une quantité égale (500ng) d'ADN de patient et d'ADN de référence marqués sont rassemblés et purifiés sur AMICON® YM-30 pour éliminer les résidus réactionnels. Les ADNs

purifiés sont ensuite dosés au NanoDrop ND1000® pour évaluer le taux d'incorporation des Cyanines et ajuster le volume final de la préparation qui doit être de 40 µL.

Hybridation

Le mélange d'ADNs est ensuite déposé sur un « gasket » (lame compartimentée par un joint), recouvert de la lame Agilent™, qui sont alors scellés dans une chambre d'hybridation et incubés pour 24h dans un four d'hybridation à 65°C, sous une rotation de 20 rpm. La lame Agilent™ comporte 8 puits constitués de 60000 sondes chacun de taille et de position génomique déterminées et connues (8 ADNs peuvent être analysés dans le même temps).

Rinçage et scan des lames

Après 24h d'hybridation à 65°C, la lame est rincée à plusieurs reprises, puis elle est placée dans le scanner Agilent™. Les lasers excitent les spots avec les 2 longueurs d'onde correspondants aux cyanines : 650 nm pour la Cyanine-5 et 550 nm pour la Cyanine-3. La lame est scannée à la résolution de 3 µm.

Extraction et analyse des données

L'extraction des données a été réalisée par le logiciel CytoGenomics version 2.7.22 (Agilent™) qui permet de traduire l'intensité lumineuse de chaque spot en « ratio de fluorescence ». Une valeur de DLRS (Derivative Log Ratio Spread) inférieure à 0,3 était le témoin d'une bonne qualité de l'ADN du prélèvement et donc de données analysables. La centralisation des log de ratio de fluorescence se faisait sur le pic majoritaire d'ADN et le logiciel considérait ce pic comme le pic «diploïde ». Les ratio de fluorescence sont considérés significatif pour un log à -0,25 pour une perte et un log à +0,25 pour un gain chromosomique. Ainsi, les pertes chromosomiques sont

déTECTABLES sur un échantillon comportant au moins 30% de cellules tumorales porteuses de l'anomalie et les gains chromosomiques sont détectables à partir de 40% de cellules tumorales.

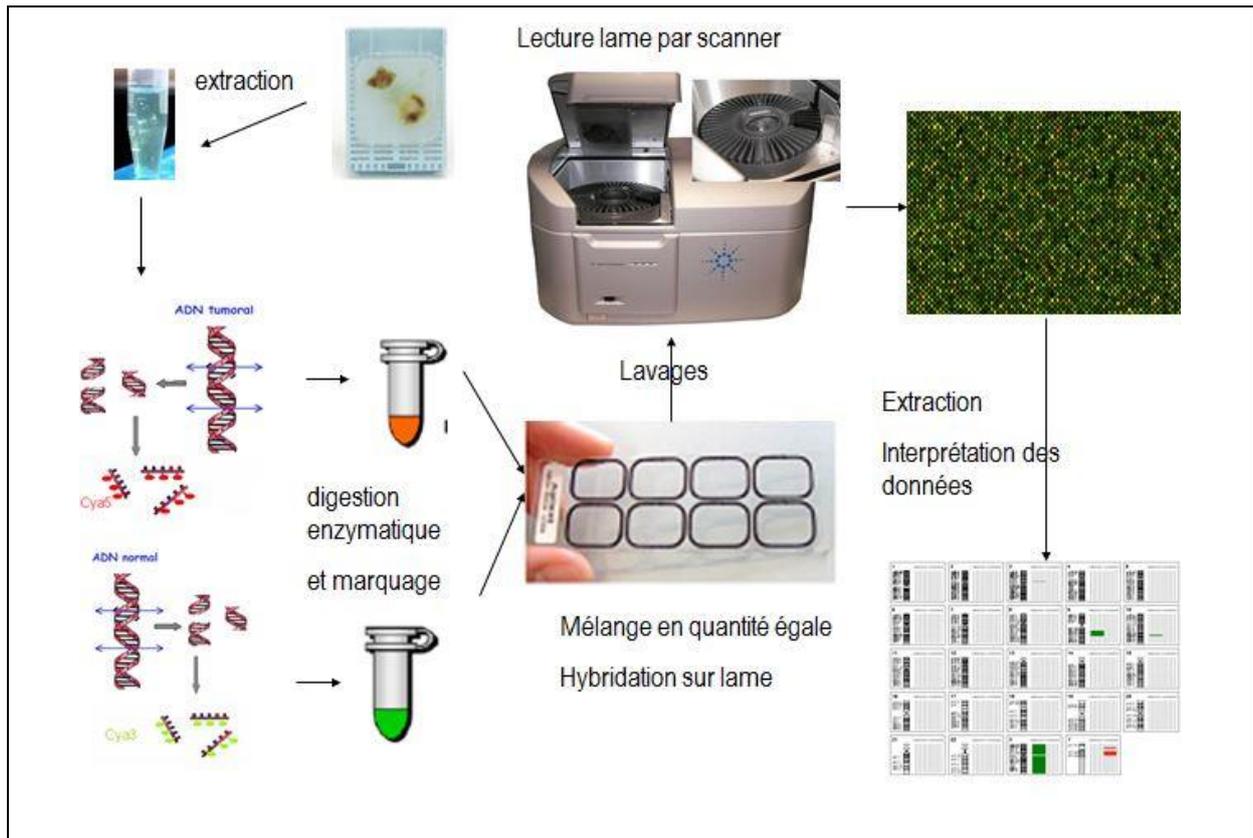


Figure 12: illustration de la technique de CGH-Array. Source: CHRU de Lille, Dr J. Andrieux

7- Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été effectuée par l'équipe du Pr Duhamel (Pôle de Santé Publique). Les variables histopathologiques et cytogénétiques semi-quantitatives ont été comparées à l'aide du test de U de Mann-Whitney. Le seuil de significativité était défini par une valeur de $p \leq 0,05$.

Pour les valeurs significatives, des seuils de sensibilité et de spécificité ont été recherchés à l'aide de courbe ROC, en prenant une valeur d'Aire sous la Courbe (AUC) discriminante au-dessus de 0,8.

Les données qualitatives n'ont pu faire l'objet d'une étude statistique approfondie en raison du faible effectif de patients dans chacun de nos groupes.

IV - Résultats

1- Caractéristiques des carcinomes à cellules chromophobes pris en charge au CHRU de Lille de 2002 à 2013

a- Epidémiologie

De janvier 2002 à décembre 2013, 1259 néphrectomies pour lésion tumorale ont été effectuées par le service d'Urologie de CHRU de Lille, parmi lesquelles 77 CCCh. Ainsi, les CCCh représentent 6,1% des néphrectomies pour tumeur, élargies ou partielles, au CHRU de Lille. Il y avait une prédominance masculine : 56% des patients étaient des hommes. La moyenne d'âge au diagnostic était de 57,5 ans, avec des extrêmes de 23 à 86 ans. Il s'agissait de néphrectomie élargie dans 49% des cas et de néphrectomie partielle dans 51% des cas. 58% des tumeurs étaient localisées dans le rein gauche.

83% des patients présentaient une tumeur de stade pT1 ou pT2, réparti comme suit : 49,3% des tumeurs en stade pT1a, 14,3% en pT1b, 9% en pT2a et 10,4% en pT2b. Ainsi, 15,7% des patients présentaient des tumeurs avec envahissement extra-rénal (stade pT3a) et 1,3% (1 seule tumeur) s'étendait au-delà du fascia de Gerota (stade pT4). Aucune des tumeurs n'était associée à un thrombus tumoral de la veine rénale.

Au diagnostic, seuls 5 patients (6,5%) présentaient d'emblée des métastases à distance de localisation hépatique, pulmonaire, osseuse et ovarienne. Un sixième patient a eu une évolution métastatique hépatique 2 ans après la néphrectomie élargie d'un CCCh de 9 cm, sans atteinte extra-rénale ou ganglionnaire initialement. Au total, 6 patients, soit 7,8% de notre effectif, ont présenté une évolution métastatique.

b- Données histopathologiques

L'ensemble des CCCh de cette série étaient unifocaux. La taille tumorale moyenne était de 5,7cm alors que la médiane de taille était de 3,8 cm, comprenant des tumeurs allant de 0,15 à 26cm. L'examen macroscopique décrivait des lésions bien limitées, charnues, polylobées, de couleur beige, brune ou jaune, parfois blanchâtre. Un aspect lobulé ou partiellement kystique était parfois rapporté. Des remaniements hémorragiques étaient souvent observés.

Le diagnostic microscopique était relativement aisé pour la majorité des cas. Le diagnostic s'est appuyé dans 35% des cas sur une étude en immunohistochimie avec l'anticorps anti-CK7 et dans 17% des cas sur une coloration de Hale.

18 des 77 CCCh présentaient de la nécrose tumorale, soit 23% des cas. Pour seulement une des tumeurs, la surface de nécrose représentait plus de 50% de la surface totale, et il s'agissait d'une tumeur métastatique. Ces 18 tumeurs étaient réparties en 4 tumeurs de stade pT1a, 1 en pT1b, 5 en pT2b, 7 en pT3a et 1 en pT4.

Seuls 2 CCCh avaient un contingent de carcinome sarcomatoïde soit 2,6% de la population étudiée. Ils étaient tous 2 métastatiques au diagnostic. L'un présentait un contingent sarcomatoïde très focal et pour l'autre, ce contingent représenté près de 40% du volume tumoral total.

Des embolies tumorales intravasculaires étaient observées dans 5 des 6 tumeurs métastatiques et dans aucune autre tumeur.

Le grade nucléaire de Führman a été évalué dans toutes les tumeurs, au moment du diagnostic, c'est-à-dire avant la recommandation de l'ISUP 2013 de ne plus en tenir compte pour ce sous-type tumoral. Aucune des lésions n'a été classée en grade 1, 61% été classées en grade 2, 31% en grade 3 et 8% en grade 4.

Les sous-types histologiques (variant classique, mixte ou éosinophile) n'étaient précisés que dans 38% des cas.

2- Etude comparative des 6 tumeurs métastatiques versus 10 tumeurs non métastatiques

a- Données épidémiologiques

7 hommes et 9 femmes ont été inclus dans cette seconde partie de l'étude, avec une moyenne d'âge au diagnostic de 59,6 ans. Dans le groupe des tumeurs métastatiques, la moyenne d'âge était de 56,2 ans.

Au diagnostic, les tumeurs métastatiques présentaient pour l'une d'entre elles un stade pT2, 4 étaient classées en pT3a et 1 en pT4. Deux des 6 tumeurs étaient N1 ou N2 et 5 des tumeurs étaient M1.

4 des 6 patients avec une tumeur métastatique sont décédés de leur maladie après 11 à 39 mois de survie globale. Les 2 patients actuellement en vie ont un suivi régulier depuis 25 mois (tumeur n°2) et 56 mois (tumeur n°3). Les 10 patients sans évolution métastatiques sont tous en vie avec un suivi régulier annuel (depuis 7 à 82 mois).

L'ensemble des données épidémiologiques et histopathologiques de ces 16 tumeurs sont reprises dans le tableau 2.

b- Données histopathologiques

Macroscopiquement, les tumeurs métastatiques avaient quelques particularités. La taille tumorale dans le groupe métastatique allait de 7 à 22cm avec une moyenne de

13,5cm. La taille des tumeurs métastatiques était significativement différente ($p=0,0056$) de celle des tumeurs non métastatiques qui était de 5,45cm (variation de 2 à 9cm). Le seuil de 10cm, établi à l'aide d'une courbe ROC (AUC = 0,9330), avait les meilleures sensibilité ($=0,833$) et spécificité ($=1$) pour discriminer les tumeurs métastatiques.

La tumeur n°1 présentait une large plage blanchâtre, indurée, qui occupait 40% du volume tumoral, et qui correspondait à un contingent sarcomatoïde prédominant (Figure 13). Les tumeurs n°2 et 11 présentaient un centre nécrotique.



Figure 13- aspect macroscopique de la tumeur n°1, présentant un contingent de carcinome sarcomatoïde prépondérant, de couleur beige, et un contingent de carcinome bien différencié, de couleur rouge sombre.

La majorité des 16 CCCh inclus dans cette étude, présentait une architecture tumorale faite de larges alvéoles de cellules séparées par de fines cloisons fibrovasculaires, mais aussi de nids de cellules, de travées, de nappes solides, de tubules ou de papilles. Dix des 16 tumeurs ont été classées en variant mixte, comportant à la fois des secteurs de cellules dites classiques et des secteurs de

cellules éosinophiles. Une seule des 16 tumeurs (tumeur n°11) présentait une cytologie classique pure, et 4 tumeurs étaient exclusivement constituées de cellules éosinophiles. A la relecture de la tumeur n°10, il apparaît qu'elle possède des cellules de type oncocytaire, étroitement mêlées aux cellules de type chromophile et qu'il pourrait s'agir d'une tumeur hybride, non diagnostiquée initialement. A noter que la tumeur n°8 possède un petit secteur intra-tumoral d'adénome papillaire millimétrique.

Deux des tumeurs présentaient de la mucine intra-cytoplasmique, focale pour l'une, diffuse et associée à une architecture tubuleuse pour l'autre (Figure 14). La présence de mucine a été confirmée par la coloration spéciale par le Bleu Alcian.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, 2 des tumeurs du groupe métastatique présentaient un contingent sarcomatoïde. Pour une des tumeurs, on identifiait 40% de contingent sarcomatoïde (tumeur n°1) (Figure 15), alors que dans la seconde, ce contingent n'était que très focal (tumeur n°4).

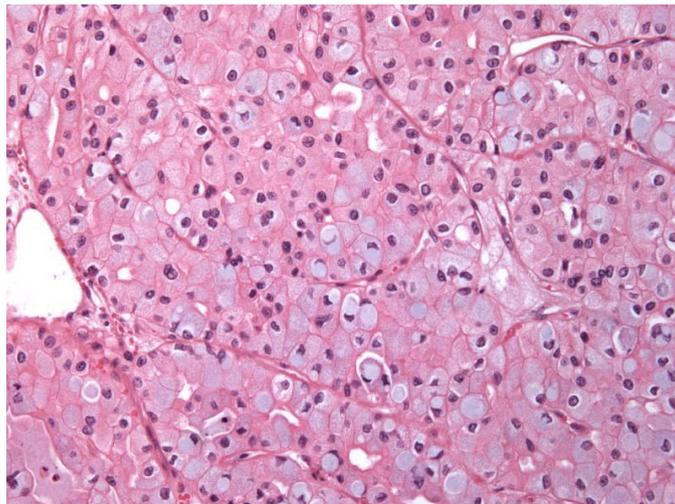


Figure 14- Mucine intracytoplasmique diffuse, x200 (tumeur n°11)

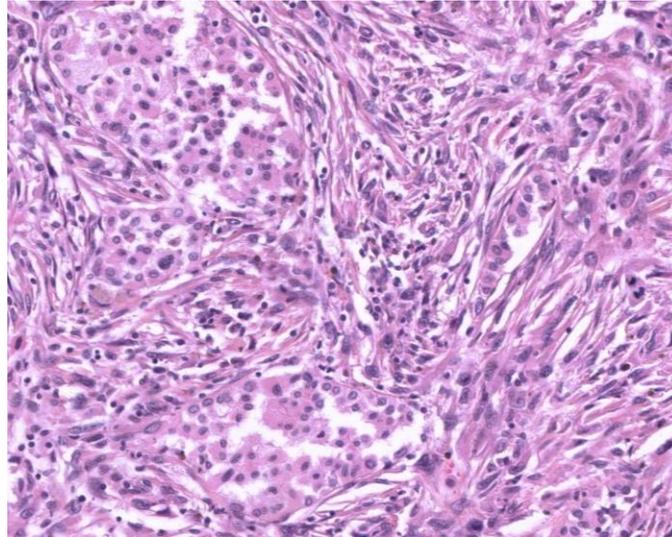


Figure 15- Contingent de carcinome sarcomatoïde mêlé à du carcinome bien différencié, x200 (tumeur n°1)

Cinq des 6 CCCh métastatiques possédaient un secteur plus ou moins important de nécrose tumorale (de focale, jusqu'à représenter 70% du volume tumoral) (Figure 16). Seules 2 des 10 tumeurs non métastatiques (tumeur n°11 et 16) présentaient de la nécrose tumorale qui restait focale.

Cinq des tumeurs métastatiques étaient associées à la présence d'emboles tumoraux (Figure 17). Aucun embole tumoral n'a été observé dans les CCCh non métastatiques.

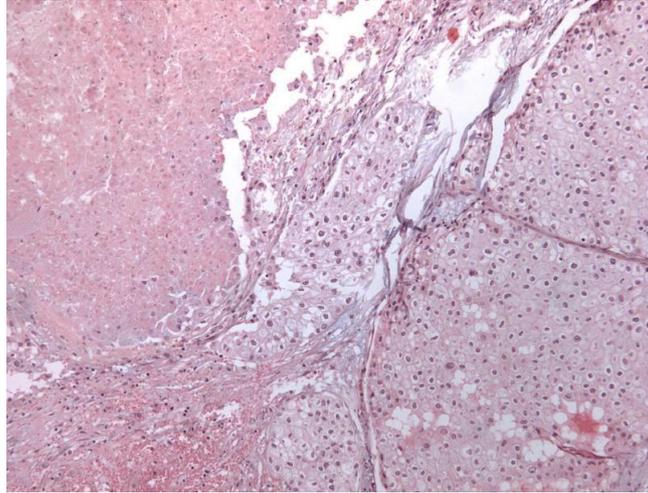


Figure 16- Plage de nécrose tumorale, x100

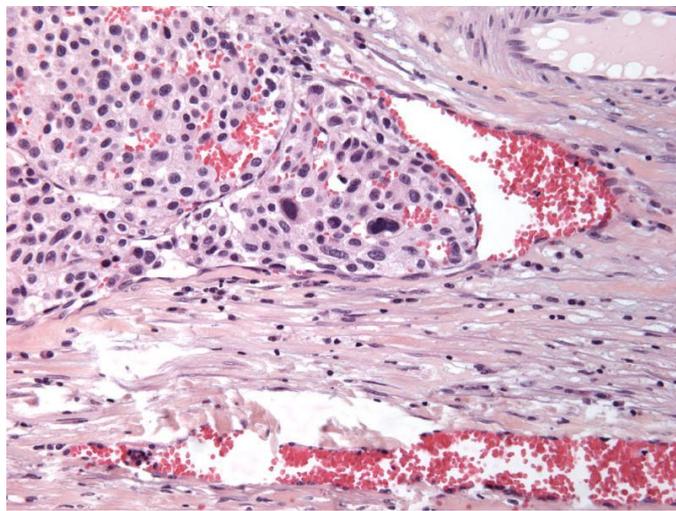


Figure 17- Illustration d'embole tumoral, x200

Les tumeurs métastatiques (tumeur n°1 et 4) possédant un contingent important de carcinome sarcomatoïde ont été classées en grade nucléaire de Fühman 4 (Figure 15). Les 4 autres tumeurs métastatiques avaient un grade 3 de Fühman. Dans le groupe non métastatique, 5 tumeurs avaient un grade 2 de Fühman et 5 étaient classées en grade 3.

Le grade nucléaire de Paner a également été évalué : dans le groupe métastatique, 4 des tumeurs présentaient un grade 3 et un grade 2 pour les 2 autres tumeurs. Dans le groupe non métastatique, 6/10 avaient un grade 1 et 4/10 un grade 2. Ce

grade a été effectué par deux pathologistes de manière indépendante. Les cas discordants (44%) ont fait l'objet d'une seconde lecture, collégiale, afin de trouver un consensus.

Le compte mitotique réalisé dans le groupe des tumeurs métastatiques était de 3 à 9 mitoses pour 10 champs au fort grossissement, soit sur une surface de 3 mm² (Figure 18). Le nombre moyen de mitoses dans ce groupe était de 5,17 mitoses. Dans le groupe non métastatique, dans 9 cas sur 10, on comptait au maximum 1 mitose pour 10 champs au fort grossissement, soit une valeur moyenne de 0,9 mitoses par tumeur et une médiane de 0,5. Le cas n°16 présentait un nombre de mitoses plus élevé de 5 mitoses pour 10 champs au fort grossissement. Le test statistique de U de Mann-Whitney a mis en évidence une différence significative entre les 2 groupes pour le compte mitotique avec un $p=0,0037$. Nous avons établi une valeur seuil ≥ 3 mitoses (AUC = 0,942), qui avait une sensibilité de 1 et une spécificité de 0,9, en faveur du risque métastatique.

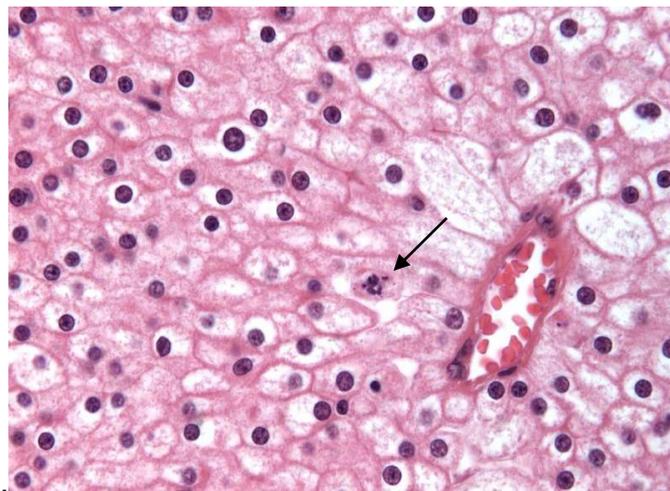


Figure 18- Figure de mitose (flèche), x500

c- Étude immunohistochimique

Dans le groupe de tumeurs métastatiques, la moyenne de l'index de prolifération évalué par marquage avec l'anticorps anti-Ki67 dans les foyers de « hot spot » était de 13,3% avec des extrêmes allant de 2 à 28% de noyaux marqués. La moyenne de cet index évalué sur l'ensemble de la lame était de 5,3% avec des valeurs allant de 1% à 10%.

Dans le groupe non métastatique, la valeur moyenne de l'index de prolifération dans les foyers de « hot spot » était de 2,4% avec une minimale de 0% et une maximale de 9%. L'index de prolifération moyen évalué sur lame entière était de 1,5%, comprenant des valeurs allant de 0 à 3%.

Les valeurs de l'index de prolifération obtenues dans les foyers de « hot spot » étaient significativement différentes dans les 2 groupes ($p=0,0104$). De plus une valeur seuil à 13% (AUC = 0,90) dans les foyers de « hot spot » permettait d'obtenir une sensibilité de 0,67 et une spécificité de 1 pour évaluer le risque métastatique.

Les valeurs de l'index Ki67 obtenues sur la lecture au faible grossissement de la lame n'étaient pas significativement différentes dans les 2 groupes ($p=0,1824$).

Pour l'ensemble des tumeurs, le marquage avec l'anticorps anti-MET n'était pas significatif (score 0 ou 1+), ce qui équivaut à une absence d'amplification du gène *MET*. L'un des CCCh métastatiques de score 1+ a fait l'objet d'une étude par FISH avec la sonde c-MET qui confirmait l'absence d'amplification du gène. De plus, aucune amplification de la région 7q21-31, correspondant à ce gène de 100kb, n'était observée en CGH-Array.

Patients	Sexe	Age au diagnostic	Taille tumorale	pTNM	Variant histologique	Contingent sarcomatoïde	Nécrose tumorale	Emboles tumoraux	Grade de Fühman	Grade de Paner	Compte mitotique*	Index de prolifération**
1	M	49 ans	18 cm	pT4 N0 M1	Mixte	Oui (40%)	Oui (20%)	Oui	4	3	5	3%
2	F	56 ans	12 cm	pT3a N2 M1	Mixte	Non	Oui (70%)	Oui	3	3	4	28%
3	M	60 ans	12 cm	pT2b N0 M1	Mixte	Non	Non	Non	3	2	5	14%
4	F	53 ans	7 cm	pT3a N0 M1	Mixte	Oui (minime)	Oui (10%)	Oui	4	3	5	13%
5	F	46 ans	10 cm	pT3a N1 M1	Eosinophile	Non	Oui (10%)	Oui	3	3	9	20%
6	M	67 ans	22 cm	pT3a N0 M1	Mixte	Non	Oui (25%)	Oui	4	3	3	2%
7	F	76 ans	3,8 cm	pT1a N0 M0	Eosinophile	Non	Non	Non	3	1	0	3%
8	M	61 ans	3,5 cm	pT1a N0 M0	Eosinophile	Non	Non	Non	3	1	0	1%
9	F	51 ans	2 cm	pT1a N0 M0	Mixte	Non	Non	Non	2	1	0	1,50%
10	F	69 ans	3,5 cm	pT1a N0 M0	Tumeur hybride	Non	Non	Non	3	1	1	1,50%
11	F	65 ans	8 cm	pT2a N0 M0	Classique	Non	Oui (20%)	Non	2	1	1	1%
12	F	56 ans	4,2 cm	pT1b N0 M0	Eosinophile	Non	Non	Non	2	1	0	4%
13	M	86 ans	8 cm	pT2a N0 M0	Mixte	Non	Non	Non	2	2	0	0%
14	F	37 ans	7,5 cm	pT2a N0 M0	Mixte	Non	Non	Non	2	2	1	2%
15	M	71 ans	9 cm	pT2a N0 M0	Mixte	Non	Non	Non	3	2	1	1%
16	M	51 ans	5 cm	pT3a N0 M0	Mixte	Non	Oui (20%)	Non	3	2	5	9%

Tableau 2- Caractéristiques épidémiologiques et histopathologiques des 16 tumeurs étudiées

*Compte mitotique sur 10 champs au grossissement x400 (3mm²)

** Index de prolifération dans les foyers de « hot spot », évalué sur 2000 cellules

d- Cytométrie en flux (CMF)

Cinq des 6 tumeurs métastatiques présentaient un profil aneuploïde. Quatre d'entre elles avaient un index d'ADN allant de 0,6 à 0,74 et étaient donc considérées comme hypodiploïde. Une des 6 tumeurs (tumeur n°4) présentait un profil tétraploïde avec un index d'ADN à 1,67 et une autre tumeur (tumeur n°2) présentait un profil péri-diploïde de type hypodiploïde avec un index d'ADN à 0,82.

5/10 des tumeurs non métastatiques présentaient un profil diploïde (index d'ADN entre 0,9 et 1,1). Trois tumeurs étaient hypodiploïdes ou péri-diploïdes de type hypodiploïde (index d'ADN entre 0,8 et 0,9). Les 2 autres tumeurs avaient un profil hyperdiploïde, dont l'une avec un profil tétraploïde.

e- Analyse Comparative sur Puce à ADN (ACPA ou CGH-Array)

Tous nos échantillons ont été analysés en CGH-Array. L'ensemble des 13 tumeurs analysées à partir de tissu congelé avait une DLRS <0,2 et était donc parfaitement interprétable. Les 3 tumeurs étudiées à partir de tissu inclus en paraffine avaient une DLRS un peu moins bonne (proche de 0,4) mais leurs profils restaient interprétables.

La plupart de tumeurs présentaient des pertes chromosomiques complètes. Dans 7 cas, des anomalies partielles, perte ou gain, ont été détectées.

Dans le groupe des tumeurs métastatiques, les anomalies chromosomiques les plus représentées étaient des pertes entières de chromosomes. Les chromosomes le plus souvent perdus étaient les suivants : chromosome 1 (6/6), 2 (6/6), 6 (6/6), 10 (6/6), 13 (5/6), 17 (6/6), 21 (4/6). Quelques autres chromosomes étaient perdus dans une moindre proportion. La moyenne de chromosomes perdus pour les tumeurs à évolution métastatique était de 9 [7 à 12].

Dans le groupe des tumeurs non métastatiques, les anomalies chromosomiques les plus représentées étaient également des pertes concernant les chromosomes 1 (6/10), 2 (5/10), 6 (5/10) et 10 (5/10). Dans ce groupe, l'une des tumeurs (tumeur n°11) montrait la présence de quelques gains chromosomiques complets, concernant les chromosomes 4, 9, 11, 13, 14 et 18. Quatre des tumeurs non métastatiques présentaient un caryotype normal ou avec très peu d'anomalie. Ainsi, dans ce groupe, la moyenne de chromosomes entiers perdus était de 3,5 [0 ; 8].

La comparaison du nombre de chromosomes perdus dans chaque groupe s'est révélée significativement différente avec un $p=0,0058$. Le nombre de gain de chromosome n'était par contre pas différent d'un groupe à l'autre ($p=0,5667$).

Un seuil de 8 chromosomes perdus ($AUC=0,925$) avait une sensibilité de 0,833 et une spécificité de 0,8, en faveur du statut métastatique.

La majorité des anomalies chromosomiques étaient bien corrélées à leur profil de CMF (tableau 3, figure 19 et 20), sauf pour un cas, la tumeur n°14 qui présentait 6 pertes chromosomiques entières et qui avait pourtant un profil diploïde en CMF, vérifié à 2 reprises.

Tumeur	CGH-Array		CMF
	Chromosome : Perte	Gain	
1	1,2,6,8,10,17,21	/	Hypodiploïde (I=0,7)
2	1,2,6,9q,10,11p12,13,17,21	/	Péridiploïde (I=0,82)
3	1,2,6,10,13,15,17,21	dup(19)q13.33	Hypodiploïde (I=0,73)
4	1,2,4q,5,6,10,13,17,18	/	Tétraploïde (I=1,67)
5	1,2,6,10,13,17,20,21	dup(8)q11.23	Hypodiploïde (I=0,6)
6	1,2,3,5,6,9,10,13,17,18,19,20q	/	Hypodiploïde (I=0,74)
7	/	/	Diploïde
8	del(1)p32.1	/	Diploïde
9	1,2,6,8,10,11,13,17	/	Hypodiploïde (I=0,74)
10	/	dup(11)q13.2	Diploïde
11	1,2,6,10,15	4,9,11,13,14,18	Hyperdiploïde (I=1,32)
12	/	/	Diploïde
13	1, 10	7	Tétraploïde (I=1,95)
14	1,2,6,10,17,21	/	Diploïde
15	1,2,6,13,17	/	Péridiploïde (I=0,90)
16	1,2,6,10,13,17,18,21	/	Hypodiploïde (I=0,76)

Tableau 3- Données cytogénétiques et de CMF de l'ensemble des CCCh étudiés (I= index d'ADN)

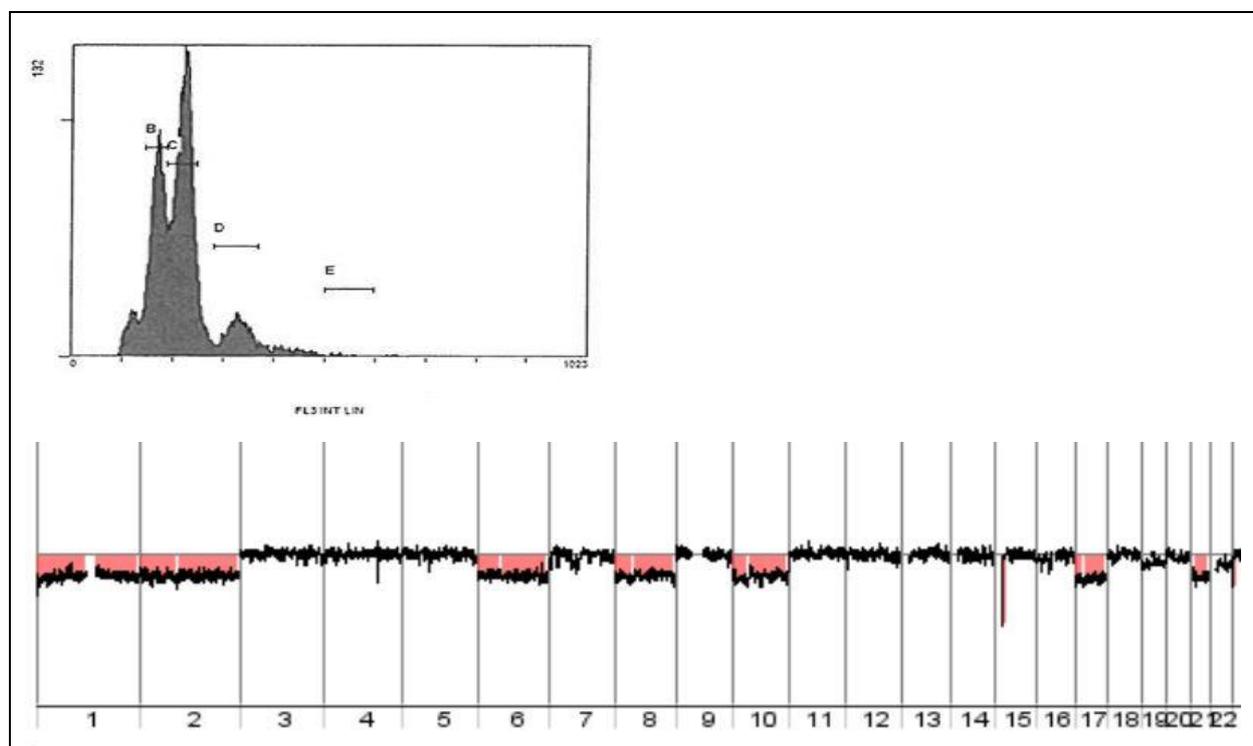


Figure 19- Illustration du profil hypodiploïde en cytométrie en flux (en haut : pic B hypodiploïde et pic C diploïde) et du profil de CGH-Array de la tumeur n°1 (en bas). Les pertes chromosomiques sont représentées par une déviation vers le bas de la ligne de base (en rouge).

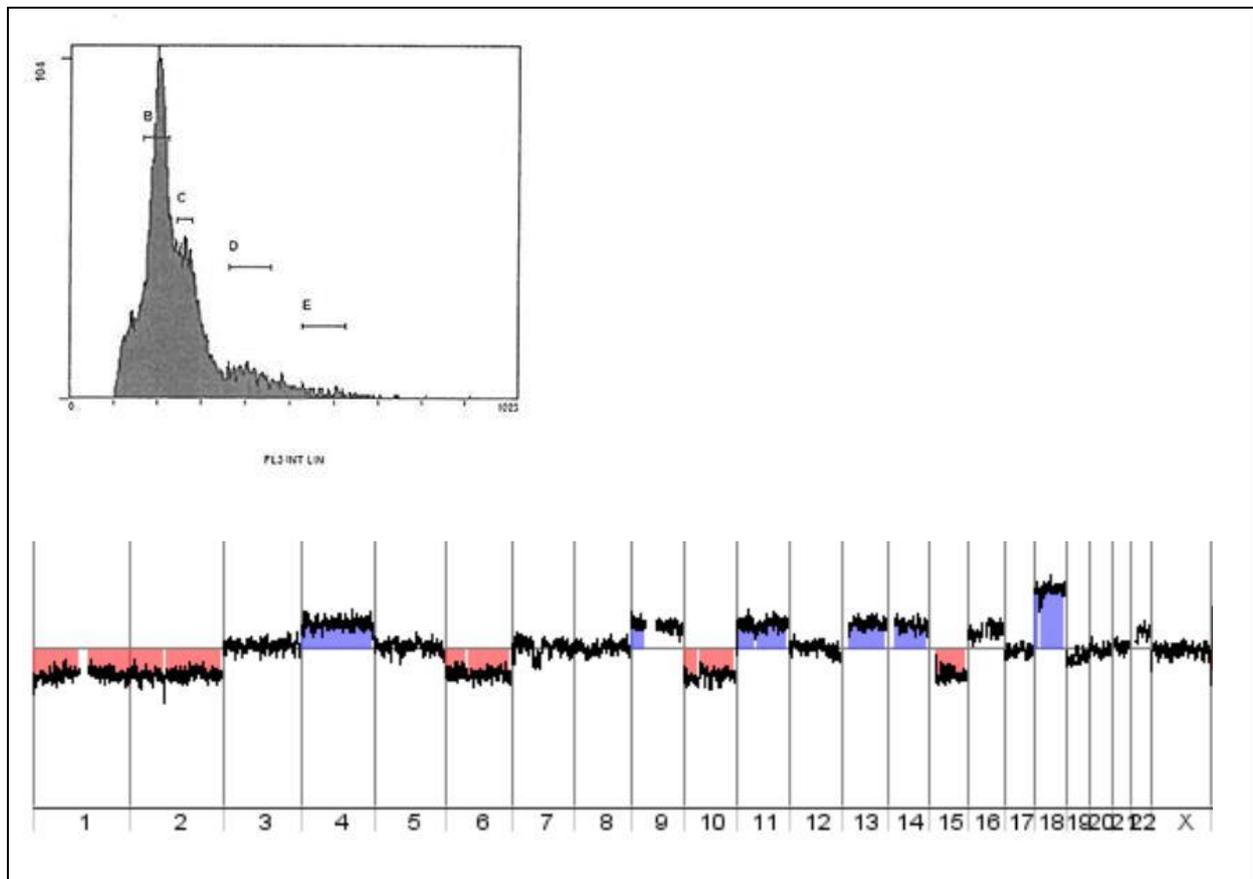


Figure 20- Illustration du profil aneuploïde en cytométrie en flux (en haut : pic diploïde en B, pic hyperdiploïde en C) et profil de CGH-Array (en bas) de la tumeur n°11. Les gains chromosomiques sont représentés décalés au-dessus de la ligne de base (en bleu) et les pertes chromosomiques en dessous (en rouge).

V- Discussion

Sur le plan épidémiologique, notre série est comparable aux plus grandes séries de la littérature, notamment en ce qui concerne l'âge moyen au diagnostic (57,5 ans dans la présente étude) qui varie de 50,2 à 61,1 ans dans les différentes études publiées (5,6,8,9,24,56). Nous observons une discrète prédominance masculine (56%) mais qui n'est pas retrouvée d'une série à l'autre.

L'ensemble des carcinomes à cellules chromophobes que nous avons étudiés présentait une architecture tumorale classique et une hétérogénéité architecturale entre les différentes tumeurs, comparables aux données de la littérature (5–7,16,75). Dans notre étude, la proportion de tumeurs présentant une cytologie mixte était prédominante (63%). Seule 1/16 tumeur (6%) était un variant classique (tumeur n°11). Dans l'étude d'Amin *et al* (6), sur 145 CCCh analysés, 47% étaient des variants mixtes, 41% des variants éosinophiles et seuls 12% des tumeurs étaient des variants classiques. Les variants mixtes sont bien les plus représentés des 3 variants de CCCh. Les foyers de cellules éosinophiles au sein de cellules d'aspect classique sont donc fréquemment observés. Cependant, en pratique quotidienne, différencier ces variants n'a aucune conséquence pronostique ou clinique.

Dans notre étude, 6,5% des CCCh (n=5) étaient **d'emblée métastatique au diagnostic**. Ce chiffre correspond à ceux retrouvés dans la littérature qui varient de 1,4% à 14% (5,6,9,22,56,76). Cependant, pour l'un de ces 5 patients, la tumeur a été découverte 6 ans avant la néphrectomie et n'était à priori pas métastatique à ce moment. Le patient avait alors refusé toute prise en charge et suivi, jusqu'en 2002,

où la tumeur était devenue très volumineuse (22 cm). Seul un patient de notre série a présenté une évolution métastatique 2 ans après la néphrectomie. Au cours des 30 dernières années, les séries de CCCh rapportent des chiffres hétérogènes de récurrence locale ou à distance qui varient de 2% à 35% (5,6,8,22,77–79). Dans l'étude d'Onishi *et al* , 2 patients ont présenté une récurrence de leur CCCh sous forme de métastase à 10,6 ans et 17 ans de la néphrectomie initiale (22). Ainsi les récurrences tardives de CCCh sont possibles, mais restent rares, et ne présentent habituellement pas de contingent sarcomatoïde, ni dans la tumeur primitive, ni dans la métastase. Klatte *et al* (56) publiaient en 2008 la série comportant le plus grand nombre de tumeurs à évolution métastatique : 14% des 124 CCCh étaient métastatiques au diagnostic. Les métastases étaient principalement de localisation pulmonaire, osseuse et hépatique. La localisation métastatique hépatique semble être plus fréquente pour les CCCh que pour les carcinomes à cellules claires (56,78).

Les CCCh métastatiques sont généralement **de plus grande taille** que les tumeurs non métastatiques, comme l'atteste les séries de Renshaw *et al* (78) et de Przybycin *et al* (5) dans laquelle la taille tumorale moyenne de la population était de 7,6 et 4,6 cm respectivement alors que dans le groupe métastatique, la taille tumorale moyenne était de 13,8 et 11,5 cm. Dans notre étude, nous mettons également en évidence ce **critère de taille comme significativement différent (p=0,0056) entre les tumeurs non métastatiques et les tumeurs métastatiques** (5,7 cm versus 13,5 cm en moyenne). Ainsi, peu de CCCh à évolution métastatique sont classés en stade pT1 (tumeur localisée au rein de moins de 7 cm). Trois séries détaillent la répartition du stade pTNM de leurs tumeurs métastatiques (tableau 4) : environ 40% des cas sont en stade pT3. Dans notre travail, la majorité des tumeurs métastatiques a été également classées en stade pT3, alors que la population non métastatique est classée majoritairement en stade pT1 ou pT2.

	Renshaw(78) (1996)	Amin(6) (2008)	Przybycin(5) (2011)	Etude actuelle
Effectif de la série	25	145	203	77
Nombre de tumeurs métastatiques	5 (20%)	15 (10,3%)	11 (5,4%)	6 (7,8%)
Taille tumorale moyenne	13,8 cm	NE	11,5 cm	13,5 cm
Contingent sarcomatoïde	NE	7 (47%)	2 (18%)	2 (33%)
Nécrose tumorale	1 (20%)	9 (60%)	8 (72%)	5 (83%)
Embole tumoral	NE	NE	5 (45%)	5 (83%)
Stade				
pT1	0	2 (15%)	2 (18%)	0
pT2	3 (60%)	3 (23%)	4 (36%)	1 (17%)
pT3	2 (40%)	5 (38%)	5 (45%)	4 (67%)
pT4	0	3 (23%)	0	1 (17%)

Tableau 4- Caractéristiques des CCCh métastatiques dans la littérature (NE= Non évalué)

Parmi les 77 CCCh du CHRU de Lille, seules 2 tumeurs métastatiques, soit 2,6%, des cas présentaient un **contingent sarcomatoïde**. Ceci s'accorde avec les données des plus grandes séries de CCCh de la littérature qui observent ce contingent sarcomatoïde dans 1,8% à 13,1% des cas (5,6,8,9,24,79). La présence de ce type de contingent est considérée comme le facteur le plus péjoratif (6,9,23,79). **Les CCCh métastatiques sont fréquemment associés à ce contingent de mauvais pronostic**, comme le souligne l'étude de Klatte *et al* (56), dans laquelle 59% des CCCh métastatiques présentaient un contingent sarcomatoïde.

La **nécrose tumorale** est également un très bon facteur pronostique selon les recommandations de l'ISUP 2013 (25). Sa présence est relevée dans 12% à 26,4% des séries de CCCh (5,6,8,24,78,80). Dans notre étude, 23% des tumeurs étaient composées d'une partie plus ou moins étendue de nécrose tumorale et **les tumeurs**

métastatiques avaient de la nécrose dans 83% des cas. Dans l'étude de Przybycin *et al*, une proportion équivalente de CCCh métastatiques présentaient également de la nécrose (72%) (5). Dans cette même étude, dans 45% de ces tumeurs métastatiques été observés des **emboles tumoraux**, alors que nous en observions dans 5 des 6 tumeurs métastatiques (83%) et dans aucune autre tumeur de notre série. La fréquence rapportée des emboles tumoraux pour les CCCh, quel que soit leur statut métastatique, varie de 5 à 24% et leur présence a été associée à un mauvais pronostic par certains auteurs (5,6,24,80).

Le grade nucléaire de Paner est un grade spécifique aux CCCh proposé par Paner *et al* en 2010 (31), afin de pallier au grade nucléaire de Führman qui n'est pas adapté à ce type de carcinome (28). Dans son étude Paner *et al* montraient que les tumeurs classées en grade 3 étaient associées à un risque de récurrence, d'évolution métastatique ou de décès. En 2011, Finley *et al* (79) comparaient le grade de Paner à celui de Führman. Les 2 grades se révélaient associés à une différence significative pour la survie sans progression et pour la survie globale mais le grade de Paner semblait plus sensible. Cependant, après exclusion des tumeurs avec un contingent sarcomatoïde (grade 4 de Führman ou grade 3 de Paner) qui représentaient 13,1% de leur effectif, aucuns des 2 grades n'étaient retenus comme facteur pronostique indépendant dans leur analyse multivariée. De même, en 2012, Cheville *et al* (23) montrait dans une série de 184 CCCh qu'une fois les cas porteurs d'un contingent sarcomatoïde retiré des analyses, le grade nucléaire de Paner, tout comme le grade nucléolaire, perdaient leur valeur significative.

Dans notre série, sur les 16 tumeurs analysées, 7 cas étaient discordants entre les 2 pathologistes ayant évalués le grade de Paner. En 2012, Pérez-Pedrosa *et al* (81) évaluaient la reproductibilité inter-observateur du grade de Paner entre 6

pathologistes : entre 2 pathologistes, la concordance variait d'un index kappa de 0,136 à 0,674. La reproductibilité inter-observateur était donc de discrète à modérée. Les cas discordants se jouaient principalement entre les grades 1 et 2. Dans notre étude, 5 des cas discordants portaient également sur le différentiel entre un grade 1 et un grade 2. Les 2 autres cas discutés portaient sur un différentiel grade 2 versus grade 3. Les cas métastatiques de notre série étaient classés en grade 2 ou 3 et les cas non métastatiques en grade 1 ou 2. Au vu des données de la littérature et de notre expérience, le grade nucléaire de Paner ne semble pas être un facteur pronostique indépendant et son application n'est pas facilement reproductible entre pathologistes.

L'index mitotique a été très peu étudié dans les différentes séries de CCCh. Dans une série de 34 CCCh sans évolution défavorable, Abrahams *et al* (44) montraient qu'aucune mitose n'était observée dans 47% des cas, 1 mitose pour 10 champs était présente dans 40% des cas et 2 mitoses pour 10 champs dans 13% des cas. La récente étude de Przybycin *et al.* (5) a évalué l'index mitotique de 200 tumeurs : 98% des tumeurs, dont 5 avaient eu une évolution métastatique, possédaient un compte mitotique inférieur ou égal à 1 mitose pour 10 champs au fort grossissement. Seules 4 tumeurs, soit 2%, présentaient plus de 1 mitose pour 10 champs, et aucune de ces lésions n'avaient eu d'évolution métastatique. Dans notre série les tumeurs métastatiques présentaient toutes un index mitotique ≥ 3 mitoses pour 10 champs au fort grossissement, et cet index (moyenne à 5,17) était significativement différente ($p=0,0037$) de celui du groupe non métastatique (moyenne à 0,9). Dans le groupe de tumeur non métastatique, 9 des 10 tumeurs avaient un index mitotique ≤ 1 . Seule l'une des tumeurs non métastatique (tumeur n°16) présentait un index mitotique élevé à 5 mitoses pour 10 champs au fort grossissement. Cette tumeur avait

probablement un potentiel plus agressif car 20% de son volume tumoral était de la nécrose tumorale. Cependant son index de prolifération moyen évalué par l'anticorps anti-Ki67 était de 1%, soit équivalent aux autres tumeurs non métastatiques et donc inférieur à la valeur moyenne de l'index de prolifération dans les tumeurs métastatiques, qui était de 5,33%. Les carcinomes à cellules chromophobes sont donc bien des tumeurs à faible index mitotique (≤ 1). **L'observation d'au moins 3 mitoses pour 10 champs au x400 doit alerter sur le potentiel agressif de la tumeur.**

L'évaluation de **l'index de prolifération** à l'aide de l'anticorps anti-Ki67 permet de montrer la proportion de cellules entrées dans le cycle cellulaire. Ainsi, plus l'index de prolifération est élevé, plus la tumeur est considérée comme agressive et associée à un mauvais pronostic ; cela a notamment été montré pour les carcinomes à cellules claires du rein (82). Cependant, selon Kramer *et al* (83), l'index de prolifération ne serait pas un facteur indépendant lié à la survie sans progression en analyse univariée, mais il le devient en analyse multivariée, avec d'autres paramètres comme la ploïdie et l'expression de la P53. Concernant les CCCh, ce paramètre n'a été que très peu étudié. Tickoo *et al* (84) ont évalué cet index sur 20 tumeurs rénales à « cellules granuleuses », dont 12 CCCh. L'index de prolifération moyen des CCCh était de 0,8%, ce qui est comparable aux valeurs que nous avons observées dans notre étude dans le groupe non métastatique. D'autres séries comportant un plus petit effectif de CCCh, montre un index de prolifération allant de 0,6, jusqu'à 5,54% (85,86). Le statut métastatique de ces tumeurs n'était pas toujours mentionné. Il n'existe pas dans la littérature d'étude ayant comparée l'index de prolifération de CCCh métastatique à celui de CCCh non métastatique. Dans notre étude, l'index de prolifération évalué sur l'ensemble de la lame et celui réalisé

dans les foyers de « hot spot » semble bien supérieur au sein des tumeurs métastatiques que dans les tumeurs non métastatiques. **Les valeurs évaluées dans les foyers de « hot spot » sont même significativement différentes entre les 2 groupes (p=0,0104).**

La tumeur n°3 a présenté une évolution métastatique 2 ans après le traitement chirurgical. Elle ne présentait ni nécrose tumorale, ni contingent sarcomatoïde, ni embole tumoral au diagnostic, mais elle avait un index mitotique à 5 mitoses pour 10 champs et un index de prolifération à 14% dans les foyers de « hot spot » et à 8% sur l'ensemble de la lame. Donc malgré l'absence de critères morphologiques évidents de mauvais pronostic, cette tumeur présentait bien dès le diagnostic des critères péjoratifs.

La ploïdie des cellules tumorales est un paramètre qui a souvent été étudié dans le domaine de la biologie des cancers. Pour cela, la cytométrie en flux et la cytométrie en analyse d'image sont les outils les plus fréquemment utilisés. Un profil aneuploïde a été associé à un moins bon pronostic dans les cancers de la prostate et du sein (87,88). Dans les carcinomes rénaux, la ploïdie a peu été comparée à la survie ou au stade tumoral et un profil aneuploïde ne semble pas associé à un mauvais pronostic (89). Les CCCh étant caractérisés par des pertes chromosomiques, leur ADN est bien souvent aneuploïde. A ce jour, c'est Crotty *et al* qui ont analysé la plus grande série de CCCh par cytométrie en flux qui comportait 50 tumeurs (90) : 77% des CCCh étaient aneuploïdes et les 23% restants étaient soit diploïde, soit tétraploïde, soit polyploïde, sans autres précisions. Dans de plus petites séries, Renshaw *et al* (78) retrouvaient 5 tumeurs au profil diploïde et 5 tumeurs au profil aneuploïde et Bonsib *et al* (91) avaient 3 tumeurs aneuploïdes sur 5 CCCh étudiés. En 2003, Akhtar *et al* (92) analysaient 31 CCCh en cytométrie en analyse

d'image : la morphologie de chaque noyau été visualisée avant détermination de la quantité d'ADN qu'il contenait. Pour chaque tumeur il était établi la proportion de cellule diploïde, hypodiploïde, hyperdiploïde et tétraploïde. 93% des profils d'ADN de ces tumeurs étaient majoritairement hypodiploïdes. En moyenne, 68,1% des noyaux d'une tumeur étaient hypodiploïdes, 8% des noyaux étaient diploïdes, 18,6% étaient hyperdiploïdes et 5,3% étaient tétraploïdes ou hypertétraploïdes. Seules 2 tumeurs avaient une proportion prédominante de cellules hyperdiploïdes Ceci souligne **l'hétérogénéité intra-tumorale de la ploïdie** au sein d'une même tumeur et ainsi les possibles difficultés d'interprétation des profils de cytométrie de flux. D'autre part, les auteurs ont déterminé la proportion de cellules binucléées au sein de chaque CCCh qui allait de 1,4 à 23,6%. Ils montraient également que les cellules binucléées avaient un index d'ADN hyperdiploïde qui était d'une valeur égale à deux fois l'index des cellules « uni-nucléées » hypodiploïdes, au sein d'une même tumeur. Ainsi les auteurs suggèrent que ces cellules binucléées seraient le résultat de la fusion de deux cellules hypodiploïdes. Des profils triploïdes ou tétraploïdes ont également été mis en évidence dans les CCCh en cytométrie en flux (93,94), mais aussi en cytogénétique conventionnelle (95,96). Il est à noter qu'avec la technique de CGH-Array, les profils tétraploïdes ou triploïdes ne sont généralement pas détectés en raison de difficulté de paramétrage.

Les données de CGH-Array des 16 CCCh étudiés mettaient en évidence dans 11 des tumeurs les pertes chromosomiques classiquement décrites : perte des chromosomes **1, 2, 6, 10, 13, 17 et 21** qui caractérisent ce sous-type histologique de carcinome rénal. L'une des tumeurs que nous avons étudiées, la tumeur n°11, présentait 6 gains chromosomiques, en plus des pertes classiques. Dans les CCCh, les gains chromosomiques ont rarement été observés. En cytogénétique

conventionnelle, au début des années 90, différents auteurs montraient des caryotypes de CCCh avec pertes chromosomiques multiples, sans gains chromosomiques (48,53,95). Cependant, peu d'études avec caryotype conventionnel ont été publiés en raison de la difficulté à obtenir des métaphases avec les CCCh en culture (97). C'est Speicher *et al* (50) en 1994 qui évaluent pour la première fois une série de 19 CCCh en CGH sur métaphase : l'ensemble des CCCh présentaient les pertes chromosomiques classiques, sans gains chromosomiques associés. A la fin des années 90, les techniques de cytogénétiques moléculaires se sont développées et ont remplacé le caryotype conventionnel. En 2003, Kallio *et al* (86) étudiaient 20 carcinomes rénaux en CGH sur métaphases. Le seul CCCh de leur série ne présentait pas les pertes chromosomiques classiques mais 3 pertes chromosomiques partielles (1p31-pter, 3p et 19q) et 7 gains chromosomiques partiels ou entiers (12p12-cen-qter, 4, 7, 11, 14, 15, 18). Il s'agissait d'une tumeur de stade pT1bN0M0, sans évolution défavorable, diagnostiquée entre 1993 et 1995. Les anomalies du bras court du chromosome 3 (3p) sont plutôt caractéristiques des carcinomes à cellules claires. Tan *et al* (98) ont comparé, en 2010, par analyse par SNP-array 15 CCCh versus 15 oncocytomes. Les CCCh présentaient les pertes chromosomiques classiques, ainsi que des gains chromosomiques (4, 7, 11, 12, 14q et 18q). Le détail des anomalies cytogénétiques n'était pas précisé pour chaque tumeur, et il n'y avait aucune donnée histopathologique des CCCh analysés. En 2013, Sperga *et al* (99) ont analysé en FISH et plus ou moins en CGH-Array 37 CCCh, et ont étudié la relation entre les anomalies chromosomiques et le grade nucléaire de Paner. Dans cette série, 69% des tumeurs présentaient les pertes chromosomiques classiques et 73% des cas possédaient au moins 1 gain chromosomique. Il paraît cependant curieux que tant de gains chromosomiques soient décrits dans les CCCh depuis l'ère de la bioinformatique alors qu'ils n'avaient été que rarement observés dans les caryotypes conventionnels. Dans l'étude de

Sperga *et al*, 15 des tumeurs ont été étudiées uniquement par technique FISH, à l'aide de 22 sondes centromériques différentes reconnaissant les chromosomes non sexuels: 2 avaient un caryotype normal, 2 présentaient les pertes chromosomiques classiques, 4 présentaient les pertes chromosomiques classiques associées à quelques gains, 4 présentaient les pertes chromosomiques classiques associées à systématiquement un gain des chromosomes non perdus, 2 ne présentaient pas de pertes mais un gain pour tous les chromosomes non classiquement perdus et 1 tumeur ne montrait que des gains, pour l'ensemble de ses chromosomes. La ploïdie avait été étudiée au préalable en évaluant le nombre de spot fluorescent sur 100 noyaux tumoraux pris au hasard. Cependant, il a été montré qu'il existait une importante hétérogénéité intra-tumorale de la ploïdie, et que les CCCh possédaient de nombreuses cellules binucléées. Il semble donc difficile d'évaluer le caryotype tumoral sur analyse par FISH. Par ailleurs, 21 autres CCCh ont été analysés, dans cette même étude, à la fois en FISH et en CGH-Array : 2 avaient un caryotype normal, 8 présentaient les pertes chromosomiques classiques, 2 présentaient les pertes chromosomiques classiques associées à la duplication du chromosome 19, 7 présentaient les pertes chromosomiques classiques associées au gain systématique de tous les autres chromosomes et 2 ne présentaient pas de pertes mais un gain pour tous les chromosomes non classiquement perdus. Ainsi, 9 des tumeurs avaient un profil caryotypique assez surprenant, avec de nombreux gains chromosomiques. Lors de notre analyse des données de CGH-Array, nous avons également rencontré ce genre de profil caryotypique. Pour 2 des 16 tumeurs de notre étude (tumeur n°4 et 5), nous avons les pertes chromosomiques classiques associées systématiquement à un gain chromosomique pour les chromosomes non perdus. Pour une 3^{ème} tumeur (tumeur n°6), il n'y avait que des gains chromosomiques dans tous les chromosomes non classiquement perdus, et le profil des chromosomes habituellement perdus était sur

la ligne de base (qui représente le statut diploïde $2n$). En s'intéressant aux données brutes des rapports de fluorescence, nous nous sommes aperçus que le logiciel prenait automatiquement le pic majoritaire d'ADN pour le pic diploïde. Pour ces 3 tumeurs, le prélèvement tissulaire était très riche en cellules tumorales et entre 8 et 13 chromosomes étaient perdus, et il s'agissait de plus de chromosomes de grande taille, le pic majoritaire était donc le pic hypodiploïde (environ $1,5n$) qui a été interprété comme étant le pic diploïde par le logiciel (Figures 21 et 22). Ainsi une centralisation manuelle a été nécessaire pour ces 3 CCCh. Dans l'étude de Sperga *et al*, le paramétrage du logiciel utilisé n'était pas entièrement détaillé et notamment leur méthode de centralisation des rapports de fluorescence. Les gains chromosomiques dans les CCCh ne seraient donc probablement pas aussi fréquents que décrits dans cette étude. Toutefois, 6 des tumeurs analysées par Sperga *et al* possédaient les pertes chromosomiques classiques et quelques gains chromosomiques, soit 16% de leur échantillon. Dans notre étude, 3 des CCCh présentaient 1 gain chromosomique, entier ou partiel, et 1 des tumeurs présentaient 6 gains chromosomiques entiers. Il n'existe donc pas que des pertes chromosomiques dans les CCCh, quelques gains de chromosomes peuvent être associés aux pertes classiques, mais semble limité à 1 ou 2 chromosomes, rarement plus. Il est à noter également qu'en cytogénétique conventionnelle, il peut exister un biais de culture cellulaire : certains sous-clones tumoraux ont une capacité mitotique moindre par rapport au clone majoritaire, ce qui pourrait expliquer que les sous-clones portant des gains chromosomiques aient été peu observés.

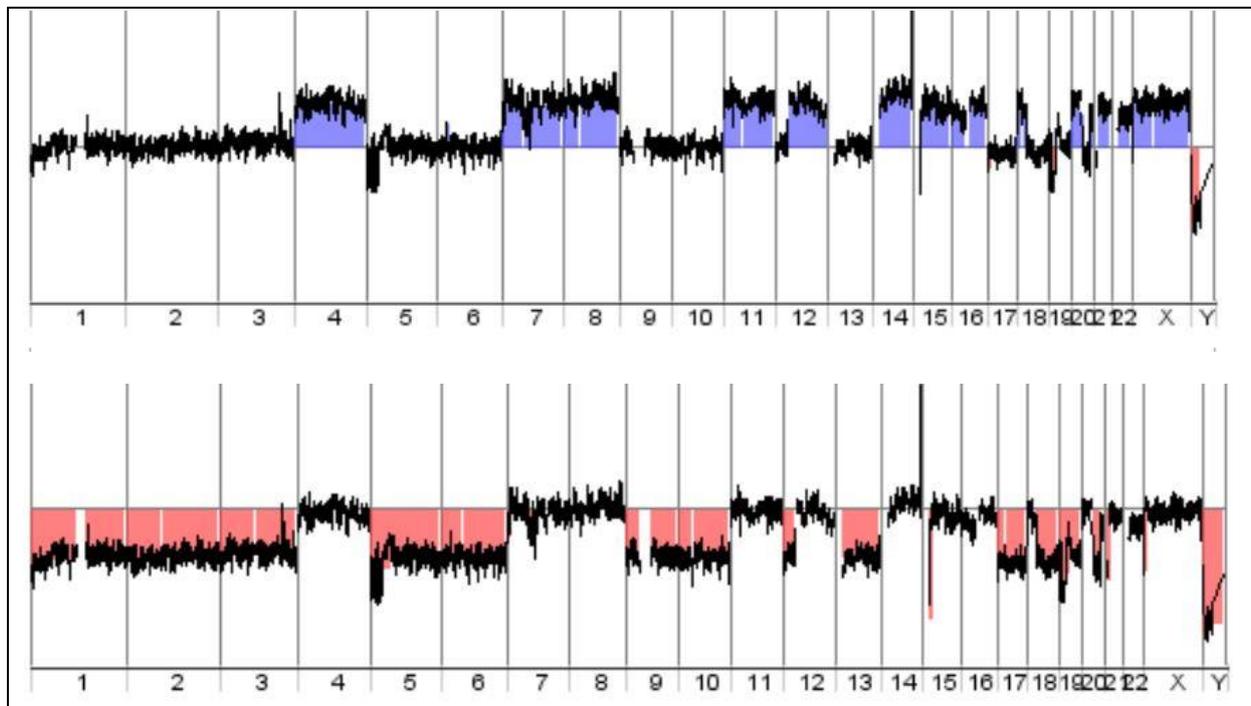


Figure 21- Profil de CGH de la tumeur n°6 avant centralisation manuelle (en haut) et après centralisation manuelle (en bas).

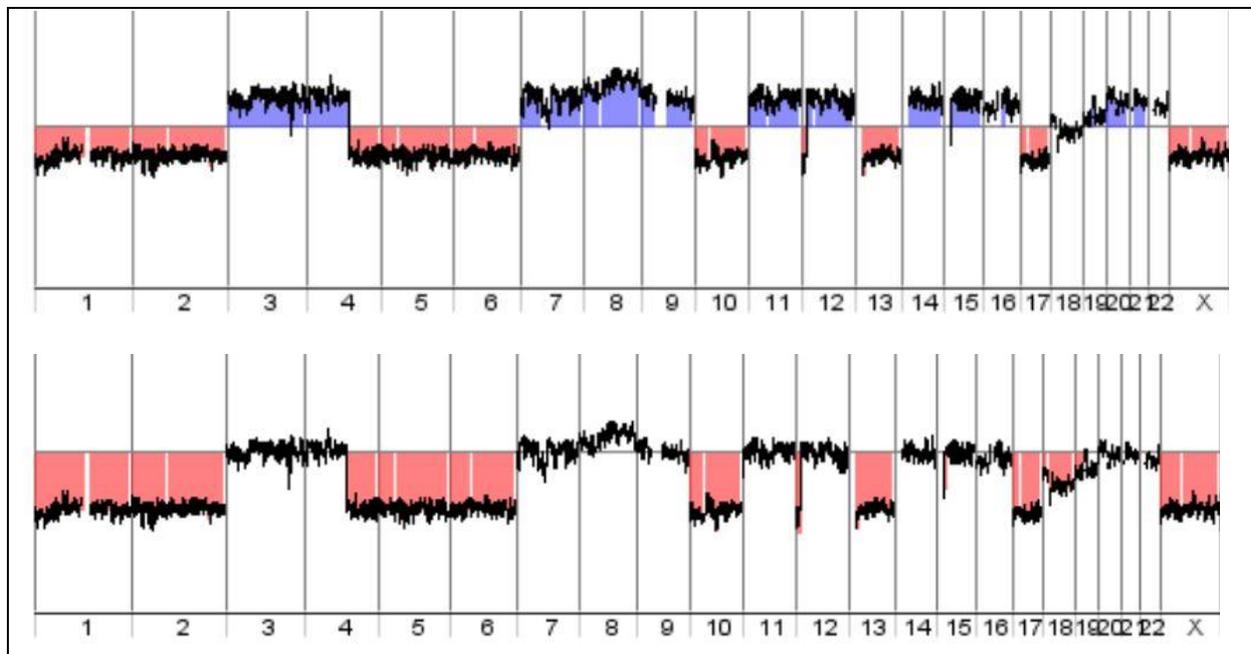


Figure 22- Profil de CGH-Array de la tumeur n°4 avant centralisation (en haut) et après centralisation manuelle (en bas). Noter la présence de gains chromosomiques artéfactuels (en bleu) avant la centralisation.

Nous observons que les CCCh métastatiques de notre étude présentaient un nombre de chromosomes perdus plus important que celui du groupe non métastatique et ces valeurs étaient significativement différentes ($p=0,0058$). Des études comparant les nombres d'anomalies chromosomiques à la survie, n'ont pas mis en évidence de relation particulière entre ces 2 facteurs (86,100). En revanche, pour Moch *et al*, le nombre de chromosomes perdus était associé de manière linéaire au risque de récurrence tumorale et la perte du bras long du chromosome 9 (9q) était associée de manière significative à la survie sans récurrence (100). Ces observations ne sont cependant pas superposables aux CCCh car ces séries étaient constituées quasi exclusivement de carcinomes à cellules claires ($n=58$) et de seulement 1 CCCh et 2 carcinomes papillaires.

Peu d'études se sont intéressées à la cytogénétique des métastases de CCCh. En 1998, Dijkhuizen *et al* ont obtenu le caryotype d'une métastase splénique de CCCh à partir de tissu frais, par technique conventionnelle (101). Des pertes chromosomiques étaient retrouvées (-1,-2, del(5)(q22),-6,-10,-13,-15,-17,-18,-21,-22), ainsi que des remaniements de type translocation (der(1)t(1;15)(q44;q13) et der(12)t(5;12)(q13;q22)) ou des additions de matériel chromosomique (add(15)(p11) et add(18)(q22)). Le nombre d'anomalies chromosomiques semble plus élevé que dans un CCCh non métastatique. Cependant, il n'a pas été réalisé d'analyse cytogénétique sur la tumeur primitive, afin de comparer si les mêmes altérations chromosomiques étaient présentes. Des analyses cytogénétiques par CGH ont été réalisées sur des séries de carcinomes rénaux à cellules claires, sur la tumeur primitive et ses métastases (102,103) : aucune lésion secondaire n'était strictement identique sur le plan génétique à sa tumeur primitive. 70% des métastases présentaient des similitudes avec le primitif et 30% possédaient des anomalies additionnelles. Dans l'étude de Bissig *et al* (103), 32% des métastases

présentaient des anomalies chromosomiques complètement différentes de celles du primitif. L'hypothèse de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale est de nouveau posée, avec possibilité de l'évolution métastatique d'un sous-clone tumoral minoritaire mais plus agressif. Ainsi, ces auteurs n'ont pas mis en évidence de relation significative entre les anomalies cytogénétiques des tumeurs primitives et les paramètres cliniques de progression de la maladie. Face à ces données, il semble donc difficile de pouvoir établir un profil cytogénétique type de tumeur à potentiel métastatique. Toutefois, les données manquent dans le domaine des carcinomes à cellules chromophobes.

Dans l'étude d'Amin *et al* (6), 18 tumeurs parmi les 60 classées en variant éosinophile pur présentaient une cytologie proche de celle des **tumeurs hybrides**, c'est-à-dire associant des cellules de CCCh et des cellules d'oncocytome. Dans notre étude, une des tumeurs présentait également une cytologie associant les 2 types de cellules tumorales (tumeur n°10). Il s'agit très probablement d'une tumeur hybride, non diagnostiquée initialement en 2009. Ce diagnostic est conforté par le profil en cytométrie de flux qui est diploïde, et le profil caryotypique en CGH-Array qui ne retrouvait qu'une duplication partielle du bras long du chromosome 11 (dup(11)q13.2). Comme l'a montré récemment 2 études s'intéressant à la cytogénétique des tumeurs hybrides (104,105), leurs caryotypes sont généralement très peu modifiés voir tout à fait normal. Décrites par l'OMS depuis 2004, les tumeurs hybrides restent de diagnostic difficile et sont facilement prises pour des CCCh de forme éosinophile. La CGH-Array est un outil intéressant pour les distinguer au vu de leur différence cytogénétique. Cependant, les CCCh à caryotype diploïde ont été décrits mais reste rares (50,52,95,96,99,106). Dans notre série, 2 des tumeurs (tumeurs n°7 et 12) présentaient un caryotype strictement normal et une troisième

(tumeur n°8) avait uniquement une délétion de la partie terminale du bras court du chromosome 1 (del(1)p32.1).

Le gène *c-MET* est un proto-oncogène codant pour le récepteur à domaine tyrosine kinase de l'hépatocyte growth factor. Il est amplifié dans les carcinomes papillaires rénaux de forme familiale mais également dans 13% des formes sporadiques (107). Ce gène a été peu étudié dans les CCCh. Des séries étudiant l'expression du récepteur à domaine tyrosine kinase issu du gène *c-MET* en immunohistochimie ont inclus quelques CCCh, dont de rares cas métastatiques, qui n'exprimaient pas ce récepteur de façon anormale (107,108). Dans notre étude, pour aucun des CCCh, métastatiques ou non, il n'était observé de surexpression du gène *c-MET*, ce qui est en accord avec les données de la littérature.

VI- Conclusion

Notre série est comparable à celles de la littérature : Les carcinomes à cellules chromophobes opérés au CHRU de Lille sur la période 2002-2013 représentent 6% de l'ensemble des tumeurs du rein. Ils surviennent principalement durant la 6^{ème} décennie, avec une taille moyenne de 5,7cm et sont localisés au rein pour 83% d'entre eux. L'évolution péjorative métastatique est observée dans moins de 8% des cas. Notre travail confirme que certaines caractéristiques comme la nécrose tumorale, un contingent sarcomatoïde, des embolies tumorales, un envahissement de la graisse péri-rénale et un envahissement ganglionnaire sont plus fréquemment observés dans les formes d'évolution défavorable. De plus nous avons identifié quatre critères significativement associés au risque métastatique : une grande taille tumorale (> 10cm), un compte mitotique $\geq 3/10$ HPF, un index de prolifération Ki67 élevé dans les foyers de « hot spot » ($\geq 13\%$) et un grand nombre de chromosomes perdus (≥ 8) en CGH. Cependant, en raison des effectifs limités de notre étude, ces critères devront être validés sur de plus larges séries.

VII- Bibliographie

1. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1985;48(3):207-217.
2. Thoenes W, Baum HP, Störkel S, Müller M. Cytoplasmic microvesicles in chromophobe cell renal carcinoma demonstrated by freeze fracture. *Virchows Arch B.* 1 déc 1987;54(1):127-130.
3. Störkel S, Steart PV, Drenckhahn D, Thoenes W. The human chromophobe cell renal carcinoma: Its probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Arch B.* 1 déc 1988;56(1):237-245.
4. Hes O, Vanecek T, Perez-Montiel DM, Alvarado Cabrero I, Hora M, Suster S, et al. Chromophobe renal cell carcinoma with microcystic and adenomatous arrangement and pigmentation--a diagnostic pitfall. Morphological, immunohistochemical, ultrastructural and molecular genetic report of 20 cases. *Virchows Arch Int J Pathol.* avr 2005;446(4):383-393.
5. Przybycin CG, Cronin AM, Darvishian F, Gopalan A, Al-Ahmadie HA, Fine SW, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 203 tumors in 200 patients with primary resection at a single institution. *Am J Surg Pathol.* juill 2011;35(7):962-970.
6. Amin MB, Paner GP, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Lyles RH, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 145 cases. *Am J Surg Pathol.* déc 2008;32(12):1822-1834.
7. Vera-Badillo FE, Conde E, Duran I. Chromophobe renal cell carcinoma: a review of an uncommon entity. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc.* oct 2012;19(10):894-900.
8. Cindolo L, de la Taille A, Schips L, Zigeuner RE, Ficarra V, Tostain J, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: comprehensive analysis of 104 cases from multicenter European database. *Urology.* avr 2005;65(4):681-686.
9. Volpe A, Novara G, Antonelli A, Bertini R, Billia M, Carmignani G, et al. Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU Int.* juill 2012;110(1):76-83.
10. Dhote R, Thiounn N, Debré B, Vidal-Trecan G. Risk factors for adult renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* mai 2004;31(2):237-247.
11. Chow W-H, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* mai 2010;7(5):245-257.
12. Purdue MP, Moore LE, Merino MJ, Boffetta P, Colt JS, Schwartz KL, et al. An investigation of risk factors for renal cell carcinoma by histologic subtype in two case-control studies. *Int J Cancer.* 2013;132(11):2640-7.

13. Kim JK, Kim TK, Ahn HJ, Kim CS, Kim K-R, Cho K-S. Differentiation of subtypes of renal cell carcinoma on helical CT scans. *AJR Am J Roentgenol.* juin 2002;178(6):1499-1506.
14. Pedrosa I, Sun MR, Spencer M, Genega EM, Olumi AF, Dewolf WC, et al. MR imaging of renal masses: correlation with findings at surgery and pathologic analysis. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc.* août 2008;28(4):985-1003.
15. Sun MRM, Ngo L, Genega EM, Atkins MB, Finn ME, Rofsky NM, et al. Renal cell carcinoma: dynamic contrast-enhanced MR imaging for differentiation of tumor subtypes--correlation with pathologic findings. *Radiology.* mars 2009;250(3):793-802.
16. Kuroda N, Toi M, Hiroi M, Enzan H. Review of chromophobe renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol.* janv 2003;18(1):165-171.
17. Yamaguchi T, Kuroda N, Imamura Y, Hes O, Michal M, Sima R, et al. Imprint cytologic features of chromophobe renal cell carcinoma morphologically resembling renal oncocytoma: is this an oncocytic variant of chromophobe renal cell carcinoma? *Diagn Cytopathol.* juill 2010;38(7):509-513.
18. Kuroda N, Tanaka A, Yamaguchi T, Kasahara K, Naruse K, Yamada Y, et al. Chromophobe renal cell carcinoma, oncocytic variant: a proposal of a new variant giving a critical diagnostic pitfall in diagnosing renal oncocytic tumors. *Med Mol Morphol.* mars 2013;46(1):49-55.
19. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Leibovich BC, Frank I, et al. Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome. *Am J Surg Pathol.* avr 2004;28(4):435-441.
20. Shuch B, Bratslavsky G, Linehan WM, Srinivasan R. Sarcomatoid renal cell carcinoma: a comprehensive review of the biology and current treatment strategies. *The oncologist.* 2012;17(1):46-54.
21. De Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, et al. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol.* mars 2001;25(3):275-284.
22. Onishi T, Oishi Y, Yanada S, Abe K, Hasegawa T, Maeda S. Prognostic implications of histological features in patients with chromophobe cell renal carcinoma. *BJU Int.* oct 2002;90(6):529-532.
23. Cheville JC, Lohse CM, Sukov WR, Thompson RH, Leibovich BC. Chromophobe renal cell carcinoma: the impact of tumor grade on outcome. *Am J Surg Pathol.* juin 2012;36(6):851-856.
24. Zhao P-J, Chen X-P, Li X-S, Yao L, Zhang C-J, Yu W, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: analysis of 53 cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* mars 2012;138(3):451-454.
25. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell

- carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol.* oct 2013;37(10):1490-1504.
26. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* oct 1982;6(7):655-663.
 27. Medeiros LJ, Jones EC, Aizawa S, Aldape HC, Cheville JC, Goldstein NS, et al. Grading of renal cell carcinoma: Workgroup No. 2. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer.* 1 sept 1997;80(5):990-991.
 28. Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, McCredie MRE, Martignoni G, Eble JN, et al. Fuhrman grading is not appropriate for chromophobe renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* juin 2007;31(6):957-960.
 29. Helpap B, Knüpfper J, Essmann S. Nucleolar grading of renal cancer. Correlation of frequency and localization of nucleoli to histologic and cytologic grading and stage of renal cell carcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* nov 1990;3(6):671-678.
 30. Delahunt B, Becker RL, Bethwaite PB, Ribas JL. Computerized nuclear morphometry and survival in renal cell carcinoma: comparison with other prognostic indicators. *Pathology (Phila).* oct 1994;26(4):353-358.
 31. Paner GP, Amin MB, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Moch H, et al. A novel tumor grading scheme for chromophobe renal cell carcinoma: prognostic utility and comparison with Fuhrman nuclear grade. *Am J Surg Pathol.* sept 2010;34(9):1233-1240.
 32. Jain S, Roy S, Amin M, Acquafondata M, Yin M, Laframboise W, et al. Amylase α -1A (AMY1A): a novel immunohistochemical marker to differentiate chromophobe renal cell carcinoma from benign oncocytoma. *Am J Surg Pathol.* déc 2013;37(12):1824-1830.
 33. Zheng G, Chaux A, Sharma R, Netto G, Caturegli P. LMP2, a novel immunohistochemical marker to distinguish renal oncocytoma from the eosinophilic variant of chromophobe renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* févr 2013;94(1):29-32.
 34. Martignoni G, Pea M, Chilosi M, Brunelli M, Scarpa A, Colato C, et al. Parvalbumin is constantly expressed in chromophobe renal carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* août 2001;14(8):760-767.
 35. Pan C-C, Chen PC-H, Ho DM-T. The diagnostic utility of MOC31, BerEP4, RCC marker and CD10 in the classification of renal cell carcinoma and renal oncocytoma: an immunohistochemical analysis of 328 cases. *Histopathology.* nov 2004;45(5):452-459.
 36. Garcia E, Li M. Caveolin-1 immunohistochemical analysis in differentiating chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol.* mars 2006;125(3):392-398.
 37. Carvalho JC, Wasco MJ, Kunju LP, Thomas DG, Shah RB. Cluster analysis of immunohistochemical profiles delineates CK7, vimentin, S100A1 and C-kit (CD117) as an optimal panel in the differential diagnosis of renal oncocytoma from its mimics. *Histopathology.* janv 2011;58(2):169-179.

38. Osunkoya AO, Cohen C, Lawson D, Picken MM, Amin MB, Young AN. Claudin-7 and claudin-8: immunohistochemical markers for the differential diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Hum Pathol.* févr 2009;40(2):206-210.
39. Demirović A, Džombeta T, Tomas D, Spajić B, Pavić I, Hudolin T, et al. Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A3/4 and NY-ESO-1 in renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma. *Pathol Res Pract.* 15 oct 2010;206(10):695-699.
40. Moch H, Srigley J, Delahunt B, Montironi R, Egevad L, Tan PH. Biomarkers in renal cancer. *Virchows Arch.* 1-7.
41. Walter B, Hartmann A, Hofstädter F, Junker K, Moch H, Bertz S, et al. Immunohistochemical marker panel differentiates between the three most common subtypes of renal cell carcinoma independent from histomorphologic criteria. *Virchows Arch.* 1 mars 2012;460(3):343-352.
42. Erlandson RA, Shek TW, Reuter VE. Diagnostic significance of mitochondria in four types of renal epithelial neoplasms: an ultrastructural study of 60 tumors. *Ultrastruct Pathol.* oct 1997;21(5):409-417.
43. Tickoo SK, Lee MW, Eble JN, Amin M, Christopherson T, Zarbo RJ, et al. Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* sept 2000;24(9):1247-1256.
44. Abrahams NA, MacLennan GT, Khoury JD, Ormsby AH, Tamboli P, Doglioni C, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: a comparative study of histological, immunohistochemical and ultrastructural features using high throughput tissue microarray. *Histopathology.* déc 2004;45(6):593-602.
45. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S. Chromophobe cell renal carcinoma and its variants--a report on 32 cases. *J Pathol.* août 1988;155(4):277-287.
46. Bonsib SM, Bray C, Timmerman TG. Renal chromophobe cell carcinoma: limitations of paraffin-embedded tissue. *Ultrastruct Pathol.* oct 1993;17(5):529-536.
47. Billis A, Carvalho RB, Magrini E, Mattos AC, Negretti F, Niero VR, et al. Chromophobe renal cell carcinoma: clinicopathological study of 7 cases. *Ultrastruct Pathol.* févr 1998;22(1):19-26.
48. Kovacs G, Soudah B, Hoene E. Binucleated cells in a human renal cell carcinoma with 34 chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet.* avr 1988;31(2):211-215.
49. Kovacs A, Kovacs G. Low chromosome number in chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* avr 1992;4(3):267-268.
50. Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schrock E, Ried T, Cremer T, et al. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* août 1994;145(2):356-364.

51. Bugert P, Kovacs G. Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis. *Am J Pathol.* déc 1996;149(6):2081-2088.
52. Bugert P, Gaul C, Weber K, Herbers J, Akhtar M, Ljungberg B, et al. Specific genetic changes of diagnostic importance in chromophobe renal cell carcinomas. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* févr 1997;76(2):203-208.
53. Soller MJ, Kullendorff C-M, Békássy AN, Alumets J, Mertens F. Cytogenetic findings in pediatric renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* févr 2007;173(1):75-80.
54. Chaux A, Albadine R, Schultz L, Hicks J, Carducci MA, Argani P, et al. Dysregulation of the mammalian target of rapamycin pathway in chromophobe renal cell carcinomas. *Hum Pathol.* oct 2013;44(10):2323-2330.
55. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell.* 10 juill 2007;12(1):9-22.
56. Klatte T, Han K, Said JW, Böhm M, Allhoff EP, Kabbinavar FF, et al. Pathobiology and prognosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* déc 2008;26(6):604-609.
57. Motzer RJ, Bacik J, Mariani T, Russo P, Mazumdar M, Reuter V. Treatment outcome and survival associated with metastatic renal cell carcinoma of non-clear-cell histology. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 mai 2002;20(9):2376-2381.
58. Toro JR, Wei M-H, Glenn GM, Weinreich M, Toure O, Vocke C, et al. BHD mutations, clinical and molecular genetic investigations of Birt-Hogg-Dubé syndrome: a new series of 50 families and a review of published reports. *J Med Genet.* juin 2008;45(6):321-331.
59. Klomp JA, Petillo D, Niemi NM, Dykema KJ, Chen J, Yang XJ, et al. Birt-Hogg-Dubé renal tumors are genetically distinct from other renal neoplasias and are associated with up-regulation of mitochondrial gene expression. *BMC Med Genomics.* 1 déc 2010;3(1):1-12.
60. Schmidt LS, Warren MB, Nickerson ML, Weirich G, Matrosova V, Toro JR, et al. Birt-Hogg-Dubé syndrome, a genodermatosis associated with spontaneous pneumothorax and kidney neoplasia, maps to chromosome 17p11.2. *Am J Hum Genet.* oct 2001;69(4):876-882.
61. Togashi Y, Kobayashi T, Momose S, Ueda M, Okimoto K, Hino O. Transgenic rescue from embryonic lethality and renal carcinogenesis in the Nihon rat model by introduction of a wild-type Bhd gene. *Oncogene.* 11 mai 2006;25(20):2885-2889.
62. Hartman TR, Nicolas E, Klein-Szanto A, Al-Saleem T, Cash TP, Simon MC, et al. The role of the Birt-Hogg-Dubé protein in mTOR activation and renal tumorigenesis. *Oncogene.* 2 avr 2009;28(13):1594-1604.
63. Baba M, Keller JR, Sun H-W, Resch W, Kuchen S, Suh HC, et al. The folliculin-FNIP1 pathway deleted in human Birt-Hogg-Dubé syndrome is required for murine B-cell development. *Blood.* 9 août 2012;120(6):1254-1261.
64. Toro JR. Birt-Hogg-Dubé Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, Smith RJ, et al., éditeurs. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of

Washington, Seattle; 1993 [cité 15 mars 2014]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1522/>

65. Pavlovich CP, Walther MM, Eyer RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM, et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Surg Pathol*. déc 2002;26(12):1542-1552.
66. Houweling AC, Gijzen LM, Jonker MA, van Doorn MBA, Oldenburg RA, van Spaendonck-Zwarts KY, et al. Renal cancer and pneumothorax risk in Birt-Hogg-Dubé syndrome; an analysis of 115 FLCN mutation carriers from 35 BHD families. *Br J Cancer*. 6 déc 2011;105(12):1912-1919.
67. Waldert M, Klatte T, Haitel A, Ozsoy M, Schmidbauer J, Marberger M, et al. Hybrid renal cell carcinomas containing histopathologic features of chromophobe renal cell carcinomas and oncocytomas have excellent oncologic outcomes. *Eur Urol*. avr 2010;57(4):661-665.
68. Lee WK, Byun S-S, Kim HH, Rha KH, Hwang T-K, Sung GT, et al. Characteristics and prognosis of chromophobe non-metastatic renal cell carcinoma: a multicenter study. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. nov 2010;17(11):898-904.
69. 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*. 31 mai 2007;356(22):2271-2281.
70. Venugopal B, Ansari J, Aitchison M, Tho LM, Campbell R, Jones RJ. Efficacy of temsirolimus in metastatic chromophobe renal cell carcinoma. *BMC Urol*. 1 déc 2013;13(1):1-4.
71. Choueiri TK, Plantade A, Elson P, Negrier S, Ravaud A, Oudard S, et al. Efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic papillary and chromophobe renal cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 janv 2008;26(1):127-131.
72. Yamazaki K, Sakamoto M, Ohta T, Kanai Y, Ohki M, Hirohashi S. Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma. *Oncogene*. 13 févr 2003;22(6):847-852.
73. Lin Z-H, Han EM, Lee ES, Kim CW, Kim HK, Kim I, et al. A distinct expression pattern and point mutation of c-kit in papillary renal cell carcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. juin 2004;17(6):611-616.
74. Pan C-C, Chen PC-H, Chiang H. Overexpression of KIT (CD117) in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Am J Clin Pathol*. juin 2004;121(6):878-883.
75. Stec R, Grala B, Maczewski M, Bodnar L, Szczylik C. Chromophobe renal cell cancer--review of the literature and potential methods of treating metastatic disease. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2009;28:134.
76. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. mai 2003;27(5):612-624.

77. Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases. *J Urol.* sept 1995;154(3):964-967.
78. Renshaw AA, Henske EP, Loughlin KR, Shapiro C, Weinberg DS. Aggressive variants of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer.* 15 oct 1996;78(8):1756-1761.
79. Finley DS, Shuch B, Said JW, Galliano G, Jeffries RA, Afifi AA, et al. The chromophobe tumor grading system is the preferred grading scheme for chromophobe renal cell carcinoma. *J Urol.* déc 2011;186(6):2168-2174.
80. Pardo P, Rodríguez-Faba O, Palou J, Algaba F, Breda A, Esquena S, et al. [Relevance of the clinical-pathological predictive factors in force in chromophobe renal cell cancer]. *Actas Urol Esp.* oct 2012;36(9):527-531.
81. Pérez-Pedrosa A, Ortiz-Rey JA, Lorenzo-Mahía Y, Iglesias-Rodríguez B, Peteiro-Cancelo A, González-Carreró J. Interobserver reproducibility of a grading system for chromophobe renal cell carcinoma. *Actas Urol Esp.* juin 2013;37(6):338-341.
82. Jochum W, Schröder S, al-Taha R, August C, Gross AJ, Berger J, et al. Prognostic significance of nuclear DNA content and proliferative activity in renal cell carcinomas. A clinicopathologic study of 58 patients using mitotic count, MIB-1 staining, and DNA cytophotometry. *Cancer.* 1 févr 1996;77(3):514-521.
83. Kramer BA, Gao X, Davis M, Hall M, Holzbeierlein J, Tawfik O. Prognostic significance of ploidy, MIB-1 proliferation marker, and p53 in renal cell carcinoma. *J Am Coll Surg.* oct 2005;201(4):565-570.
84. Tickoo SK, Amin MB, Linden MD, Zarbo RJ. The MIB-1 tumor proliferation index in adult renal epithelial tumors with granular cytoplasm: biologic implications and differential diagnostic potential. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* nov 1998;11(11):1115-1121.
85. Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, Atkinson G, Fanshawe T, Griffiths DF, et al. Mcm2, Geminin, and KI67 Define Proliferative State and are Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 4 janv 2005;11(7):2510-2517.
86. Kallio JP, Mahlamäki EH, Helin H, Karhu R, Kellokumpu-Lehtinen P, Tammela TLJ. Chromosomal gains and losses detected by comparative genomic hybridization and proliferation activity in renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol.* 2004;38(3):225-230.
87. Amling CL, Lerner SE, Martin SK, Slezak JM, Blute ML, Zincke H. Deoxyribonucleic acid ploidy and serum prostate specific antigen predict outcome following salvage prostatectomy for radiation refractory prostate cancer. *J Urol.* mars 1999;161(3):857-862; discussion 862-863.
88. Panousis D, Xepapadakis G, Lagoudianakis E, Karavitis G, Salemis N, Koronakis N, et al. Prognostic value of EZH2, paxillin expression and DNA ploidy of breast adenocarcinoma: correlation to pathologic predictors. *J BUON Off J Balk Union Oncol.* déc 2013;18(4):879-885.

89. Van Brussel JP, Mickisch GH. Prognostic factors in renal cell and bladder cancer. *BJU Int.* mai 1999;83(8):902-908; quiz 908-909.
90. Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. Chromophobe Cell Renal Carcinoma: Clinicopathological Features of 50 Cases. *J Urol.* sept 1995;154(3):964-967.
91. Bonsib SM, Lager DJ. Chromophobe cell carcinoma: analysis of five cases. *Am J Surg Pathol.* mars 1990;14(3):260-267.
92. Akhtar M, Chantziantoniou N. Flow cytometric and quantitative image cell analysis of dna ploidy in renal chromophobe cell carcinoma. *Hum Pathol.* nov 1998;29(11):1181-1188.
93. Morell-Quadreny L, Gregori-Romero M, Llombart-Bosch A. Chromophobe renal cell carcinoma. Pathologic, ultrastructural, immunohistochemical, cytofluorometric and cytogenetic findings. *Pathol Res Pract.* déc 1996;192(12):1275-1281; discussion 1282.
94. Gómez-Román JJ, Fernández F, Buelta-Carrillo L, Val-Bernal JF. Chromophobe cell renal carcinoma: DNA flow cytometry and proliferation status in 9 cases. *Urol Int.* 1997;58(4):203-207.
95. Iqbal MA, Akhtar M, Ali MA. Cytogenetic findings in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* sept 1996;27(9):949-954.
96. Verdorfer I, Hobisch A, Hittmair A, Duba H-C, Bartsch G, Utermann G, et al. Cytogenetic Characterization of 22 Human Renal Cell Tumors in Relation to a Histopathological Classification. *Cancer Genet Cytogenet.* mai 1999;111(1):61-70.
97. Brunelli M, Delahunt B, Gobbo S, Tardanico R, Eccher A, Bersani S, et al. Diagnostic usefulness of fluorescent cytogenetics in differentiating chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma: a validation study combining metaphase and interphase analyses. *Am J Clin Pathol.* janv 2010;133(1):116-126.
98. Tan M-H, Wong CF, Tan HL, Yang XJ, Ditlev J, Matsuda D, et al. Genomic expression and single-nucleotide polymorphism profiling discriminates chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma. *BMC Cancer.* 2010;10:196.
99. Sperga M, Martinek P, Vanecek T, Grossmann P, Bauleth K, Perez-Montiel D, et al. Chromophobe renal cell carcinoma--chromosomal aberration variability and its relation to Paner grading system: an array CGH and FISH analysis of 37 cases. *Virchows Arch Int J Pathol.* oct 2013;463(4):563-573.
100. Moch H, Presti JC Jr, Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, et al. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1 janv 1996;56(1):27-30.
101. Dijkhuizen T, van den Berg E, Störkel S, de Jong B. Chromosome changes in a metastasis of a chromophobe renal cell tumor. *Cancer Genet Cytogenet.* août 1998;105(1):86-89.

102. Junker K, Moravek P, Podhola M, Weirich G, Hindermann W, Janitzky V, et al. Genetic alterations in metastatic renal cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization: correlation with clinical and histological data. *Int J Oncol.* nov 2000;17(5):903-908.
103. Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schäffer AA, et al. Evaluation of the Clonal Relationship between Primary and Metastatic Renal Cell Carcinoma by Comparative Genomic Hybridization. *Am J Pathol.* juill 1999;155(1):267-274.
104. Petersson F, Gatalica Z, Grossmann P, Perez Montiel MD, Alvarado Cabrero I, Bulimbasic S, et al. Sporadic hybrid oncocytic/chromophobe tumor of the kidney: a clinicopathologic, histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular cytogenetic study of 14 cases. *Virchows Arch Int J Pathol.* avr 2010;456(4):355-365.
105. Poté N, Vieillefond A, Couturier J, Arrufat S, Metzger I, Delongchamps NB, et al. Hybrid oncocytic/chromophobe renal cell tumours do not display genomic features of chromophobe renal cell carcinomas. *Virchows Arch Int J Pathol.* juin 2013;462(6):633-638.
106. Brunelli M, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Delahunt B, Cheng L. Eosinophilic and classic chromophobe renal cell carcinomas have similar frequent losses of multiple chromosomes from among chromosomes 1, 2, 6, 10, and 17, and this pattern of genetic abnormality is not present in renal oncocytoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* févr 2005;18(2):161-169.
107. Choi JS, Kim M-K, Seo JW, Choi Y-L, Kim DH, Chun YK, et al. MET expression in sporadic renal cell carcinomas. *J Korean Med Sci.* août 2006;21(4):672-677.
108. Nagi FM, Omar A-AM, Mostafa MG, Mohammed EA, Abd-Elwahed Hussein MR. The expression pattern of Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, MET proto-oncogene, and TFE3 transcription factor oncoprotein in renal cell carcinoma in Upper Egypt. *Ultrastruct Pathol.* avr 2011;35(2):79-86.

AUTEUR : Juliette BEAUJOT

Date de soutenance : 05 juin 2014

Titre de la thèse : Carcinome rénal à cellules chromophobes : étude clinico-pathologique de 77 cas et caractérisation morphologique et cytogénétique des cas métastatiques.

Thèse médecine, Lille, 2014

Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Mots-clés : Carcinome à cellules chromophobes, métastase, CGH-Array, caryotype, facteurs pronostiques, index de prolifération, index mitotique, nécrose tumorale, contingent sarcomatoïde

Résumé :

Titre : Carcinome rénal à cellules chromophobes : étude clinico-pathologique de 77 cas et caractérisation morphologique et cytogénétique des cas métastatiques.

Contexte : Les carcinomes à cellules chromophobes représentent 5 à 10% des tumeurs rénales et sont d'excellent pronostic. Les cas métastatiques sont rares (7%) et ont été peu étudiés.

Matériel et méthodes : Nous avons évalué rétrospectivement les critères épidémiologiques et histopathologiques des 77 cas de carcinomes à cellules chromophobes diagnostiqués au CHRU de Lille de 2002 à 2013. Les 6 cas métastatiques extraits de cette série ont été comparés à 10 cas non métastatiques. Les critères d'analyse étaient les suivants : la taille tumorale, la nécrose tumorale, un contingent sarcomatoïde, l'index mitotique, l'index de prolifération Ki67, la présence d'emboles tumoraux, le stade, le grade nucléaire de Paner, la ploïdie de l'ADN et le caryotype obtenu par CGH-Array.

Résultats : Dans la série de 77 cas, l'âge moyen au diagnostic était de 57,5 ans et la taille tumorale moyenne était de 5,7cm. 83% des tumeurs étaient de stade pT1 ou pT2. Un contingent de carcinome sarcomatoïde et des emboles tumoraux n'étaient observés que dans les tumeurs métastatiques. Les cas métastatiques représentaient 7,8% de la série (n=6). 5/6 de ces tumeurs présentaient de la nécrose tumorale et des emboles tumoraux. Les tumeurs non métastatiques étaient classées en grade 1 ou 2 de Paner, alors que les tumeurs métastatiques étaient de grade 2 ou 3. Le compte de mitoses était significativement différent dans les 2 groupes (p=0,0037) avec en moyenne, 5,17 mitoses dans le groupe métastatique et 0,9 mitoses dans l'autre groupe. L'évaluation de l'index de prolifération Ki67 dans les foyers de « hot spot » mettait en évidence des valeurs significativement différentes dans les 2 groupes (p=0,0104) alors que ces index évalués en moyenne sur l'ensemble de la lame ne l'étaient pas (p=0,1824). L'ensemble des tumeurs métastatiques avaient un profil d'ADN aneuploïde de type hypodiploïde en cytométrie en flux et de 7 à 12 pertes chromosomiques en CGH-Array. 4 des 10 tumeurs non métastatiques avaient un profil d'ADN et un caryotype diploïde. Le nombre de chromosomes perdus entre les 2 groupes de tumeurs étaient significativement différent avec un p=0,0058. Le nombre de gains chromosomiques n'étaient pas significativement différent entre les 2 groupes.

Conclusion : Notre série est comparable à celle de la littérature : les carcinomes à cellules chromophobes représentent 6% des tumeurs rénales opérées au CHRU de Lille et moins de 8% des cas sont métastatiques. Nous avons montré que les cas métastatiques sont significativement caractérisés par leur taille (≥ 10 cm), un compte mitotique $\geq 3/10$ HPF, un index de prolifération $\geq 13\%$ dans les foyers de « hot spot » et par un nombre de chromosomes perdus (≥ 8) plus important que dans les cas non métastatiques.

Composition du Jury :

Président : Madame le Professeur Marie-Christine COPIN

Assesseurs : Monsieur le Professeur Arnaud VILLERS

Madame le Docteur Catherine ROCHE-LESTIENNE

Directeur : Monsieur le Professeur Xavier LEROY