



UNIVERSITE PARIS DIDEROT- SORBONNE PARIS CITE



Thèse
Pour l'obtention du diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VII

Ecole doctorale : ED 561 - Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies
Spécialité : Hématologie et Oncologie

Unité de recherche : **INSERM U965 C.A.R.T** :
Carcinose Angiogénèse et Recherche Translationnelle

Soutenue publiquement le 30 Janvier 2017 par

Anthony DOHAN

DIAGNOSTIC, CARACTERISATION ET SUIVI DE LA CARCINOSE PERITONEALE - APPORTS DE L'IMAGERIE FONCTIONNELLE

Thèse dirigée par le **Pr Philippe SOYER**

Devant le Jury composé de :

Pr Alain LUCIANI
Pr Christine HOEFFEL
Pr Jérôme ALEXANDRE
Pr Laure FOURNIER
Pr Boris GUIU
Pr Marc POCARD
Pr Philippe SOYER

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Président et codirecteur
Directeur

Remerciements

Au **Professeur Philippe Soyer**, directeur de thèse.

Merci de m'avoir encadré durant ces nombreuses années et pour continuer à le faire. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la recherche, pour tes nombreuses relectures, tes conseils et ton amitié. Cher Philippe, encore une fois merci de m'avoir mené jusqu'ici. Je ne serais probablement pas là sans toi.

Au **Professeur Marc Pocard**, codirecteur de thèse et président de jury.

Merci encore, de m'avoir accueilli au sein de l'unité U965, et de m'avoir transmis votre passion pour la recherche. Merci aussi pour m'avoir tant appris sur les malades, pour votre soutien, vos conseils, votre rigueur, votre disponibilité et votre enthousiasme. C'est en grande partie grâce à vous et votre équipe que j'ai tant apprécié mes années passées à Lariboisière. Je n'ai pas de doute que nous continuerons à travailler ensemble.

Au **Professeur Alain Luciani**, rapporteur

Merci d'avoir accepté tout de suite d'être rapporteur et de me faire l'honneur de juger ce travail. Cher Alain, tes travaux ont toujours été source d'inspiration pour moi et je suis honoré que tu sois là aujourd'hui.

Au **Professeur Christine Hoeffel**, rapporteur

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur et de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci pour ta rigueur, ta passion de l'imagerie et pour ton immense gentillesse.

Au **Professeur Jérôme Alexandre**, examinateur

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Je suis impatient de travailler avec vous très bientôt.

Au **Professeur Boris Guiu**, examinateur

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour vos conseils et votre rigueur.

Au **Professeur Laure Fournier**, examinateur

La « femme » de la situation, merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Je suis ravi que nous ayons l'occasion de travailler bientôt ensemble.

Au Dr Philippe Bonnin,

Qui veille si bien sur ses petits. Merci Philippe pour m'avoir poussé jusqu'au bout, et parfois même remorqué. Merci pour ton humour, ton enthousiasme. N'oublie pas de me transmettre le secret de ton éternelle jeunesse.

Aux Professeurs Benoit Gallix et Caroline Reinhold,

Merci de votre accueil dans votre équipe à Montréal. Merci de me donner cette chance de découvrir autre chose, à la fois en recherche et en clinique.

A l'équipe du L'unité INSERM U965,

Merci à tous pour votre accueil dans l'unité, pour votre aide et votre bonne humeur.

A mes collègues du service de radiologie de l'Hôpital Lariboisière,
Vous êtes ma seconde famille. Merci pour votre soutien quotidien, pour les sucreries et les panachés, et plus que tout, pour votre amitié.

A mes amis,
Que je sens si proches, même quand vous êtes loin.

A ma famille,
A mon grand-père, que j'aime plus que tout
A mes frères et leurs familles, à mes chers neveux que j'aime tant
A mon père, qui m'impressionne chaque jour d'avantage. Merci pour ton soutien et ton amour.

A Sarah,
Mon guide dans le brouillard. Grâce à toi je me rappelle de ce qui est vraiment important.
Merci d'être à mes côtés chaque jour.

A ma mère,
Qui aurait tant aimé être là aujourd'hui. Je sens que tu continues à veiller sur moi comme tu l'as toujours fait.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	4
Liste des abréviations :	6
RÉSUMÉ.....	7
1. Introduction :	8
1.1 Le péritoine normal et tumoral	8
1.1.1 Physiologie du péritoine	8
1.1.2 La carcinose péritonéale	9
1.1.2.1 Angiogenèse dans la carcinose péritonéale	10
1.1.2.2 Rôle des progéniteurs endothéliaux :	13
1.1.2.3 Progéniteurs endothéliaux et niche pré-métastatique.....	15
1.1.2.4 Le microenvironnement tumoral	15
1.1.2.5 Implications cliniques	17
1.2 Prise en charge des carcinoses péritonéales.....	19
1.2.1 La prise en charge chirurgicale	19
1.2.2 La prise en charge médicale	20
1.3 Exploration d'une carcinose péritonéale	21
1.3.1 Explorations chirurgicale	21
1.3.2 Exploration non invasive préopératoire	23
1.3.3 Les techniques d'évaluation « classiques » d'une carcinose péritonéale.....	23
1.3.3.1 La tomодensitométrie (TDM).....	24
1.3.3.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	25
1.3.3.3 La tomographie par émission de positron (TEP)-TDM	27
1.3.3.4 La TEP-IRM	28
1.3.3.5 Evaluation de la réponse à la chimiothérapie.....	29
1.3.3.6 Le compte-rendu	30
1.4 Imagerie fonctionnelle : principe, techniques et applications	31
1.4.1 Échographie Doppler.....	32
1.4.2 Échographie de contraste	33
1.4.3 Imagerie de perfusion: TDM et IRM	34
1.4.3.1 Les compartiments	36
1.4.3.2 Interprétation.....	36
1.4.3.3 TDM vs IRM de perfusion.....	37
1.4.4 IRM de diffusion	39
1.4.4.1 Bases physiques	39
1.4.4.2 La valeur du gradient de diffusion : b	41
1.4.4.3 Modélisation mono-exponentielle : le coefficient apparent de diffusion ...	42
1.4.4.4 Diffusion bi-compartimentale : le modèle intra-voxel incoherent motion .	43
1.4.4.5 Applications cliniques de l'imagerie de diffusion	44
1.5 Evaluation de la réponse histologique	46
1.6 Evaluation de la néo-vascularisation tumorale	48
1.7 Le pseudomyxome péritonéal (PMP)	49
1.7.1 Définition :	49

1.7.2	Epidémiologie :	49
1.7.3	Anatomopathologie :	49
1.7.4	Imagerie TDM du PMP	51
1.7.5	Imagerie IRM du PMP	52
1.7.6	Aspect IRM du PMP	54
1.7.8	Intérêt de la TEP-TDM	58
1.7.9	Critères de non résecabilité	58
1.7.10	Diagnostic différentiel	59
1.7.10.1	Cas de la mucocele	59
1.7.10.2	Les autres carcinomes	60
1.7.10.3	Les autres lésions kystiques	61
1.7.11	Conclusion	62
1.8	Les modèles animaux	63
2.	Objectifs	65
3.	Résultats	67
3.1	Etablissement d'un modèle murin de PMP pour évaluer et caractériser l'angiogenèse tumorale péritonéale :	67
3.2	Mise au point d'une séquence de diffusion pour les études murines à 1.5T	91
3.2.1	Evaluation de la variabilité et de la reproductibilité des paramètres quantitatifs	91
3.2.2	Application traitement anti-angiogénique dans le modèle murin de PMP	112
4.	Perspectives	120
4.1	Projet Evaluation quantitative de la microcirculation tumorale et de la réponse à un traitement anti-angiogénique dans un modèle murin de PMP par IRM de perfusion, de diffusion multi-b (IVIM) et analyse de texture tridimensionnelle.	120
4.1.1	Résumé du projet :	120
4.1.2	Etat de la question	121
4.1.3	Objectif du projet	122
4.1.4	Méthodologie	122
4.1.5	Résultats attendus	123
4.2	Applications translationnelles : validation d'un nouveau mode d'évaluation de l'agressivité des PMP par échographie-Doppler des vaisseaux mésentériques	124
4.3	Prédiction de la survie à 2 ans chez les patients atteints de CP non résecable	131
	Conclusion	135
	Bibliographie	138
	Annexes	153
	Annexe n°1 : Valeur ajoutée de l'IRM dans le bilan préopératoire des carcinomes péritonéales	153
	Annexe n°2 : PHRC-K POSITIF	171
	Annexe n°3 : TDM de perfusion chez la souris	174

Liste des abréviations :

¹⁸FDG: 18-fluoro-désoxyglucose
ADC: coefficient apparent de diffusion
AIF : fonction d'entrée artérielle (Arterial Input Function)
ASL : arterial spin labelling
BOLD : Blood Oxygen Level Dependant
CHIP: chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale
CP : carcinose péritonéale
CSM: cellules souches mésenchymateuse
D : coefficient de diffusion « pure »
D* : coefficient de « pseudo-diffusion » ou « diffusion liée à la perfusion »
DCE : injection dynamique de produit de contraste (Dynamic contrast enhanced)
DMV : densité micro-vasculaire
EPI : echo-planar imaging
FSE or TSE : fast or turbo spin echo
HASTE : half-Fourier acquisition single-shot turbo spin-echo
ICP : index de carcinose péritonéale
IRM : imagerie par résonance magnétique
IVIM : intravoxel incoherent motion
Ktrans : constante de perméabilité capillaire
OCT : Optimal cutting temperature
PMP: pseudomyxome péritonéale
RECIST: Response evaluation criteria in solid tumor
SCID : severe combined immunodeficiency
SUV: standard uptake value
TDM: tomodensitométrie
TEP : tomographie par émission de positrons
u.a. : unités arbitraires
US: échographie (ultrasound)
Ve : volume interstitiel
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VPF : vascular permeability factor
WT: type sauvage (Wild Type)

Diagnostic, caractérisation et suivi de la carcinose péritonéale - apports de l'imagerie fonctionnelle

RÉSUMÉ

L'évaluation de la carcinose péritonéale (CP) reste difficile et peu standardisée. Nous avons évalué différentes techniques de suivi de la CP en imagerie fonctionnelle, afin de mieux comprendre l'évolution microcirculatoire de la maladie, la valeur des différents biomarqueurs disponibles et essayer de construire une méthodologie d'évaluation multiparamétrique fonctionnelle.

Le pseudomyxome péritonéale (PMP) est une tumeur rare du péritoine, au sein de laquelle l'angiogenèse tumorale semble jouer un rôle prépondérant. Nous avons établi un modèle murin orthotopique de PMP. Nous avons suivi la perfusion tumorale par échographie Doppler de l'artère mésentérique supérieure (AMS), et montré une accélération des flux au sein de l'AMS accompagnant le développement de la tumeur, ainsi qu'une diminution de ces flux chez les souris traitées par bévacizumab.

Puis, nous avons évalué la microcirculation au sein même de la tumeur. Nous avons ainsi pu montrer dans le modèle murin de PMP et dans un modèle de carcinose murine une bonne reproductibilité pour mesurer la valeur du coefficient apparent de diffusion dans la tumeur ainsi que les paramètres de microcirculation extraits par la méthode Intra-Voxel Incoherent Motion (IVIM) en utilisant une séquence d'imagerie par résonance magnétique (IRM) de type HASTE avec un équipement clinique standard à 1.5T. Nous avons ensuite appliqué la méthode IVIM pour le suivi de PMP de souris traitée par anti-angiogénique (sorafénib). Nous avons montré à 3 semaines de traitement, une diminution de la fraction de perfusion intra-tumorale ainsi qu'une diminution du coefficient de diffusion lié à la perfusion chez les souris traitées, sans différence significative de taille de la tumeur entre les souris traitées et non traitées.

L'application de ces méthodes d'imagerie fonctionnelle, combinées entre elles pourraient permettre de construire des modèles prédictifs et de suivi chez les patients atteints de PMP et de proposer des stratégies thérapeutiques personnalisées très précocement au cours de la maladie.

Diagnostic, caractérisation et suivi de la carcinose péritonéale - apports de l'imagerie fonctionnelle

1. Introduction :

1.1 *Le péritoine normal et tumoral*

1.1.1 Physiologie du péritoine

Le péritoine est une structure complexe, dont la surface est d'environ 1.7 m², composée d'une couche de cellules mésothéliales recouvrant une membrane basale et un tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques (1). C'est un feuillet graisseux continu, dont la portion viscérale recouvre les organes, et la portion pariétale la paroi abdominale (Figure 1). L'un des rôles principaux du péritoine est de permettre le glissement sans friction des organes digestifs mobiles entre eux. Il assure la sécrétion du liquide mésothélial, qui circule dans le sens horaire, et agit comme une barrière, notamment au passage des macromolécules. C'est une membrane semi-perméable qui permet une diffusion rapide du liquide et des petites molécules mais limite la diffusion des grosses molécules. Son épaisseur est de 90 µm. Certaines macromolécules sont secrétées *in-situ* telles que le CA-125, et leur concentration y est bien plus élevée que dans le plasma sanguin (2). Il joue aussi un rôle dans la défense immunitaire notamment en facilitant l'agrégation des lymphocytes en cas d'agression. Les cellules mésothéliales participent aussi activement à la régulation des échanges entre les vaisseaux et le milieu extracellulaire à travers les jonctions de type gap et le transport vésiculaire. Le péritoine intact est imperméable à la diffusion de gaz tels que le CO₂ (3). Il a longtemps été considéré comme une simple enveloppe recouvrant les viscères, alors qu'il s'agit en réalité d'un organe à part entière, et d'une barrière contre la dissémination tumorale et infectieuse (4, 5). La cavité péritonéale est un vrai microenvironnement avec une concentration spécifique en hormones, cytokines, facteurs de croissance, cellules (telles que macrophages et lymphocytes), et un système immunitaire spécifique. Le mode de dissémination de la carcinose péritonéale (CP) secondaire, qui se fait le plus souvent de proche en proche plutôt qu'en profondeur à travers le péritoine, est en partie lié à ce rôle de barrière physiologique (4, 6). Le rôle des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) dans la fonction du péritoine ainsi que des macrophages a été suggéré par plusieurs études mais leur rôle n'a pas

encore été identifié (7-9). Des études sur des modèles animaux ont mis en évidence une efficacité de certaines immuno-toxines contre les processus tumoraux péritonéaux (10). Son rôle et son fonctionnement restent toutefois, à ce jour, encore incomplètement compris.

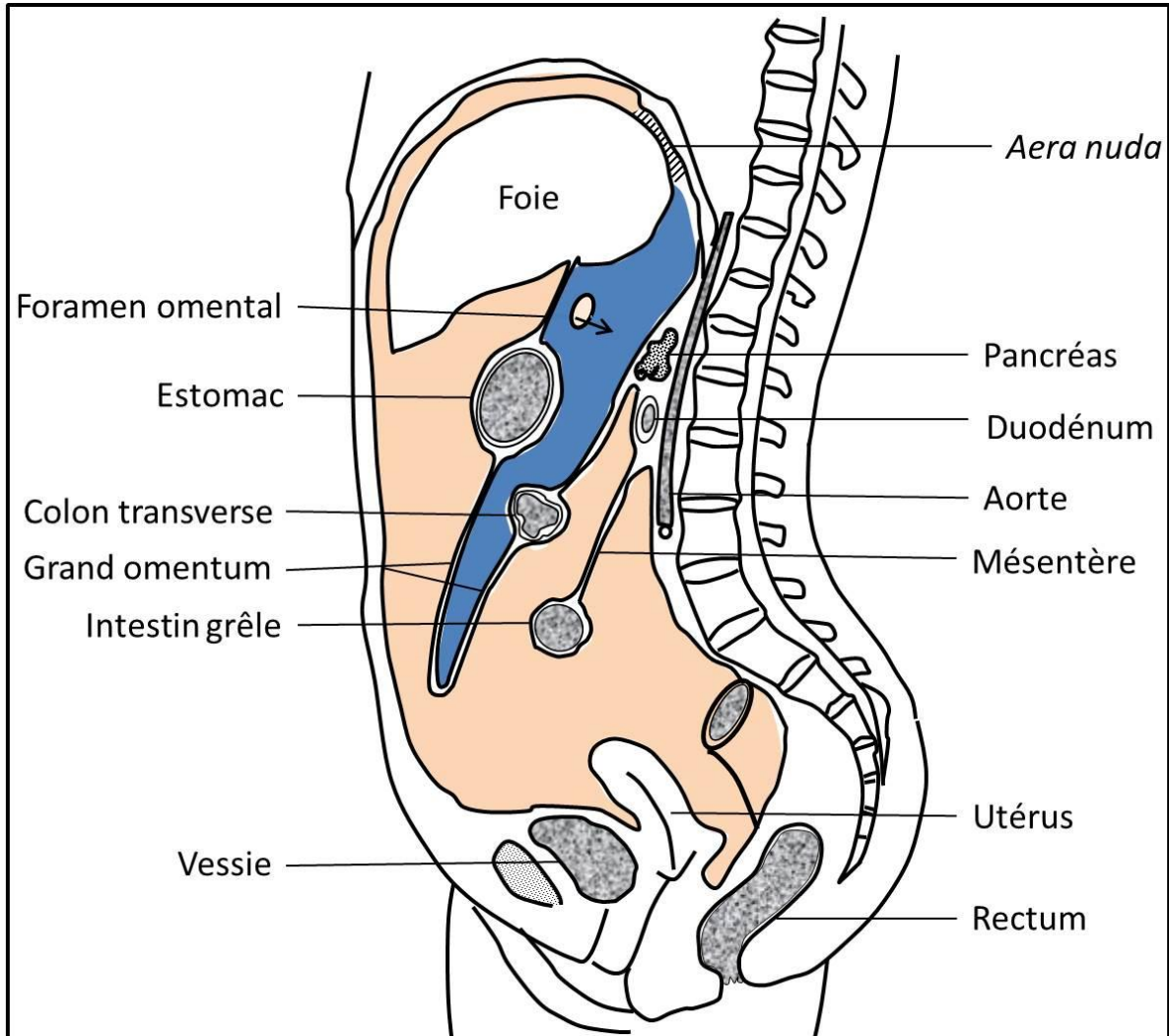


Figure 1. Anatomie normale du péritoine

1.1.2 La carcinose péritonéale

La CP est la dissémination de cellules tumorales dans la cavité péritonéale. Les tumeurs malignes primitives du péritoine sont rares : il s'agit principalement du mésothéliome péritonéal. Le plus souvent, la CP est secondaire à une tumeur primitive d'origine digestive ou gynécologique. Historiquement, la CP était considérée comme une phase terminale de la

maladie, et était traitée de façon palliative en raison d'une survie limitée de 5,2 mois (11, 12). La CP est présente chez environ 7% des patients opérés pour cancer colorectal et apparaît après traitement chirurgical à visée curative chez 4 à 19% des patients au cours du suivi (13, 14).

Les mécanismes de survenue de la CP sont à ce jour mal compris, mais les anciennes théories qui la considéraient comme une simple dissémination par contiguïté des tumeurs digestives perforées ou des tumeurs ovariennes (les ovaires étant intra-péritonéaux), ne peuvent pas expliquer certaines CP secondaires, en particulier celles survenant au cours de certaines tumeurs du sein (15, 16). Il n'y a presque jamais de pénétration directe de la PC dans les structures sous-jacentes du péritoine. Cela est probablement dû à la fonction de barrière du péritoine. La CP est de plus en plus considérée comme une métastase régionale à part entière, et le péritoine comme un organe (17). Depuis les années 1990, la survie de ces patients a été transformée grâce à une nouvelle approche thérapeutique utilisant un traitement locorégional agressif proposé par Paul Sugarbaker (18, 19). Ce traitement combine une chirurgie de cytoréduction tumorale maximale suivie d'une chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale peropératoire (CHIP) (12, 20-23).

1.1.2.1 Angiogenèse dans la carcinose péritonéale

Des études récentes ont amené à considérer la CP comme un processus métastatique complexe, impliquant les mêmes mécanismes que ceux décrits par Hanahan & Weinberg (24, 25). En particulier, le développement des cellules tumorales ne se fait pas au hasard, mais au sein d'un microenvironnement tumoral où se développe une néo-angiogenèse tumorale et un échappement au contrôle immunitaire. L'angiogenèse est le mécanisme par lequel les cellules tumorales vont induire la croissance de néo-vaisseaux pour subvenir à leurs besoins accrus en nutriments et oxygène. L'acquisition de cette capacité à induire la formation de néo-vaisseaux est une des caractéristiques des cellules tumorales (Figure 2). L'angiogenèse est sous la dépendance de facteurs de croissance pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, FGF...) et anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine). A l'état physiologique, tous ces facteurs de croissance régulent la formation des vaisseaux. Il existe des processus physiologiques ou pathologiques dans lesquels cet équilibre est modifié, comme par exemple la cicatrisation ou la rétinopathie diabétique.

Certains de ces facteurs de croissance, notamment le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *platelet-derived growth factor* (PDGF), le *transforming growth factor beta* (TGF-béta) sont stimulés au cours de nombreux développements tumoraux et pourraient avoir un rôle dans le développement des CP et dans la formation de la niche « pro-métastatique » péritonéale (26-31).

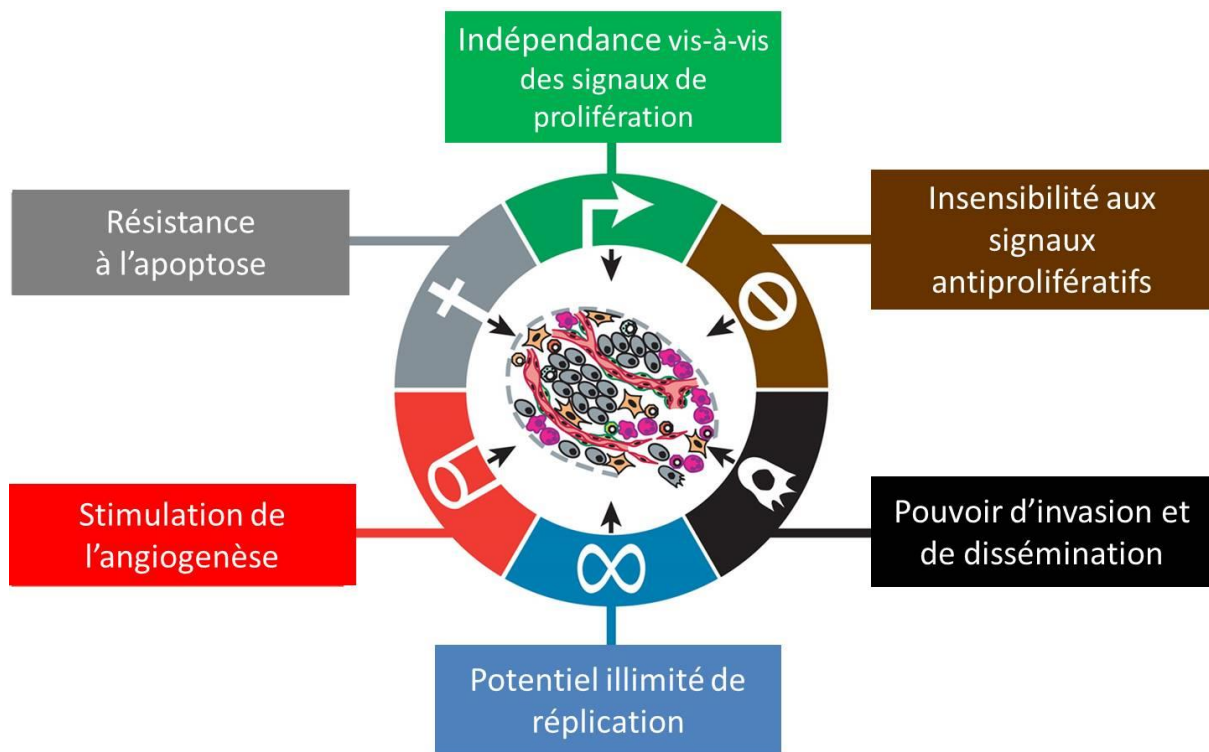
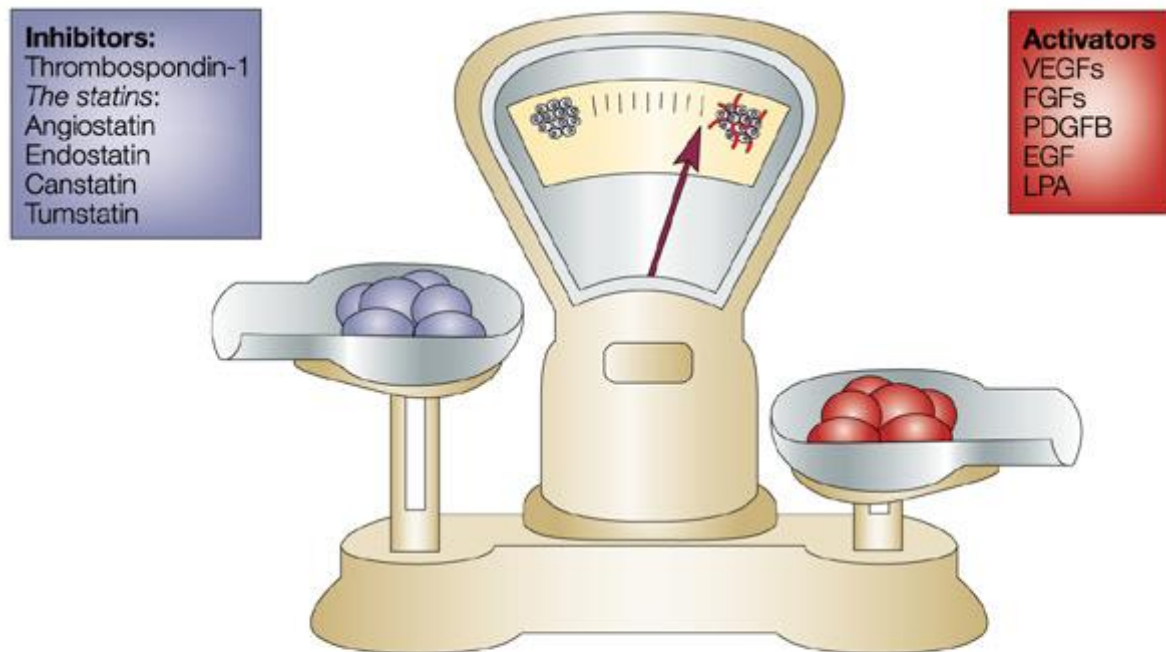


Figure 2. Mécanismes de l'oncogenèse d'après Hanahan & Weinberg (24, 25).

A la phase initiale du développement tumoral, les cellules vont s'alimenter par simple diffusion. Elles vont croître en amas jusqu'à atteindre une taille limite (environ 2 mm³) au-delà de laquelle la croissance va nécessiter le recrutement et la formation de nouveaux vaisseaux : c'est le « switch angiogénique » décrit par Folkman en 1971 (32). Cette étape de la cancérogenèse est indispensable au développement tumoral pour la tumeur primitive mais aussi pour les lésions à distance. Au cours du « switch angiogénique », la balance entre les facteurs pro et anti-angiogéniques va être déséquilibrée en faveur des molécules pro-angiogéniques (Figure 3) (33). La sécrétion de facteurs pro-angiogéniques va être favorisée par l'hypoxie tissulaire et par des modifications génétiques au sein du génome des cellules tumorales, intéressant certains proto-oncogènes clés tels qu'EGFR ou RAS (34). Ces facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés par la cellule tumorale elle-même, ou par son

microenvironnement tumoral comme cela a été démontré dans les CP d'origine ovarienne (35).



Nature Reviews | Cancer

Figure 3. Balance entre les molécules pro et anti-angiogéniques d'après Bergers et al. (34). Le dérèglement de la balance va faire basculer la cellule tumorale quiescente dans la phase angiogénique.

Dans les tumeurs solides, la phase de croissance précoce d'une tumeur primitive et son processus de dissémination métastatique sont largement dépendants de la formation de ces nouveaux vaisseaux, sans lesquels les cellules tumorales demeurent à l'état quiescent. Ces néo-vaisseaux tumoraux assurent les apports en nutriments, oxygène et facteurs de croissance indispensables à la croissance de la tumeur primitive, mais aussi à sa dissémination à distance. Le processus d'angiogenèse se fait par deux mécanismes : le bourgeonnement des vaisseaux sanguins préexistants (*sprouting*) et le recrutement et l'incorporation de cellules endothéliales aux vaisseaux en formation. Parmi les facteurs angiogéniques identifiés, le VEGF est le régulateur clé de l'angiogenèse tumorale. Cette glycoprotéine est exprimée de façon dérégulée par les cellules tumorales et va agir *via* sa fixation, active deux récepteurs VEGFR1 et

VEGFR2. L'activation de cette voie de signalisation VEGF-dépendante est un élément favorisant la migration, la survie et la prolifération des cellules endothéliales, l'induction de protéinases conduisant à un remodelage de la matrice extracellulaire, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le maintien de la survie des vaisseaux néoformés (34).

L'angiogenèse tumorale diffère de l'angiogenèse physiologique car les néo-vaisseaux tumoraux ont souvent une architecture aberrante, une perméabilité capillaire anormalement augmentée, une maturation retardée et des interactions péricyte-cellule endothéliale altérées. Alors que les vaisseaux induits par l'angiogenèse physiologique deviennent rapidement matures et stables, les néo-vaisseaux tumoraux vont avoir une forme irrégulière, et des contours tortueux. Le réseau vasculaire est anarchique est irrégulier, sans organisation structurée en veinules, artérioles et capillaires. Ce réseau est volontiers hémorragique avec une fuite capillaire élevée, car le VEGF joue aussi un rôle dans la régulation de la perméabilité capillaire (il est aussi appelé le vascular permeability factor, VPF) (36). Les cellules de soutien péri-vasculaire vont être moins denses avec des contacts plus lâches. Des cellules tumorales peuvent venir s'intégrer dans la paroi de ces néo-vaisseaux (37). Certaines tumeurs vont être capables d'envoyer des signaux pour recruter des progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse (38, 39).

1.1.2.2 Rôle des progéniteurs endothéliaux :

L'angiogenèse a longtemps été considérée comme un processus local et exclusivement assuré par le bourgeonnement des vaisseaux préexistants, résultant de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Plusieurs études ont suggéré que des précurseurs endothéliaux circulants pourraient être recrutés, à distance des processus tumoraux et participer à la néo-angiogenèse tumorale (40-42). Ces progéniteurs endothéliaux, sont sécrétés par la moelle osseuse, circulent dans le sang et seraient capables de migrer vers le site tumoral (43-45).

Lyden et al. ont démontré que ces mêmes progéniteurs pouvaient participer à la croissance tumorale, à la néo-angiogenèse tumorale, à la formation d'une « niche prométastatique » et au développement des métastases (38). Dans cette étude, les auteurs ont utilisés des souris *knock-out*, chez lesquels les gènes impliqués dans la mobilisation et l'incorporation membranaire des récepteurs au VEGF (VEGFR1 et VEGFR2) ont été

désactivés ($Id1^{+/-}Id3^{-/-}$) (38). Chez ces souris, ils ont irradié la moelle osseuse afin de détruire leurs progéniteurs endothéliaux hématopoïétiques. Quatre groupes ont été constitués, et dans chacun des groupes, ils ont greffé en intradermique des cellules tumorales de lymphomes et des cellules de carcinome pulmonaire :

- *Groupe 1* : souris irradiées ($Id1^{+/-}Id3^{-/-}$), greffées avec la moelle osseuse des souris mutantes ayant le récepteur au VEGF inactivé ($Id1^{+/-}Id3^{-/-}$).
- *Groupe 2* : souris irradiées ($Id1^{+/-}Id3^{-/-}$), greffées avec la moelle osseuse des souris sauvages ayant le récepteur au VEGF actif (WT)
- *Groupe 3* : souris irradiées ($Id1^{+/-}Id3^{-/-}$) non greffées
- *Groupe 4* : souris non mutantes (wt) irradiées, greffées avec la moelle osseuse des souris mutantes ayant le récepteur au VEGF inactivé ($Id1^{+/-}Id3^{-/-}$).

Les tumeurs n'ont pas pu se développer chez les souris témoins qui n'ont pas reçu de moelle osseuse, et déficientes en récepteur au VEGF (groupe 3). En revanche, chez les souris ayant reçu une moelle osseuse exprimant le récepteur au VEGF (groupe 2), les tumeurs ont pu se développer normalement. De plus, les auteurs ont pu mettre en évidence des cellules de la moelle osseuse greffée (WT) dans les néo-vaisseaux et le lit capillaire de la tumeur intradermique. Dans le groupe 1, les souris ont reçu une moelle osseuse issue de souris mutantes ($Id1^{+/-}Id3^{-/-}$) n'exprimant pas le récepteur au VEGF et les tumeurs ont involué. Dans le groupe 4, la tumeur a pu se développer, mais avec un retard de 3 semaines par rapport au souris du groupe 2.

Ces résultats ont été reproduits dans plusieurs études, notamment dans des modèles orthotopiques de métastases hépatiques (46, 47). Ils montrent que les cellules tumorales vont recruter des progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse, sous l'influence du VEGF, qui sont nécessaires au développement de l'angiogenèse localement. Les cellules endothéliales circulantes et les progéniteurs endothéliaux circulants pourraient donc être considérés comme de potentiels biomarqueurs de l'angiogenèse tumorale. Les études sur la valeur pronostique des progéniteurs endothéliaux circulants et des cellules endothéliales circulantes sont nombreuses dans le cancer du sein (48-50). Dans le cancer colorectal en situation métastatique, il a été rapporté une corrélation entre un taux élevé de progéniteurs endothéliaux circulants ou de cellules endothéliales circulantes et la réponse tumorale après bévacizumab ainsi qu'avec la survie globale (51-53).

1.1.2.3 Progéniteurs endothéliaux et niche pré-métastatique

Des travaux récents chez la souris ont montré que le microenvironnement du futur site métastatique pourrait être modifié à distance par la tumeur initiale (54, 55). La tumeur primitive serait donc capable d'induire une « niche pré-métastatique » en rendant le microenvironnement de l'organe cible propice et favorable au développement des métastases. Les cellules tumorales sécrètent du VEGF et des chimiokines qui vont provoquer le recrutement, l'activation, et la mobilisation de cellules progénitrices hématopoïétiques exprimant le récepteur au VEGF (VEGFR), dans la moelle osseuse. Celles-ci vont migrer vers les sites métastatiques, avant même qu'ils ne soient colonisés par les cellules tumorales, et s'incorporeraient au stroma péri-vasculaires. Elles vont alors interagir avec les cellules, notamment les fibroblastes, et la matrice extracellulaire. Cette activation locale du stroma, ainsi que l'augmentation de la perméabilité capillaire qui va en découler va provoquer la captation des cellules tumorales circulantes par la niche pro-métastatique.

1.1.2.4 Le microenvironnement tumoral

Les cellules souches mésenchymateuse (CSM) sont caractérisées par leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en tissus d'origine mésodermique (os, cartilage, graisse, tissu conjonctif). Elles participent activement à la régénération tissulaire (56). Les CSM sont recrutées par la moelle osseuse vers les tissus endommagés, ou inflammatoires qui vont produire des signaux endocriniens (57). Les tissus tumoraux sécrètent des facteurs de croissance en quantité abondante, ainsi que des cytokines et des protéines de remodelage de la matrice. L'une des hypothèses actuelles est que les CSM migrent vers le site tumoral de même que vers le site d'une blessure, pour s'incorporer au stroma tumoral (Figure 4). Toutefois, les mécanismes de cette incorporation et leur effet sur la physiologie tumorale restent mal compris. Des études ont montré que les CSM favorisaient la croissance tumorale et seraient impliqués dans l'invasion et l'angiogenèse tumorale ainsi que dans la formation des métastases (58-64). Mishra et al. ont montré que les CSM pouvaient se différencier en un type cellulaire proche des fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) lorsqu'elles étaient en contact avec un milieu tumoral et que ces cellules pouvaient promouvoir la croissance tumorale (64, 65).

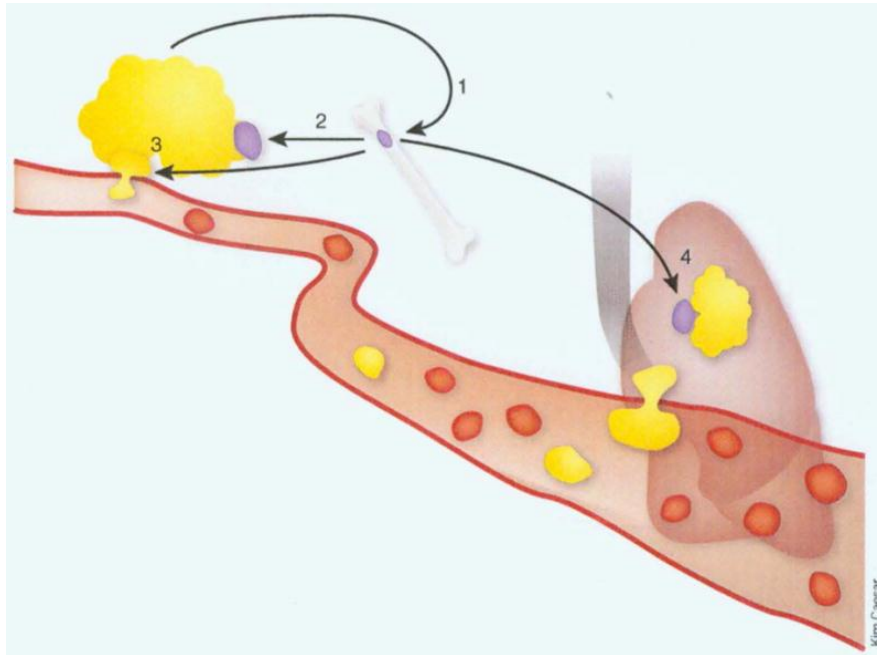


Figure 4. D'après Hurst et al., Nat Med. 2007 (66) : Les cellules souches dérivées de la moelle osseuses ont plusieurs rôles dans la régulation du processus métastatique : la mobilisation des cellules souches (cellules bleues), incluant les cellules souches mésenchymateuse et hématopoïétiques, est stimulée par les cellules tumorales (jaunes) via un mécanisme inconnu. Les cellules souches contribuent à l'angiogenèse, l'invasion locale et la formation de la « niche pro-métastatique ». Les CSM sont recrutées vers les sites où les tissus sont lésés, tel que les lésions induites par les cellules tumorales sur la matrice extracellulaire. Des populations diverses de progéniteurs peuvent potentiellement jouer un rôle complémentaire dans chaque étape de cette cascade via des signaux paracrines et juxtracrines.

L'influence du microenvironnement sur la biologie des cellules tumorales a longtemps été suspectée : la première théorie de la « graine et du sol » a été proposée par Stephen Paget en 1889 (« Seed and Soil ») (67). De l'observation que la distribution des métastases n'est pas liée au hasard, Paget pose l'hypothèse que la tumeur primitive interagit avec le site métastatique et que l'environnement doit être approprié pour que les métastases puissent s'y développer. Les cellules tumorales (les graines) ne pourraient disséminer que dans un microenvironnement compatible et favorable (le sol).

Dans le cas particulier du péritoine, Rafii et al. ont isolé une cellule stromale dans l'ascite de patientes traitées pour CP d'origine ovarienne, ayant la particularité d'exprimer des protéines de résistance multi-drogues (68). Ils ont nommé ces cellules, les *hospicells*. Ces *hospicells* ont la particularité d'interagir de façon forte avec les cellules tumorales épithéliales ovariennes, et de leur conférer une résistance aux chimiothérapies à base de sels de platine et ainsi qu'aux taxanes. L'interaction entre les deux cellules se ferait aux travers de jonctions de type gap permettant l'échange de protéines par un mécanisme appelé « trogocytose ». Grâce à ce mécanisme, la cellule tumorale pourrait donc acquérir de nouvelles fonctions, et notamment, des pompes de résistance multi-drogue leur permettant de devenir chimio-résistantes. Ces cellules pourraient donc jouer un rôle similaire à celui des cellules stellaires dans le foie, en protégeant la cellule tumorale et en participant au développement d'un terreau propice à son développement (69).

1.1.2.5 Implications cliniques

La croissance tumorale s'associe à l'expression accrue de facteurs pro-angiogéniques. Il a été ainsi montré qu'une surexpression du VEGF était trouvée dans 37 à 100% des cas des cancers colorectaux (70). Cette surexpression est corrélée à l'invasion cellulaire, à la densité vasculaire, au développement des métastases et au pronostic des malades (71, 72). L'expression du VEGF semble fréquemment corrélée aux mutations de *RAS*, aux mutations de la voie de signalisation APC-WNT, ainsi qu'à la surexpression de la cyclo-oxygénase 2, anomalies fréquemment rapportées au cours du cancer colorectal (73, 74). Une association significative entre la densité micro-vasculaire tumorale et les taux de récurrence tumorale et de survie des malades a été également rapportée (75-77).

Il a été montré dans la CP d'origine ovarienne que le taux sanguin de VEGF était corrélé à l'extension de la maladie (78). Chia et al. ont corrélé le taux de VEGF intrapéritonéal à la survie sans progression chez 97 patients consécutifs traités pour CP (79). Ils ont mesuré le VEGF circulant sanguin (T_{IV}) en préopératoire ainsi que le taux de VEGF intrapéritonéal au cours de la chirurgie. Ils ont ainsi montré que le taux de VEGF intrapéritonéal en début d'intervention (T_i) était associé à une meilleure survie globale, et que le rapport T_i / T_{IV} était associé à une meilleure survie sans progression. Ces auteurs suggèrent que les traitements néo-adjuvants incluant des anti-angiogéniques pourraient avoir un intérêt,

en particulier chez les patients à risque de résection incomplète, car ayant de trop volumineuses masses tumorales.

1.2 Prise en charge des carcinoses péritonéales

La CP a longtemps était considérée comme un site métastatique non résecable et donc un stade terminal de la maladie. Les patients étaient traités par chimiothérapie à visée palliative uniquement. Malgré l'amélioration de l'efficacité des chimiothérapies systémiques, la survie des patients traités par chimiothérapie seule reste limitée (5,2 mois) (11, 12). Le paradigme de la maladie a changé considérablement, avec l'apparition de traitements curatifs qui ont permis d'améliorer considérablement le pronostic chez certains patients. La prise en charge à visée curative inclut donc une chimiothérapie péri-opératoire adaptée à la tumeur primitive, une chirurgie de cytoréduction complète qui va retirer l'ensemble de la maladie macroscopique et une chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) dont l'objectif est de traiter les microlésions résiduelles (80).

1.2.1 La prise en charge chirurgicale

Le principe de cette technique est d'éradiquer la maladie macroscopique par cytoréduction complète. Dans un second temps, la maladie microscopique résiduelle est éradiquée par une chimiothérapie intra-péritonéale administrée soit en peropératoire, soit dans la période post-opératoire immédiate. Lorsqu'elle est administrée en peropératoire, la chimiothérapie est administrée à l'aide d'un bain chauffé à 38°C afin de favoriser l'action des drogues et leur diffusion, sans brûler les tissus sains (18). Cela va permettre d'obtenir une concentration locale en chimiothérapie bien supérieure aux traitements administrés par voie intraveineuse.

Les premières études cliniques ont montré un bénéfice sur la survie des patients en fonction de l'extension de la maladie péritonéale, et que la survie médiane pouvait dans certains cas être améliorée de 4 ans (81). Les patients ayant une CP d'origine colorectale traitée par CRS et CHIP ont vu leur survie atteindre une moyenne de 21 à 40 mois (82). Ce traitement permet de prolonger la survie des patients avec CP d'origine colorectale jusqu'à plus de 40 mois (médiane : 30 mois) (12, 83-86). Le bénéfice du traitement chirurgical est le plus important dans le cas du pseudomyxome péritonéal (PMP), carcinose mucineuse rare, pour laquelle aucun autre traitement n'a montré d'efficacité, notamment aucune

chimiothérapie. En cas de résection complète, le taux de survie à 20 ans des patients avec PMP peut atteindre 70% (87).

Dans le cas du cancer colorectal et des carcinomes ovariens, cette amélioration de la survie peut être attribuée non seulement aux améliorations des techniques chirurgicales et à l'introduction de la CHIP, mais également à l'amélioration des chimiothérapies systémiques.

1.2.2 La prise en charge médicale

Le plus souvent, la chirurgie n'est pas réalisée d'emblée mais après une chimiothérapie néo-adjuvante. Le choix des drogues va dépendre de l'histologie de la tumeur primitive. Dans le cadre de CP d'origine colorectale, les chimiothérapies sont les mêmes que celles utilisées pour les cancers colorectaux avec métastases hépatiques : on propose principalement du 5-fluorouracil (5FU) et de l'acide folinique associés à un sel de platine (tel que l'oxaliplatine, protocole FOLFOX) ou à l'irinotécan (protocole FOLFIRI) (88-92). Cette chimiothérapie néo-adjuvante a plusieurs objectifs :

- Améliorer la survie globale (93).
- Faire diminuer le volume tumoral et rendre résécable une CP inopérable d'emblée (94).
- Traiter le patient en attendant la chirurgie et évite la progression dans l'intervalle.
- Favoriser la préservation des organes.
- Tester l'efficacité de la chimiothérapie qui pourra être donnée ensuite en adjuvant (12, 13, 20-23).

Selon le profil génétique de la tumeur, certaines biothérapies peuvent être proposées en association ou plus rarement seules en traitement d'entretien (95).

Dans le cadre du cancer ovarien, la chimiothérapie néoadjuvante est devenue le traitement de référence dans les maladies découvertes à un stade avancé, en particulier en cas de CP ou chez les patientes non opérables d'emblée (96). Cette chimiothérapie est souvent associée à un traitement anti-angiogénique et permet notamment de diminuer la morbidité peri-opératoire, et de rendre le cancer résécable chez certains patients (97, 98).

1.3 Exploration d'une carcinose péritonéale

1.3.1 Explorations chirurgicale

La tomodensitométrie (TDM) abdominale avec injection sert actuellement d'examen préopératoire systématique chez ces patients pour faire le bilan péritonéal et extra-péritonéal de la maladie. Une exploration chirurgicale est parfois réalisée dans un temps différent du traitement, afin d'évaluer la résecabilité de la maladie. Pour cette exploration à visée diagnostique, la voie laparoscopique est préférée à la laparotomie du fait de sa durée plus courte, de ses complications moindres et de sa plus faible durée d'hospitalisation (99).

La laparoscopie diagnostique est utilisée afin d'améliorer la sélection préopératoire des patients : il s'agit de la seule technique qui permet de visualiser directement la surface péritonéale et la capsule hépatique. Elle permet donc de diagnostiquer de façon mini-invasive des lésions métastatiques de faible volume qui ne seraient pas visualisées par la TDM, et donc ainsi, de diminuer le nombre de laparotomies inutiles (100). Elle reste la méthode la plus fiable pour le bilan préopératoire de la maladie. Plusieurs systèmes de score ont été développés pour quantifier la maladie.

- L'index de carcinose péritonéal (ICP) proposé par Sugarbaker (101).
- Le N score de Verwall (102)
- La classification de Gilly (103)
- Le P score (104)

D'autres scores et modèles existent, tels que le score de Fagotti (105). Toutefois, ce dernier est un score de prédiction de la résecabilité plutôt qu'un score de quantification topographique, et a été développé et validé uniquement pour la CP d'origine ovarienne.

L'ICP de Sugarbaker (101) est le plus répandu parmi les centres de référence prenant en charge des CP. L'abdomen est divisé en 9 régions et l'intestin grêle en 4 segments (Figure 5). La taille de la masse tumorale est évaluée dans chaque région avec une échelle semi-quantitative allant de 0 à 3 (0 : pas de tumeur ; 1 tumeur de moins de 0,5 cm; 2 : tumeur mesurant entre 0.5 et 5 cm; 3 : tumeur mesurant plus de 5 cm). Le score varie donc de 0 à 39. Dans son analyse, Sugarbaker montre que les patients ayant un ICP < 20/39 ont un pronostic amélioré par le traitement chirurgical du fait de la possibilité de résection complète (101).

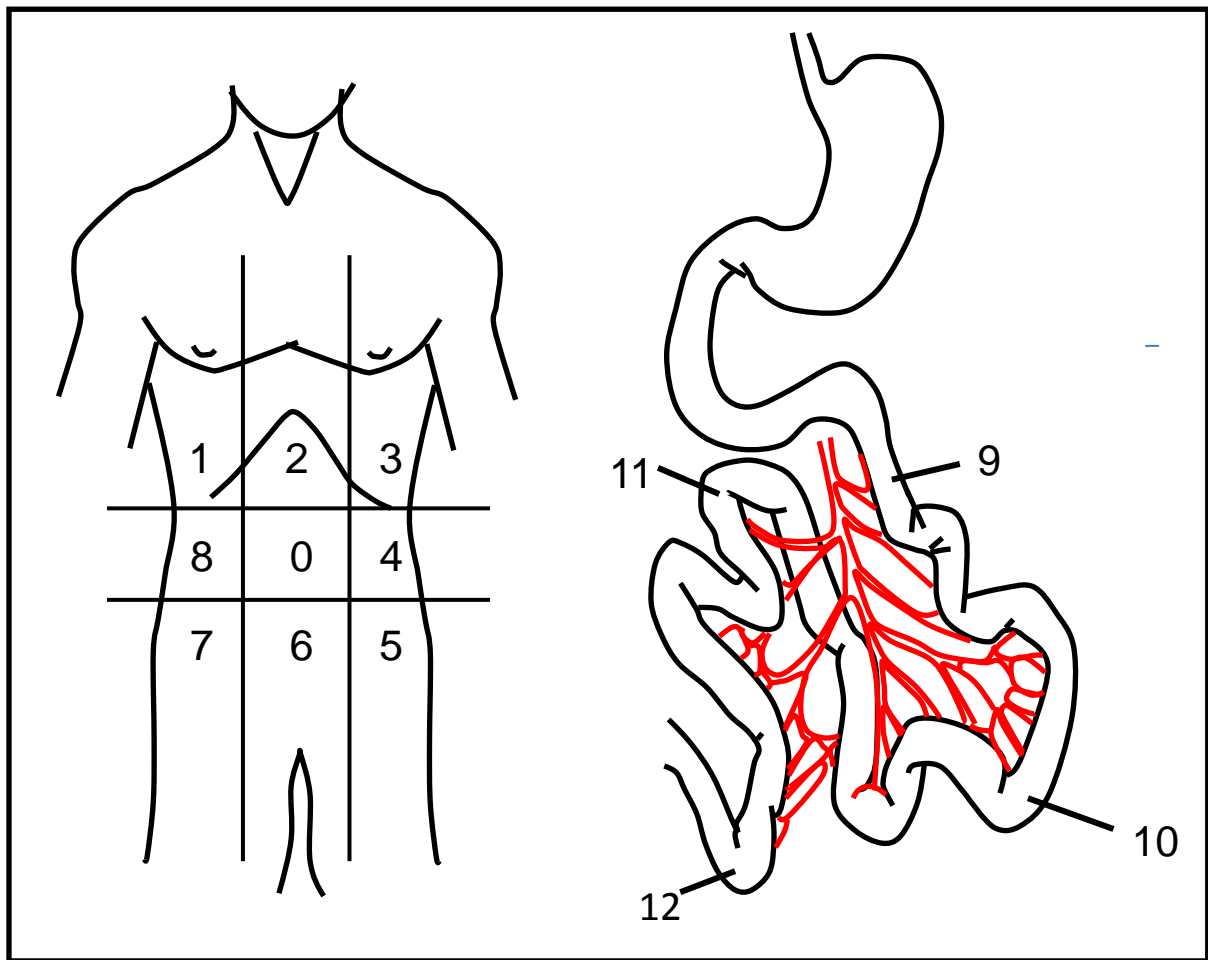


Figure 5. Les différentes régions de l'abdomen et de l'intestin grêle :

0. Centrale : grand omentum, colon transverse
1. Supérieur droit : surface supérieure du lobe droit hépatique, surface péritonéale du diaphragme droit, espace rétro-hépatique droit.
2. Epigastre : graisse épigastrique, lobe gauche du foie, petit omentum, ligament falciforme.
3. Supérieur gauche : surface péritonéale du diaphragme gauche, rate, queue du pancréas, surface antérieure et postérieurs de l'estomac.
4. Flanc gauche : colon descendant, gouttière pariéto-colique gauche
5. Inférieur gauche : parois latérale gauche du pelvis et colon sigmoïde.
6. Pelvis: organes génitaux féminins (ovaires, trompes, utérus), cul-de-sac de Douglas, jonction recto-sigmoïdienne.
7. Inférieur droit : paroi latérale droite du pelvis, caecum et appendice
8. Flanc droit : colon ascendant, gouttière pariéto-colique droite
9. Jéjunum supérieur : intestin grêle et son mésentère
10. Jéjunum inférieur : intestin grêle et son mésentère
11. Iléon supérieur : intestin grêle et son mésentère
12. Iléon inférieur : intestin grêle et son mésentère

En fin d'intervention, l'exérèse est classée comme étant complète ou incomplète selon un score :

- CC0 : absence de résidu tumoral macroscopique

- CC1 : résidu tumoral $\leq 0,25$ cm
- CC2 : résidu tumoral $0,25 < R < 2,5$ cm
- CC3 : résidu tumoral $\geq 2,5$ cm.

1.3.2 Exploration non invasive préopératoire

L'objectif de l'exploration préopératoire est double : elle doit fournir au chirurgien et l'ensemble de l'équipe de concertation multidisciplinaire une évaluation à la fois quantitative et qualitative de la maladie. Elle doit fournir à la fois une cartographie précise des lésions avec une évaluation quantitative ou plutôt semi-quantitative de leur taille, ainsi que des critères permettant d'évaluer la résecabilité de ces lésions. Cela va permettre une sélection optimale des patients candidats au traitement chirurgical. En effet, celui-ci est lourd, et non dénué de complications. Si la cytoréduction complète ne peut être obtenue, la survenue de complications va aggraver le pronostic du patient (22). Il faut donc réserver le traitement aux patients qui vont le plus en bénéficier, c'est-à-dire ceux chez qui la résection complète est possible.

1.3.3 Les techniques d'évaluation « classiques » d'une carcinose péritonéale.

	Irradiation	Disponibilité	Rapidité	Cout	Acquisition
TDM	++	+++	+++	€	Très standardisée
IRM	-	++	++	€€	Variabilité importante. Doit être réalisée en centre expert
TEP-TDM	+++	+	+	€€€	Très standardisée
TEP-IRM	+	-	-	€€€€	Variabilité importante. Doit être réalisée en centre expert

1.3.3.1 La tomодensitométrie (TDM)

La TDM reste l'examen indispensable à tout bilan en cancérologie et en particulier dans la CP (106). L'acquisition est rapide, très standardisée, l'examen est peu coûteux, facilement disponible, très performant y compris en dehors de centres spécialisés. Bien qu'irradiant, cette problématique passe au second plan devant patient ayant un cancer et en particulier une CP. La TDM permet à l'heure actuelle d'acquérir des images ayant une très haute résolution spatiale et des coupes très fines, permettant de faire des reconstructions dans tous les plans de l'espace sur une console standard. L'un de ses défauts est sa relativement faible résolution en contraste, en particulier dans les tissus mous et les parenchymes et c'est pour cela que l'administration intraveineuse de produit de contraste est indispensable pour toute évaluation cancérologique et en particulier pour évaluer le tube digestif, le péritoine et les organes pleins tels que le foie.

Les performances de la TDM rapportées dans la littérature pour la détection de la CP varient de 25% à 96% (107-111). De nombreuses évolutions technologiques ont eu lieu au cours des dernières années, permettant d'augmenter de façon considérable la résolution spatiale ce qui explique que les performances augmentent au cours du temps. Toutefois, la plupart des études soulignent que les performances de la TDM ne sont pas suffisantes pour affirmer définitivement l'absence de maladie ou de récurrence, ou bien l'irrésécabilité de la maladie. Les faux positifs dépendent principalement de la taille des lésions et de leur localisation. Main et al. ont rapporté une sensibilité de 43% pour les lésions de moins de 5 mm, de 100% pour les lésions de plus de 5 cm, et de 87% pour les lésions de taille intermédiaire (112). Ces auteurs ont aussi montré que la sensibilité était élevée dans certaines régions telles que la partie antérieure de l'abdomen (100%), la surface hépatique (100%) et plus faible pour la surface splénique (67%), dans le petit omentum (40%) ou sur la paroi de l'intestin grêle (58%) (112). La spécificité de la TDM était particulièrement élevée dans l'ensemble des régions excepté le mésentère. Les résultats de cette étude ne peuvent toutefois pas être généralisés, car il s'agit d'une étude rétrospective chez 18 patients. Les performances élevées, notamment à la surface du foie ne correspondent pas à ce qui est retrouvé en pratique courante et dans les autres études, cette région restant difficile à analyser (107). Par ailleurs, la distinction entre une petite lésion de CP faisant *scalopping* sur le foie ou d'une lésion sous capsulaire peut parfois être un vrai challenge pour le radiologue, alors que cette distinction peut modifier considérablement la stratégie médicale et chirurgicale, en particulier lorsqu'il s'agit de la seule lésion ou d'une suspicion de récurrence. En effet, le traitement et le pronostic

d'une récurrence péritonéale est très différent de celui d'une lésion hépatique sous capsulaire unique.

Enfin la TDM permet de faire le bilan extra-péritonéal. Il s'agit du meilleur examen pour détecter les nodules pulmonaires, y compris en l'absence d'injection du fait de sa très haute résolution spatiale. Concernant le bilan hépatique, les performances de la TDM restent bonnes, mais l'IRM lui est supérieure, et doit être réalisée au moindre doute (113).

1.3.3.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

La place de l'IRM dans l'exploration de l'abdomen supérieur (foie, reins, surrénales) est largement établie. Elle est aussi la pierre angulaire de l'exploration du pelvis, notamment dans les pathologies gynécologiques, urogénitales et dans le bilan du cancer du rectum (114, 115). Toutefois, sa place dans le bilan de la CP n'a jamais été réellement validée : les études publiées incluent le plus souvent de petits effectifs et leurs résultats en terme de performances sont inconstants.

Comparativement à la TDM, l'examen d'IRM est plus cher, moins facilement disponible et le temps d'acquisition est plus long. Mais sa principale limite est probablement le manque de standardisation de la technique d'acquisition et des séquences. L'étude du péritoine en IRM est difficile à plus d'un titre. Malgré les améliorations techniques constantes, la résolution spatiale de l'IRM reste significativement inférieure à celle de la TDM. Les facteurs influençant la détectabilité d'une lésion étant sa taille, et le contraste avec les tissus autour, l'IRM va bénéficier de son importante résolution en contraste : cette résolution est très élevée pour les tumeurs à fort contenu hydrique (telles que les tumeurs mucineuses), ainsi que pour les tumeurs à forte densité en cellules tumorales qui vont rehausser le contraste de façon intense, et dans lesquelles la diffusion libre des molécules d'eau va être restreinte..

Du fait de sa très haute résolution spatiale et de ses performances élevée dans la détection des lésions extra-péritonéales, la tomodensitométrie reste l'examen de première ligne dans le bilan d'une CP (106). Dans notre expérience, l'interprétation de l'IRM doit être conjointe à celle de la TDM. Cela permet de combiner la haute résolution en contraste de l'IRM et la haute résolution spatiale de la TDM. Dans un des articles présentés en annexe, nous avons ainsi montré que la combinaison de la TDM et de l'IRM permettait d'améliorer l'estimation de l'ICP par rapport à la TDM seule, pour des lecteurs experts. Nous avons aussi

montré que la valeur ajoutée de l'IRM était la plus élevée dans la région centrale (région 0), le pelvis (région 6), et le quadrant supérieure gauche (région 3).

Certains auteurs ont montré une excellente sensibilité de l'IRM pour la détection des implants de CP : dans une étude évaluant les performances de l'IRM avec séquence de diffusion et administration intraveineuse de chélates de gadolinium, Low et al. ont rapporté une sensibilité par région de 88% et une spécificité de 74% chez 33 patients (116). Toutefois, la principale limite de cette étude, hormis le faible effectif, était que 25/33 patients traités avaient un carcinome mucineux de type PMP. Hors, pour les tumeurs mucineuses, la très forte concentration moléculaire d'eau permet d'avoir un excellent contraste en IRM, et toutes les études rapportent d'excellentes performances dans ce cas particulier (117, 118). Dans une étude plus récente comparant les performances de la TDM à l'IRM, Low et al. ont rapporté une supériorité significative de l'IRM sur la TDM (116). Après avoir classé 22 patients en 3 catégories (ICP=0-9 ; 10-20 ; et 20-39), 20 patients étaient classés dans la bonne catégorie par l'IRM (91%) et seulement 11 patients (50%) par la TDM. Ils rapportaient aussi une sensibilité et une spécificité par région anatomique de 95% et 70% pour l'IRM contre 55% et 86% pour la TDM. Toutefois, cette étude présente la même limite majeure que la précédente de cette équipe : 17/22 patients ont été traités pour une tumeur de l'appendice, et probablement des PMP pour lequel les performances de l'IRM sont excellentes.

D'autres études n'ont pas montré de supériorité ni de valeur ajoutée à l'IRM par rapport à la TDM. Ainsi, Torkzad et al. ont comparé les l'IRM et la TDM chez 39 patients pour catégoriser les patients en 2 catégories : ICP faible (0-19) ou élevé (20-39) en comparant les performances d'un lecteur senior et d'un lecteur junior (119). L'IRM et la TDM étaient équivalentes pour le lecteur sénior alors que le lecteur junior était plus performant avec la TDM qu'avec l'IRM. Dans notre expérience, l'interprétation et la réalisation d'un IRM du péritoine nécessite un lecteur expérimenté, ce qui est moins prépondérant pour la TDM. Toutefois, les résultats de l'étude de Torkzad et al. sont à interpréter avec précaution en raison d'une méthodologie perfectible (catégorisation en seulement 2 groupes) et de critères d'inclusion inhabituels : 8/39 patients avec un PMP, 1/39 un cancer de l'ovaire, 3/39 un cancer colorectal, et 26/39 patients avaient une CP d'origine indéterminée.

Dans le cas des tumeurs mucineuses et des PMP, les performances de l'IRM sont excellentes, et il s'agit du seul cas où l'on pourrait éventuellement se passer de TDM. Les implants de CP, y compris ceux de petite taille, vont être en hyper signal sur les séquences en pondération T2 du fait de la haute concentration en molécules d'eau au sein de la mucine. Low et al. ont rapporté une sensibilité et une spécificité par région de 87% et 89% chez 22

patients avec PMP explorés en IRM (118). Par ailleurs, ils rapportaient une corrélation entre le degré de rehaussement 5 minutes après administration de gadolinium et le grade de la tumeur, mais ces données n'ont jamais été confirmées par d'autres études. Dans une étude plus récente chez 82 patients, dont 73 ayant eu une IRM, Menassel et al. ont montré que l'IRM pouvait prédire la non résecabilité du PMP; ils rapportaient une sensibilité et une spécificité de 67% et 100% pour évaluer l'atteinte du pédicule hépatique et de 88% et 100% pour évaluer l'engainement du mésentère (117).

1.3.3.3 La tomographie par émission de positron (TEP)-TDM

La tomographie par émission de positrons couplée à la tomodynamométrie (TEP-TDM) fournit une information à la fois anatomique et fonctionnelle. En particulier, l'information fonctionnelle semble avoir une valeur pronostique dans certains cancers (120-122). Concernant la CP, peu d'études existent à ce jour. La TEP-TDM permet de mesurer l'avidité des cellules pour le glucose, en utilisant comme traceur le 18-fluoro-désoxyglucose (¹⁸FDG), un glucose radioactif émetteur de positrons. La TEP-TDM mesure donc l'activité métabolique des cellules tumorales qui vont avoir une surconsommation de glucose. La principale limite de cette technique est la faible résolution spatiale de la TEP. C'est pourquoi elle est couplée à une TDM basse dose qui va permettre de réaliser des images de fusions et de localiser précisément les hyperfixations. Toutefois, la masse critique tumorale pour obtenir une fixation significative dépend des types tumoraux, de leur activité et du volume tumoral : ainsi, les micronodules pulmonaires, même malins, peuvent ne pas avoir d'hyperfixation, surtout lorsqu'ils mesurent moins de 5 mm. Dans le cadre de la CP, les petites infiltrations nodulaires où la masse tumorale est faible ne vont donc pas avoir d'hyperfixation en raison de ce défaut de résolution. Par ailleurs, les tumeurs à faible contingent cellulaire, notamment celles à dominante mucineuse telles que le PMP n'ont typiquement pas d'hyperfixation.

Les études publiées rapportent des performances de la TEP-TDM seule, inférieures à celles de la TDM, mais une amélioration globale des performances lorsque l'on combine les deux examens, en terme de corrélation à l'ICP (123). Toutefois, cette dernière étude n'a inclus que 22 patients rétrospectivement. Soussan et al. ont rapporté de bonnes performances de la TEP-TDM, mais en utilisant un standard de référence imparfait (seuls 18/30 patients ont eu une exploration chirurgicale de la cavité abdominale) et en divisant l'abdomen en 3 régions uniquement (124). Une méta-analyse récente a montré une sensibilité de 84% et une

spécificité de 98% (125). Toutefois, il s'agit de résultats par patient et non pas région péritonéale. Le TEP-TDM pourrait aussi être utile pour choisir le site d'une potentielle biopsie, car il va montrer les sites ayant la plus forte activité métabolique et donc le plus de cellules tumorales actives.

Certaines études ont rapporté une valeur ajoutée pour certains nodules accolés au tube digestif, qui, même s'ils sont visibles à la TDM ou en IRM, sont manqués en première lecture et considérés comme des structures normales. Ces cas de faux négatifs peuvent être limités si la TDM et l'IRM réalisées dans le cadre d'un bilan préopératoire de CP sont relues dans le centre expert par des radiologues spécialisés. Par ailleurs, la valeur ajoutée de la TEP-TDM dans le bilan préopératoire de la maladie extra-abdominale reste à évaluer dans de larges essais multicentriques.

Une étude récente a montré que le TEP-TDM avait une valeur pronostique dans le PMP et que les patients ayant le SUV le plus élevé étaient les plus à risque de récurrence et de résection incomplète (126). Ces résultats restent à être validés dans d'autres études. L'utilisation de la TEP-TDM dans le PMP reste du domaine de la recherche, et est réalisée uniquement dans les centres experts.

1.3.3.4 La TEP-IRM

Il s'agit de la plus récente des techniques d'imagerie, née de la fusion de deux techniques déjà utilisées : l'IRM et la TEP. Le traceur utilisé en pratique clinique reste très majoritairement le ^{18}F FDG. La TEP apporte donc l'information fonctionnelle sur l'avidité de la tumeur pour le glucose et va être fusionnée à l'IRM qui va apporter l'information anatomique, mais aussi des informations fonctionnelles (intensité du rehaussement, restriction de la diffusion...) (127). Les avantages sont donc la diminution de l'irradiation, la possibilité d'obtenir deux types d'imageries fonctionnelles simultanément et la possibilité d'avoir un meilleur contraste des tissus mous dans certaines zones difficiles en TDM telles que le pelvis, ou la région cervicale. Toutefois, les limites de cette technique restent importantes : très faible disponibilité à l'heure actuelle, coût élevé, temps d'acquisition encore plus long qu'une TEP-TDM. De plus, l'intérêt de réaliser les deux examens simultanément plutôt que de façon distincte reste incertain. La réalisation d'images de fusion grâce au recalage précis des images est un argument souvent mis en avant mais peu évalué à l'heure actuelle. La faible résolution spatiale de la TEP rend l'utilisation d'une technique ayant une forte résolution spatiale

obligatoire et la TDM remplit parfaitement cette fonction avec une rapidité d'acquisition et une simplicité qui restent inégalées. De plus l'utilisation de l'IRM à la place de la TDM induit des difficultés pour calculer la correction de l'atténuation des rayons X, et donc semble altérer les valeur de standard uptake value (SUV) qui est moins fiable qu'en TEP-TDM sur les machines actuelles (128). L'acquisition IRM comprend généralement une acquisition corps entier (avec des séquences types T2 single-shot et T1 écho de gradient sans injection) puis un examen IRM spécifique sur les régions concernées. Probablement que l'intérêt de cette technique sera l'utilisation des paramètres fonctionnels pour évaluer la réponse aux traitements, voire la prédire. Toutefois, concernant le bilan anatomique préopératoire, la TEP-IRM ne permet pas de le faire de façon très précise.

1.3.3.5 Evaluation de la réponse à la chimiothérapie

L'évaluation de la réponse tumorale aux traitements anticancéreux est actuellement basée sur les critères morphologiques RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor) (129). Ces critères sont reproductibles et adaptés à la réponse tumorale aux drogues cytotoxiques. Ce sont des critères uniquement morphologiques, évaluant l'évolution de la taille des lésions ainsi que l'apparition de nouvelles lésions. Le développement de nouvelles biothérapies, ciblant les mécanismes de l'oncogenèse (telles que les anti-angiogéniques) a rendu l'évaluation de la réponse plus difficile. En effet, sous biothérapie, il va se produire des changements structurels des lésions, ainsi que dans leur vascularisation, avec un effet sur la taille qui va être retardé voire inexistant.

Les critères RECIST n'ont jamais été validés dans la CP. En pratique clinique, il est difficile de définir des lésions cibles, surtout quand il s'agit d'une infiltration épiploïque ou d'infiltrations mal définies, et les valeurs seuils définissant la réponse ou la progression ne sont pas claires (130). On utilise le plus souvent une évaluation visuelle semi-quantitative, totalement non standardisée. De plus, l'absence de lésion visible, ne signifie pas l'absence de maladie, en particulier dans le cas de la CP d'origine ovarienne. Chez ces patientes, le suivi et la détection de la récurrence se fonde le plus souvent sur la clinique, le suivi des marqueurs tumoraux biologiques (CA125). En cas de récurrence, l'augmentation du taux sérique d'un marqueur précède souvent l'apparition de lésions visibles en imagerie. Le recours à la cœlioscopie diagnostique reste fréquent (20-22). L'utilisation de nouveaux paramètres

fonctionnels (restriction de la diffusion, densité tomodynamométrique ou analyse d'histogramme) pourraient avoir une place importante dans cette évaluation à l'avenir.

1.3.3.6 Le compte-rendu

La transmission des informations entre les différents spécialistes prenant en charge les patients atteints de CP reste difficile. La corrélation des images préopératoires, avec les constatations peropératoires et les résultats anatomopathologiques nécessite l'utilisation de comptes rendus rigoureux, fournissant une cartographie complète des régions atteintes. Une évaluation radiologique de l'ICP peut être proposée mais interprétée en connaissance des limites des différents examens d'imagerie. Récemment, un outil de compte rendu standardisé gratuit et en ligne a été proposé par le réseau national de prise en charge des CP français (RENAPE et BIG-RENAPE) (131). Cette application permet de quantifier l'extension de la maladie région par région, ainsi que de rapporter les signes associés : elle est adaptée à la fois pour le radiologue, le chirurgien et le pathologiste. La principale limite reste le temps nécessaire à la réalisation de ce type de compte rendu standardisé.

1.4 Imagerie fonctionnelle : principe, techniques et applications

Le principal objectif des différentes techniques d'imagerie fonctionnelle est de fournir une information quantitative ou semi-quantitative sur la fonction des cellules tumorales, qu'il s'agisse de leur croissance, leur consommation en glucose, leur macro- ou leur microcirculation (132). L'une des principales pistes à l'heure actuelle, et le développement d'outils de quantification de l'angiogenèse tumorale, permettant le suivi de la réponse tumorale aux traitements anti-angiogéniques de plus en plus nombreux. Le développement de ces techniques de quantification de l'agressivité tumorale pourrait permettre de prédire de façon précoce la sensibilité tumorale au traitement ou l'absence de réponse, permettant ainsi de proposer une stratégie personnalisée de façon précoce, et d'épargner aux patients de potentiels effets indésirables de ces nouveaux traitements coûteux.

Les techniques d'imagerie non invasives à visée fonctionnelle disponibles sont :

- *L'échographie* : soit par effet Doppler, qui permet de quantifier les flux dans les gros vaisseaux, soit après administration intraveineuse dynamique de produit de contraste ultrasonore, qui va permettre de quantifier la perfusion directement au sein d'une lésion tumorale.
- *La TDM de perfusion* : elle permet de visualiser la cinétique d'un produit de contraste intraveineux dans une lésion cible. Soit on réalise un nombre faible d'acquisitions (artérielle, veineuse et tardive) pour avoir une évaluation semi-quantitative de la cinétique de rehaussement, soit on réalise une acquisition rapide et continue sur la lésion cible, ce qui va permettre d'échantillonner précisément la cinétique de la courbe de rehaussement au sein de la lésion cible et d'extraire des paramètres quantitatifs tels que le débit de perfusion, le volume sanguin tumoral, le temps de transit du produit de contraste, le temps mis pour atteindre le pic d'intensité maximale de rehaussement et la perméabilité capillaire au niveau de la zone d'analyse retenue (133).
- *L'IRM de perfusion* : cette technique est très proche de la TDM de perfusion, mais ne souffre pas de la problématique de l'irradiation. Dans le cadre de l'imagerie abdominale, pour réaliser une évaluation quantitative, on va utiliser des séquences en pondération T1, répétées pendant l'administration intraveineuse de chélates de gadolinium. Le principe est

donc similaire à la TDM, mais la durée d'acquisition des séquences T1 en IRM abdominale ne permet généralement pas d'obtenir une résolution temporelle suffisante pour échantillonner précisément la cinétique de rehaussement. Certains paramètres tels que la perfusion tumorale vont donc difficilement être évalués précisément par cette technique. De plus, contrairement à la TDM où l'atténuation des rayons X est proportionnelle à la concentration en produit de contraste, le signal en IRM est liés de façon non linéaire à la concentration en contraste, ce qui va nécessiter un post-traitement plus compliqué, et une acquisition initiale avec plusieurs angles de bascule différents, ou plusieurs temps de répétition (TR) différents pour quantifier la valeur du T1 dans le tissu cible, avant l'administration d'une quantité précise de produit de contraste.

- *L'IRM de diffusion* : permet de mesurer les mouvements browniens de l'eau dans un tissu : ces mouvements seraient corrélés au degré de cellularité, de nécrose et de fibrose en particulier dans les tissus tumoraux (134-137).
- *La Tomographie par Emission de Positrons couplée à la TDM (TEP-TDM)* : elle permet d'évaluer la consommation de glucose par les cellules tumorales et à déjà montré des résultats très encourageants dans l'évaluation précoce de la réponse métabolique dans de nombreux cancers, en particulier gynécologiques (138-145).
- *L'analyse computationnelle de texture* : il s'agit d'une technique récente de post-traitement qui permet de quantifier de la distribution de l'intensité des différents pixels de l'image par analyse statistique de l'histogramme d'une région d'intérêt, et donc de donner une mesure de l'hétérogénéité des tumeurs. Elle peut être appliquée sur n'importe quelle image acquise quelle que soit la modalité (TDM, IRM, TEP) (146-148).

1.4.1 Échographie Doppler

L'échographie Doppler est probablement la première des techniques d'imagerie fonctionnelle. L'utilisation de l'effet Doppler va permettre de quantifier les vitesses circulatoires (V) dans les gros vaisseaux sanguins. Le débit volumique (Q) étant lié à la surface de l'artère (S) par la relation : $Q_v = S.V$, la mesure de la vitesse moyenne et du diamètre de l'artère va permettre d'en calculer un débit moyen.

Le Doppler pulsé est une technique particulièrement rependue en recherche animale : elle est peu coûteuse, non invasive, et rapide (149-156). De nombreuses études ont évalué l'échographie Doppler comme technique de suivi de la vascularisation tumorale dans des

modèles animaux. En raison des difficultés techniques pour mesurer le diamètre de l'artère chez la souris, le biomarqueur utilisé est le plus souvent la vitesse au sein de l'artère. En effet, le développement du lit vasculaire tumoral grâce à la néo-angiogenèse et l'augmentation du volume tumoral vont s'accompagner d'une augmentation du débit sanguin vers son territoire, et donc d'une accélération du flux et d'une augmentation de diamètre de l'artère afférente. Ainsi, dans des modèles de carcinome hépatocellulaire multifocal, il a été démontré que la vitesse des flux sanguins enregistrés dans le tronc cœliaque était corrélée au développement de la tumeur hépatique. Par ailleurs, ces flux diminuent sous traitement anti-angiogénique, avec une augmentation de la « survie » des souris traitées et un ralentissement de la croissance tumorale (154, 155, 157). L'échographie Doppler est donc un outil de quantifications de la macro-circulation, qui peut être appliqué aux vaisseaux nourriciers principaux d'une tumeur (tels que l'artère hépatique pour un carcinome hépatocellulaire, l'artère mésentérique supérieure pour une CP).

Toutefois, l'échographie Doppler n'apporte pas d'information directe sur l'architecture ou la circulation intra-tumorale. De plus, les flux vasculaires peuvent être influencés par de nombreux facteurs, notamment l'alimentation en ce qui concerne les vaisseaux digestifs, ce qui explique que ces mesures, si elles sont effectuées chez l'être humain, doivent être réalisées à jeun. Enfin, les difficultés techniques inhérentes à chaque patient, et le caractère opérateur dépendant de la technique en ont freiné le développement pour les applications cliniques humaines.

1.4.2 Échographie de contraste

L'échographie dynamique de contraste (DCE-US) est une technique utilisant l'échographie en mode B pour évaluer la perfusion tissulaire en utilisant un agent de contraste intraveineux et un modèle mathématique de post traitement des images.

Les agents de contraste actuellement utilisés sont les microbulles et le plus largement répandu est le SonoVueTM, (Bracco SpA Milan, Italie). Il est composé d'hexafluorure de soufre (SF₆) encapsulé dans une mono paroi de phospholipides élastique. Le diamètre de ces microbulles varie de 1 à 12 µm avec un diamètre moyen de 2.5 µm. Elles ont donc à peu près la taille des globules rouges. Celles-ci sont stables durant plusieurs minutes dans la circulation et ont une distribution uniquement intravasculaire, sans diffusion interstitielle.

L'imagerie harmonique en mode B va faire entrer les microbulles en résonance à la fréquence double de la fréquence de transmission (158). La réponse harmonique des microbulles va permettre de les visualiser et éventuellement de les quantifier au prix d'une détérioration de l'image 2D (159).

Elle a l'avantage d'être facilement accessible, non irradiante et elle va permettre de quantifier uniquement la perfusion intra-tumorale en utilisant un logiciel de post traitement (160-162). En effet, les microbulles ont une distribution uniquement intravasculaire et ne peuvent donc pas apporter d'information sur la perméabilité capillaire ou le volume interstitiel.

1.4.3 Imagerie de perfusion: TDM et IRM

Ces techniques d'imagerie fonctionnelle vont permettre de quantifier des paramètres de microcirculation. L'acquisition d'images va être réalisée continu au cours de l'injection intraveineuse d'un bolus de produit de contraste. L'objectif va être d'échantillonner de façon précise la cinétique de rehaussement du produit de contraste, par une acquisition séquentielle rapide, afin de modéliser cette courbe à l'aide d'une équation et d'en extraire des paramètres fonctionnels. En fonction de la rapidité d'acquisition, et donc de la résolution temporelle de la technique, cet échantillonnage sera plus ou moins précis.

Les techniques d'imagerie de perfusion permettent d'évaluer la perméabilité des micro-vaisseaux tumoraux, la perfusion tissulaire, le volume sanguin tumoral ainsi que la fuite capillaire dans l'espace interstitiel. Ces paramètres sont extraits de l'analyse de la cinétique de rehaussement d'un agent de contraste dans un tissu d'intérêt ainsi que dans son artère afférente (Arterial Input Function, AIF) après modélisation du rehaussement tissulaire à l'aide d'un modèle le plus souvent compartimental (Figure 6) (163).

Plusieurs modèles compartimentaux ont été décrits, mais le choix du modèle à appliquer va dépendre de la qualité de l'échantillonnage des données acquises et en particulier de la résolution temporelle (163-167). L'échantillonnage de la phase dite de « premier passage », reflétant la perfusion tissulaire et le volume sanguin, nécessite d'avoir une artère afférente dans le champ de vu, pour pouvoir mesurer l'AIF, et surtout, d'avoir une excellente résolution temporelle, inférieure au temps de transit moyen du produit de contraste qui est le plus souvent de l'ordre de 2 secondes (168). Lorsque cela n'est pas possible, on utilise des modèles plus simples qui ne vont permettre d'estimer que la perméabilité membranaire

(K_{trans}) et le volume interstitiel (V_e) (167, 169). De plus, si l'AIF ne peut être mesurée, car l'artère afférente ne peut être imagée en même temps que le tissu d'intérêt, certains auteurs ont proposé de calculer une AIF théorique, mais dont les résultats sont à interpréter avec précaution (170, 171).

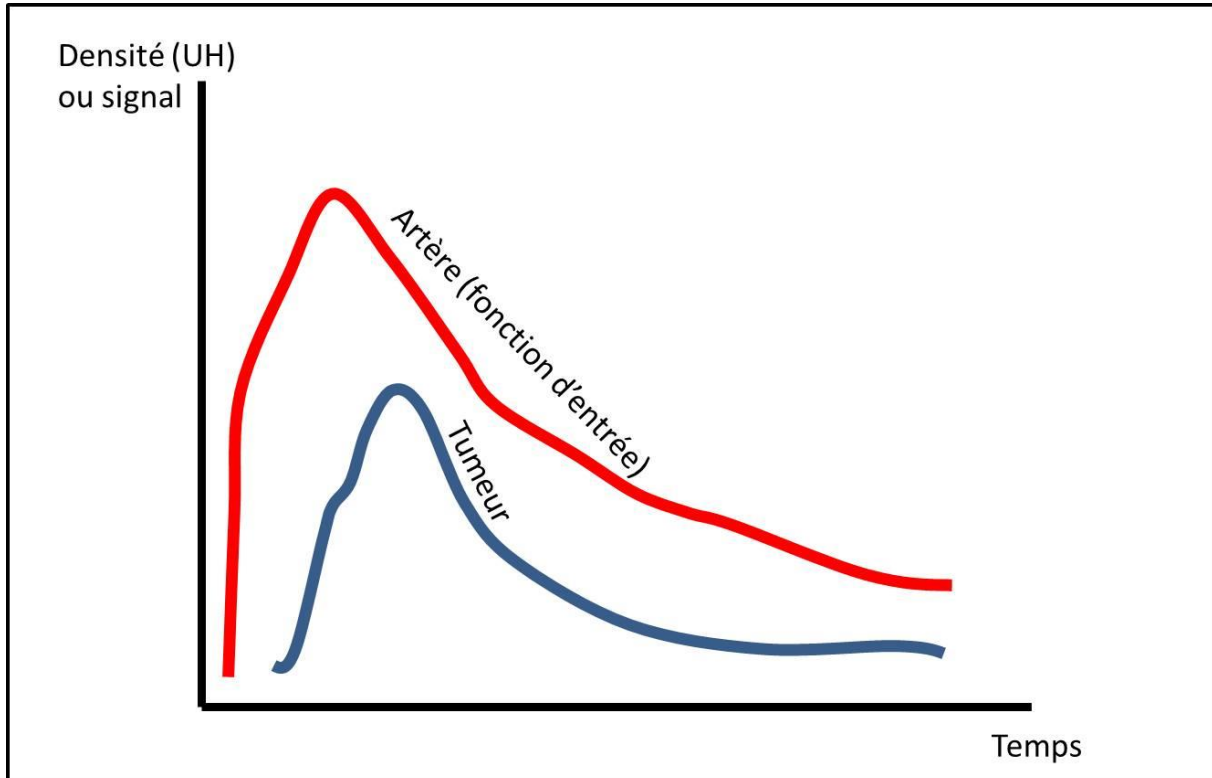


Figure 6. Acquisition de la cinétique de rehaussement dans l'artère afférente (fonction d'entrée ou arterial input function) ainsi que dans le tissu tumoral d'intérêt. La courbe de rehaussement peut être modélisée selon un modèle compartimental (modèle de Toft le plus souvent utilisé, mais le modèle est à adapter en fonction de la qualité de l'échantillonnage) (172).

La cinétique de rehaussement d'un tissu peut être modélisée pour en extraire les paramètres suivant au niveau de chaque voxel :

1. La perfusion ou fonction d'entrée (Arterial Input Function ou AIF)
2. La perméabilité (ou fuite) capillaire (K_{trans})
3. Le volume interstitiel (la fraction extracellulaire de produit de contraste : V_e)
4. Le K_{ep} : rapport K_{trans}/V_e .
5. Le temps de transit moyen
6. Le temps au pic de rehaussement

Les modèles circulatoires ont pour but de modéliser la distribution des agents de contraste dans les tissus à partir du rehaussement tissulaire mesuré. En fonction du modèle utilisé, on va considérer que le tissu se subdivise en n compartiments dans lesquels l'agent de contraste va diffuser au travers des membranes cellulaires et des caractéristiques physiologiques de biodistribution.

Un compartiment est un ensemble homogène de molécules sur le plan cinétique. Dans les modèles compartimentaux, il y a des échanges ou transferts entre les compartiments. Les échanges entre compartiments sont symbolisées par des constantes de transfert notées K .

1.4.3.1 Les compartiments

Pour utiliser un modèle compartimental, les compartiments doivent avoir les caractéristiques suivantes :

1. L'agent de contraste se distribue de façon homogène et instantanée dans le compartiment
2. Les flux entre les deux compartiments se font par diffusion passive et sont donc dépendants de façon linéaire de la concentration d'agent de contraste dans chacun des deux compartiments, ainsi que de la perméabilité de la membrane séparant les deux compartiments.
3. Les paramètres microcirculatoires mesurés ne doivent pas varier au cours du temps
4. La concentration d'entrée doit être connue : c'est pourquoi, il est nécessaire de connaître la concentration de l'agent de contraste dans l'artère afférente au tissu tumoral, pour obtenir cette fonction d'entrée.
5. Chaque compartiment est caractérisé par un volume, une quantité et une concentration en agent de contraste.

1.4.3.2 Interprétation

Dans un premier temps, le produit de contraste arrive dans la tumeur par une artère afférente, puis se distribue dans le réseau capillaire tumoral : la prise de contraste initiale est donc liée à la perfusion de la tumeur. La pente initiale est un reflet du débit de perfusion

tissulaire qui conditionne donc l'arrivée du contraste dans le tissu lors du premier passage et le remplissage du réseau capillaire. La hauteur du pic va refléter le volume sanguin tissulaire (V_p). Pour mesurer précisément F et V_p , une résolution temporelle élevée est nécessaire car le pic est précoce et fugace. Ensuite, des échanges de produit de contraste se font au travers des membranes vasculaires en fonction des gradients de concentration entre l'espace vasculaire et l'espace interstitiel jusqu'à atteindre une phase d'équilibre : la vitesse de ces échanges va dépendre de la constante de perméabilité capillaire des vaisseaux tumoraux (K_{trans}). La pente de décroissance (lavage ou wash-out) va aussi dépendre de la perméabilité capillaire. Enfin la distribution et l'accumulation du produit de contraste dans l'espace interstitiel est responsable de la prise de contraste tardive. La hauteur de la partie finale de la courbe est donc le reflet du volume interstitiel (V_e). On peut étudier la perméabilité et le volume interstitiel même si la résolution temporelle est faible, à condition d'avoir une durée d'acquisition suffisante pour pouvoir échantillonner le lavage du produit de contraste (167).

Il a été démontré une corrélation entre les paramètres de microcirculation estimés en imagerie de perfusion les paramètres d'angiogenèse ainsi que leur évolution sous traitement, tels que la densité micro-vasculaire (173-177).

1.4.3.3 TDM vs IRM de perfusion

L'acquisition de perfusion en TDM nécessite une couronne de détecteurs large, permettant de couvrir l'organe d'intérêt et son artère afférente de façon séquentielle. La TDM combine plusieurs avantages : une importante résolution spatiale ainsi qu'une excellente résolution temporelle. En termes d'analyse de la prise de contraste, elle offre aussi une relation linéaire entre la concentration en produit de contraste iodé et l'atténuation mesurée en unités Hounsfield. Ceci est un avantage important par rapport à l'IRM pour laquelle cette linéarité n'est pas respectée. Son inconvénient majeur est l'irradiation qu'il génère ce qui a freiné considérablement l'utilisation de la TDM de perfusion en pratique clinique.

De plus en plus d'études rapportent que l'analyse fonctionnelle de la microcirculation par acquisition dynamique avec administration de contraste en TDM ou en IRM pourrait

permettre de distinguer de façon ultra-précoce les répondeurs des non répondeurs a certaines chimiothérapies, notamment anti-angiogeniques (167, 170).

1.4.4 IRM de diffusion

1.4.4.1 Bases physiques

La séquence de diffusion est une séquence fonctionnelle développée dans les années 1980-1990 (178, 179). Le signal de la séquence de diffusion reflète les déplacements microscopiques des molécules d'eau. Ce déplacement est dépendant de la température ambiante. Dans de l'eau pure placée à la température du corps humain (37°C), le déplacement moyen des molécules d'eau est approximativement de 30 μm toutes les 50 millisecondes (180). A cette échelle, il y a une très forte probabilité que les molécules d'eau interagissent avec les cellules, leurs membranes hydrophobiques et les macromolécules ce qui va modifier leur mouvement. C'est pourquoi, la diffusion apparente observée des molécules d'eau dans les tissus est typiquement plusieurs fois inférieure à la diffusion dans l'eau pure. De plus, la diffusion dans les systèmes biologiques est influencées par les échanges entre le milieu intra et le milieu extracellulaire, ainsi que par la tortuosité de l'espace extracellulaire.

La diffusion pure, dite diffusion moléculaire est liée aux mouvements des molécules d'eau selon leur énergie thermique propre. Chaque collision avec une autre molécule provoque un changement de direction. Ce processus a été décrit par Albert Einstein en 1905 et s'appelle la marche aléatoire (*random walk*). De façon similaire, à une plus grosse échelle, en plus du phénomène de diffusion, les molécules d'eau vont suivre le flux sanguin et changer de direction au niveau de chaque segment capillaire. Si ces capillaires ne sont pas orientés dans une direction préférentielle, cela revient à une marche aléatoire à plus grosse échelle et le même modèle devrait pouvoir s'appliquer. Ce deuxième phénomène est appelé pseudo diffusion. Ce deuxième phénomène est donc influencé par la perfusion des tissus. L'imagerie de diffusion va donc permettre d'imager ces deux composantes, diffusive et pseudo-diffusive, l'une pouvant être négligée par rapport à l'autre sous certaines conditions.

La séquence de diffusion a initialement été utilisée principalement dans le cerveau, pour visualiser l'œdème cytotoxique dans l'accident vasculaire cérébral à la phase aiguë, qui se caractérise entre autre par une restriction de la diffusion libre de l'eau au sein des cellules. L'imagerie de diffusion reflète ces mouvements browniens de l'eau à l'échelle moléculaire, qui vont être modifiés par les interactions avec les membranes cellulaires, les macromolécules, et l'altération des tissus. L'imagerie de diffusion permet de quantifier la restriction de la diffusion libre des molécules d'eau au sein des tissus.

La séquence de diffusion est obtenue en appliquant un gradient dit « de diffusion » de part et d'autre de l'impulsion de 180 degrés au cours d'une séquence d'écho de spin pondérée en T2 (Figure 7).

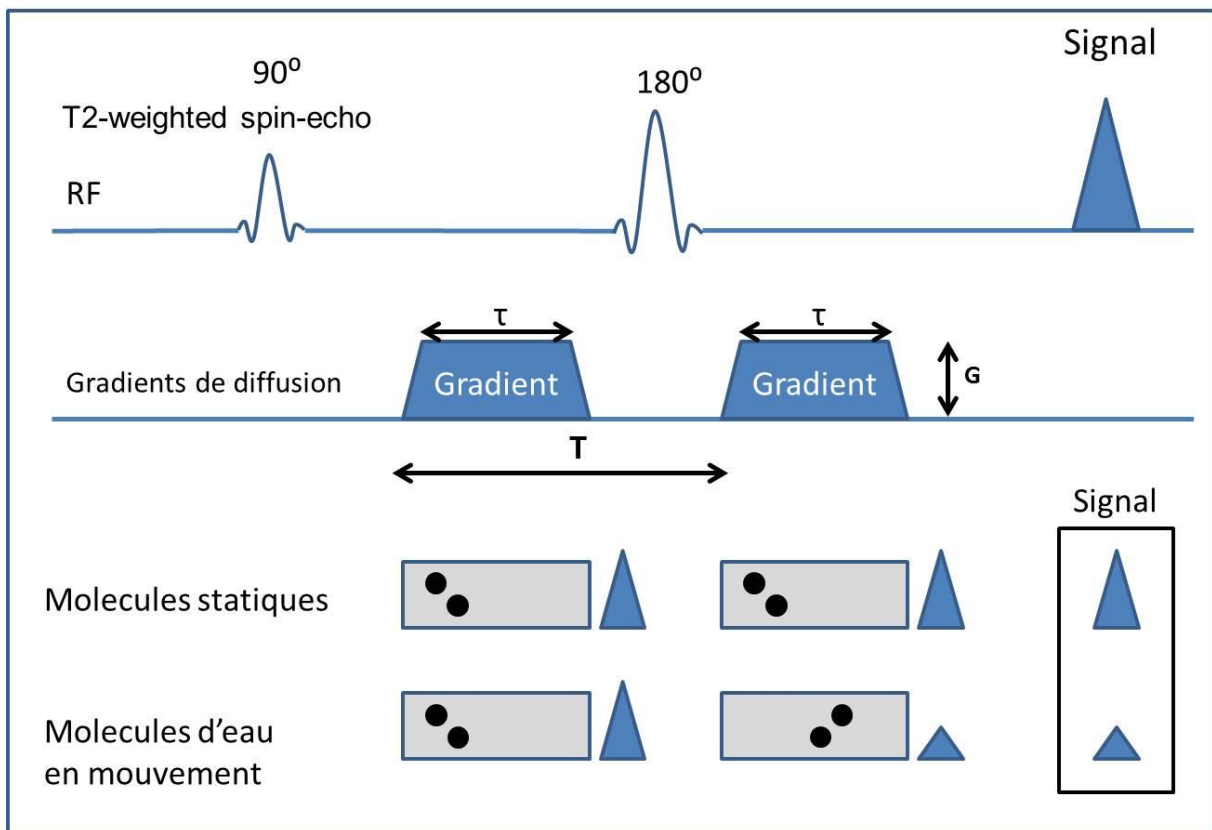


Figure 7. Diagramme de la séquence de diffusion. Le gradient de diffusion est appliqué de part et d'autre de l'impulsion d'écho de spin de 180° . Les protons qui ont peu bougé vont être rephasés et avoir un signal élevé. Les protons ayant une diffusion libre vont bouger et sortir du voxel pendant le temps T . Ils ne seront pas rephasés et leur signal va diminuer.

Les molécules dont la diffusion est restreinte vont peu bouger. Elles seront déphasées par le premier gradient et presque entièrement rephasées par le second. Leur signal sera donc

élevé. Les molécules dont la diffusion est libre vont bouger pendant le temps séparant l'application des deux gradients de diffusion. Le premier gradient va donc les déphaser, et le deuxième gradient ne va pas pouvoir les rephaser. Leur signal va donc diminuer d'autant plus que le gradient de diffusion est élevé.

1.4.4.2 La valeur du gradient de diffusion : b

La force du gradient de diffusion appliqué est caractérisée par une valeur appelée facteur b qui se calcul avec la formule suivante :

$$b = (\gamma \cdot G \cdot \tau)^2 \cdot (T - \tau/3) \text{ (en s/mm}^2\text{)}$$

ou γ est le rapport gyromagnétique, G l'amplitude du gradient, τ la durée d'application du gradient et T le temps séparant l'application des deux gradients.

Lorsque cette valeur est égale à 0, cela revient à faire une imagerie en pondération T2 simple. Lorsque l'on augmente le gradient de diffusion (et donc, la valeur du facteur de diffusion b), le signal des tissus où la diffusion est libre va diminuer plus rapidement que le signal des tissus où la diffusion est restreinte. Plus le gradient de diffusion est élevé, plus le déphasage va être important, et le signal faible pour les tissus où la diffusion est libre (car les protons ne seront pas rephasés). Dans les tissus où la diffusion est restreinte, les molécules d'eau vont peu bouger, et donc être rephasés : leur signal sera donc plus élevé que les autres tissus. Les molécules d'eau vont donc être « piégées » dans le voxel où la diffusion est restreinte et apparaître en hypersignal par rapport aux autres tissus.

La modélisation du signal obtenu est difficile du fait de l'environnement complexe intracellulaire et extracellulaire *in vivo*. La décroissance du signal peut être modélisée selon une décroissance mono-exponentielle, bi-exponentielle, voire tri-exponentielle (181).

1.4.4.3 Modélisation mono-exponentielle : le coefficient apparent de diffusion

En première approximation, la décroissance du signal lorsque l'on augmente le gradient de diffusion (et donc la valeur de b) va suivre une courbe mono-exponentielle de type (figure 8) :

$$S(b)=S(0).e^{-b.ADC}$$

La constante ADC représente le coefficient apparent de diffusion qui va permettre de quantifier la valeur de la restriction ou non de la diffusion. Pour la calculer, il va falloir avoir au moins deux acquisitions, l'une à faible valeur de b , et l'autre à haute valeur de b , mais pas trop élevée pour que la décroissance du signal ne soit pas trop importante.

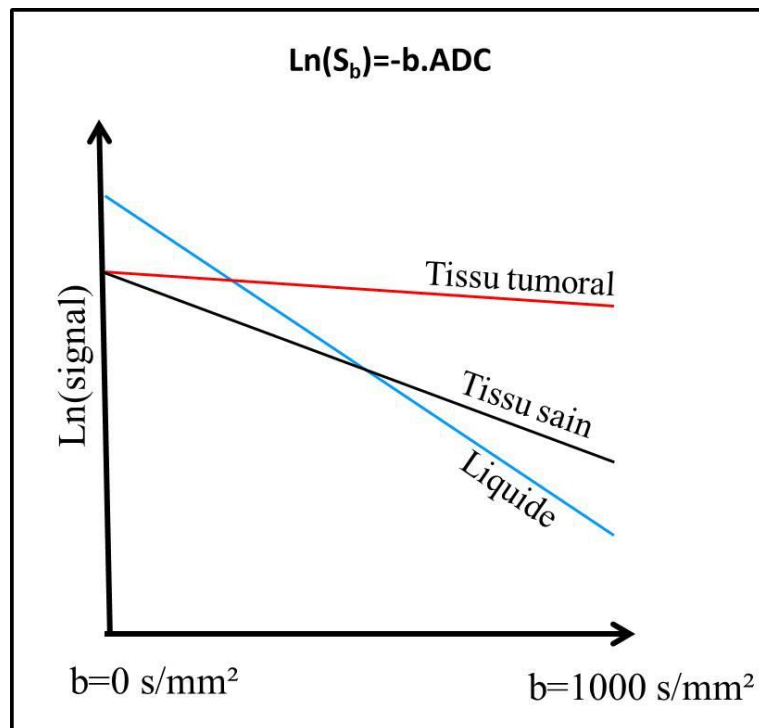


Figure 8. Décroissance mono-exponentielle du signal. La décroissance est rapide dans les liquides, et fortement ralentie dans les tissus à diffusion restreinte.

Le grand avantage de l'ADC est qu'il s'agit d'une mesure quantitative simple et qu'aujourd'hui, la plupart des constructeurs vont proposer un post-traitement automatique des images de diffusion et fournir une image paramétrique appelée cartographie ADC permettant de mesurer l'ADC dans les voxels d'intérêt.

1.4.4.4 Diffusion bi-compartmentale : le modèle intra-voxel incoherent motion

Décrit par Le Bihan et al. en 1988, le modèle Intra-Voxel Incoherent Motion (IVIM) prévoit que la diffusion des molécules d'eau peut être séparée en deux compartiments : un compartiment intravasculaire où une proportion f des protons circule et un compartiment extravasculaire. La constante du premier compartiment est alors appelée D^* ou D' ou D_{fast} et correspond à la valeur de la diffusion dans ce compartiment (aussi appelé pseudo-diffusion, ou diffusion liée à la perfusion). La constante du second compartiment appelée D ou D_{slow} correspond donc à la diffusion uniquement du compartiment extravasculaire c'est pourquoi certains l'appelle le coefficient de diffusion pure.

Ce modèle bi-compartmental prévoit que la décroissance du signal lorsque la valeur de b augmente peut être modélisée par une bi-exponentielle (Figure 9) (178). Cela revient à considérer que la diffusion se fait à deux échelles différentes. Un premier compartiment où la diffusion est très rapide correspond à la première phase de la décroissance du signal et un second compartiment où la diffusion est lente. Le premier compartiment est considéré comme étant lié à la perfusion au sein du voxel.

On peut donc modéliser le signal selon l'équation :

$$S(b) = S(0) \cdot [(1-f) \cdot e^{-b \cdot D} + f \cdot e^{-b \cdot D^*}]$$

Certains auteurs ont décrit un troisième compartiment correspondant la diffusion ultra-rapide au sein des cellules, mais l'échantillonnage de cette décroissance tri-exponentielle requiert l'acquisition de très faibles valeurs de b (181).

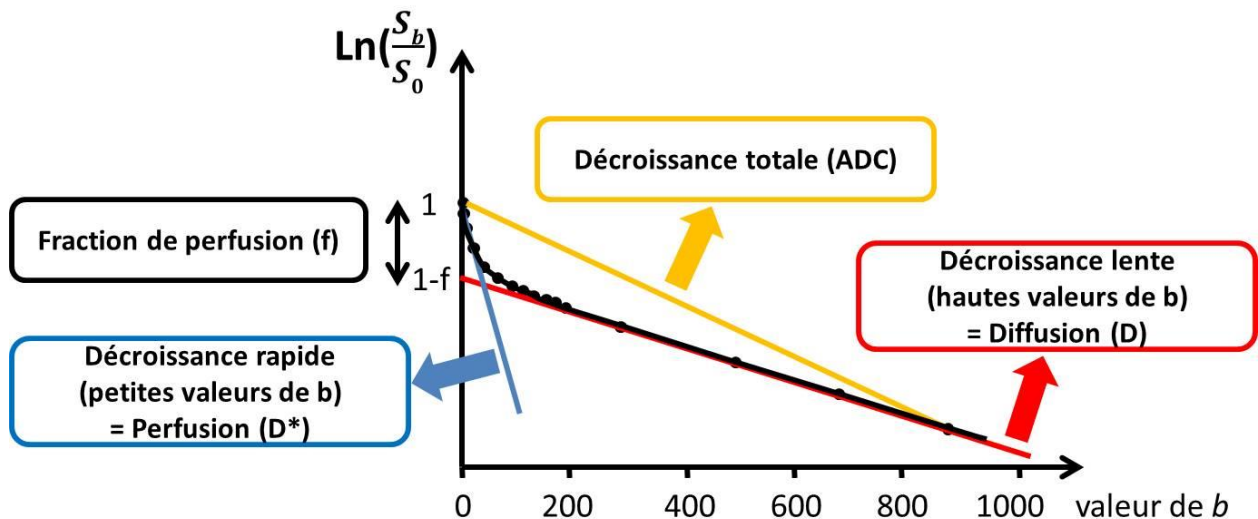


Figure 9. Décroissance du signal suivant un modèle bi-exponentiel. La partie initiale de la courbe a une décroissance rapide reflétant le compartiment à diffusion rapide, lié à la perfusion. La décroissance lente correspond à la diffusion moléculaire pure. Le modèle mono-exponentiel approxime donc les deux compartiments en un seul.

1.4.4.5 Applications cliniques de l'imagerie de diffusion

Les nouvelles techniques d'IRM fonctionnelle, en particulier l'IRM de perfusion dynamique et l'IRM de diffusion multi- b (IVIM) sont considérées comme des outils prometteurs pour l'évaluation de paramètres de microcirculation et la prédiction précoce de la réponse aux traitements (172, 178, 179, 182).

L'IRM de diffusion permet de mesurer des paramètres quantitatifs qui reflètent la cellularité, la nécrose et la fibrose dans les tissus tumoraux (134-137). Son utilisation dans l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie a déjà été étudiée dans de nombreuses localisations tumorales (137, 183-188). En pratique clinique courante, l'utilisation de la diffusion a été familiarisée très vite dans le cerveau pour la détection précoce de l'accident vasculaire cérébral à la phase aiguë, puis des applications ont vu le jour pour l'ensemble des organes, notamment dans l'abdomen.

Au-delà de son pouvoir de détection élevé qui a été démontré à la fois dans les pathologies ischémiques, tumorales et inflammatoires dans différents organes, l'imagerie de diffusion est aussi un candidat majeur parmi les biomarqueurs permettant de prédire ou de suivre la réponse aux traitements (189-194).

De nombreuses études ont déjà étudié la valeur pronostique de l'ADC ; ainsi, il a été montré que les carcinomes hépatocellulaires avec les plus bas ADC étaient les plus indifférenciés, ceux qui répondent le moins bien aux traitements et ceux qui ont le plus mauvais pronostic (189). Il a aussi été montré que la réponse à la chimiothérapie s'accompagne d'une augmentation relative de l'ADC dans les métastases hépatiques d'origine colorectale (195, 196). Des résultats similaires ont été montrés dans le cerveau, notamment dans les glioblastomes (197). L'ADC a aussi été proposé comme marqueur quantitatif de l'inflammation, notamment dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Certains scores d'inflammation ont été proposés dans lesquels l'ADC fait partie intégrante tel que le score de Clermont pour le suivi de l'inflammation dans la maladie de Crohn en entéro-IRM (198). Les applications cliniques abdominale du modèle IVIM bi-compartmental restent pour le moment du domaine de la recherche (134).

1.5 Evaluation de la réponse histologique

De même que l'on a défini des critères de réponse à la chimiothérapie en imagerie, on a tenté d'en définir en anatomopathologie. Lorsqu'une chimiothérapie est efficace, le nombre de cellules tumorales va diminuer, le taux de tissu nécrotique et de tissu fibrotique va augmenter. La plupart des tumeurs sont spontanément partiellement nécrotiques, et l'évaluation de la réponse est donc plus aisée si l'on dispose de tissus avant et après traitement. Toutefois, dans le cas du cancer colorectal, la réponse va s'associer une diminution du taux de cellules viables et une augmentation de la fibrose pour lesquels la quantification post thérapeutique peut s'avérer suffisante.

La réponse histologique peut être évaluée de façon semi quantitative en différentes catégories selon un système appelé TRG (tumor regression grading). Cette quantification est déjà validée dans les métastases hépatiques et dans le cancer du rectum où elle est utilisée en routine (Figure 10) (199, 200). L'absence de réponse histologique au traitement peut conduire l'équipe pluridisciplinaire à proposer un changement thérapeutique après la chirurgie.

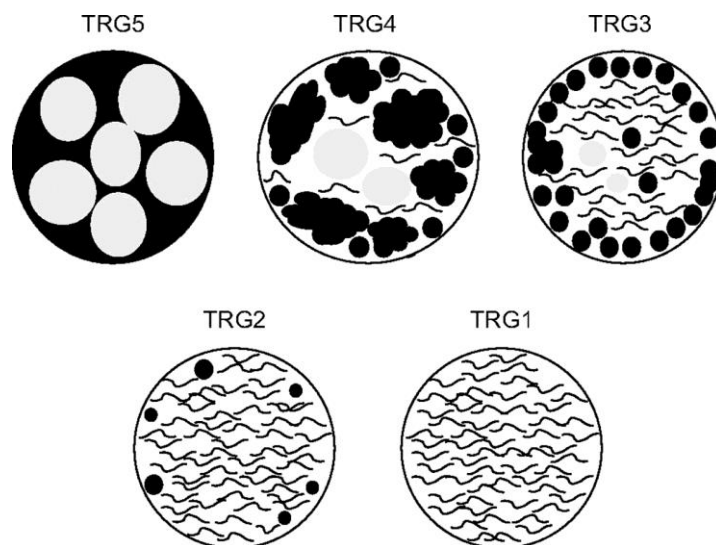


Figure 10. D'après *Rubbia Brandt et al.* Tumor regression grade (TRG) scoring system utilisé dans le foie (199).

- TRG1: absence de cancer résiduel et fibrose en grande quantité
- TRG2: rares cellules tumorales résiduelles, parmi la fibrose
- TRG3: cellules tumorales résiduelles mais fibrose prédominante
- TRG4: cellules tumorales résiduelles prédominantes sur la fibrose
- TRG5: pas de signe de réponse

(Zones noires: cellules tumorales. Zones grises: zones nécrotiques. Lignes: fibrose)

Par ailleurs, il a été montré que cette réponse histologique à la chimiothérapie sur les prélèvements opératoires étant prédictive de la survie dans la CP d'origine colorectale (201). Le standard de référence pour l'évaluation de nouvelles techniques non invasives de quantification de la réponse par imagerie fonctionnelle peut donc être la régression tumorale sur des prélèvements anatomopathologiques.

1.6 Evaluation de la néo-vascularisation tumorale

L'évaluation de référence pour la quantification de la vascularisation est l'examen pathologique et immuno-histochimique. Les vaisseaux sont bien visibles sur les colorations standards (coloration hématoxyline éosine safran) mais il est difficile de les quantifier à l'œil nu de façon reproductible.

Afin de quantifier les vaisseaux, on va avoir recours le plus souvent à l'immunohistochimie : le tissu est incubé avec un anticorps dirigé contre des marqueurs vasculaires (CD₃₁, CD₃₄, facteur Von Willebrand). L'étude au microscope va ensuite se concentrer sur les régions à plus forte densité vasculaire (zones appelées « hot-spots ») et des techniques de comptage semi-automatique ou automatique des vaisseaux marqués par les anticorps va permettre de calculer la densité micro-vasculaire (DMV) correspondant au nombre moyen de vaisseaux/cm².

1.7 Le pseudomyxome péritonéal (PMP)

Le PMP est une carcinomatose péritonéale mucineuse rare qui reste confinée à la cavité péritonéale. Les patients avec PMP sont probablement ceux qui bénéficient le plus du traitement par chirurgie de cytoréduction complète et CHIP puisque après traitement, des taux de survie de l'ordre de 70% à 20 ans ont été obtenus (87). Toutefois, ces résultats dépendent de l'extension de la maladie et de la possibilité de réaliser une résection complète (202).

1.7.1 Définition :

Le PMP n'est pas caractérisé par un type tumoral ayant des marqueurs spécifiques. C'est pourquoi le diagnostic n'est pas posé uniquement sur l'examen anatomopathologique, mais sur l'ensemble clinique, imagerie et pathologie. Il correspond donc à un syndrome anatomo-clinique, et non d'un type tumoral. Il est caractérisé par un épanchement mucineux dans la cavité péritonéale, associé ou non à des cellules épithéliales néoplasiques. C'est pourquoi l'autre nom de ce syndrome est la maladie gélatineuse du péritoine.

1.7.2 Epidémiologie :

Il s'agit d'une maladie rare dont l'incidence annuelle est estimée à 1 à 2 cas / 1000 000 / an (203). L'âge moyen au diagnostic est de 49 ans, atteignant des patients de 20 à 80 ans, avec un prépondérance féminine avec un sexe ratio de 2 à 3 pour un homme (204).

1.7.3 Anatomopathologie :

La cause la plus fréquente du PMP est la rupture d'une néoplasie appendiculaire mucineuse dans la cavité péritonéale. D'autres origines du PMP ont été décrites, notamment les tumeurs ovariennes, coliques, gastriques, pancréatique, tubaire ou même de l'ouraqué, mais ces origines sont beaucoup plus rares (205). Des études immunohistochimiques ont démontré l'origine digestive et en particulier appendiculaire du PMP dans plus de 90% des cas (206, 207).

Le diagnostic anatomopathologique n'est pas aisé et aucun marqueur spécifique des cellules tumorales responsables du PMP n'a été identifié. Le diagnostic doit donc être posé par un anatomopathologiste expert, ayant les informations cliniques et d'imagerie à sa disposition. Les cas difficiles doivent faire l'objet de relectures collégiales au sein des réseaux d'expertise (www.renape-online.fr/fr/espace-professionnel/groupe-rena-path.html).

La principale classification anatomopathologique a longtemps été la classification de Ronnet et al. en 3 grades :

- Adénomucinoïse péritonéale disséminée (AMPD)
- Carcinomatose mucineuse péritonéale intermédiaire (CMP-I)
- Carcinomatose mucineuse péritonéale de haut grade (CMP)

Cette classification a été simplifiée en 2010 et l'on utilise maintenant la classification OMS en 2 grades (208) :

- *Bas grade* : dépôts de mucine avec une faible quantité de cellules tumorales (<10%), pas d'atypie cytologique, et épithélium cuboïdal simple non stratifié.
- *Haut grade* : dépôts de mucine avec une haute cellularité tumorale, des atypies cellulaires modérées à sévères, et une morphologie des cellules tumorales cibriforme, avec une réaction desmoplastique.

Cette distinction se justifie car il a été montré que les patients ayant un PMP de haut grade ont un plus mauvais pronostic que les patients ayant un PMP de bas grade (209, 210).

Toutefois, une des particularités du PMP, y compris de haut grade, est de rester confiné à la cavité abdominale et de rarement être responsable de métastases ce qui est une différence majeure avec l'adénocarcinome mucineux de l'appendice, qui va volontiers être responsables de métastases hépatiques, et exceptionnellement d'une ascite mucineuse de grande abondance.

La présence d'une mucocèle appendiculaire est secondaire à une néoplasie de bas ou de haut grade située dans l'appendice, sécrétant de la mucine, responsable de la dilatation de l'appendice. C'est classiquement la rupture de la mucocèle dans le péritoine qui va causer la dissémination des implants mucineux et le PMP.

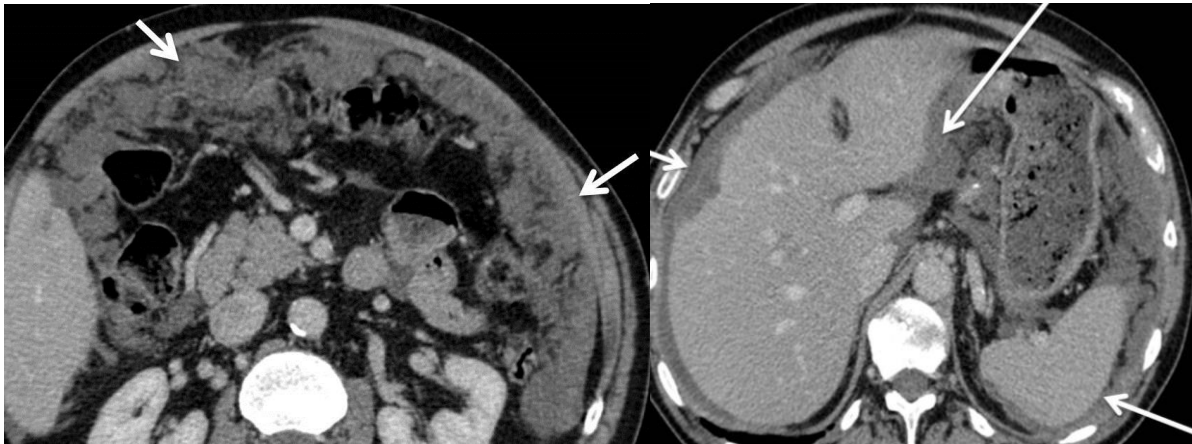
1.7.4 Imagerie TDM du PMP

La TDM reste à l'heure actuelle l'examen le plus répandu dans le bilan du PMP, du fait de sa grande disponibilité, reproductibilité, son caractère peu opérateur dépendant et sa grande vitesse d'acquisition permettant de faire le bilan complet de l'abdomen, du pelvis et du thorax. La conférence de consensus de 2007 en a fait l'examen de premier intention indispensable dans l'exploration de toutes les CP (106). Il n'y a aujourd'hui aucune recommandation sur la nécessité ou non d'une opacification digestive orale ou basse. Le choix est laissé à la préférence chaque équipe.

L'aspect du PMP est typiquement celui d'une ascite gélatineuse, plus dense que le liquide avec parfois des cloisons et des composantes de densité hétérogène. Un aspect de gâteau épiploïque est souvent rencontré, mais celui-ci est moins tissulaire est plus gélatineux que celui que l'on visualise classiquement dans les CP d'origine ovarienne ou digestive (Figure 11A). Cette ascite est typiquement de grande abondance et peut être responsable d'un aspect dit de « *scalopping* » sur le foie et la rate (Figure 11B). Elle peut aussi être responsable d'un effet de masse sur les structures digestives, voire entraîner des compressions extrinsèques, qui sont la principale cause de mortalité secondaire au PMP. Faire la différence entre l'ascite liquidienne et la gélatine n'est pas toujours aisé et l'on doit resserrer les limites de la fenêtre de visualisation de la console de lecture pour augmenter le contraste.

De plus, la visualisation d'une mucocèle appendiculaire est un élément fortement en faveur du diagnostic. La mucocèle appendiculaire va typiquement apparaître sous la forme d'un appendice plus ou moins dilaté avec un contenu hypodense, et des parois fines, sans infiltration de la graisse péri-appendiculaire. Des calcifications pariétales fines sont possibles qu'il ne faut pas confondre avec un stercolithe. La présence de macro calcifications péritonéales est aussi fréquente.

Enfin, même si les lésions extra-péritonéales sont très rares dans le PMP, la TDM permet d'en faire le bilan.



A.

B.

Figure 11. A. PMP de bas grade chez un patient de 53 ans : aspect de « gâteau épiploïque gélatineux » (flèches). B. Aspect de *scalopping* sur la capsule hépatique et splénique (flèches).

1.7.5 Imagerie IRM du PMP

Bien que l'apport de l'IRM dans le bilan des PMP n'ait pas encore été validé par des études de grands effectifs, l'IRM est aujourd'hui sans conteste l'examen le plus performant. En effet, les implants mucineux vont avoir un hypersignal franc, quasi liquidien sur les séquences en pondération T2 alors que les parties les plus tissulaires vont rehausser le produit de contraste. De plus, l'administration de produit de contraste va permettre de détecter des rehaussements péritonéaux avec une meilleure sensibilité que la TDM (211). Les séquences pondérées en T1, avec saturation de la graisse, après administration intraveineuse de chélates de gadolinium vont aussi être très sensibles pour détecter les discrètes infiltrations des tissus graisseux.

Des recommandations pour la réalisation d'une IRM du péritoine ont été publiées par les radiologues du groupe d'imagerie du réseau national de prise en charge des carcinose rares du péritoine (RENAPE : <http://www.renape-online.fr/fr/espace-professionnel/rena-rad.html>). Ce protocole est relativement proche des protocoles utilisés pour l'exploration des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin en entéro-IRM.

Un jeûne de 6 heures est recommandé pour limiter le péristaltisme intestinal. L'opacification orale est optionnelle. Dans le cas spécifique du PMP, un agent de contraste

super paramagnétique tel que le ferumoxsil (Lumiren®) ou plus simplement le jus d’ananas, permet de faire diminuer le signal de la lumière du tube digestif (212).

L’acquisition peut être réalisée en décubitus dorsal ou ventral indifféremment. L’utilisation d’un agent antipéristaltique est recommandée. On peut administrer du glucagon en intraveineux reparté en deux doses : une en début d’examen et la seconde avant les séquences injectées. On peut aussi proposer l’administration en continue dans une perfusion du glucagon dilué pendant toute la durée de l’examen. L’administration intraveineuse de chélates de gadolinium est hautement recommandée en l’absence de contre-indication notamment d’insuffisance rénale sévère. Les séquences réalisées sont des séquences pondérées en T2 sans saturation de la graisse. Du fait de leur meilleure résolution, les séquences de type en écho de spin rapide (turbo ou fast spin echo, TSE et FSE) sont à préférer aux séquences de type single shot, même si ces dernières, plus fortement pondérées en T2, semblent souvent suffisantes et moins sujettes aux artefacts de mouvements. L’épaisseur des coupes est habituellement de 4 à 5 mm, acquises dans le plan axial, idéalement jointives ou avec un écart de coupe ne dépassant pas 1 mm. Le plan coronal peut aussi être réalisé, mais est généralement plus sujet aux artefacts de mouvements pour les séquences de type TSE ou FSE. Il est possible de réaliser une séquence complémentaire pondérée en T2 avec saturation de la graisse, ou seule la mucine et les liquides resteront en hypersignal. Toutefois, la qualité des images est souvent dégradée et peut être responsable de faux positifs en cas de saturation incomplète de la graisse (Figure 12). De plus, la graisse sert de repère anatomique et il peut être difficile de différencier le tube digestif du péritoine après saturation de la graisse. C’est pourquoi cette séquence ne peut se substituer aux séquences T2 sans saturation de la graisse.

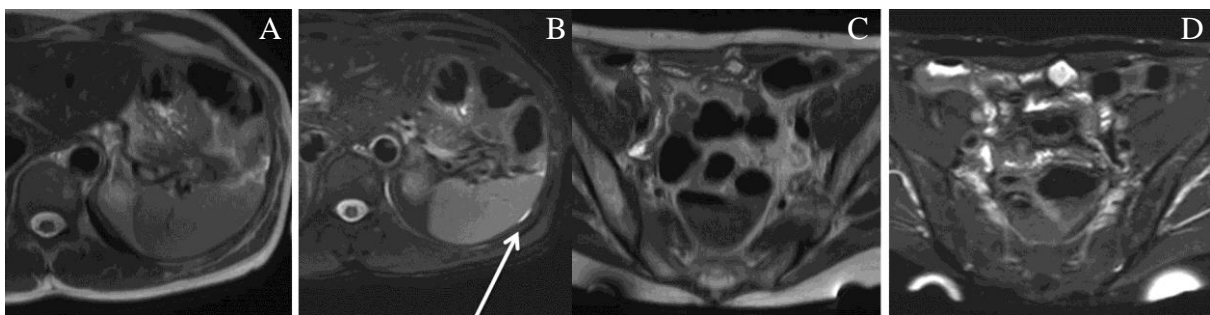


Figure 12. Patient de 27 ans avec PMP de bas grade. **A.** Séquence T2 TSE ne montrant pas d’anomalie. **B.** Séquence T2 TSE avec saturation de la graisse. Un défaut de saturation de la graisse fait suspecter une lésion péri-splénique (flèche). **C.** Image pondérée en T2 TSE centrée sur le pelvis. **D.** Même coupe que précédemment, pondérée en T2 TSE avec saturation de la graisse. Perte des silhouettes grasses rendant l’interprétation plus difficile.

Bien qu'aucune étude n'ait validé son utilité dans le PMP, il est recommandé de réaliser une séquence de diffusion de type écho planaire (EPI) dans le plan axial avec au moins deux valeurs de b (basses 0 ou 50 s/mm² et élevées, >800 s/mm²). Les images acquises avec de basses valeurs de b sont très fortement pondérées en T2 et la graisse est saturée, ce qui peut aider à faire la différence entre la graisse et des lésions mucineuses. Les valeurs de b élevées vont être sensibles pour les zones très tissulaires et éventuellement permettre de calculer la valeur du coefficient apparent de diffusion (ADC), dont l'utilité reste du domaine de la recherche (124).

Enfin, la dernière séquence est l'acquisition dynamique après injection de chélates de gadolinium de séquences volumiques en écho de gradient pondérées en T1 avec saturation de la graisse (idéalement de type Dixon). L'acquisition dynamique n'est pas obligatoire dans le cas du PMP. On peut réaliser une acquisition artérielle et veineuse centrée soit sur le foie, soit sur le pelvis en fonction de la distribution de la maladie. La séquence la plus sensible après injection est la phase tardive qui doit être réalisée entre 3 et 5 min après le début de l'injection (118). On recommande une acquisition dans le plan axiale et coronal étant donné la rapidité d'acquisition de ces séquences en écho de gradient.

1.7.6 Aspect IRM du PMP

Chez le patient avec PMP, on constate le plus souvent la présence d'un épanchement mixte liquidien et mucineux particulièrement bien visualisé sur les images en pondération T2 (Figure 13A). Les lésions mucineuses sont parfois difficiles à différencier du liquide, mais ont typiquement un signal élevé et moins homogène, un contenu hétérogène avec un aspect de micro-cloisons et des parois épaisses (Figure 13B). La présence de masses tissulaires est relativement fréquente (60% des cas dans notre expérience) mais ne se voit pas uniquement chez les patients ayant un PMP de haut grade. Les masses vont typiquement être des lésions en hyposignal hétérogène T2 se rehaussant après administration de chélate de gadolinium, entourées d'une couronne de mucine simple, peu rehaussée (Figure 14). La lésion centrale va typiquement avoir un ADC plus bas que la mucine alentour. Parfois, ces masses sont moins tissulaires et plus homogènes, et vont se rehausser de façon moins intense mais plus diffuse.

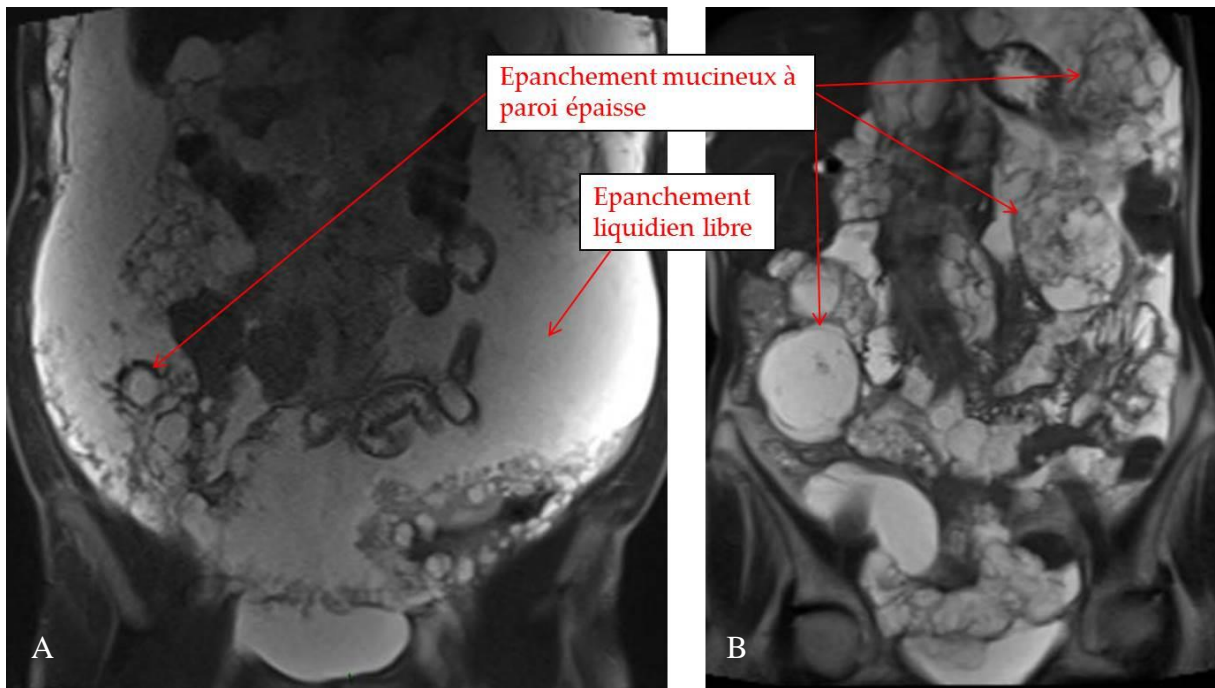


Figure 13. **A.** Patient de 56 ans avec un PMP de haut grade. Epanchement mixte liquidien et gélatineux. **B.** Patient de 64 ans avec PMP de haut grade. Aspect de multiples lésions mucineuses à paroi épaisse.

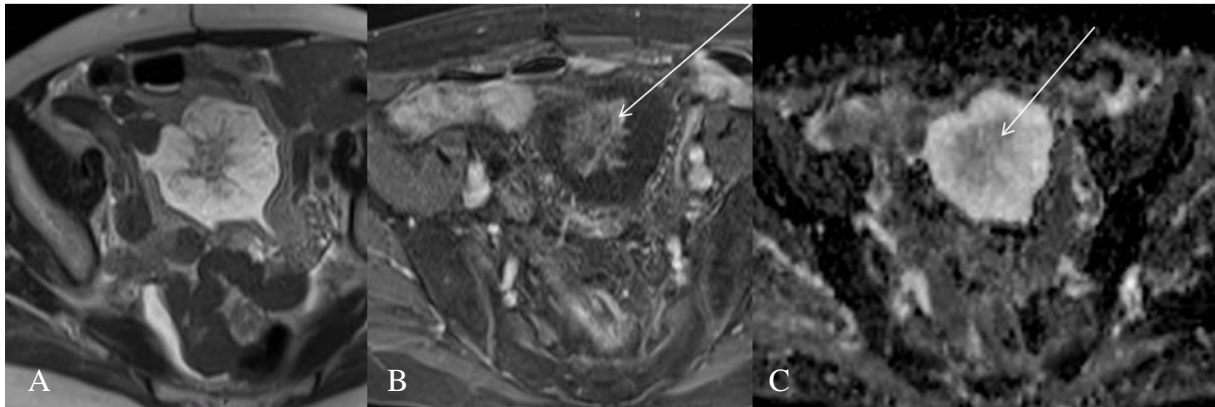


Figure 14. Patiente de 67 ans avec PMP de haut grade. Image pondérée en T2 single shot (**A**), en T1 après administration intraveineuse de gadolinium au temps tardif (**B**) et cartographie ADC (**C**). Volumineuse masse pelvienne avec une zone centrale en hyposignal T2, rehaussant intensément après administration intraveineuse de chélate de gadolinium et avec une restriction de la diffusion.

L'administration de chélates de gadolinium va notamment aider à caractériser les atteintes des parois et séreuses, telles que le diaphragme, la capsule hépatique, la séreuse digestive, et le péritoine (Figures 15 et 16).

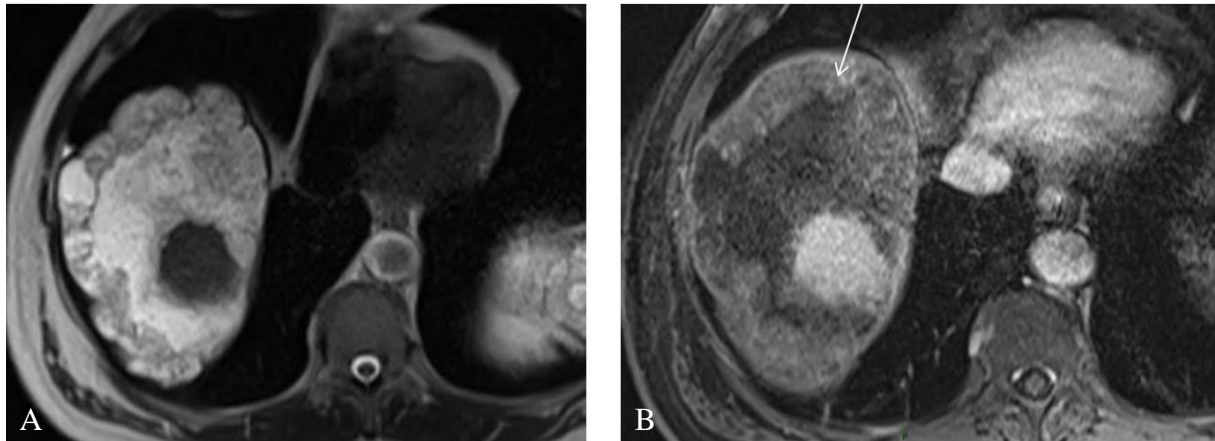


Figure 15. PMP de bas grade chez un patient de 48 ans. **A.** Images pondérées en T2-TSE. Atteinte de la coupole diaphragmatique droite. **B.** Images pondérées en T1 après administration de chélates de gadolinium. Discret rehaussement (flèche). Les lésions purement mucineuses ne se rehaussent presque pas.

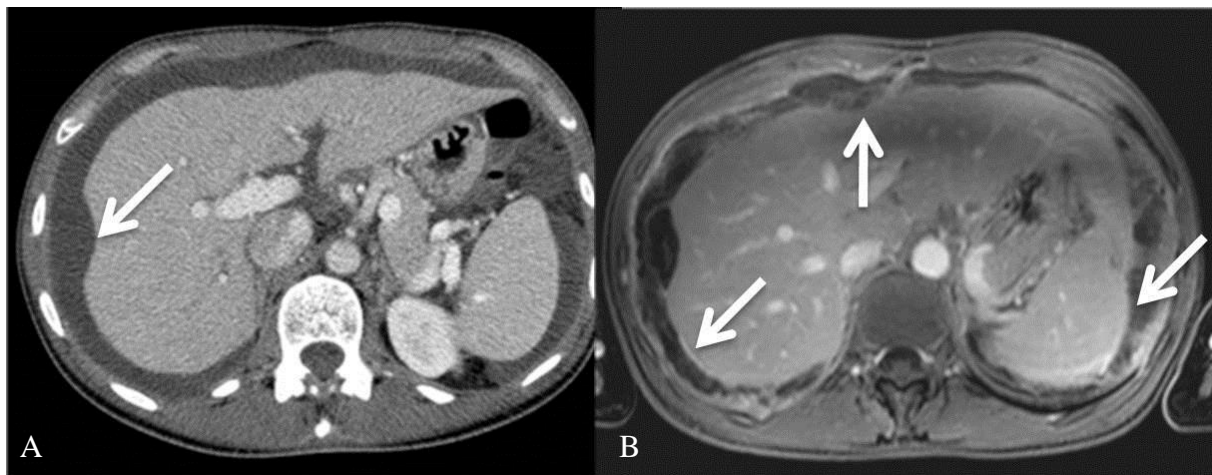


Figure 16. Patient de 54 ans avec PMP de bas grade. **A.** TDM: ascite avec scalloping focal sans cloison visible. **B.** En IRM en pondération T1 après injection de chélates de gadolinium. Rehaussement des capsules hépatique et splénique. Le patient a été traité par glissonectomie et splénectomie.

Une étude a rapporté une corrélation entre l'intensité du rehaussement du PMP 5 minutes après administration de gadolinium et le grade la tumeur mais ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études (118). Dans notre expérience, un délai de 5 minutes peut s'avérer un peu long et nous préférons les acquisitions à 3 minutes après injection.

L'intérêt de la séquence de diffusion n'a pas encore été évalué. Le signal de la mucine va décroître lorsque la valeur de b augmente, un peu moins vite que pour les liquides purs. La séquence EPI avec saturation de la graisse à faible valeurs de b est souvent de meilleure qualité qu'une séquence de type single shot avec saturation de la graisse et moins artefactée qu'une séquence TSE avec saturation de la graisse. Du fait sa forte pondération T2, elle peut être complémentaire de la séquence en pondération T2 sans saturation de la graisse pour détecter la mucine, à condition que les deux séries d'images soient analysées en même temps. Sur les images avec une valeur de b élevée, seuls les implants tissulaires vont rester en hypersignal modéré et en particulier les masses (Figure 17). La mesure de l'ADC n'a pour l'instant pas démontré d'intérêt, mais pourrait peut-être permettre de distinguer les PMP de bas grade des PMP de haut grade.

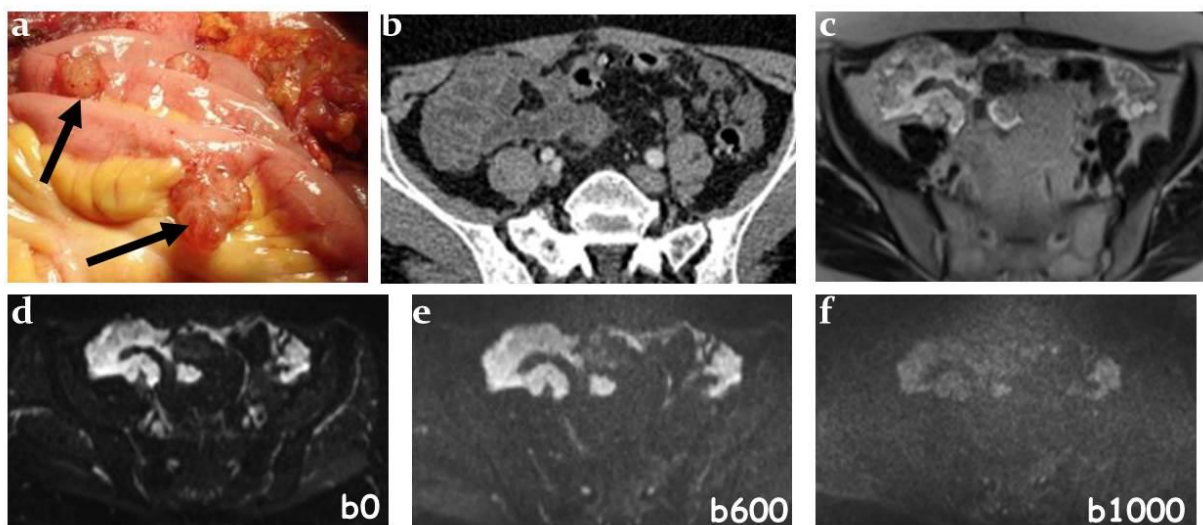


Figure 17. Patient de 67 ans avec PMP de bas grade. **a.** vue chirurgicale : multiples implants autour du tube digestif. **b.** TDM : faible contraste des lésions qui sont difficiles à distinguer des anses digestives normales. **c.** images pondérées en T2 single shot montrant les lésions antérieures au tube digestif en hypersignal. **d, e, f.** décroissance du signal au sein de la mucine lorsque la valeur de b augmente. La séquence lorsque $b=0$ est particulièrement sensible pour détecter les implants en hypersignal.

1.7.8 Intérêt de la TEP-TDM

Du fait de son caractère peu cellulaire et richement mucineux, le PMP est une tumeur peu consommatrice de glucose. La TEP est donc peu adaptée à l'exploration du PMP. De plus, chez ces patients, le bilan d'imagerie spécifique est souvent fait après une chirurgie première au cours de laquelle le diagnostic a été fait et des biopsies réalisées. Il est donc possible de voir des hyperfixations résiduelles faussement positives. Une étude a décrit une corrélation entre l'intensité de la consommation de glucose et le grade de la tumeur, mais ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études (213). Il est intéressant de noter qu'une corrélation similaire a été trouvée avec l'intensité rehaussement en IRM et le grade (118). Une étude récente de la même équipe a montré qu'une hyperfixation du ¹⁸FDG était un facteur prédictif de récurrence (126).

1.7.9 Critères de non résectabilité

L'objectif du bilan préopératoire est double : faire la cartographie précise des lésions, et chercher des critères de non résectabilité. En effet, l'intérêt de la chirurgie de cytoréduction si la résection ne peut être complète est controversé, même si des études récentes suggèrent qu'une résection la plus complète possible dans un centre expert est associée à une meilleure survie globale (214). Il est donc primordial de repérer des critères de non résectabilité et de signaler au chirurgien les zones où la résection risque d'être délicate. Les critères de non résectabilité chirurgicale sont classiquement les atteintes trop étendues pour lesquelles la résection d'une trop longue portion de l'intestin grêle est nécessaire, ou la nécessité d'associer une colectomie complète et une gastrectomie qui se traduirait par une trop grande morbidité post-opératoire. Les atteintes profondes du pédicule hépatique engainant les vaisseaux sont aussi un élément majeur de non résectabilité. L'une des rares études sur le sujet a comparé les performances de la TDM et de l'IRM lues par un lecteur junior et un lecteur senior pour évaluer l'atteinte non résectable du pédicule hépatique et du mésentère (117). Menassel et al. ont ainsi montré chez 73 patients avec PMP que la TDM et l'IRM avaient une spécificité de 100% pour prédire l'envahissement non résectable du pédicule hépatique pour le lecteur senior alors que pour le lecteur junior, la spécificité était de 100% en TDM et 97% en IRM. Par ailleurs, l'envahissement non résectable du mésentère était prédit en TDM et en IRM par le

lecteur senior avec une spécificité de 100% et 99% et une spécificité de 100% pour les deux modalités pour le lecteur junior. Ces excellents résultats sont à mettre en perspective avec les autres carcinomes péritonéaux pour lesquels les performances du bilan préopératoire pour prédire la non résectabilité sont nettement inférieures (108).

1.7.10 Diagnostic différentiel

1.7.10.1 Cas de la mucocèle

Pour un nombre non négligeable de patients, le diagnostic est fait lorsqu'ils se présentent en urgence pour des douleurs abdominales et que l'on visualise un appendice élargi sur la TDM préopératoire. Lorsque le diagnostic de mucocèle appendiculaire est manqué sur la TDM, il va alors être peropératoire et anatomopathologique. Lorsque la mucocèle est isolée et non rompue, l'apparence est celle d'une structure tubulée, souvent de grande taille, avec une paroi fine et éventuellement de fines calcifications pariétales (Figure 18). Il est important de noter qu'il n'y a pas d'infiltration de la graisse péri-appendiculaire ce qui permet d'éliminer le diagnostic d'appendicite aigue dans la plupart des cas.

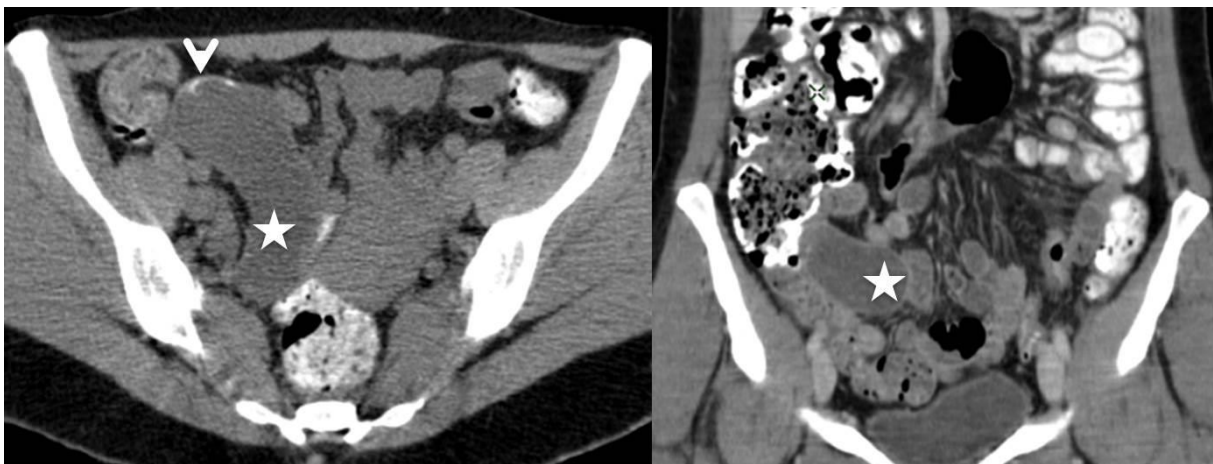


Figure 18. TDM chez un patient de 43 ans se présentant aux urgences pour des douleurs abdominales. Mucocèle appendiculaire secondaire à un cystadénome borderline de l'appendice (étoile) avec de fines calcifications pariétales (tête de flèche).

1.7.10.2 Les autres carcinoses

Certaines CP peuvent vraiment mimer l'aspect du PMP. Dans le cas d'adénocarcinomes digestifs mucineux, les lésions métastatiques péritonéales peuvent avoir un aspect mucineux (Figure 19). Il est alors presque impossible de les différencier du PMP. La présence de signes associés tels que des métastases hépatiques, une masse primitive colorectale ou ovarienne, sont des arguments forts contre le diagnostic de PMP. De plus le PMP est responsable d'un effet de masse chronique, donnant un aspect de « scalloping cystique » faisant un effet de masse plus doux sur les parenchymes que les CP ovariennes ou colorectales (Figure 20). Enfin, les CP ovariennes ont un aspect assez classique, associant des masses ovariennes hétérogènes, une ascite plus liquidienne et un « gâteau épiploïque ». Les atteintes nodulaires sont plus rares et seront généralement en hyposignal sur les images en pondération T2.

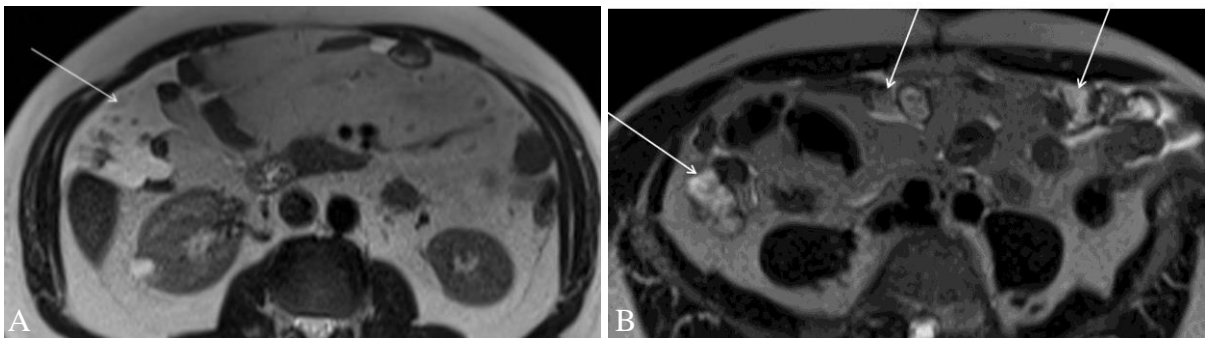


Figure 19. Patient de 45 ans. IRM préopératoire d'un cancer mucineux du colon gauche. Images en pondération T2 montrant des lésions de CP en hypersignal (flèches). Aspect très proche du PMP.

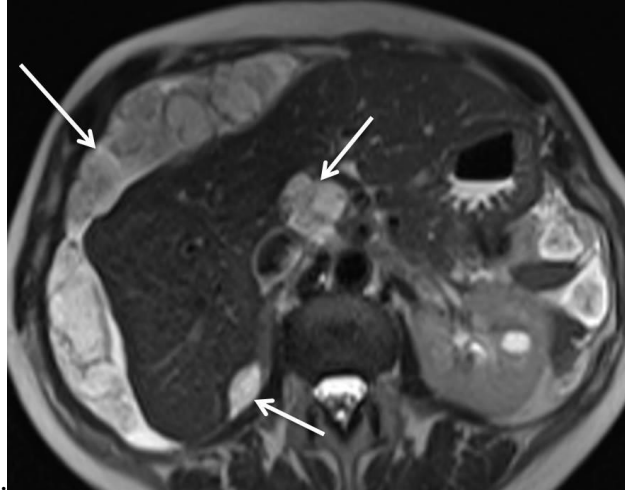


Figure 20. Image en pondération T2 single shot chez un patient de 67 ans avec PMP de bas grade: scalloping cystique (flèche) : le parenchyme est refoule et déformé mais la capsule reste bien continue.

1.7.10.3 Les autres lésions kystiques

Les autres diagnostics différentiels sont les lésions kystiques péritonéales et pelviennes.

Le mésothéliome kystique (anciennement kyste mésothélial) est une lésion bénigne, composée de lésions purement kystiques, dont les parois sont fines. Il n'y a aucun contingent mucineux ou solide et les images IRM sont fortement évocatrices (Figure 21).

Un autre diagnostic différentiel est le lymphangiome kystique. Le plus souvent il est unique, avec des septa et une localisation préférentielle dans les mésos. Il n'y a aucun contingent graisseux ou mucineux et pas de rehaussement.

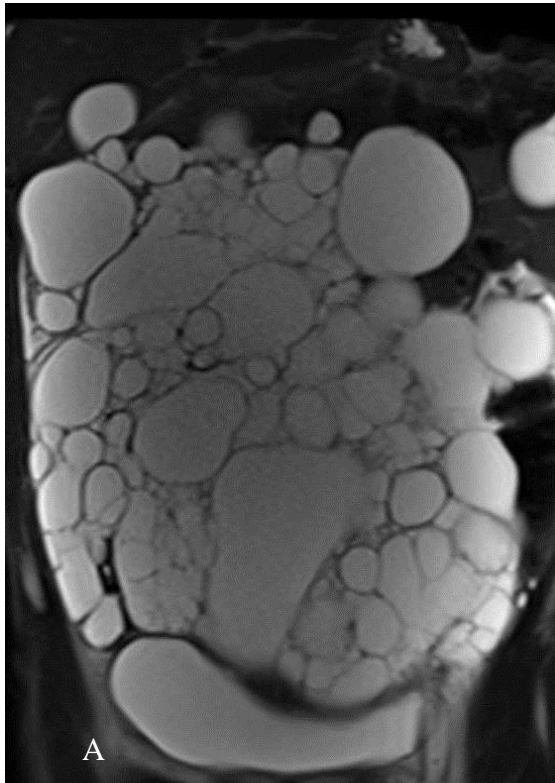


Figure 21. Mésothéliome kystique chez une patiente de 43 ans. **A.** Image coronale en pondération T2 single shot : aspect de multiples kystes réguliers à paroi fine. Il n’y a aucun contingent tissulaire. **B.** Aspect de la pièce d’exérèse.

1.7.11 Conclusion

Le PMP est une CP particulière à plus d’un titre. Ses caractéristiques structurales et son polymorphisme en font une maladie particulière pour le radiologue car les performances des examens d’imagerie sont meilleures que pour les autres CP. Du fait de sa rareté, peu d’études ayant inclus un grand nombre de patients ont été menées. Les résultats de plusieurs études préliminaires, notamment sur la prédiction du grade doivent être validés sur de larges cohortes, et l’imagerie de diffusion reste à évaluer. L’IRM est vraiment l’examen fondamental et le plus performant dans cette maladie. Le radiologue doit savoir la proposer, alors que la TDM reste trop souvent le seul examen réalisé. La prise en charge doit être faite dans des centres spécialisés. Enfin, le caractère relativement vasculaire de la maladie, malgré son faible contingent cellulaire en font une pathologie singulière pour étudier l’angiogenèse tumorale.

1.8 Les modèles animaux

L'élaboration de modèles animaux pour tester des hypothèses est souvent nécessaire avant de passer à aux essais chez l'être humain. En effet, ils permettent de tester des molécules dans un système vivant proche de l'être humain, contrairement aux explorations réalisées *in-vitro*. Un modèle animal doit reproduire les caractères de la pathologie humaine de façon adéquate. Dans le cadre des modèles animaux tumoraux, il y a deux différents types de modèles:

- Les modèles immunocompétents
- Les modèles immunodéficients

Les modèles immunocompétents ont plusieurs avantages : ils sont moins chers car les souris ne sont pas génétiquement modifiées, et ils permettent de reproduire une maladie chez un animal ayant un système immunitaire complet, et donc permettent d'évaluer le rôle de ce système immunitaires et ses potentielles interactions avec la pathologie et les traitements évalués. Leur principal inconvénient, est qu'ils ne permettent que de travailler sur des tumeurs murines, qui vont sécréter des hormones ou des toxines murines et qui ne seront pas toujours sensibles à un traitement conçu pour une tumeur humaine. Par exemple, un anticorps anti-VEGF humain tel que le bévacicumab n'aura pas un effet aussi marqué sur une tumeur d'origine murine sécrétant du VEGF murin que sur une tumeur d'origine humaine (215, 216). La souris est l'un des animaux les plus utilisé car sa petite taille permet d'étudier un grand nombre d'individus pour un faible encombrement, et que son cycle de reproduction est court (9 semaines). Les souris BALB/c sont un type de souris de laboratoire immunocompétentes largement utilisées.

Les modèles immunodéficients : ils existent des modèles chez des souris ayant une immunodéficiences globale ou sélective. Les souris ayant une immunodéficiences sélective ont un gène ou un ensemble de gènes qui sont sélectivement modifiés ou désactivés (souris dites « *knock out* ») pour étudier l'expression de ce gène spécifique ou tester un traitement visant à combler le déficit en question (217).

Les modèles murins ayant une immunodéficiences globale sont plus fréquents et moins chers. On utilise tout particulièrement la souris athymique nude : elles proviennent d'une lignée génétique présentant une mutation génétique du gène FOXP1 causant l'absence congénitale de thymus ou son non fonctionnement. Cela va provoquer un déficit en immunité humorale via les lymphocytes T. Par ailleurs, le phénotype de cette souris se caractérise par

l'absence de poils. L'absence d'immunité humorale va permettre de créer des modèles par xéno greffe de tissus issus d'une autre espèce sans rejet. Par exemple, la xéno greffe d'une tumeur humaine va entraîner la colonisation de la tumeur par le stroma et les vaisseaux murins et de recréer un avatar. Le microenvironnement tumoral ainsi créé va avoir une composante mixte humaine et murine. Ces modèles sont particulièrement intéressants lorsque l'on veut étudier une tumeur humaine avec des cellules humaines. Si le tissu est greffé en orthotopique, il peut reproduire une grande partie des caractéristiques de la tumeur initiale. Beaucoup d'études utilisent des modèles de greffes ectopiques de cellules tumorales en sous-cutané. L'avantage de ces modèles et leur facilité d'obtention et de suivi visuel de la croissance tumorale, mais ils ne permettent pas d'étudier les interactions entre la tumeur et son stroma.

Des lignées de souris plus profondément immunodéficientes existent, telles que les souris SCID (severe combined immunodeficiency). Elles vont pouvoir recevoir non pas du tissu mais des cellules d'une autre espèce, comme des cellules souches ou des cellules stellaires hépatiques qui vont pouvoir coloniser la souris receveuse (218).

2. Objectifs

Les objectifs de ce travail de thèse étaient la mise au point et l'application d'une méthodologie d'évaluation fonctionnelle de la carcinose péritonéale

Pour parvenir à cet objectif, le travail s'articule en 3 parties

1. Etablir un modèle murin d'angiogenèse tumorale péritonéale : il s'agit d'un modèle murin orthotopique de PMP chez la souris nude permettant :

- De caractériser l'angiogenèse tumorale en histologie, immunohistochimie, et en imagerie par micro-angiographie
- D'évaluer l'échographie Doppler dans l'artère mésentérique supérieure dans le suivi de l'angiogenèse au cours du développement tumoral dans un premier temps puis sous traitement anti-angiogénique
- D'évaluer la valeur des marqueurs sériques d'angiogenèse dans ce modèle

2. Mettre au point d'une séquence de diffusion pour les études murines à 1.5T

- Nous avons pu évaluer la fiabilité et la reproductibilité de cette séquence dans le modèle murin de PMP et dans un modèle murin de carcinose colique murine chez la souris immunocompétente

3. Suivi de l'efficacité d'un traitement angiogénique par IRM de diffusion multi-*b* dans un modèle murin de PMP:

- Nous avons suivi longitudinalement un groupe de souris traitées par sorafénib et un groupe de souris témoins, par IRM de diffusion multi-*b* afin d'extraire les paramètres IVIM et suivre leur évolution au cours du temps
- Les paramètres d'imagerie ont été corrélés à la densité micro-vasculaire, aux marqueurs sériques de l'angiogenèses et au volume tumoral.

Perspectives : Applications translationnelles chez le patient

- Dans le prolongement de notre expérience chez le modèle murin, nous avons évalué l'apport de l'échographie Doppler dans le suivi des patients avec PMP.
- Nous avons étudié une autre technique d'imagerie fonctionnelle : l'analyse d'histogramme comme biomarqueur de la survie chez des patients atteints de CP colorectale non résécable.
- Nous avons évalué l'apport de l'IRM par rapport à la TDM dans le bilan préopératoire des CP.

3. Résultats

3.1 Etablissement d'un modèle murin de PMP pour évaluer et caractériser l'angiogenèse tumorale péritonéale :

L'utilisation de modèles animaux est la première étape nécessaire pour l'étude préclinique de la microcirculation tumorale *in vivo*. La croissance tumorale ainsi que l'action des traitements anti-cancéreux dépend en grande partie du microenvironnement tumoral dans laquelle la tumeur se développe. De plus, les modèles tumoraux animaux qui sont le plus souvent utilisés sont des tumeurs greffées en sous-cutané, qui permettent de visualiser directement le développement de la tumeur. Toutefois, ces modèles de greffes sous cutanées ne reconstituent pas un environnement tumoral complet, avec son tissu de soutien et tous ses facteurs de croissances.

L'utilisation de modèles orthotopiques permet en revanche, de reconstituer un environnement tumoral proche de la tumeur d'origine, avec son architecture. C'est pourquoi nous avons décidé de travailler sur deux modèles murins de greffe orthotopique de CP.

L'objectif de la première étape de notre travail a donc été triple :

1. Développer un modèle murin de PMP par xéngreffe orthotopique de tissu humain chez la souris nude, et le caractériser d'un point de vue histologique et immunohistochimique.
2. Evaluer une première technique de quantification non-invasive *in vivo* de l'angiogenèse tumorale et du développement tumoral par échographie Doppler dans ce modèle.
3. Enfin, nous avons testé l'effet d'un traitement anti-angiogénique, le bevacizumab chez ce modèle, et quantifié l'effet du traitement par échographie Doppler.

La réponse à ces objectifs a été apportée dans l'article présenté ci-dessous, publié dans *The American Journal of Pathology*.

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis au point un modèle murin de PMP obtenu par greffe intra-péritonéale de petits morceaux de PMP provenant de patients humains opérés. Nous avons ainsi pu établir 9 modèles murins de PMP de bas et de haut grade. Dans ces modèles murins, nous avons observé le développement de la tumeur avec augmentation visuelle du périmètre abdominal de la souris dans un délai initialement de 136 jours [116-166] mais qui s'est raccourci au fur et à mesure des passages de souris à souris jusqu'à une moyenne de 78 jours [42-115]. Nous avons expliqué ce résultat par la sélection au fur et à mesure des passages d'un contingent de plus en plus tissulaire ayant le pouvoir reproductif le plus élevé. Par ailleurs, nous avons observé peu de composante liquidienne et une prédominance de composante tissulaire dans ce modèle.

En histologie, nous avons pu confirmer par coloration trichromatique hématoxyline éosine safran (HES) la reproduction de l'architecture tissulaire du PMP lors du passage de l'humain à la souris. Enfin, les immuno-marquages par CK20, pancytokératines DAPI et pour le Ki67 ont confirmé l'origine digestive épithéliale de la tumeur, ainsi que sa paucicellularité. Nous avons aussi pu mettre en évidence la persistance d'un marqueur des cellules productrices de mucine (MUC2). La mutation Kras a été retrouvée à la fois chez l'un des patients ayant un PMP de haut grade et le modèle murin correspondant.

Les analyses par immunofluorescence ont montré une importante expression de marqueurs de la paroi endothéliale (anti-CD₃₁) et de la paroi des péricytes (anti-desmine) confirmant une importante angiogenèse dans cette tumeur peu cellulaire.

L'architecture du réseau capillaire micro-vasculaire a été étudiée et visualisée grâce à la technique de micro-angiographie. Nous avons ainsi pu visualiser le réseau capillaire extrêmement tortueux et irrégulier au sein de la tumeur. Sous traitement anti-angiogénique, nous avons aussi pu mettre en évidence une normalisation de l'aspect de ces vaisseaux.

Par l'échographie Doppler de l'artère mésentérique supérieure (AMS), nous avons observé une accélération des flux vasculaires au sein de l'AMS accompagnant le développement de la tumeur. En parallèle, nous avons pu montrer que les vitesses circulatoires restaient stables dans le tronc cœliaque.

Nous avons ensuite réalisé deux sets d'expérimentation :

Dans un premier set, nous avons comparé 2 groupes de souris greffées avec du PMP issues du même modèle :

- Un groupe de souris témoins
- Un groupe de souris traitées par anti-angiogénique (bêvacizumab)

Dans un second set, nous avons comparé 2 groupes de souris greffées avec du PMP issues du même modèle chez lesquelles une chirurgie de résection incomplète a été réalisée : l'objectif était de reproduire la situation clinique de la chirurgie de cytoréduction incomplète. On a comparé :

- Un groupe de souris traitées par chirurgie de résection seule
- Un groupe de souris traitées par chirurgie de résection puis traitées par anti-angiogéniques (bêvacizumab)

Les souris étaient sacrifiées lorsque leur poids atteignait 40 grammes. Dans ces deux sets expérimentaux, nous avons pu mettre en évidence :

- Un ralentissement de la croissance tumorale chez les souris traitées par anti-angiogéniques comparativement aux souris non traitées
- Ce ralentissement de la croissance tumorale s'accompagnait d'une réduction significative des flux dans l'artère mésentérique supérieure dans les deux sets.
- Une augmentation significative des marqueurs sériques de l'angiogenèse (VEGF, PlGF, et TGF- β) chez les souris PMP comparées à des souris témoins
- Une diminution significative de ces marqueurs sériques de l'angiogenèse chez les souris PMP traitées par anti-angiogéniques comparées aux souris PMP non traitées.

Nos résultats suggèrent donc une efficacité des traitements anti-angiogéniques sur le PMP et l'échographie Doppler semble être un outil intéressant dans le suivi de l'activité vasculaire de cette maladie.



ANIMAL MODELS

Orthotopic Animal Model of Pseudomyxoma Peritonei *An in Vivo Model to Test Anti-Angiogenic Drug Effects*

Anthony Dohan,^{*†} Ruben Lousquy,^{*} Clarisse Eveno,^{*‡} Diane Goere,[§] Dong Broqueres-You,^{*¶} Rachid Kaci,^{*||}
Jacqueline Lehmann-Che,^{**} Jean-Marie Launay,^{*††} Philippe Soyer,^{*‡} Philippe Bonnin,^{*‡‡} and Marc Pocard^{*‡}

Running title: Antiangiogenic Therapy in Pseudomyxoma Peritonei Model

Key Words: Pseudomyxoma peritonei; murine model; antiangiogenic therapy; Doppler Ultrasound; superior mesenteric artery.

ABSTRACT

Pseudomyxoma peritonei (PMP) is an uncommon peritoneal mucinous carcinomatosis confined to the peritoneal cavity. The rarity of PMP in humans makes evaluation of the disease biology and new therapeutic strategies difficult. Accordingly, there is a need for animal models of PMP. Human PMP tissue was intraperitoneally grafted and grew into nude mice, then constituted reliable and reproducible orthotopic models. Histological and immunostaining analysis was performed. Bevacizumab was injected twice a week either during tumor growth or after cytoreductive surgery. In vivo imaging of tumor angiogenesis was performed using barium sulfate or isolectin microangiography and Doppler ultrasound of the superior mesenteric artery (SMA). Tumor angiogenesis was confirmed by the presence of tortuous vascular networks with high levels of expression of CD31, Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, and Desmin. Doppler ultrasound of the SMA revealed a 2-fold increase in blood flow velocity compared to tumor free mice ($p < 0.001$). Bevacizumab administration was correlated with the normalization of tumor vascularity when injected during tumor growth and with the stabilization of the histological and hemodynamic findings when injected after cytoreductive surgery. Our PMP models mimic human PMP. Our results confirmed the presence of tumor angiogenesis related to PMP growth. Our murine model allows researchers to actually bench test and evaluate in preclinical studies the efficacy of new therapeutic strategies and antiangiogenic therapies.

INTRODUCTION:

Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a rare malignant disease characterized by the progressive, accumulation of mucinous tumor tissue in the peritoneal cavity without extraperitoneal growth, leading to intra-abdominal compression and a fatal outcome. Consensus is that PMP has an intestinal origin and results from the perforation of a mucinous appendiceal neoplasm.(1-4) Complete cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), is now a well-established treatment option for patients with PMP.(5-10) Despite the improved survival rate achieved with this combined treatment, this therapeutic option is not applicable to all patients, especially for those with coexisting causes of morbidity. Moreover, treatment failure and recurrence are not rare.(11)

Histopathologically, PMP is graded from disseminated peritoneal adenomucinosis (DPAM or low grade) to peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA or high grade) with an intermediate histological type (PMCA-I/D).(12) PMP presents as large patches of mucinous deposits that contain a few cells organized as a low-proliferative epithelium. The paucity of tumor cells may explain the relative lack of efficacy of the common cytotoxic chemotherapy regimens on PMP. To date, we are aware of only 2 case reports that have studied the potential impact of an antiangiogenic agent (i.e., bevacizumab) in PMP and reported a partial response.(13, 14) To improve the overall survival and recurrence-free survival rate, the development of new therapeutic strategies that combine chemotherapy and/or an antiangiogenic drug with cytoreductive surgery is of major importance.

Animal models of PMP should mirror the peritoneal growth pattern of PMP in humans and should also mirror the histopathological classification used in humans. In addition, such animal models should be appropriate for testing new antiangiogenic therapies and evaluating the tumor response. To our knowledge, there are only three published animal studies that describe the development of orthotopic xenografted PMP in animal models.(15, 16)

To date, the evaluation of patients with PMP is based on computed tomography and no functional imaging modality has a proven efficacy in the follow-up of these patients. Doppler ultrasound (DUS) has been successfully used to monitor the tumor blood supply in primary and secondary liver cancers.(17-21) The main blood supply of the PMP tumor arises from the superior mesenteric artery (SMA). We thus hypothesized that DUS of the SMA would provide an evaluation of the blood flow supplying the tumor vascular network. Indeed, it has been previously demonstrated that measurement of the blood flow velocity in the feeding artery upstream of the tumor vascular network allows for the semi-quantitative analysis of the development or the involution of the tumor vasculature.(17, 21, 22)

The goals of our study were threefold. First, we wanted to develop a murine model of PMP to investigate tumor angiogenesis in PMP. Second, we wished to evaluate the capabilities of DUS in depicting and quantifying the development or the involution of the tumor vasculature in this experimental murine model. Third, we wanted to investigate the effects of antiangiogenic therapies alone or as adjuvant treatments of PMP after incomplete surgical resection.

MATERIALS AND METHODS

Orthotopic murine model of PMP

Patients

All of the tissue samples were collected after Institutional Review Board approval and after informed consent was obtained from all of the patients. Tumor samples were obtained from 18 patients with histologically proven PMP that originated from an appendiceal mucinous neoplasm and who were treated with surgery at two different institutions between November 2009 and May 2012.

Animals

Five-week-old female athymic Swiss nude mice (Charles River Laboratories International Inc., Arbresle, France) weighing between 16 to 18 g were acclimatized for 1 week before tumor transplantation. The animals were maintained under specific pathogen-free conditions, and irradiated food and water were supplied *ad libitum*. During surgical procedures, the animals were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg) delivered intraperitoneally (Virbac, Carros, France). All of the experimental protocols and the animal procedures for the care and use of laboratory animals were conducted according to the guidelines of our institution and the Federation of European Laboratory Animal Science Association.

Tumor collection and implantation

The tumor samples were collected and immediately brought to the animal facility. The fresh tumor tissue was cut into 3×3×3 mm pieces. The tumor fragments were intraperitoneally implanted in 2 mice for each sample. A 1-cm midline laparotomy was performed, and six tumor pieces were placed in the peritoneal cavity in both sides of the subdiaphragmatic area, the flank and the pelvis. After implantation, the peritoneum and muscle were closed with one layer of Monocryl 5/0, and the skin was closed with staples.

Sampling and evaluation

The mice were carefully monitored and weighed twice a week. The mice were sacrificed when they weighed more than 40g. After sacrificing the mice, the macroscopic assessment of PMP was performed, during which a search for primary and metastatic tumors was carried out; these tumors were sampled for further analyses. The tumor samples were embedded in Optimal Cutting Temperature (OCT) compound or fixed in formalin.

Cytoreductive surgical procedure

Cytoreductive surgery was performed at 33g. Each mouse was anesthetized with 1.5% isoflurane in 100% O₂. A large midline incision was made, and maximum resection was performed with a clip applier. Lesions adjacent to digestive tract were not resected because of the high risk of a lethal wound. The peritoneum and muscle were closed with one layer of Monocryl 5/0, and the skin was closed with staples. Immediately after surgery, mice were given an analgesic drug (buprenorphine, Schering-Plough Europe, Brussels, Belgium) in a single subcutaneous dose of 0.1 mg/kg.

Ex vivo and in vivo characterization of orthotopic murine models

Histological and immunohistological analyses

Tissue from the mouse tumor was explanted after sacrifice, fixed with formalin and stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) and alcian blue. Histological classification was performed according to the three groups as described by Ronnett et al. (1, disseminated peritoneal adenomucinosis (DPAM); 2, peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA); and 3, intermediate histological type (PMCA-I/D)).(14)

Archival paraffin-embedded tissue blocks were cut into 4-5 microns sections and transferred to glass slides. After deparaffinization, antigen retrieval was carried out using citrate solution at pH=6.0. The slides were stained on an automated Benchmark immunostainer. The monoclonal anti-MUC-2 antibody (cloner Ccp58 - Novocastra, Newcastle, United Kingdom) was used at 1:100 dilutions. The epitope specifically recognized by the anti-MUC-2 antibody is Human Muc-2 glycoprotein (no crossreaction with Muc-1 or Muc-3 derived peptides). Slides were incubated with the above primary antibody for 1 hour at room temperature; thereafter, goat anti-mouse secondary antibody was applied and the reaction was developed using diaminobenzidine.

Additionally, tumor samples from each passage through passage 5 were embedded in OCT compound for the preparation of frozen tissue sections (5 µm-thickness), which were then fixed in acetone at 4°C for 10 minutes and immunostained as described. After washing, the non-specific sites were saturated for 20 minutes with BSA (10 g/L in PBS-1% Tween). The sections were then incubated for 1 hour with the following primary antibodies: anti-pan-cytokeratin antibody (1/100) (Abcam, Cambridge, USA) and anti-cytokeratin 20 (CK20) antibody (prediluted) (Abcam, Cambridge, USA), which are specific for colon cancer; an antibody against Ki67 (1/100) (Neomarker Inc. Fremont, CA, USA), which is a nuclear protein expressed in proliferating cells; antibodies against platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31) (1/50) (BD Pharmingen, Le Pont-de-Claix, France); an antibody against VE-cadherin (1/50) (Santa Cruz Biotechnology Tebu SA, Le Perray-en-Yvelines, France), which is a protein localized at the intercellular junctions of endothelial cells; an antibody against desmin (1/200) (Neomarker Inc. Fremont, CA, USA), which is a protein specific for smooth and striated muscle. After washing, the sections were incubated for 30 minutes with the appropriate secondary antibody (1/200) [Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse, goat anti-rabbit, or donkey anti-goat, or Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse, donkey anti-rat, or donkey anti-goat (Interchim, Asnieres, France)] and then washed with PBS-1% Tween. The primary antibody was omitted on sections that were used as negative controls. To perform double immunostaining, the sections were initially incubated with the first primary antibody, then with the second primary antibody, and finally with the appropriate secondary antibody. The histological sections were analyzed with a fluorescence microscope equipped with the appropriate filters (Observer.Z1; Carl Zeiss Inc.).

TP53 functionality and KRAS mutations analysis

Mutational analysis of *TP53* was performed using FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast), in accordance to the method described by Flaman et al (23)

This method requires frozen tumor samples and evaluates the transactivation activity of p53 on a p53-responsive promoter stably integrated in the yeast genome. RNA was extracted by phenol-chloroform method, reverse transcribed and p53 transcripts were amplified by PCR and transfected into yeast. Yeast colonies transformed with wild type or mutated TP53 sequences appear white and large, or red and small, respectively. TP53 status was considered mutated when: more than 10% of the yeast colonies were red and analysis using the split versions of the test could identify the defect in the 5' or 3' part of the gene.

The seven most frequent *KRAS* mutations on codon 12 and 13 were analysed by allelic discrimination after DNA extraction from selected FFPE-sections (>20% tumor cells) of the tumor samples using the QIAamp DNA minikit (Qiagen) according to manufacturer's

instructions Specific probes for each allele (mutated or not) were labelled with fluorescent reporter dyes at their 5' end and analysed by real time PCR on a LC480 (Roche) (24).

Microangiography

Conventional microangiography was performed in 5 grafted mice to characterize the tumor vascular network. Under anesthesia, a longitudinal laparotomy was performed, and the abdominal aorta was exposed by moving the tumor to the left side and then ligated upstream of the iliac bifurcation. A polyethylene catheter with monitored pressure and volume was introduced into the abdominal aorta to inject a contrast material (barium sulfate, 1 g/mL). Image acquisition was performed with a digital X-ray transducer (2100; Kodak Dental Systems, Atlanta, GA).(22)

Alternatively, performing the same surgical procedure in another 5 mice, we perfused 0.5 mL of heparinized saline and 0.8 mL of *bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 (IB4) conjugated to FITC (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) diluted with PBS to a concentration of 0.25 mg/mL. This tracer binds selectively to terminal α -galactose (IB4)(25) and is an endothelial cell-specific marker that was used to identify and characterize the neovessels in the tumor. Fifteen minutes later, the mice were sacrificed, and the tumors were harvested. After fixation, the tumor samples were analyzed with a computer-assisted Nikon fluorescence microscope with a digital camera (Eclipse TE200, Nikon Inc., Melville, New York). Because of the heterogeneous distribution of the vasculature and the presence of wide ranges of mucinous content, we did not quantify the density of the vessels.

Ultrasound examination

Ten Swiss nude PMCA-tumor-grafted and 10 age-matched normal mice had ultrasound measurements using a DUS instrument (Vivid 7, GE Medical Systems Ultrasound, Horten, Norway) equipped with a 12-MHz linear transducer as previously described.(22). Briefly, after sedation, the mice were placed on a heating blanket (38°C) in the left lateral prone position to avoid placing pressure on the abdomen with the transducer. The color Doppler mode was activated with an anterior longitudinal view of the abdomen crossing the longitudinal axis of the aorta. The SMA and celiac trunk were localized on the screen by their color-coded blood flow. A pulsed Doppler sample was then placed on the longitudinal axis of each vessel, and pulsed Doppler velocity waveforms were recorded. Peak-systolic, end-diastolic and time-averaged mean blood flow velocities (BFV) were measured according to the pulsed Doppler spectrum. The DUS recordings were repeated every two weeks from the initiation of the tumor graft up to 6 weeks.

Serum Angiogenesis markers

After sacrificing the mice, blood was collected into chilled tubes containing heparin (Sarstedt, France). The plasma concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PIGF) and transforming growth factor beta (TGF- β) were determined with ELISA tests (MMV00, DPG00 and MB100B, respectively) according to the manufacturer's instructions.

Treatment

In another set of experiments, we applied an antiangiogenic treatment in two models of peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA-1 and PMCA-2). Four weeks after the PMCA surgical graft, the mice were randomly assigned to two different groups. The mice in the treated groups were intraperitoneally (IP) injected twice a week with bevacizumab (5 mg/kg intraperitoneally, n=10 for PMCA-1 and n=10 for PMCA-2) according to prior publications. The mice in the control groups (n=10 for each experiment) received an equivalent volume of

phosphate-buffered saline (PBS). The mice were sacrificed when they weighed more than 40g. The serum angiogenesis markers (VEGF, PlGF and TGF- β) were quantified in these two groups 6 weeks after the tumor graft and compared to 5 age-matched non-grafted mice. In another set of experiments, after cytoreductive surgery was performed at the weight of 33g, the grafted mice were submitted to an antiangiogenic treatment with bevacizumab (n=11) versus PBS (n=9) intraperitoneally injected twice a week in an adjuvant setting. The mice were carefully monitored for 4 weeks with DUS and weighed weekly. The development of tumor growth was evaluated by following the increase in weight. Serum angiogenesis markers were also quantified.

Statistical Analysis

Results were expressed as the means \pm standard deviation (SD). Heart rate, blood flow velocities, and concentrations of serum angiogenesis markers were compared using an analysis of variance (ANOVA). Post hoc paired and unpaired Student's *t* tests were performed to identify which time point or which group differences accounted for the significant ANOVA. The survival probabilities were estimated using the Kaplan-Meier product-limit method (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). A *P*-value<0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Tumor growth in the animal models

Among the 18 intraperitoneally grafted, patient-retrieved PMP samples, 9 succeeded in growing, but growth occurred only once for one of the samples. Among the eight remaining samples, seven were similar to a peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA-1 to PMCA-7), and one was representative of a disseminated peritoneal adenomucinosis (DPAM). These eight models were considered to be reliable and reproducible orthotopic mouse models of PMP. The delay between successive tumor growths decreased from 136 days [116-166] after the first transplant to 78 days [42-115] after the fifth transplant. The take rates ranged from 80 to 100% for PMCA-1 to 7 and from 40 to 90% for DPAM. As observed in humans, the mice presented abdominal distension due to tumor growth. PMCA-1 to 7 were considered as more aggressive compared to DPAM because these tumors grew more quickly.

The typical initial intraperitoneal growth pattern was characterized by mucinous ascites accompanied by a variable number of "solid" mucinous tumor lesions of varying sizes. The solid tumor components were attached to the peritoneum and serosa of all of the intraperitoneal organs. No animal presented any metastatic lesions.

Microscopic assessment

The animal models of PMP reflect the histopathological classification after each transplant generation. In the mice, we confirmed with HES staining that DPAM developed from a low-grade appendiceal mucinous tumor. This subtype was characterized by widespread peritoneal deposits of abundant pools of extracellular mucin with strips of proliferative mucinous columnar epithelium with little cytologic atypia or mitotic activity (Supplementary Fig. 1A-B). PMCA consisted of a juxtaposition of glands formed by an abundant mucinous epithelium and/or signet ring cells and commonly had severe cytological atypia. This subtype had poorly differentiated architecture (Supplementary Fig. 1C-D). The pathological characteristics were conserved through the successive tumor passages with no change in the proportion of mucinous ascites and "solid" mucinous tumor lesions.

High levels of expression of pan-cytokeratin and CK20 as indicated with immunostaining were observed in the tumor through the successive tumor passages from mouse to mouse, which indicates that the human and digestive origin was maintained (Supplementary Fig. 2A-B). Low levels of DAPI immunostaining and the presence of only a few isolated Ki-67-positive tumor cells were observed, which verified the paucicellular and low proliferative characteristics of the tumor (Supplementary Fig. 2C-D).

Immunohistochemistry showed high levels of Cytoplasmic staining of tumor cells by the antibody anti-MUC-2 as well in the human tumor as after passages from mouse to mouse, confirming that tumor kept its biochemical characteristics with a high production of mucin (Supplementary Fig. 3A-B).

Molecular characteristics were also analyzed in the PMCA-2 model for initial patient and xenografted PMP in two mice. No alteration of the p53 functionality (TP53 WT) was detected in the initial human sample nor in the xenografted tumors. Nevertheless, an activating p.G12V mutation of the *KRAS* gene was detected in the human sample and in the two xenografted mice, highlighting that the xenografted tumors reflect the human origin at the molecular level.

Angiogenesis analysis

Tumor angiogenesis was visualized with anti-CD31 and anti-VE-cadherin antibodies, which are specific for endothelial cells (Supplementary Fig. 2E-G), and an anti-desmin antibody,

which stained pericytes (Supplementary Fig. 2H). Double staining confirmed the co-localization of the VE-cadherin and desmin immunoreactivity.

Microangiography

After *in vivo* intra-aortic injection of barium sulfate (Fig. 1A) or *bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 (IB4) (Fig. 1B), microangiography revealed the arterial vascular network and showed the abdominal aorta, the left and right renal arteries, the gastric arteries, the hepatic arteries and the superior mesenteric artery. The vascular networks downstream of the SMA presented many functional tortuous and irregular newly developed vessels going toward and through the intraperitoneal tumor.

Ultrasound examination

The tumor growth and development of ascites were observed by DUS (Fig. 2A). In the control mice, time-averaged mean-BFV measurements in the SMA and in the celiac trunk remained stable: $6.9 \pm 1.9 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and $12.5 \pm 4.4 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively (Fig. 2B-C). In contrast, in the tumor group, the mean-BFV in the SMA increased from the time of the tumor graft to the time of sacrifice (from 6.9 ± 1.9 to $13.8 \pm 2.1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $p < 0.001$), although the mean-BFV remained stable in the celiac trunk (Fig. 2D). The 1.75-fold increase in the mean-BFV in the SMA compared with the control values ($p < 0.001$) was representative of the development of the vascular network downstream from the artery, i.e., the number of opened and dilated vessels, and thus indicates tumor angiogenesis of the peritoneal tumor.

Treatments

Treatment with an antiangiogenic agent (bevacizumab) alone without cytoreductive surgery.

Survival was defined by the time required to reach the weight of 40g. Mice in the PMCA-1-grafted and PMCA-2-grafted mouse models treated with bevacizumab had a significantly greater survival time than the mice in the control groups without treatment (Fig. 3A-B). For the PMCA-1 model, the median survival time was 79.8 days [45-103] in the treated group ($n=10$) and 58.4 days [45-68] in the control group ($n=10$, $p < 0.001$, HR=0.12; 0.03-0.47). For the PMCA-2 model, the median survival time was 81.6 days [54-126] in the treated group ($n=9$) and 58.2 days [51-70] in the control group ($n=9$, $p=0.002$, HR=0.16; 0.05-0.57).

The plasma concentrations of VEGF, PIGF, and TGF- β in the 5 healthy ungrafted mice were $17.9 \pm 2.7 \text{ ng/L}$, $20.9 \pm 4.1 \text{ ng/L}$ and $4.5 \pm 2.9 \text{ ng/L}$, respectively. In the PMCA-1 model, the control mice ($n=5$) presented dramatically increased plasma concentrations of $140.7 \pm 19.5 \text{ ng/L}$, $203.4 \pm 55.2 \text{ ng/L}$ and $28.1 \pm 5.4 \text{ ng/L}$ for VEGF, PIGF, and TGF- β , respectively ($p < 0.001$, compared to the healthy mice). In the bevacizumab-treated mice ($n=5$), the serum levels were lower compared with the untreated grafted mice, and were decreased to $50.6 \pm 5 \text{ ng/L}$ ($p=0.005$), $54.2 \pm 13.4 \text{ ng/L}$ ($p=0.014$) and $14.1 \pm 3.5 \text{ ng/L}$ ($p=0.047$), respectively, for VEGF, PIGF, and TGF- β . However, the serum levels remained elevated compared with the healthy mice ($p < 0.01$) (Fig. 4A). After treatment with bevacizumab, the vessels were more organized, regular and straight as indicated by microangiography using IB4 in conjunction with FITC (Fig. 1C-D).

Treatment with an antiangiogenic agent (bevacizumab) after cytoreductive surgery.

After surgery, all of the mice presented lower weights ($p < 0.01$). The PBS-treated mice had a rapid recurrence of the PMP with an increase in weight and abdominal volume (Fig. 5A). Moreover, all of the PBS-treated mice reached the cut-off weight of 40g within the first four weeks following resection. The mean-BFV recorded in the SMA increased to 190% 4 weeks after surgery ($p < 0.01$) without any decrease immediately after surgery (Fig. 5B). The mean-

BFV recorded in the celiac trunk remained unchanged (Fig. 5C). In contrast, the bevacizumab-treated mice did not present any increase in their weight or in their abdominal volume until the 4th week, (i.e., at the end of the follow-up). Moreover, they had lower weights at 4 weeks compared with the untreated mice ($p < 0.05$). At the 4th week, the mean-BFVs in the SMA decreased to 75% of the value recorded before surgery ($p < 0.05$). Moreover, they were lower compared with those recorded in the untreated mice at the 4th week of follow-up ($p < 0.001$) (Fig. 5B). The mean-BFV remained unchanged in the celiac trunk during the first 3 weeks after surgery and the introduction of antiangiogenic treatment but decreased at the 4th week compared to the untreated mice ($p < 0.01$) (Fig. 5C). The plasma concentrations of VEGF, PlGF, and TGF- β in the mice treated with surgery alone were 178.6 ± 42.4 ng/L, 12.82 ± 3.79 ng/L and 65.6 ± 7.3 ng/L, respectively, while the levels of these markers decreased in the mice treated with surgery in combination with bevacizumab to 41.5 ± 17.4 ng/L ($p < 0.001$), 4.6 ± 1.6 ng/L ($p < 0.001$) and 23.4 ± 7.0 ng/L ($p < 0.001$), respectively, for VEGF, PlGF, and TGF- β . However, the serum levels remained elevated compared with the healthy mice ($p < 0.01$) (Fig. 4B).

DISCUSSION

We established eight reliable and reproducible *in vivo* models of PMP in immune-compromised nude mice, including one DPAM model and seven PMCA models. The tumors resulting from the intraperitoneal implantation of PMP retained histological, immunohistological, molecular and topographical characteristics similar to those in humans. The immunostaining analysis highlighted the presence of vessels within the tumor associated with a few isolated Ki-67-positive tumor cells, thus confirming the low proliferation characteristic of the tumor and this tumor's low sensitivity to standard chemotherapy.(26)

Using our models, we were also able to demonstrate with microangiography and DUS the actual *in vivo* development of tumor angiogenesis. Moreover, we also demonstrated a correlation between the mean-BFV as measured in the SMA with DUS and the body weight. Finally, we illustrated the antiangiogenic effect of bevacizumab, which manifested as a slower tumor progression.

To our knowledge, our models are among the first mouse models of PMP. We found in the literature only three publications that reported animal models of PMP.(15, 27, 28) Flatmark et al. published five mouse models of human PMCA.(16, 27) Indeed, three of the five models consisted of mucinous peritoneal carcinomatosis from various origins. In addition, two of the five models were classified as PCAM-I according to Ronnett's classification that corresponded to tumors with a moderate degree of aggressiveness. In their last study, Flatmark et al. successfully tested several intraperitoneal chemotherapies and a new immunotoxin immediately after the graft. Although their model is very interesting, they intraperitoneally inject mucinous ascites and not solid tumor tissue; therefore, their model is more liquid.(28) Moreover, no study has tested any therapy in an adjuvant setting or after cytoreductive surgery.

Chua et al. have created three models of histologically proven DPAM in rats.(15) Although they reported a take rate of 100% within 3 months after the grafts, they did not provide any information regarding the conservation of their model, which makes their model difficult to reproduce.(15) In addition, similar to Flatmark et al., the models of Chua et al. corresponded to a benign subtype of PMP, precluding the meaningful assessment of antiangiogenic treatments. The histopathological subtype of a tumor is an independent predictor of poor progression-free survival and poor overall survival.(5) Consequently, the assessment of antiangiogenic drugs should be performed on the most aggressive models of PMP. In our study, we developed PMCA animal models of the most aggressive subtypes, which are the most useful for evaluating antiangiogenic treatments.

Angiogenesis has become a new area for intensive research in imaging. The quantification of angiogenesis requires new models and more refined tools or the implementation of functional applications of well-established techniques for monitoring the response to newly developed antiangiogenic drugs. The development of techniques to quantify tissue activity may help predict tumor sensitivity to a specific treatment and allow for the early detection of the absence of a response to new and expensive therapies that are not free from side effects.

Non-invasive functional imaging modalities, such as magnetic resonance imaging, dynamic contrast enhanced computed tomography, and positron emission tomography, have been used for the assessment of the vessels and microcirculation in animals. However, the limitations of these techniques include a high cost and limited availability. For preclinical studies in small animals, we require non-invasive methods that ideally would be reliable, rapid, reproducible, easy to repeat during a prolonged follow-up and affordable. Two-dimensional color-coded pulsed DUS for the measurement of BFV in tumor-feeding vessels

provides a powerful tool for the *in vivo* evaluation of tumor growth and the assessment of neovascularization in preclinical studies and can be a useful technique to assess treatment efficacy.(19-21)

We used the SMA mean-BFV recordings to assess the functionality and density of the downstream vessels. In our study, we found greater mean-BFVs in the SMAs of mice with peritoneal tumors containing abnormal vessels. The peritoneal vasculature is mainly supplied by the SMA. According to our results, mean-BFV measurements in the SMA could be an indirect indication of the development of vessels in the peritoneal tumor and constitute a useful tool for the assessment of neovascularization in PMP in mice. The results of the DUS, along with an increased abnormal vessel density observed with microangiography and an increase in the blood markers of angiogenesis, reinforce our hypothesis that our orthotopic murine models of PMP are relevant to test angiogenesis as well as the putative beneficial effects of antiangiogenic therapies.

The potentially beneficial effects of antiangiogenic therapies have led to the development of various drugs that require preclinical studies in animals to evaluate their efficacy and toxicity before clinical trials can be initiated. The role of angiogenesis and vascular remodeling in the development of cancer has been largely demonstrated.(29, 30) Consequently, tumor vessels have become an important target in cancer therapy with the development of novel targeted therapies.(31-33) However, these clinical developments appear to have more challenges to controlling tumor growth such that preclinical studies in small animals with the evaluation of tumor angiogenesis are required. We postulated that PMP models could be utilized for testing the efficacy of new antiangiogenic drugs because of the PMP tumors grow slowly. Because of the associated antitumor effect of the majority of antiangiogenic agents, testing only the antiangiogenic function, apart from the antitumor function, is difficult with common cancers. Indeed, the low proliferative profile of PMP associated with neo-angiogenesis allows for the evaluation of the efficacy of antiangiogenic drugs without any bias induced by an anti-proliferative effect. PMP is a rare disease, but this animal model could offer a new possibility to replace the Matrigel test that is usually proposed. Indeed, bevacizumab induced a significant delay in tumor growth according to our experiments.

Recent studies have revealed that anti-VEGF therapy may have a limited effect on tumor vessels,(34-36) highlighting the importance of developing other antiangiogenic strategies for cancer treatment. Other therapeutic targets may be explored through identifying cytotoxic drugs that target the atypical cells or disturb the mucinous excretion component of the tumor cells. Importantly, there is a need to recognize why conventional DNA-damaging cytotoxic drugs have a limited efficacy in PMP. Indeed, the majority of PMP contains large amounts of mucin but is paucicellular. Anti-inflammatory drugs, could inhibit extracellular mucin production in PMP by targeting inflammatory cascades and may increase the disease-free interval or reduce the extent or frequency of morbid cytoreductive surgeries.(37)

Our study has several limitations. First, in xenograft models, tumor vessel formation originates from the host mouse. The loss of human stromal cells was reported in a large colon cancer xenograft panel that was recently published.(38) For this reason, it could be postulated that some drugs may be ineffective, or less effective, because the drugs are targeted to human vessels and not to mouse vessels. We did not observe such an occurrence in our models, but such a situation is theoretically possible. Second, DUS is an operator-dependent technique. Therefore, sampling of the mean-BFV was repeated five times and averaged to limit intra-observer variability. Moreover, the investigator performing the DUS was blinded to the treatment for each mouse. Third, although we demonstrated angiogenesis in PMP, because of the poor cellularity inside the tumor and the amount of non-vascularized mucinous component, this angiogenesis does not account for the global increase in blood flow in the

SMA. However, isolectin microangiography indicated irregular and tortuous neovessels in the tumor. It is likely that further experimentation with *in vivo* functional imaging of the tumor will help to understand the changes in tumor vascularity in terms of permeability and changes in the size of the vessels.

In conclusion, we established eight reproducible murine models of PMP, which are very similar to human PMP, particularly regarding the local peritoneal development and the absence of metastasis. Moreover, the human histological features of the tumor are retained in the mouse. In this model, we highlighted the role of tumor angiogenesis even for this paucicellular tumor. The antiangiogenic drug (bevacizumab) has proven benefit with respect to the reduction of tumor microvessel density as revealed with DUS and the normalization of the microvessels as well as when this drug is introduced as an adjuvant therapy after cytoreductive surgery. This promising adjuvant therapy will help to avoid a recurrence of the disease and the re-accumulation of mucin, which characterizes the failure of surgical treatments and which is responsible for repeated treatment and increased morbidity.

Acknowledgements: Raphaëlle AUDOLLENT, Aurore RAMPANOU, Isabelle MADELAINE, Nathalie JOURDAN, Judith NEMETH

REFERENCES

1. Cuatrecasas M, Matias-Guiu X, Prat J: Synchronous mucinous tumors of the appendix and the ovary associated with pseudomyxoma peritonei. A clinicopathologic study of six cases with comparative analysis of c-Ki-ras mutations, *Am J Surg Pathol* 1996, 20:739-746
2. Guerrieri C, Franlund B, Fristedt S, Gillooley JF, Boeryd B: Mucinous tumors of the vermiform appendix and ovary, and pseudomyxoma peritonei: histogenetic implications of cytokeratin 7 expression, *Hum Pathol* 1997, 28:1039-1045
3. Ronnett BM, Shmookler BM, Diener-West M, Sugarbaker PH, Kurman RJ: Immunohistochemical evidence supporting the appendiceal origin of pseudomyxoma peritonei in women, *Int J Gynecol Pathol* 1997, 16:1-9
4. Szych C, Staebler A, Connolly DC, Wu R, Cho KR, Ronnett BM: Molecular genetic evidence supporting the clonality and appendiceal origin of Pseudomyxoma peritonei in women, *Am J Pathol* 1999, 154:1849-1855
5. Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, Levine EA, Glehen O, Gilly FN, Baratti D, Deraco M, Elias D, Sardi A, Liauw W, Yan TD, Barrios P, Gomez Portilla A, de Hingh IH, Ceelen WP, Pelz JO, Piso P, Gonzalez-Moreno S, Van Der Speeten K, Morris DL: Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, *J Clin Oncol* 2012, 30:2449-2456
6. Elias D, Gilly F, Quenet F, Bereder JM, Sideris L, Mansvelt B, Lorimier G, Glehen O: Pseudomyxoma peritonei: a French multicentric study of 301 patients treated with cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy, *Eur J Surg Oncol* 2010, 36:456-462
7. Miner TJ, Shia J, Jaques DP, Klimstra DS, Brennan MF, Coit DG: Long-term survival following treatment of pseudomyxoma peritonei: an analysis of surgical therapy, *Ann Surg* 2005, 241:300-308
8. Moran B, Baratti D, Yan TD, Kusamura S, Deraco M: Consensus statement on the loco-regional treatment of appendiceal mucinous neoplasms with peritoneal dissemination (pseudomyxoma peritonei), *J Surg Oncol* 2008, 98:277-282

9. Smeenk RM, Verwaal VJ, Antonini N, Zoetmulder FA: Progression of pseudomyxoma peritonei after combined modality treatment: management and outcome, *Ann Surg Oncol* 2007, 14:493-499
10. Sugarbaker PH: New standard of care for appendiceal epithelial neoplasms and pseudomyxoma peritonei syndrome?, *Lancet Oncol* 2006, 7:69-76
11. Yan TD, Chu F, Links M, Kam PC, Glenn D, Morris DL: Cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma: non-mucinous tumour associated with an improved survival, *Eur J Surg Oncol* 2006, 32:1119-1124
12. Ronnett BM, Yan H, Kurman RJ, Shmookler BM, Wu L, Sugarbaker PH: Patients with pseudomyxoma peritonei associated with disseminated peritoneal adenomucinosis have a significantly more favorable prognosis than patients with peritoneal mucinous carcinomatosis, *Cancer* 2001, 92:85-91
13. Sun WL, Hutarew G, Gradl J, Gratzl M, Denz H, Fiegl M: Successful antiangiogenic combination therapy for pseudomyxoma peritonei with bevacizumab and capecitabine, *Cancer Biol Ther* 2009, 8:1459-1462
14. Winer I, Buckanovich RJ: Bevacizumab for the Treatment of Non-Resectable Pseudomyxoma peritonei Associated with Mucinous Ovarian Tumor of Low Malignant Potential - A Comparison of Two Cases, *Case Rep Oncol* 2009, 3:1-8
15. Chua TC, Akther J, Yao P, Morris DL: In vivo model of pseudomyxoma peritonei for novel candidate drug discovery, *Anticancer Res* 2009, 29:4051-4055
16. Flatmark K, Davidson B, Kristian A, Stavnes HT, Forsund M, Reed W: Exploring the peritoneal surface malignancy phenotype--a pilot immunohistochemical study of human pseudomyxoma peritonei and derived animal models, *Hum Pathol* 2010, 41:1109-1119
17. Berge M, Bonnin P, Sulpice E, Vilar J, Allanic D, Silvestre JS, Levy BI, Tucker GC, Tobelem G, Merkulova-Rainon T: Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma, *Am J Pathol* 2010, 177:3192-3201
18. Delorme S, Haberkorn U, Kinscherf R, Zuna I, Bahner ML, van Kaick G: Changes of tumor vascularity during gene therapy monitored with color Doppler US, *Ultrasound Med Biol* 2001, 27:1595-1603
19. Eveno C, Le Henaff C, Audollent R, Soyer P, Rampanou A, Nemeth J, Brouland JP, Dupuy E, Pocard M, Bonnin P: Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models, *Ultrasound Med Biol* 2012, 38:1195-1204
20. Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, Oura H, Tijeras-Raballand A, Schmidt T, Loges S, Albrecht I, Jonckx B, Vinckier S, Van Steenkiste C, Tugues S, Rolny C, De Mol M, Dettori D, Hainaud P, Coenegrachts L, Contreres JO, Van Bergen T, Cuervo H, Xiao WH, Le Henaff C, Buyschaert I, Kharabi Masouleh B, Geerts A, Schomber T, Bonnin P, Lambert V, Haustreaete J, Zacchigna S, Rakic JM, Jimenez W, Noel A, Giacca M, Colle I, Foidart JM, Tobelem G, Morales-Ruiz M, Vilar J, Maxwell P, Vinores SA, Carmeliet G, Dewerchin M, Claesson-Welsh L, Dupuy E, Van Vlierberghe H, Christofori G, Mazzone M, Detmar M, Collen D, Carmeliet P: Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PlGF inhibition in cancer and eye disease, *Cell* 2010, 141:178-190
21. Vincent F, Bonnin P, Clemessy M, Contreres JO, Lamande N, Gasc JM, Vilar J, Hainaud P, Tobelem G, Corvol P, Dupuy E: Angiotensinogen delays angiogenesis and tumor growth of hepatocarcinoma in transgenic mice, *Cancer Res* 2009, 69:2853-2860
22. Bonnin P, Villemain A, Vincent F, Debbabi H, Silvestre JS, Contreres JO, Levy BI, Tobelem G, Dupuy E: Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma, *Ultrasound Med Biol* 2007, 33:561-570

23. Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, Charbonnier F, Martin C, Chappuis P, Sappino AP, Limacher IM, Bron L, Benhattar J, et al.: A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:3963-3967
24. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C, Andre T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P: KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab, *J Clin Oncol* 2008, 26:374-379
25. Goldstein IJ, Winter HG: The *Griffonia simplicifolia* I-B4 isolectin. A probe for alpha-D-galactosyl end groups, *Subcell Biochem* 1999, 32:127-141
26. Nakakura EK: Pseudomyxoma peritonei: more questions than answers, *J Clin Oncol* 2012, 30:2429-2430
27. Flatmark K, Reed W, Halvorsen T, Sorensen O, Wiig JN, Larsen SG, Fodstad O, Giercksky KE: Pseudomyxoma peritonei--two novel orthotopic mouse models portray the PMCA-I histopathologic subtype, *BMC Cancer* 2007, 7:116
28. Flatmark K, Guldvik IJ, Svensson H, Fleten KG, Ann Florenes V, Reed W, Giercksky KE, Fodstad O, Andersson Y: Immunotoxin targeting EpCAM effectively inhibits peritoneal tumor growth in experimental models of mucinous peritoneal surface malignancies, *Int J Cancer* 2013,
29. Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature* 2000, 407:249-257
30. Folkman J: Angiogenesis-dependent diseases, *Semin Oncol* 2001, 28:536-542
31. Davis DW, McConkey DJ, Abbruzzese JL, Herbst RS: Surrogate markers in antiangiogenesis clinical trials, *Br J Cancer* 2003, 89:8-14
32. Fox SB, Gasparini G, Harris AL: Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs, *Lancet Oncol* 2001, 2:278-289
33. Scappaticci FA: Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies, *J Clin Oncol* 2002, 20:3906-3927
34. Helfrich I, Scheffrahn I, Bartling S, Weis J, von Felbert V, Middleton M, Kato M, Ergun S, Schadendorf D: Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma, *J Exp Med* 2010, 207:491-503
35. Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, Kahnoski R, Futreal PA, Furge KA, Teh BT: Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma, *Cancer Res* 2010, 70:1063-1071
36. Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, Johnson M, Lusic AJ, Cohen DA, Iruela-Arispe ML, Wu L: Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy, *Blood* 2010, 115:1461-1471
37. Choudry HA, Mavanur A, O'Malley ME, Zeh HJ, Guo Z, Bartlett DL: Chronic anti-inflammatory drug therapy inhibits gel-forming mucin production in a murine xenograft model of human pseudomyxoma peritonei, *Ann Surg Oncol* 2012, 19:1402-1409
38. Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goere D, Mariani P, Landron S, Bigot L, Nemati F, Dartigues P, Weiswald LB, Lantuas D, Morgand L, Pham E, Gonin P, Dangles-Marie V, Job B, Dessen P, Bruno A, Pierre A, De The H, Soliman H, Nunes M, Lardier G, Calvet L, Demers B, Prevost G, Vrignaud P, Roman-Roman S, Duchamp O, Berthet C: Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer, *Clin Cancer Res* 2012, 18:5314-5328

FIGURES

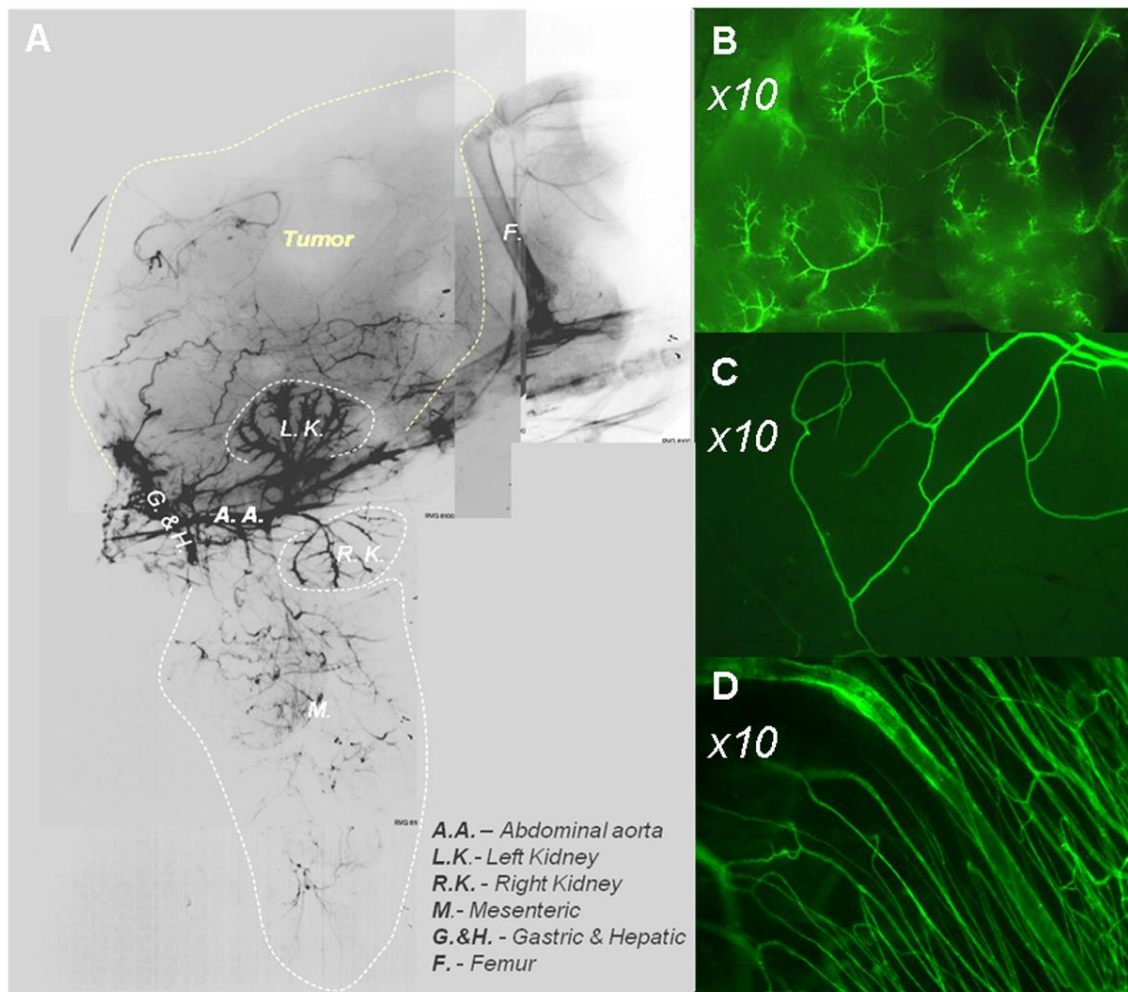


Figure 1. Representative computed photomicroangiographs performed with a digital X-ray transducer in a 12-week-old mouse with PMP (A) (A.A., abdominal aorta; L.K., left kidney; R.K., right kidney; M., superior mesenteric artery; G. and H., gastric and hepatic vessels; F., femur). Representative images of neoangiogenesis in PMP after *in vivo* intra-aortic injection of IB4 (green fluorescence) in untreated control mice (B). After the 6 weeks bevacizumab treatment, the tumor vessels appeared more regular, straight and organized (C, D).

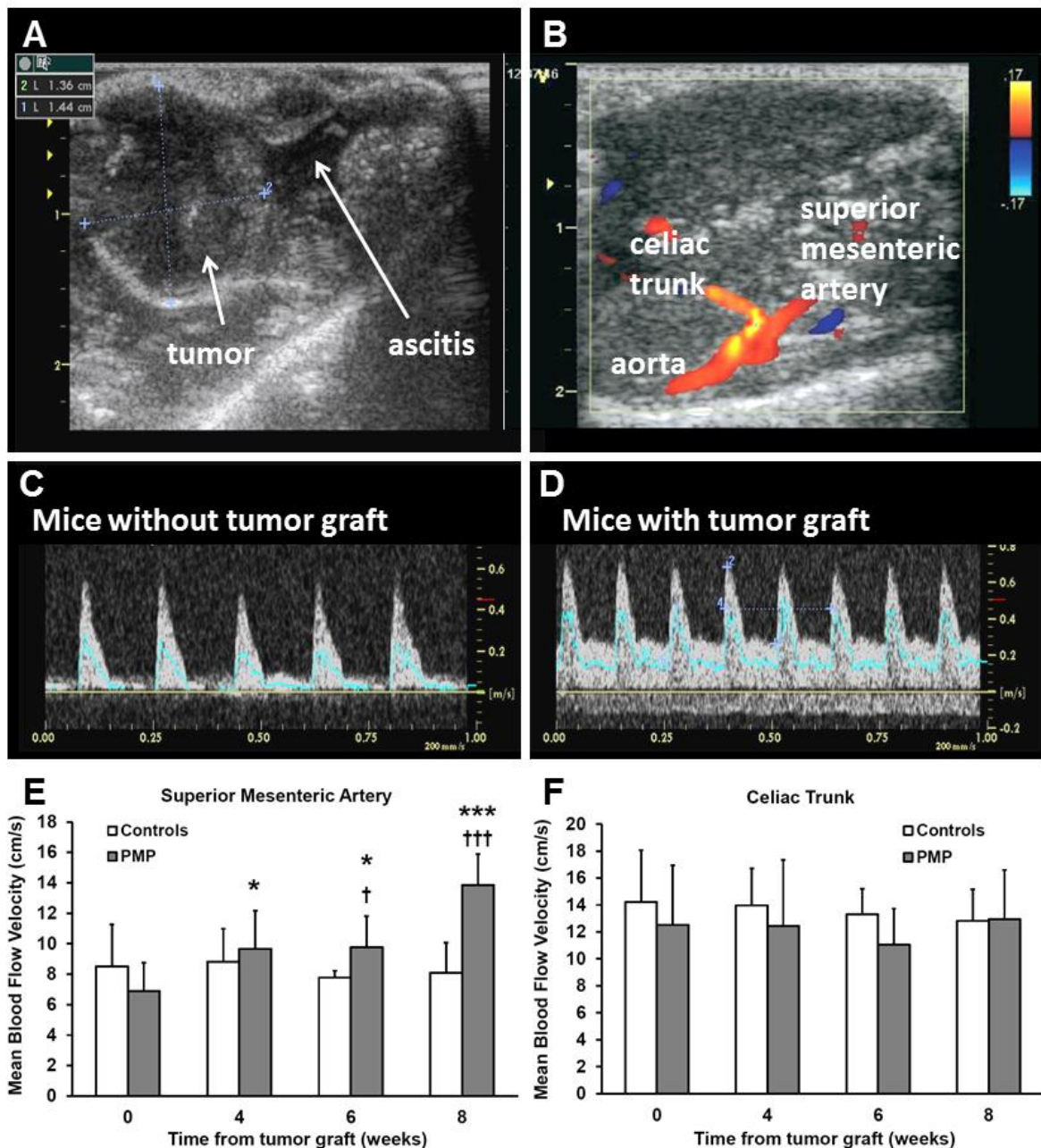


Figure 2. Two-dimensional DUS of the abdomen of a 12-week-old mouse with PMP showing solid tumor and ascites (A). Anterior longitudinal view of the abdomen crossing the longitudinal axis of the aorta with the SMA and celiac trunk revealed by color-coded Doppler ultrasound (B). Representative blood flow velocity (BFV) waveforms recorded in the SMA in ungrafted (C) and PMP-grafted mice (D); the blue line represents the time-averaged mean-BFV. Changes in the mean-BFV in the SMA and in the celiac trunk from the time of the tumor graft to 6 weeks afterward (n=10) (E, F). The mean-BFV remained constant in the celiac trunk but increased markedly in the SMA (* p<0.05, *** p<0.001 vs. the beginning of the recordings just after tumor graft; †† p<0.05, ††† p<0.001 vs. healthy mice, n=10).

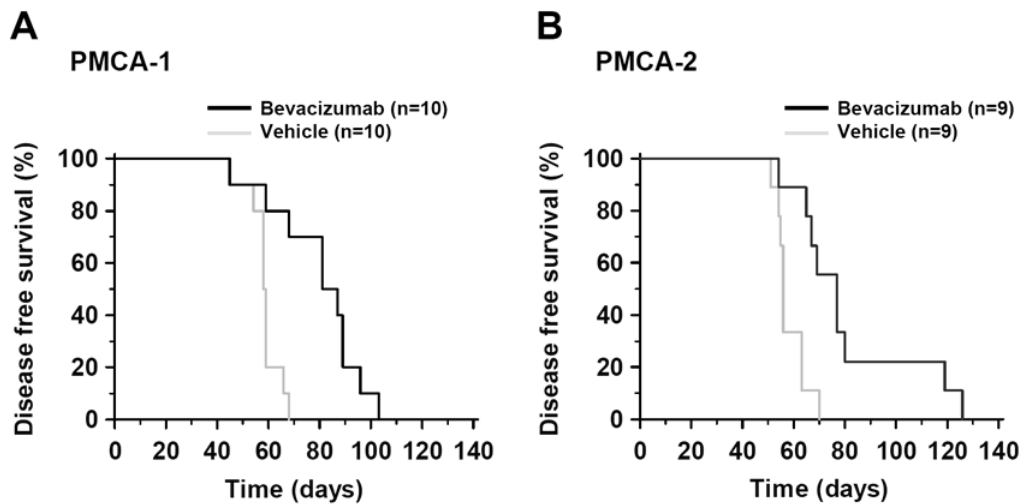


Figure 3 Kaplan-Meier analysis of survival in intraperitoneal tumor-grafted mice injected twice a week with bevacizumab (5 mg/kg) compared with mice injected with vehicle (control mice). First model of PMCA (PMCA-1) (**A**). Second model of PMCA (PMCA-2) (**B**). Mice treated with bevacizumab had a significantly longer survival time than the mice in the control groups in both models ($p < 0.001$, Hazard ratio = 8.7318 and $p < 0.001$, Hazard ratio = 7.0511 respectively).

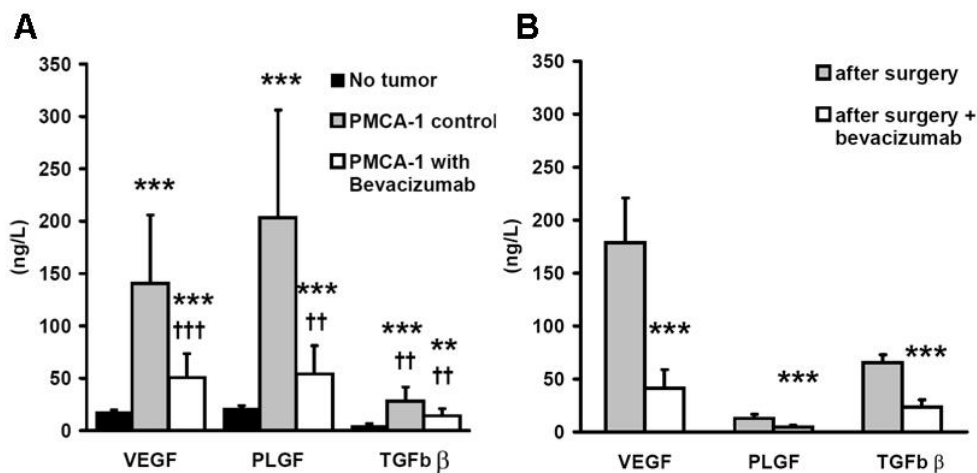


Figure 4. Analysis of serum angiogenesis markers (VEGF, PLGF and TGF- β). The expression levels of VEGF, PLGF and TGF- β were significantly increased in PMP-grafted mice ($n=5$) compared with healthy mice ($n=5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); the expression levels were decreased in the PMP-grafted mice that were injected twice a week with bevacizumab (5 mg/kg) ($n=5$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ vs the vehicle group) but remained elevated compared with the control group (**A**). Analysis of serum angiogenesis markers (VEGF, PLGF and TGF- β) in healthy mice ($n=5$), in PMP-grafted mice treated with cytoreductive surgery and PBS ($n=9$) and in grafted mice treated with cytoreductive surgery and bevacizumab injected twice a week (5 mg/kg, $n=11$). The expression levels were decreased in the bevacizumab-treated group (††† $p < 0.001$ vs the vehicle group) but remained elevated compared with the control group (**B**).

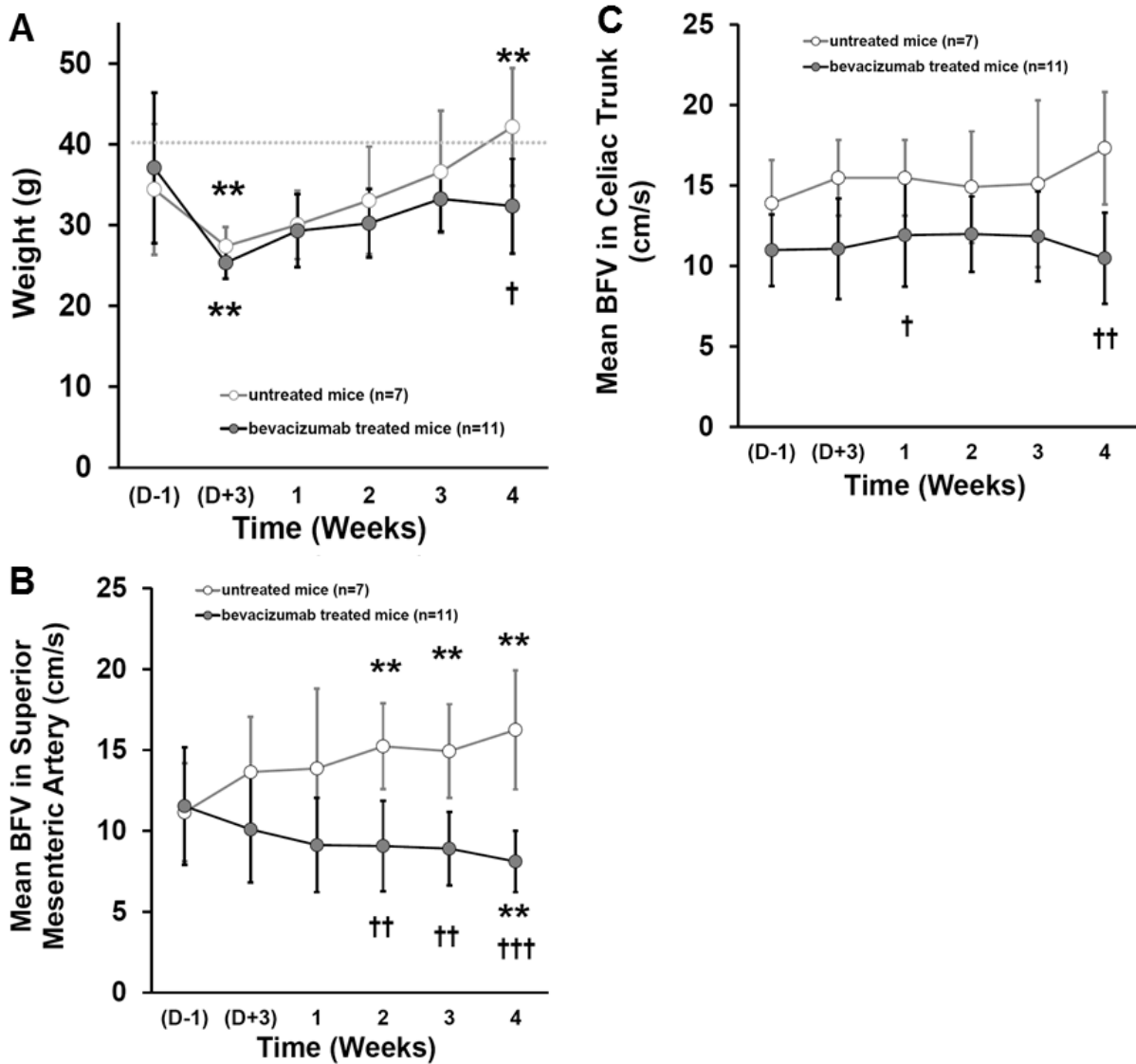
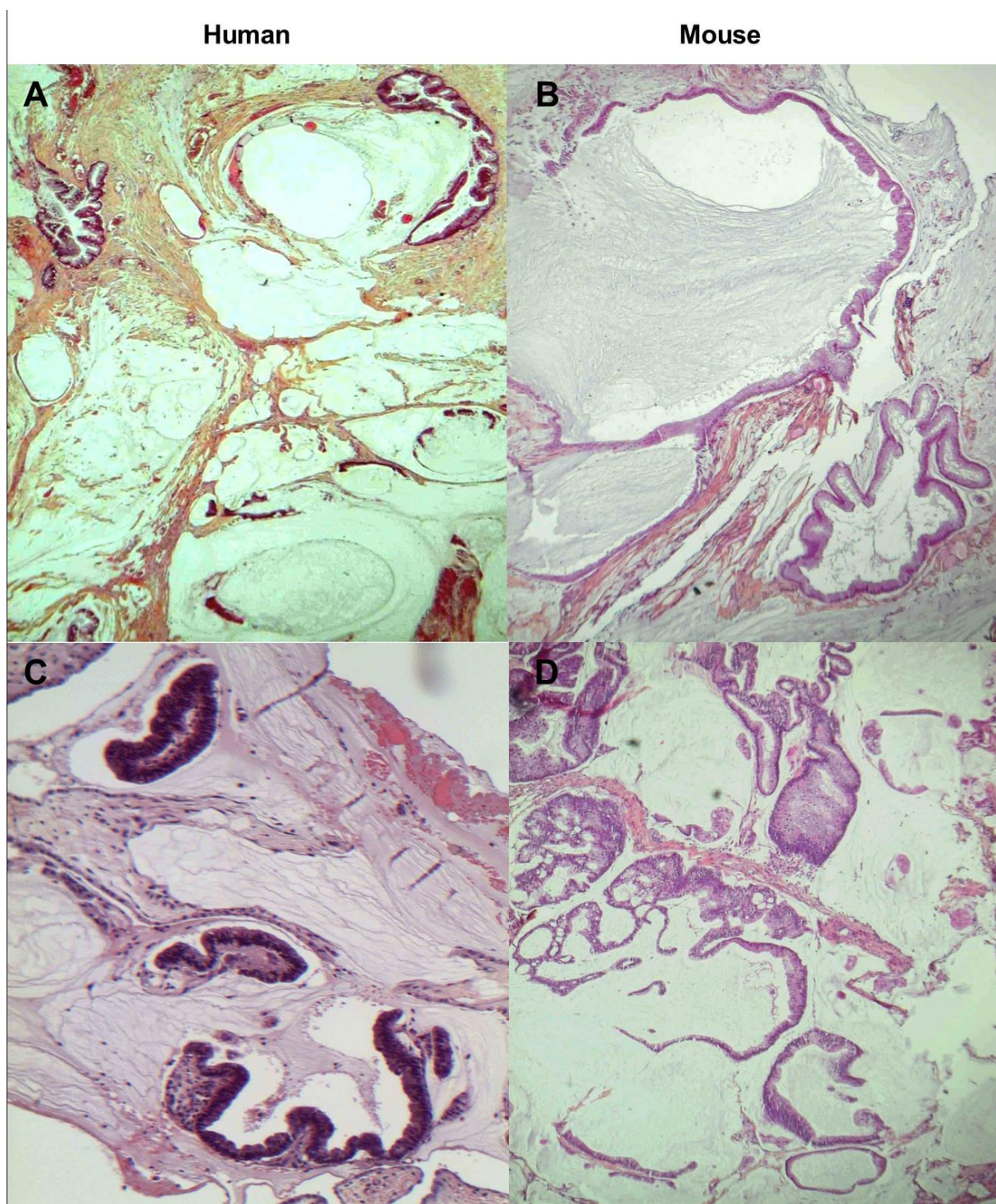
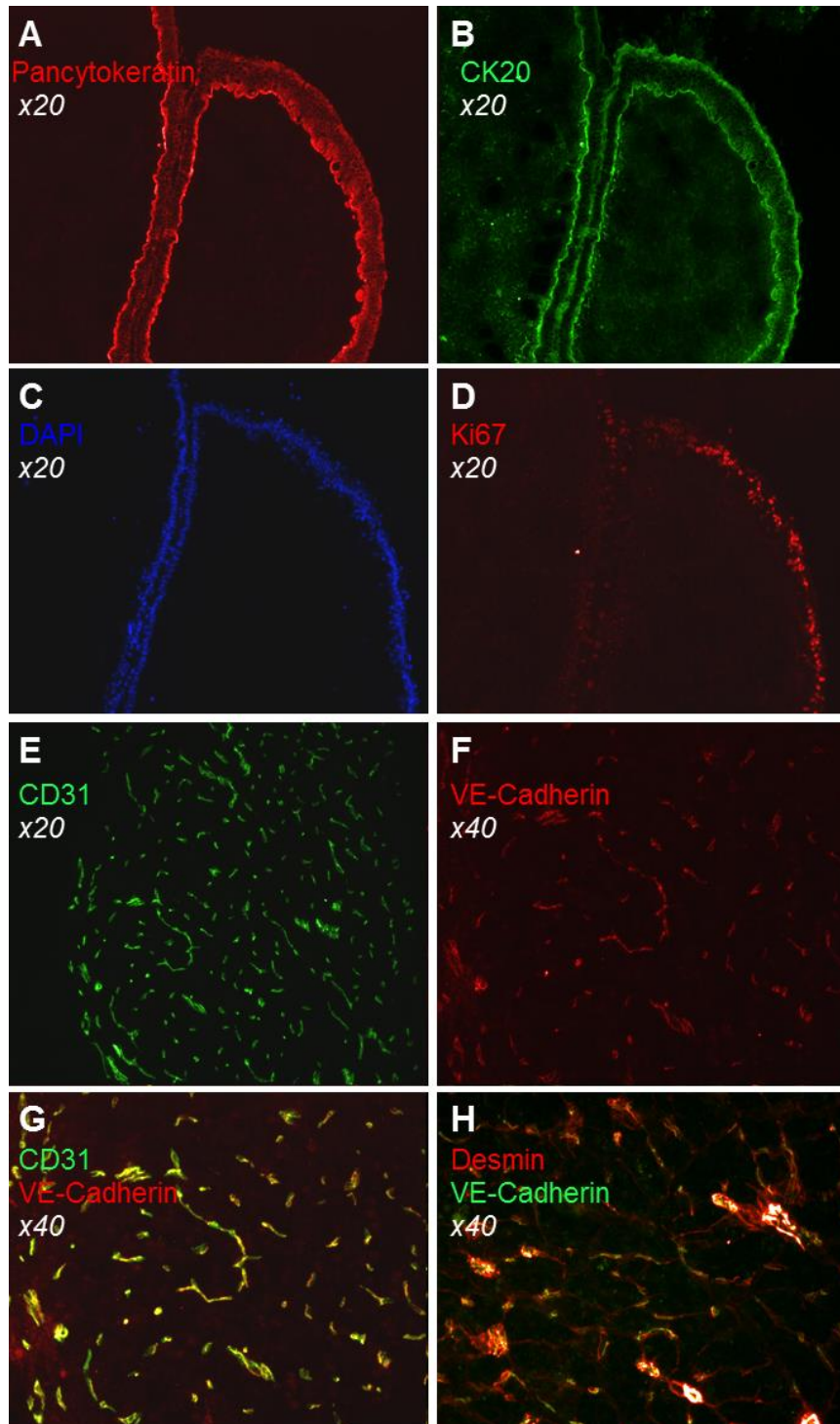


Figure 5. Treatment with an antiangiogenic agent (bevacizumab) after cytoreductive surgery. All of the mice had reached 35-40g before surgery. After resection, the weight decreased significantly (** $p < 0.01$) in both groups. In the PBS-treated group, the weight was significantly higher at 4 weeks (** $p < 0.01$) compared to the pre-resection weight, whereas no significant difference was found in the bevacizumab-treated group († $p < 0.05$ vs PBS treated mice) (A). In the PBS-treated group, the mean-BFV in the SMA increased progressively after surgery whereas decreased in the bevacizumab-treated group (** $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ vs PBS-treated mice) (B). In the PBS-treated group, the mean-BFV in celiac trunk remained stable after surgery whereas decreased at the 4th week in the bevacizumab-treated group († $p < 0.05$ vs PBS-treated mice) (C).

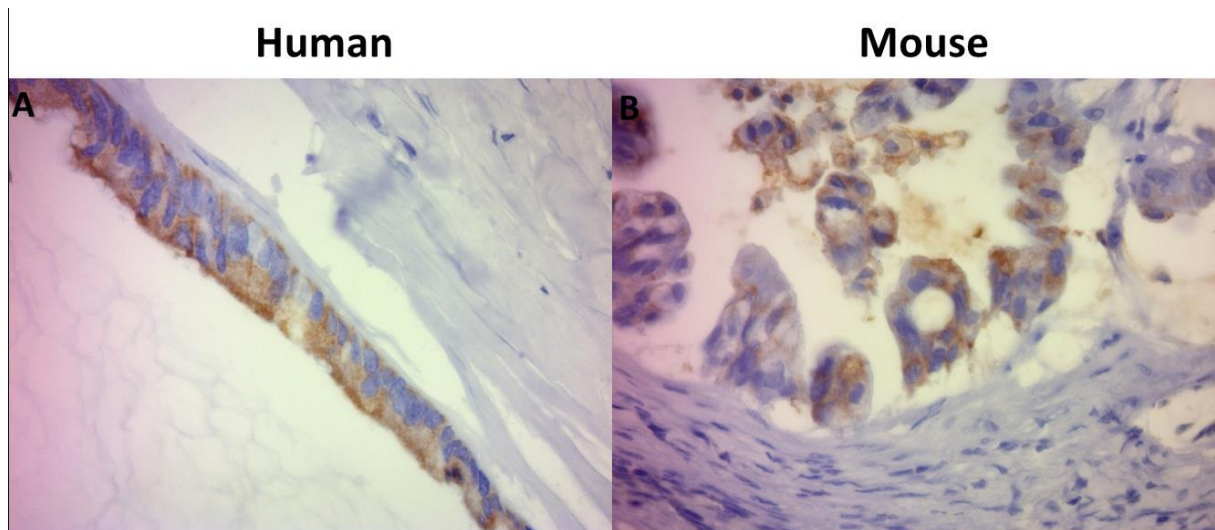
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1. Histological aspects of PMP tumors (hematoxylin-eosin-safran staining). Representative disseminated peritoneal adenomucinosis tumors (DPAM) in human (A) and in mouse (B); both evidenced proliferative mucinous columnar epithelium associated with little cytological atypia or mitotic activity. Representative surgical specimen in human (C) and in the mouse xenograft (D) of peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA-1) with abundant mucinous epithelium, forming glands and/or signet ring cells, and with severe cytological atypia and a poorly differentiated architecture.



Supplementary Figure 2. Pan-cytokeratin (red) (A) and CK20 (green) (B) immunostaining of the tumor withdrawn from the abdomen of the mouse. Immunostaining confirmed the human and digestive origin of the tumor in mouse (A, B). DAPI (blue) (C) confirmed the paucicellular characteristic of this mucinous carcinomatosis. Ki67 (red) (D) immunostaining confirmed the poor proliferation. CD31 (green) (E), VE-Cadherin (red) (F) immunostaining and CD31 (green) and VE-Cadherin (red) double immunostaining (G) of the tumor. Highlight of the vessels within the tumor. Desmin (red), specific to pericytes and VE-Cadherin (green) double immunostaining (H) of the tumor confirmed the neoangiogenesis in the tumor.



Supplementary Figure 3. Immunostaining with myeloperoxidase of MUC-2 in patient (A) and in mouse (B). Immunostaining confirm the high levels cytoplasmic staining of tumor cells by the antibody anti-MUC - 2 with a large production of mucin by both tumors.

3.2 Mise au point d'une séquence de diffusion pour les études murines à 1.5T

3.2.1 Evaluation de la variabilité et de la reproductibilité des paramètres quantitatifs

L'IRM est aujourd'hui un outil de plus en plus indispensable à la fois dans le bilan de la CP et dans le suivi des patients en raison notamment de tous les paramètres fonctionnels qu'elle apporte. La séquence de diffusion est probablement la séquence qui permet d'apporter le plus d'informations fonctionnelles. Elle reflète la cellularité, la nécrose et même la micro-perfusion tumorale.

La réalisation d'une séquence d'IRM de diffusion chez la souris est difficile avec un système clinique standard. Cette séquence est souvent sujette aux artéfacts et c'est pourquoi la plupart des études utilisant de l'IRM fonctionnelle chez le petit animal sont réalisées sur des aimants de recherche à très haut champs magnétique (4.7T ou 7T). Toutefois, cela limite l'application translationnelle en clinique de ces études car elles utilisent des paramètres d'acquisition, et des durées d'acquisition qui ne sont pas adaptés à la recherche clinique. De plus les résultats numériques obtenus manquent de standardisation.

C'est pourquoi, plutôt que de travailler à très haut champs, nous avons décidé d'utiliser un aimant clinique à 1.5T. La première étape a donc été de mettre au point et de tester une séquence de diffusion performante chez la souris et de vérifier que ses résultats étaient fiables et reproductibles. Cette séquence a été testée sur deux modèles murins de CP : un modèle de CP murine chez la souris immunocompétente et un modèle murin de PMP humain greffé de façon orthotopique à la souris nude.

Ce travail est présenté ci-dessous sous la forme d'un article soumis à *Radiology*

Nous avons évalué une séquence de diffusion à 1.5T utilisant un *pulse* de type HASTE (Half-Fourier Acquisition Single-Shot Turbo Spin-Echo) plutôt que le classique EPI (Echo-Planar Imaging). La séquence de diffusion de type HASTE, bien que légèrement plus longue que la séquence EPI en terme de temps d'acquisition, est une séquence clinique couramment utilisée dans l'imagerie de l'oreille moyenne pour détecter le cholestéatome. Elle a la particularité d'être moins sensible aux artéfacts, notamment ceux causés par les milieux osseux et aériques au niveau de la base du crâne. Cela s'explique par le fait que les séquences single shot de type HASTE sont des séquences en écho de spin, alors que les séquences EPI, qui sont utilisées le plus fréquemment pour la réalisation d'images pondérées en diffusion, vont être acquise avec un premier écho de spin à 180° de part et d'autre duquel sont appliqués les gradients de diffusion, puis l'image est acquise au cours d'un seul TR avec des impulsions d'écho de gradient. C'est pourquoi, l'EPI est plus sensible aux artéfacts, en particulier aux artéfacts de susceptibilité magnétique.

Pour évaluer cette séquence, nous avons utilisé deux modèles murins de CP différents : un modèle de carcinose murine CT-26 injectée en intra-péritonéale chez la souris immunocompétente BALB/c et un modèle murin de PMP humain greffé de façon orthotopique à la souris nude.

Dix-neuf souris du modèle murin de carcinose colorectale CT-26 ont eu une IRM de diffusion avec la séquence HASTE en utilisant 3 valeurs de b ($b=0, 200, 800$ s/mm²) et les cartographies ADC ont été calculées. Les valeurs d'ADC ont été mesurées dans 35 nodules de CP (3,5 par souris). Les valeurs ont été comparées aux valeurs d'ADC de 33 nodules de CP colorectales chez 13 patients ayant eu une séquence de diffusion classique EPI avec les mêmes valeurs de b . L'acquisition a été répétée chez 15 souris à 48 heures d'intervalle pour évaluer la reproductibilité. Nous n'avons pas trouvé de différence entre les ADC mesurés dans les nodules de CP chez les souris et les patients ($P=0.43$). Les valeurs mesurées dans les nodules murins correspondent donc à des valeurs cliniques, mesurées chez des patients. La reproductibilité des valeurs d'ADC était excellente avec un coefficient de variation de 5.0% [0.3-13.2]. La reproductibilité intra et inter observateur étaient excellente avec un coefficient de corrélation intra-classe de 0.997 (0.992–0.999) et de 0.967 (0.918–0.987) respectivement.

Dans l'autre set expérimental, 20 souris nude du modèle le modèle murin de PMP ont eu une IRM de diffusion avec la séquence HASTE en utilisant 12 valeurs de b ($b=0, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 200, 400, 600, 800$ s/mm²) et les cartographies ADC, ainsi que des paramètres IVIM (D, D^* et f) ont été extraites avec un script développé sous Matlab®. Ces paramètres ont été comparés à ceux obtenus chez 14 patients avec PMP ayant eu une séquence de diffusion classique EPI avec 3 valeurs de b ($b=0, 200, 800$ s/mm²). L'acquisition a été répétée chez 9 souris à 48 heures d'intervalle pour évaluer la reproductibilité. Nous n'avons pas trouvé de différence entre les ADC, ni les fractions de perfusion mesurés dans le PMP murin et le PMP humain ($P=0.23$ et 0.17). Toutefois, la valeur du coefficient de diffusion pure D était plus basse chez le souris que les patients ($P<0.001$). La reproductibilité des valeurs d'ADC, D, D^* et f était excellente avec un coefficient de variation compris entre 3.3 et 5.5). La reproductibilité intra et inter observateur étaient excellente pour tous les paramètres excepté D^* pour lequel le coefficient de corrélation intra-classe était de 0.541 (0.130–0.790).

Nos résultats montrent que la séquence de diffusion de type HASTE, est très fiable pour évaluer les paramètres de diffusion chez la souris avec un équipement IRM clinique de 1.5 Tesla. En particulier, cette séquence a montré une grande robustesse en termes de reproductibilité pour l'évaluation des paramètres de microcirculation tumorale, tels que le coefficient de diffusion liée à la perfusion (D^*) ou la fraction de perfusion. Ces paramètres sont habituellement bien moins reproductibles en particulier avec des séquences de type EPI.

Diffusion-weighted imaging and intra-voxel incoherent motion (IVIM) in murine models of peritoneal carcinomatosis with a clinical 1.5T MR scanner

Purpose:

To evaluate a diffusion-weighted MR imaging (DWI) sequence, which allows calculating a reproducible apparent diffusion coefficient (ADC) and extract intra-voxel incoherent motion (IVIM) derived parameters in two murine models of peritoneal carcinomatosis (PC) with a standard 1.5T clinical equipment.

Methods:

Ethics committee approved this study. In set-1, 19 Balb-C mice with PC from colorectal origin had HASTE-DWI ($b=0,200,800\text{s/mm}^2$). ADC values of PC nodules were compared to those of PC nodules in 13 patients. In set-2, 20 nude mice with pseudomyxoma peritonei (PMP) had HASTE-DWI ($b=0,10,20,30,40,50,80,100,200,400,600,800\text{s/mm}^2$). ADC and IVIM-derived parameter values were compared to those of PMP in 14 patients. Test-retest, intra- and inter-observer reproducibility were evaluated for both sets by measuring the coefficient of variation (CV), limits-of-agreements, and intra-class correlation coefficients (ICC).

Results:

ADC values were not different between mice and humans in PC nodules in set-1 ($P=0.43$) nor in PMP tumor in set-2 ($2.730\text{vs}2.687\times 10^{-3}\text{mm}^2/\text{s}, P=0.23$). D-value was lower in mice compared to patients ($2.326\text{vs}2.937\times 10^{-3}\text{mm}^2/\text{s}, P<0.001$), but perfusion fraction values were not different ($P=0.17$). There were no differences between values obtained at test-retest for ADC in Set-1 and Set-2 ($P=0.57$ and 0.36), nor in D, D* and f ($P=0.35, 0.87$ and 0.72 , respectively). The CVs ranged from 0.3 to 15.7 and was 4.2 for D*. Intra- and inter-observer agreements were excellent for all measures except for D* (ICC=0.541).

Conclusion:

HASTE-DWI in mice with PC allows performing ADC measurements and IVIM analyses on a clinical system with a high reproducibility of f and D*.

Index terms: Diffusion weighted imaging; intra-voxel incoherent motion, murine model; peritoneal carcinomatosis; pseudomyxoma peritonei

Diffusion-weighted imaging and intra-voxel incoherent motion (IVIM) in murine models of peritoneal carcinomatosis with a clinical 1.5T MR scanner

INTRODUCTION

Magnetic resonance (MR) imaging is now an important tool for the initial diagnosis and further treatment monitoring of a wide range of tumors (1, 2). Improvement in the understanding of oncologic pathway regulations has led to the development of new targeted molecules and biotherapies (3). Because of the large number of candidate molecules, the use of animal models has become mandatory in the evaluation of new treatments (4).

Several studies have shown that conventional MR clinical scanners (1.5T and 3T) allow performing morphological evaluation of small rodents (5, 6). Perfusion imaging has also been investigated with clinical MR and computed tomography scanners (7-9). However, the application of diffusion-weighted imaging (DWI) in rodent with clinical MR scanners remains challenging. The main limitations of DWI are the need of a high signal-to-noise ratio and conventional DWI is often altered by multiple artifacts when using small fields of views (FOV) (10).

The increasing number of publications about DWI reflects the pivotal role of DWI for detecting diseases and monitoring during treatment. DWI provides functional information that includes cellular, micro-perfusion, vasculature and architecture of tissues (11). DWI has demonstrated clinical relevance for the detection of tumors, ischemic or inflammatory disease while some studies suggest that apparent diffusion coefficient (ADC) calculation or intra-voxel incoherent motion (IVIM) derived parameters may be used as a quantitative biomarker, which might allow the longitudinal follow-up in pathological processes, necrosis, fibrosis, cellularity and perfusion (12, 13).

Some authors have suggested that IVIM derived parameters may improve the characterization of tissue microarchitecture as it provides an evaluation of pure diffusion (D) and a non-invasive information about perfusion through the related pseudo-diffusion coefficient (D*) and the perfusion fraction (f) which may be correlated to angiogenesis in tumors (14, 15). However, most of studies about IVIM parameters lack standardization (10, 16, 17).

Myriad studies about longitudinal follow-up of treatments are now available, but the lack of standardization of protocols remains an issue. Moreover, most of the research about DWI in rodent uses preclinical high field systems (4.7T or 7T). Recent studies suggest that the measures obtained with those systems are quite reproducible, especially when considering measurement of ADC (18). However, the use of high field systems limits the translational applicability of these results to human studies (10). The sequence pulses used with these research devices lack standardization and clinical validation. In the contrary, clinical systems are widespread, available and clinical sequence pulses are robust and strongly validated.

Echo planar imaging (EPI)-based techniques are the most common for DWI in humans. EPI-diffusion pulse sequence is very sensitive to artifacts and requires a high signal to noise ratio to obtain accurate images, which is difficult to achieve accurately in small rodents. Geometric distortions secondary to susceptibility artifacts are frequent (19, 20). Half-Fourier acquisition single-shot turbo spin-echo (HASTE) DWI pulse is a largely used sequence in imaging of the middle ear and the mastoid process. This pulse is more robust to decrease the artifacts, especially in the area of mastoids (21).

The aim of our study was to evaluate the feasibility, the reproducibility and the ability of HASTE-DWI performed at 1.5T to evaluate functional parameters such as ADC and IVIM derived parameters in two murine models of peritoneal carcinomatosis (PC).

MATERIAL AND METHODS:

Mice

All experimental protocols met all the standards required by the European community guidelines for the care and use of laboratory animals. Ethics committee of our institution approved this study. We used 2 different murine models of PC: firstly (Set-1 of experiments), 20 BALB/c mice with PC obtained after intra-peritoneal injection using a 27-gauge needle of 2.5×10^5 CT-26 murine colorectal cancer cells obtained from Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel. For the second murine model of PC (Set-2 of experiments), 20 five-week-old female athymic Swiss nude mice were orthotopically grafted with fresh tumor tissue of pseudomyxoma peritonei (PMP) originating from the one single mouse model of high grade PMP as previously described (22). Surgical procedures were performed under general anesthesia with a mixture of 80 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine delivered intraperitoneally (i.p.) (Virbac, Carros, France).

Human control group

After institutional review board approval, two human control groups were constituted retrospectively. To be included, patients should have had an MR examination with DWI (Magnetom Avanto[®], VB15 software version, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany, 1.5T, $b=0$, 200 and 800 s/mm²) the day before surgery and lesions visible on DWI measuring more than 5 mm to allow calculation of ADC. The DWI consisted in a classical EPI-DWI pulse sequence used in routine (table 1). The first group constituted of 13 patients with surgically and pathologically proven PC from colorectal origin (Set-1). The second group constituted of 14 patients with surgical and pathological proven PMP (Set-2).

MRI protocol in mice

All MR examinations were performed with the same protocol, using a 1.5-T clinical MR unit (Magnetom Avanto[®], VB15 software version, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) with 12 receiver channels. All MRI acquisitions in mice were performed under general anesthesia with a mixture of 80 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine delivered i.p. (Virbac, Carros, France). Twenty one days after injection of tumor cells for Set-1 and 4 weeks after graft for Set-2, mice were placed in a clinical wrist coil and all sequences were acquired in the coronal plane. For the BALB/C murine colorectal PC model, the protocol included a morphological T2-weighted turbo spine echo (TSE) sequence and HASTE-DWI with $b=0$, 200 and 800 s/mm² (table 1). For the PMP murine model, the protocol included a morphological T2-weighted TSE sequence and HASTE-DWI with 12 b -values ($b=0$, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 200, 400, 600, 800 s/mm²). For Test-Retest evaluation of reproducibility of measures, 15 BALB/C colorectal PC-model mice (Set-1) and 9 PMP mice (Set-2) were scanned twice after an interval of 2 days.

Post-processing of acquired images

For Set-1, ADC maps were calculated for mice and patients with the vendor software performing a mono-exponential algorithm (Leonardo workstation, VB15 software version, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Three b -values were used for this mono-exponential fitting algorithm ($b=0, 200, 1000$ s/mm² in humans and $b=0, 200, 800$ s/mm² in mice).

For Set-2, in PMP mice, mono and bi-exponential analyses for calculation of ADC and IVIM derived parameters maps were performed using in-house script programmed in Matlab[®] (v. R2016a, The MathWorks Inc, Natick, MA, USA) with nonlinear least-squares fitting based on the Levenberg-Marquardt Method. Post-processing, the mean signal intensity (SI) of DWI was fitted to the IVIM equation, which models the SI decay with increasing b values as a perfusion related pseudo-diffusion coefficient (D^* or ADCfast, mm²/s), a perfusion fraction (f , %), and a true or pure diffusion coefficient (D or ADCslow, mm²/s):

$$S = S_0[(1 - f) \cdot e^{-b \cdot D} + f \cdot e^{-b \cdot D^*}]$$

Where S is the signal intensity at an arbitrary b value, S_0 is the SI in the absence of diffusion weighting ($b=0$ s/mm²). For PMP patients, ADC, D and perfusion fraction maps were extracted according to Koh et al. using an in-house developed script programmed in Matlab[®] (23, 24). D^* was not estimated because of the lack of sufficient number of low b -values acquisitions.

Image evaluation

To assess repeatability of ADC and IVIM derived parameter measurements, measures were done on test and retest set acquired at 48h interval, in 15 BALB/C colorectal PC-model mice (Set-1) and 9 PMP mice (Set-2). In order to assess inter-observer reproducibility, measures of all mice on the post-processed images were repeated by two independent observers blinded from the results from each other. One reader repeated all the measurements 6 months later to assess intra-observer reproducibility and to avoid recall bias. In Set-1, key images with arrows were used to report the same PC nodules in human control group and in mice among evaluations. Only lesions measuring more than 5 mm in maximum diameter in human control group and more than 3 mm in main diameter in mice were measured. All ADC maps and IVIM derived parameters maps (D , D^* , f) were loaded as Dicom in ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). ADC values were measured in each PC nodule using a circular region of interest (ROI) including the maximum area of each nodule in human control group and in Set-1 mice. In PMP mice, the ROI was drawn manually to segment the whole tumor and in patients, an ellipsoidal ROI was drawn in the most tissue zone avoiding ascites. Finally, both readers reported independently the presence of geometric deformations or susceptibility artifacts using a 3 points scale (0=no artifact, 1=discrete, 2=severe).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software version 20.0.02 (IBM inc., Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). All analyses were done on a per lesion basis. Descriptive statistics were calculated for all numerical data and reported as means, medians, first quartiles (Q1), third quartiles (Q3) and ranges. Test-Retest, intra and inter-observer reproducibility were assessed by calculating; the mean difference, the 95% Bland-Altman limits of agreement normalized to the averaged value of two scans to yield a relative value in percent, coefficient of variation (CV) and the intraclass correlation coefficient using the two-way random single measures method. Bland-

Altman plots were used to determine whether the difference was influenced by the magnitude of the measurements [27, 28]. Intra and inter-observers differences in parameter distributions were analyzed using a paired t-test. We defined parameter reproducibility as excellent when CV was <10%, good when CV was between 10–20%, acceptable when CV was between 20–30%, and poor when CV was >30%. Distribution of ADC between mice and humans in Set-1 and distribution of ADC, D, and f between PMP mice and humans in Set-2 were compared with non-parametric Mann-Whitney test. Significance was set at a *P* value < .05.

RESULTS

Considering Set-1, all mice had PC nodules visible on T2-WI ranging from 3.3 to 12.6 mm (Fig. 1). A total of 35 PC nodules were analyzed (3.5 nodule per mouse) and compared to 33 nodules in 13 patients (2.5 nodule per patient) ranging from 5.2 to 39.2 mm ($P<0.0001$) (Table 2). The ADC values were not different between mice and humans PC nodules (1.053 ± 0.316 vs $1.128\pm 0.293 \times 10^{-3}$ mm²/s, $P=0.43$) (Fig. 2).

Considering Set-2, one mouse was excluded from analyses because of motion artifacts. In the remaining 19 PMP mice, the median area of contoured tumor was 9.88 mm² in mice and 932 mm² in PMP patients ($P<0.0001$) (Fig. 3). The mean ADC was not different between human and PMP tumors (2.730 ± 0.453 vs $2.687\pm 0.394 \times 10^{-3}$ mm²/s, $P=0.23$). D value was lower in mice compared to patients (2.326 ± 0.319 vs $2.937\pm 0.299 \times 10^{-3}$ mm²/s, $P<0.001$), but f values of perfusion fraction were not different ($21.9\pm 16.8\%$ vs $33.4\pm 2.0\%$, $P=0.17$).

Test-retest reproducibility

There were no differences between values obtained at test-retest for ADC in Set-1 ($P=0.57$, Table 3). In Set-2, ADC, D, D* and f did show neither differences between test and retest ($P=0.36, 0.35, 0.87$ and 0.72 , respectively) (Table 3). Test-retest reproducibility was excellent for all parameters with the coefficient of variation (CV) ranging from 0.3 to 15.7 for ADCs and IVIM derived parameters (Table 3). The CV of D* was 4.2 [range: 1.1-7.9] and the CV of f was 3.3 [range: 0.7-7.4] with no difference between test and retest values ($P=0.87$ and 0.72 respectively).

Intra-observer agreement

Agreements between ADC values and IVIM derived parameters obtained in mice and humans measured by the same investigator at 6 months interval showed a high ICC ranging from 0.91 to 1.0 and low biases (Table 4).

Inter-observer agreement

Agreements between ADC values and IVIM derived parameters obtained in mice and humans measured by the two investigators showed a high ICC for ADC, D, and f ranging from 0.967 to 0.99 and low biases (Table 4). The inter-observer agreement was lower for the evaluation of D* with an ICC of 0.541 indicating a fair agreement.

Artifacts

The two investigators did not report any geometric distortions secondary to susceptibility artifacts on HASTE-DWI. In one mouse of Set-2, moved during IVIM acquisition and was

excluded from analyses. A mild to moderate amount of ascites was reported in 6 mice of Set-1, but no artifacts related to ascites was observed. No ascites was reported in the mice of Set-2.

DISCUSSION

Our study shows that DWI is a feasible and reproducible technique using clinical MR scanners with a HASTE pulse sequence. ADC calculations, as well as acquisition with several low b -values are feasible, and parametric IVIM map can be processed and analyzed.

Reliable evaluation of functional parameters such as ADC or IVIM derived parameters is critical for comparative or longitudinal follow-up of rodent with functional imaging. The HASTE-DWI pulse achieved an excellent reproducibility and reliability with high ICCs for intra- and inter-observer agreements. Verhappen et al. compared the reproducibility of EPI-DWI to HASTE-DWI in head and neck cancer in 12 patients and found a superior inter-observer agreement for HASTE-DWI compared to EPI-DWI (25). They also found the same result as our study concerning susceptibility artifacts which were significantly decreased with HASTE-DWI compared to EPI-DWI in head and neck; where such artifacts are frequent because of the presence of air, bones and exogenous metal such as dental prostheses (26). Moreover, such artifacts may impair the quantitative evaluation of ADC or IVIM derived parameters and thus make unreliable any quantification of tumor microcirculation (27).

In our study, ROIs were copied and pasted from the T2-WI images where all lesions were easily visible. PC nodules had intermediate signal intensity on T2-WI, which makes the differentiation between bowel and tumors easy. PMP shows high signal intensity on T2-WI. Hence, the placement of the ROIs in the lesions was easy because of the excellent visibility of the target lesions which might explain the excellent intra- and inter-observer agreements.

New biotherapies usually induce changes in texture, necrosis and vascular patterns of lesions before showing any change in size (28). These drugs target the vasculature of tumors so that the decrease in size of the lesions is often delayed. Hence, evaluation of early therapeutic effects of biotherapies in mice has become a hot topic of research and new biomarkers such as DWI and IVIM derived parameters are under evaluation (29). Biomarkers allowing to monitor the effect of those new expensive therapies have not been determined yet, but DWI and IVIM derived parameters are very promising candidates (30-32). The issue of reproducibility and reliability of these parameters is critical for these studies. High inter and intra-observer agreement is paramount before a quantitative technique might be used routinely. However, most of studies are done with a very high magnetic field magnet (4.7 or 7T) with dedicated MR scanners which are very powerful to test new hypotheses, but limit the translational clinical implications of the findings (33, 34). In our study, we used the same magnet for humans and mice with the same diseases and showed similar values of ADC in two peritoneal diseases. Moreover, we found IVIM-derived parameters values in the same range than those observed in patients. Our results suggest that the use of HASTE-DWI with a clinical magnet might be used in rodent for longitudinal monitoring studies and that the results might be easily transposed to patients in a translational way.

Several studies have already evaluated the suitability of clinical 1.5- and 3-T MR scanners to obtain images in rodents and tried to assess response to chemotherapies with functional imaging such as DWI (14, 29, 32, 35, 36). Cui et al. have monitored the response to a new anti-angiogenic agent using DWI and IVIM with a 3 Tesla clinical scanner and using a classical EPI sequence pulse (29). They found a good correlation between decrease in perfusion fraction (f), decrease in perfusion related pseudo-diffusion coefficient (D^*) and increase in true diffusion coefficient (D) and ADC early only 1 day after beginning the

treatment. However, their results showed a significant variability with a moderate reproducibility with CVs above 20% for D^* and f . The main advantage of the HASTE DWI is the extremely low CV for D^* and f (4.2 and 3.3 respectively) lower than CV published in human studies (ref BT). While the presumed high variability of these parameters has limited their use as biomarkers of angiogenesis, we assume that the high robustness and reproducibility of HASTE DWI might overcome this classical limitation.

Moreover, all the studies using a clinical magnet investigated subcutaneous inserted xenografts to obtain a tumor large enough to be imaged. Cui et al. xenografts ranged from 200 mm^3 to 500 mm^3 which corresponds to a big tumor for a mouse and that could represent an ethical issue. Moreover, subcutaneous tumors do not have the same microenvironment of the original human tumor which is a strong limit to extrapolate the results to humans (37). In our study, we imaged orthotopic models of PC from CRC origin and an orthotopic model of PMP. The diameter of the PC nodules was as small as 3.3 mm (i.e. 19 mm^3). EPI-DWI is feasible for big subcutaneous lesions in mice, but has never been investigated in orthotopic models of abdominal tumors. The HASTE DWI allows such an evaluation of in situ small tumors which might be a major advantage in a translational point of view.

One of the main limitations for the use of DWI as a biomarker in clinical practice is its lack of reproducibility. This is particularly true for perfusions related coefficients (D^* and f), especially in hypovascular diseases and not only in animal models but also in patients (38, 39). Hence, the robustness of acquisition in term of image artifacts is a critical issue, and the use of similar platform for preclinical and clinical studies is a promising way for translational research to ensure consistency in image contrast (10).

Our study is the first to compare results from DWI and IVIM in murine model with those of patients with the same disease using the same platform. We investigated orthotopic murine models, which reproduce biological, pathological and imaging features of human disease (22). We found with the same disease similar values in mice and humans, which suggests that the method is robust and promising for future translational studies. We used two different models of PC: the PC nodules originating from CT-26 murine cells is a classical model which has a high density of tumor cells which mimics human solid tumors such as PC from CRC origin. PMP model is less classical but has been demonstrated to express angiogenesis markers. That is why we assumed that it was a good model for evaluating IVIM parameters. The murine model of PMP was mostly solid as no ascites was observed in our model. In human PMP, ascites is frequent and tumor is heterogeneous, possibly explaining why perfusion fraction variability was higher in humans than in mice.

Our study has several limitations. First we performed only a single thick slice evaluation for IVIM acquisition. It was technically feasible to obtain several slices as thin as 1.5 mm. However, we favored the single slice acquisition with a thick slice, because we assumed that a slice containing the whole tumor would allow performing a more global evaluation of the whole tumor vascularity. Moreover, the PMP tumor grafts were all larger than 15 mm in diameter and we assumed that the signal in the slice was almost completely related to the tumor. Secondly, some authors have reported a third compartment, corresponding to ultra-fast diffusion (40). However, this technique requires triexponential modeling of the decay of the signal with several very low b -values ($<15\text{s}/\text{mm}^2$) that were not available on our clinical scanner. However, we used an already validated clinical MR sequence which is used in our head and neck protocol in everyday practice. Moreover, we found similar results in mice and human using the same scanner suggesting that our results are robust.

In conclusion, the images obtained with a HASTE-DWI pulse sequence in mice achieved a good quality that was sufficient to perform ADC and IVIM analyses on a standard

clinical system with relevant quantitative results. This pulse could allow the widespread use of diffusion imaging in rodents and make research easier with IVIM parameters.

References

1. Miyazaki K, Orton MR, Davidson RL, et al. Neuroendocrine tumor liver metastases: use of dynamic contrast-enhanced MR imaging to monitor and predict radiolabeled octreotide therapy response. *Radiology* 2012;263(1):139-48.
2. Marcus CD, Ladam-Marcus V, Cucu C, Bouche O, Lucas L, Hoeffel C. Imaging techniques to evaluate the response to treatment in oncology: current standards and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;72(3):217-38.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
4. Eveno C, Gaujoux S, Tobelem G, Pocard M. Did animal offer relevant model for Bevacizumab testing? *Br J Cancer* 2008;99(9):1555.
5. Cho HR, Choi SH, Lee N, Hyeon T, Kim H, Moon WK. Macrophages homing to metastatic lymph nodes can be monitored with ultrasensitive ferromagnetic iron-oxide nanocubes and a 1.5T clinical MR scanner. *PLoS One* 2012;7(1):e29575.
6. Levene HB, Mohamed FB, Faro SH, et al. Small mammal MRI imaging in spinal cord injury: a novel practical technique for using a 1.5 T MRI. *J Neurosci Methods* 2008;172(2):245-9.
7. Bazeli R, Coutard M, Duport BD, et al. In vivo evaluation of a new magnetic resonance imaging contrast agent (P947) to target matrix metalloproteinases in expanding experimental abdominal aortic aneurysms. *Invest Radiol* 2010;45(10):662-8.
8. Fournier LS, Cuenod CA, de Bazelaire C, et al. Early modifications of hepatic perfusion measured by functional CT in a rat model of hepatocellular carcinoma using a blood pool contrast agent. *Eur Radiol* 2004;14(11):2125-33.
9. Sun X, Wang H, Chen F, et al. Diffusion-weighted MRI of hepatic tumor in rats: comparison between in vivo and postmortem imaging acquisitions. *J Magn Reson Imaging* 2009;29(3):621-8.
10. Koh DM. Science to practice: can intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging be used to assess tumor response to antivascular drugs? *Radiology* 2014;272(2):307-8.
11. Panagiotaki E, Chan RW, Dikaivos N, et al. Microstructural characterization of normal and malignant human prostate tissue with vascular, extracellular, and restricted diffusion for cytometry in tumours magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 2015;50(4):218-27.
12. Cuenod CA, Balvay D. Perfusion and vascular permeability: basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. *Diagn Interv Imaging* 2013;94(12):1187-204.
13. Wagner M, Doblaz S, Daire JL, et al. Diffusion-weighted MR imaging for the regional characterization of liver tumors. *Radiology* 2012;264(2):464-72.
14. Lee HJ, Rha SY, Chung YE, et al. Tumor perfusion-related parameter of diffusion-weighted magnetic resonance imaging: correlation with histological microvessel density. *Magn Reson Med* 2014;71(4):1554-8.
15. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Aubin ML, Vignaud J, Laval-Jeantet M. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology* 1988;168(2):497-505.
16. Taouli B, Beer AJ, Chenevert T, et al. Diffusion-weighted imaging outside the brain: Consensus statement from an ISMRM-sponsored workshop. *J Magn Reson Imaging* 2016.

17. Padhani AR, Liu G, Koh DM, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations. *Neoplasia* 2009;11(2):102-25.
18. Doblus S, Almeida GS, Ble FX, et al. Apparent diffusion coefficient is highly reproducible on preclinical imaging systems: evidence from a seven-center multivendor study. *J Magn Reson Imaging* 2015;42(6):1759-64.
19. Hong X, To XV, Teh I, Soh JR, Chuang KH. Evaluation of EPI distortion correction methods for quantitative MRI of the brain at high magnetic field. *Magn Reson Imaging* 2015;33(9):1098-105.
20. Freidlin RZ, Kakareka JW, Pohida TJ, Komlos ME, Basser PJ. A spin echo sequence with a single-sided bipolar diffusion gradient pulse to obtain snapshot diffusion weighted images in moving media. *J Magn Reson* 2012;221:24-31.
21. Reiser M, Faber SC. Recent and future advances in high-speed imaging. *Eur Radiol*. 1997;7 Suppl 5:166-73.
22. Dohan A, Lousquy R, Eveno C, et al. Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: an in vivo model to test anti-angiogenic drug effects. *Am J Pathol* 2014;184(7):1920-9.
23. Koh DM, Scurr E, Collins DJ, et al. Colorectal hepatic metastases: quantitative measurements using single-shot echo-planar diffusion-weighted MR imaging. *Eur Radiol* 2006;16(9):1898-905.
24. Lewin M, Fartoux L, Vignaud A, Arrive L, Menu Y, Rosmorduc O. The diffusion-weighted imaging perfusion fraction f is a potential marker of sorafenib treatment in advanced hepatocellular carcinoma: a pilot study. *Eur Radiol* 2011;21(2):281-90.
25. Verhappen MH, Pouwels PJ, Ljumanovic R, et al. Diffusion-weighted MR imaging in head and neck cancer: comparison between half-fourier acquired single-shot turbo spin-echo and EPI techniques. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33(7):1239-46.
26. Kim S, Loevner L, Quon H, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for predicting and detecting early response to chemoradiation therapy of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):986-94.
27. Wang J, Takashima S, Takayama F, et al. Head and neck lesions: characterization with diffusion-weighted echo-planar MR imaging. *Radiology* 2001;220(3):621-30.
28. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1753-9.
29. Cui Y, Zhang C, Li X, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted magnetic resonance imaging for monitoring the early response to ZD6474 from nasopharyngeal carcinoma in nude mouse. *Sci Rep* 2015;5:16389.
30. Yang SH, Lin J, Lu F, et al. Evaluation of antiangiogenic and antiproliferative effects of sorafenib by sequential histology and intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging in an orthotopic hepatocellular carcinoma xenograft model. *J Magn Reson Imaging* 2016.
31. Joo I, Lee JM, Grimm R, Han JK, Choi BI. Monitoring vascular disrupting therapy in a rabbit liver tumor model: relationship between tumor perfusion parameters at IVIM diffusion-weighted MR imaging and those at dynamic contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*. 2016;278(1):104-13.
32. Seierstad T, Folkvord S, Roe K, Flatmark K, Skretting A, Olsen DR. Early changes in apparent diffusion coefficient predict the quantitative antitumoral activity of capecitabine, oxaliplatin, and irradiation in HT29 xenografts in athymic nude mice. *Neoplasia* 2007;9(5):392-400.

33. Padhani AR, Koh DM, Collins DJ. Whole-body diffusion-weighted MR imaging in cancer: current status and research directions. *Radiology* 2011;261(3):700-18.
34. Koh DM, Collins DJ, Orton MR. Intravoxel incoherent motion in body diffusion-weighted MRI: reality and challenges. *AJR Am J Roentgenol* 2011;196(6):1351-61.
35. Sun J, Zhang XP, Li XT, et al. Applicable apparent diffusion coefficient of an orthotopic mouse model of gastric cancer by improved clinical MRI diffusion weighted imaging. *Sci Rep* 2014;4:6072.
36. Meier R, Braren R, Kosanke Y, et al. Multimodality multiparametric imaging of early tumor response to a novel antiangiogenic therapy based on anticinalins. *PLoS One* 2014;9(5):e94972.
37. Eveno C, Hainaud P, Rampanou A, et al. Proof of prometastatic niche induction by hepatic stellate cells. *J Surg Res* 2015;194(2):496-504.
38. Andreou A, Koh DM, Collins DJ, et al. Measurement reproducibility of perfusion fraction and pseudodiffusion coefficient derived by intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging in normal liver and metastases. *Eur Radiol* 2013;23(2):428-34.
39. Kakite S, Dyvorne H, Besa C, et al. Hepatocellular carcinoma: short-term reproducibility of apparent diffusion coefficient and intravoxel incoherent motion parameters at 3.0T. *J Magn Reson Imaging* 2015;41(1):149-56.
40. Cercueil JP, Petit JM, Nougaret S, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging in the liver: comparison of mono-, bi- and tri-exponential modelling at 3.0-T. *Eur Radiol* 2015;25(6):1541-50.

Table 1. Imaging parameters used in patients and mice.

	TR/TE (ms)	ETL	FOV (mm ²)	Matrix	Section thickness (mm)	Voxel size (mm ³)	Nex
<i>Mice</i>							
T2-TSE	2570/77	9	60x120	224x448	1.5	0.268x0.268x1.5	8
HASTE- DWI	1500/125	256	50x126	76x192	9	0.662x0.662x12	32
<i>Patients</i>							
EPI-DWI	6000/91	1	380x380	192x182	5	1.98x1.98x5	4

Notes. TSE indicates Turbo spin echo; HASTE indicates Half-Fourier acquisition single-shot turbo spin-echo; DWI indicates diffusion weighted imaging; TR indicates repetition time; TE indicates time of excitation; ETL indicates echo train length; FOV indicates field of view; EPI indicates echo-planar imaging; Nex indicates number of excitations.

Table 2. Comparison of PC nodules and PMP tissue in human and in mice

	Humans (n=13)	Mice (n=20)	P-value
<i>PC nodules (n)</i>	33	35	
<i>PC nodules size (mm):</i>			
Median \pm SD	15.6 \pm 9.9	6.6 \pm 2.3	< 0.0001
Q1, Q2	9.9, 27.8	5.4, 8.2	
Min, max	5.2, 39.2	3.3, 12.6	
<i>PC nodules ADC ($\times 10^3$ mm²/s):</i>			
Median \pm SD	1.053 \pm 0.316	1.128 \pm 0.293	0.43
Q1, Q2	0.937, 1.267	0.971, 1.337	
Min, max	0.456, 1.815	0.605, 1.774	
	Humans (n=14)	Mice (n=19)	P value
<i>PMP ROI size (mm²):</i>			
Median \pm SD	932 \pm 1297	9.88 \pm 0.58	< 0.0001
Q1, Q2	365, 1708	9.34, 10.10	
Min, max	125, 4622	8.50, 10.51	
<i>PMP tissue ADC ($\times 10^3$ mm²/s):</i>			
Median \pm SD	2.687 \pm 0.394	2.730 \pm 0.453	0.23
Q1, Q2	2.472, 2.777	2.603, 3.248	
Min, max	2.038, 3.431	2.234, 3.761	
<i>PMP tissue D ($\times 10^{-6}$ mm²/s):</i>			
Median \pm SD	2.326 \pm 0.319	2.937 \pm 0.299	< 0.001
Q1, Q2	2.118, 2.667	2.698, 3.041	
Min, max	2.012, 2.885	2.436, 3.560	
<i>PMP tissue f (%):</i>			
Median \pm SD	21.9 \pm 16.8	33.4 \pm 2.0	0.17
Q1, Q2	13.8, 45.4	31.5, 34.1	
Min, max	11.6, 54.3	28.7, 35.5	

Notes. SD indicates standard deviation. Variables in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

Table 3. Test-retest reproducibility of ADC and IVIM derived parameters

	<i>Set-1 (n=15)</i>	<i>Set-2 (n=9)</i>			
	ADC (x 10 ⁻³ mm ² /s)	ADC (x 10 ⁻³ mm ² /s)	D (x 10 ⁻³ mm ² /s)	D* (x 10 ⁻³ mm ² /s)	f (%)
Test	1.101±0.368	2.820±0.360	2.970±0.380	34.67±1.52	32.52±2.06
Retest	1.092±0.360	2.730±0.420	2.920±0.400	34.53±2.95	32.23±1.34
<i>P</i> *	0.57	0.36	0.35	0.87	0.72
CV	5.0	5.3	5.5	4.2	3.3
(range)	(0.3-13.2)	(1.5-13.7)	(1.5-15.7)	(1.1-7.9)	(0.7-7.4)
Limits of agreement	-13.24-14.62	-18.2-25.9	-8.1-11.4	-13.4-14.7	-13.2-14.8

Notes. 15 mice had repeated scans in Set-1 with calculation of ADC in PC nodules and 9 mice had repeated scan in set-2 with evaluation of IVIM derived parameters in murine PMP tumors.

Mean/range of coefficient of variation (CV in %) and Bland-Altman limits of agreements (%) are shown.

*Paired *t*-test, bolded when significant (*P*<0.05).

D: pure diffusion coefficient (x10⁻³ mm²/s), D*: perfusion related pseudo-diffusion coefficient (x10⁻³ mm²/s), F: perfusion fraction (%), ADC : Apparent Diffusion Coefficient (x10⁻³ mm²/s)

Table 4. Intra and inter-observer agreement for IVIM derived parameters and ADC measurement

IVIM derived parameters		Mean difference	95% limits of agreement	ICC [†] (95% CI)
Intra-observer agreement				
<i>Set 1</i>	ADC ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	0.033 \pm 0.107	-0.177 to 0.242	0.939 (0.882–0.969)
<i>Set 2</i>	ADC ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	0.022 \pm 0.077	-0.128 to 0.173	0.997 (0.992–0.999)
	D ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	0.003 \pm 0.029	-0.055 to 0.061	0.999 (0.999–1.000)
	D* ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	2.983 \pm 3.504	-3.884 to 9.851	0.911 (0.802–0.962)
	f (%)	0.036 \pm 0.132	-0.222 to 0.294	1.000 (1.000–1.000)
Inter-observer agreement				
<i>Set 1</i>	ADC ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	0.118 \pm 0.106	-0.089 to 0.326	0.930 (0.865–0.964)
<i>Set 2</i>	ADC ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	0.035 \pm 0.116	-0.193 to 0.262	0.967 (0.918–0.987)
	D ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	0.005 \pm 0.045	-0.082 to 0.092	0.990 (0.974–0.996)
	D* ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	4.786 \pm 5.731	-6.447 to 16.02	0.541 (0.130–0.790)
	f (%)	0.055 \pm 0.186	-0.309 to 0.419	0.996 (0.990–0.999)

Notes. [†]ICC indicates intraclass correlation coefficient calculated according to the “two-way random single measures” method (ICC = 1.0–0.81 indicates excellent agreement; 0.80–0.61 good; 0.60–0.41 moderate; 0.40–0.21 fair and 0.20–0.00 poor agreement).

Figure 1. **A.** T2-weighted turbo spin echo MR image in the coronal plane shows nodule of peritoneal carcinomatosis in colorectal PC model (Set-1)(arrow). **B.** HASTE-DWI in the coronal plane ($b=200$ s/mm²) shows the nodules with signal decay. **C.** ADC map obtained from mono-exponential fit shows the PC nodules with a low signal indicating a low ADC value.

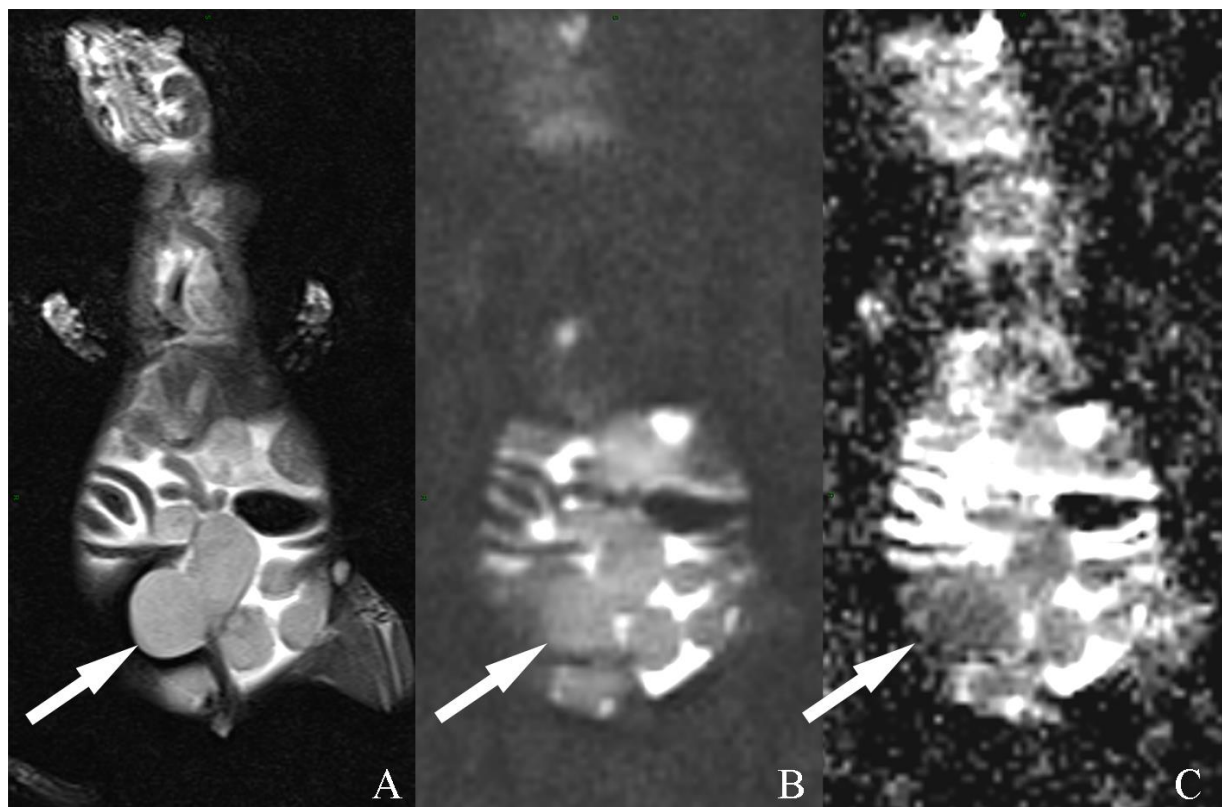


Figure 2. Box plot diagram shows the distribution of ADC values in PC nodules among mice and humans ($P=0.43$).

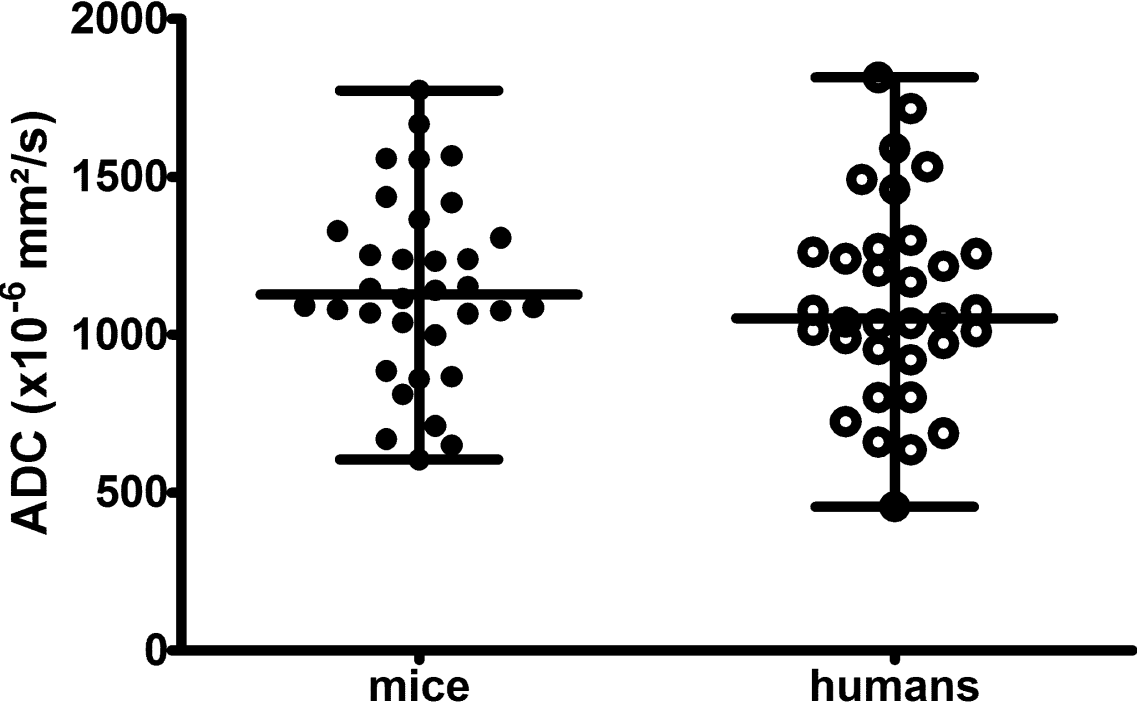


Figure 3. IVIM acquisition, HASTE-DWI in the coronal plane with 12 b -values: $b=0, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 200, 400, 600, 800 \text{ s/mm}^2$ in PMP model (Set-2). The intraperitoneal PMP tumor (arrow) shows a decay of the signal according to the bi-exponential IVIM model.

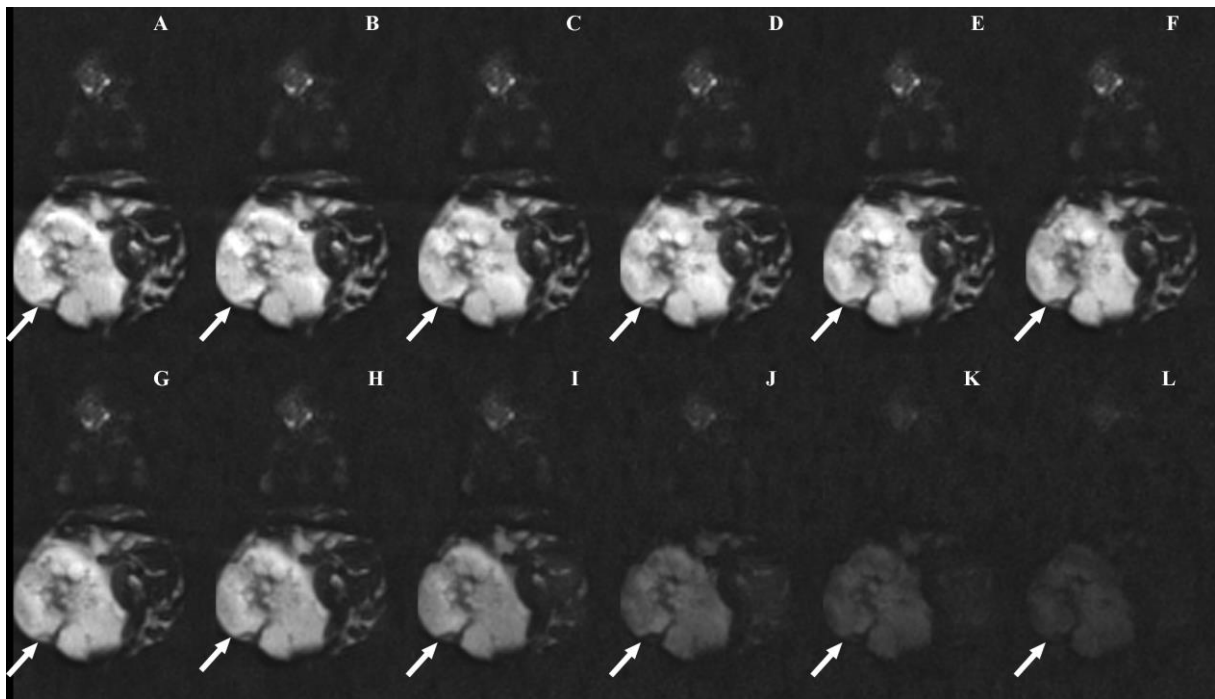
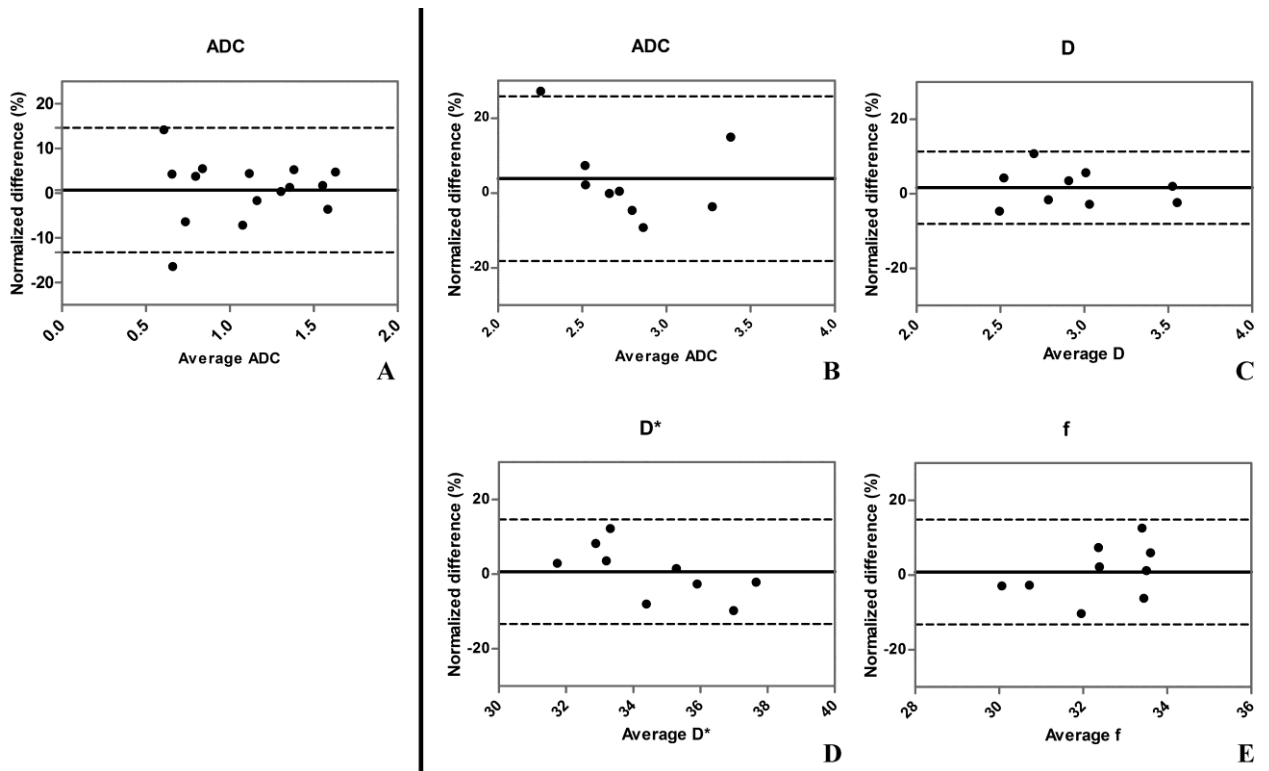


Figure 4. Test-retest reproducibility: Bland–Altman plots show agreement for ADC in Set-1 (A), and for ADC, D, D* and f in Set-2 (B, C, D, E).



3.2.2 Application traitement anti-angiogénique dans le modèle murin de PMP

Dans un second temps, après avoir évalué la fiabilité et la reproductibilité des paramètres d'IVIM mesurés avec la séquence de diffusion de type HASTE à 1.5T, nous avons voulu appliquer cette méthodologie dans le suivi des modèle de PMP sous traitement anti-angiogénique. L'échographie Doppler nous a permis de suivre la macro-vascularisation au sein de l'artère mésentérique supérieure (AMS) alimentant la tumeur et de montrer une corrélation entre les flux au sein de l'AMS et le développement ou l'involution tumorale. L'objectif de cette expérience était de suivre l'évolution des paramètres microcirculatoires obtenus en IRM de diffusion par la méthode IVIM au sein de la tumeur et de les corrélérer à la réponse au traitement anti-angiogénique en termes de volume tumoral, densité micro-vasculaire tumorale et marqueurs sériques angiogéniques.

3.2.2.1 Protocole expérimental :

Nous avons constitué 2 groupes de 10 souris chacun chez lesquelles a été greffé la même tumeur issue d'un modèle PMP de haut grade. Six semaines après la greffe intrapéritonéale (Figure 22), un groupe a été traité par sorafénib par gavage quotidien (60 mg/kg/jour) et le groupe témoin a été traité par gavage quotidien de sérum physiologique.

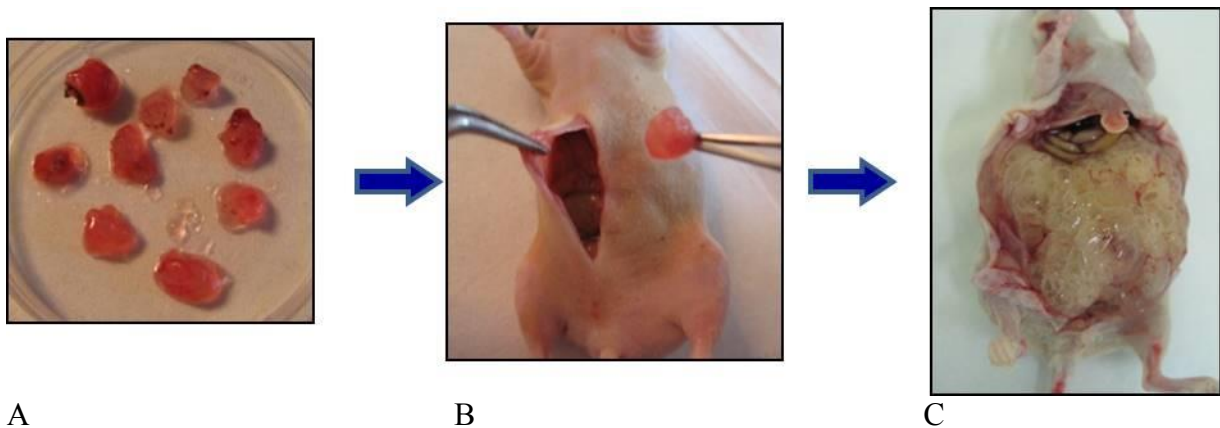


Figure 22. A. Prélèvements humains de PMP de haut grade découpés en petit morceaux. B. greffe intra-péritonéale de PMP. C. sacrifice de la souris à 3 semaines. Le modèle reproduit le développement naturel de la maladie.

Les souris ont toutes eu un examen d'IRM (Siemens, Avanto 1.5 T) initial, 1 semaine et 3 semaines après le début du traitement. Le protocole d'IRM comportait une séquence de diffusion de type HASTE avec 12 valeurs de b ($b=0, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 200, 400, 600, 800 \text{ s/mm}^2$) et une séquence coronale en pondération T2 TSE comportant des coupes jointives de 1.5 mm d'épaisseur (TR/TE=2570/77 ms ; matrice : 448x224) (Figure 23).

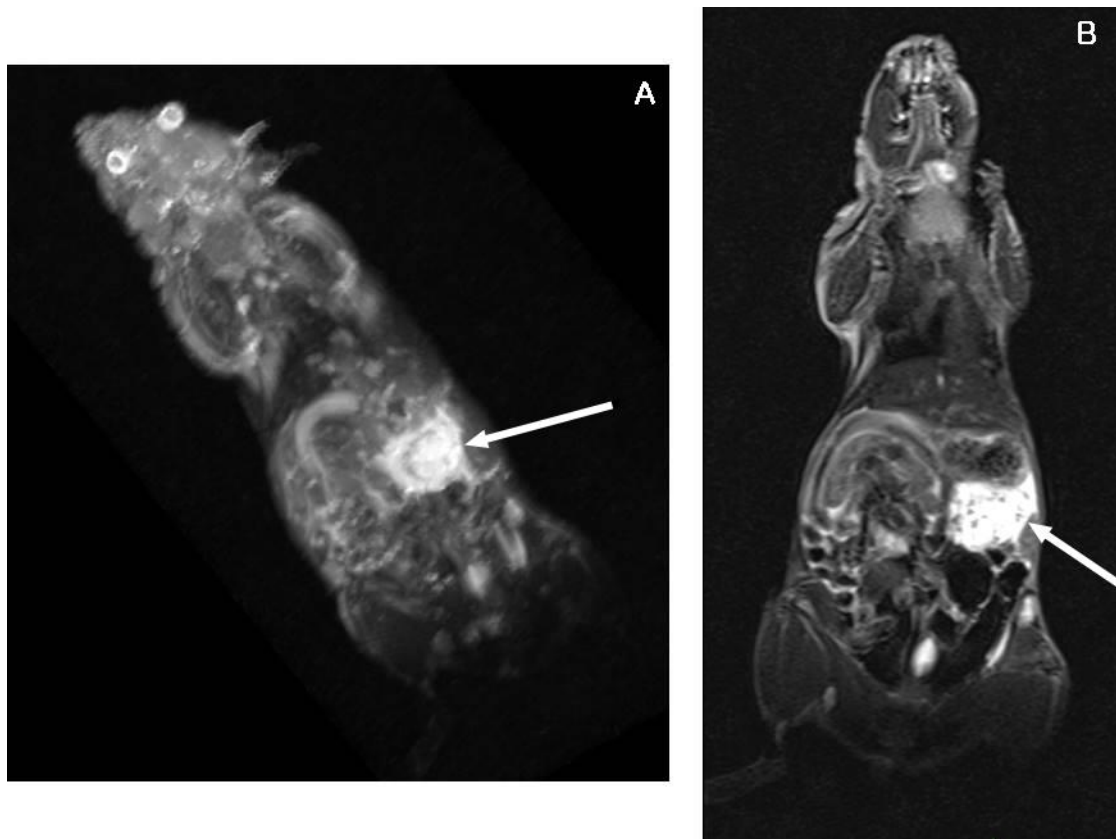


Figure 23. Acquisition coronale pondérée en T2 TSE. Coupes de 1.5 mm jointives permettant une évaluation volumétrique du PMP.

A 3 semaines, les souris ont été sacrifiées. La tumeur a été fixée dans l'OCT (Optimal Cutting Temperature) et congelée. Puis, la tumeur était découpée au cryotome en coupes de 5 μm et incubées avec des anticorps issus de lapins, dirigés contre le CD31 (1/50) (BD Pharmingen, Le Pont-de-Claix, France), puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Les images ont été acquises avec un microscope à fluorescence. La densité micro-vasculaire (DMV) a été évaluée par la technique des « *hots spots* » en calculant le nombre de pixels fluorescents par champ de visualisation en utilisant le logiciel ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, USA) (Figure 24).

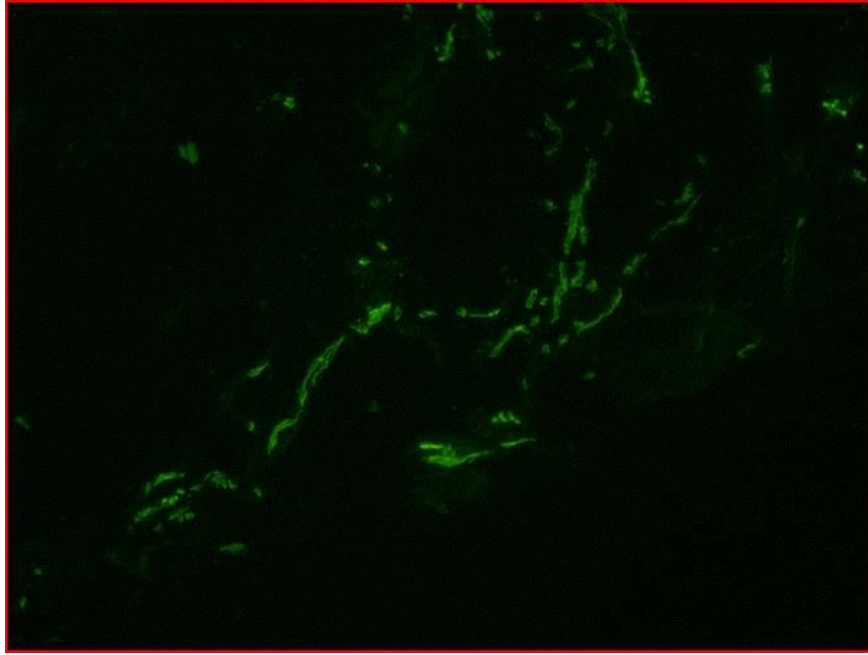


Figure 24. Immunomarquage au CD31 (grossissement x 20 au microscope à fluorescence).

Les marqueurs sériques de l'angiogenèse (VEGF, PlGF, et TGF- β) ont été dosés dans le sang des souris au sacrifice par la méthode ELISA.

3.2.2.2 Analyse des images :

Le plus grand diamètre et le volume tumoral ont été évalués à chacun des points de suivi sur les images pondérées en T2 TSE avec le logiciel *Directview (11.3 sp1 version, Carestream Health Inc, Rochester, NY, USA)* après segmentation manuelle.

Les cartographies IVIM des paramètres D , D^* et f ont été générées avec un script d'ajustement développé sous Matlab[®] (v. R2016a, The MathWorks Inc, Natick, MA, USA) par la technique des moindres carrés basé sur l'algorithme de Levenberg-Marquardt (figure 25). Les mesures ont été faites avec le logiciel ImageJ[®] sur les images de cartographie D , D^* et f par segmentation manuelle de la tumeur et extraction de la valeur moyenne.

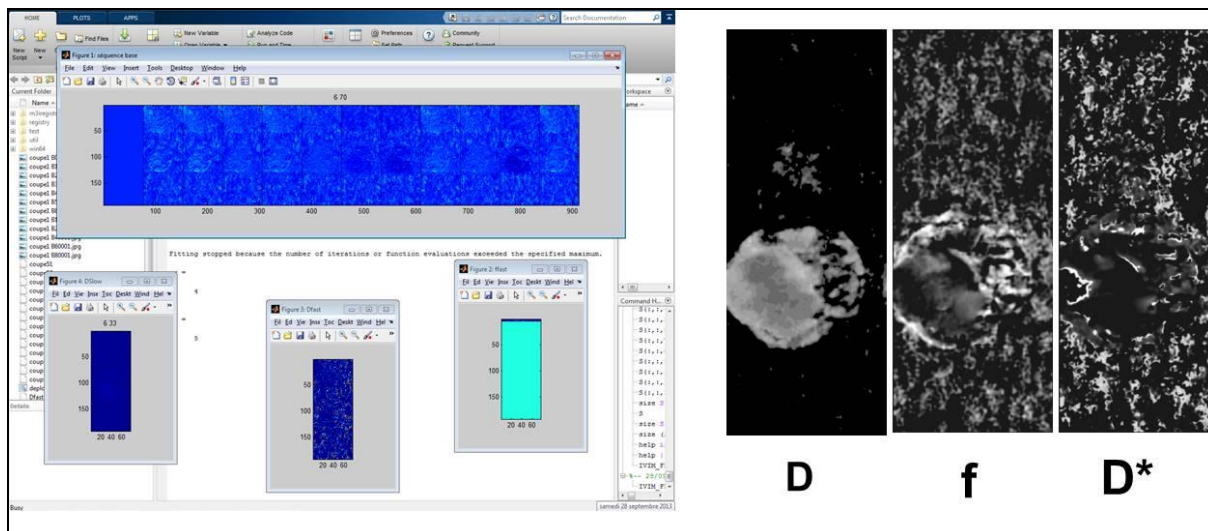


Figure 25. Post traitement des images de diffusion avec le script d'ajustement développé sous Matlab[®] permettant d'extraire des cartographies D, D* et f.

3.2.2.3 Résultats :

Les données à J0 n'ont pas été exploitables pour une souris du groupe contrôle en raison d'artéfacts de mouvements. Une souris dans chacun des groupes est décédée entre J7 et J21. A J0, il n'y avait pas de différence entre les 2 groupes pour les valeurs de D, D* et f (tableau 1). A J7, on observait une augmentation non significative de D dans les deux groupes. D* et f étaient stables entre J7 et J0 avec une diminution non significative f dans le groupe traité par sorafénib. A J21, la valeur de f et de D* était inférieure dans le groupe traité. Il n'y avait pas de différence significative entre les 2 groupes concernant le D (figure 26).

		J0	J7	J7 vs J0 <i>P</i> =	J21	J21 vs J7 <i>P</i> =
D (.10 ⁻³ mm ² /s)	Contrôle	2,85±0,34	2,91±0,10	0.656	2,94±0,12	0.561
	Sorafénib	2,84±0,20	2,99±0,32	0.245	2,90±0,31	0.574
	<i>P</i>	0,931	0,481		0,672	
D* (.10 ⁻³ mm ² /s)	Contrôle	34,66±1,52	34,52±2,95	0.901	35,54±1,05	0.370
	Sorafénib	34,84±1,99	33,41±4,90	0.402	33,42±2,35	0.993
	<i>P</i>	0,829	0,562		0,033	
f (%)	Contrôle	32,5±2,1	32,2±1,3	0.728	32,2±1,4	0.969
	Sorafénib	32,8±2,0	30,6±3,1	0.080	26,9±2,9	0.018
	<i>P</i>	0,706	0,191		0,004	

Tableau 1. Valeurs moyennes de D, D* et f au cours du suivi. Comparaison entre les groupes réalisée avec le test t de Student. Le gras indique les valeurs significatives.

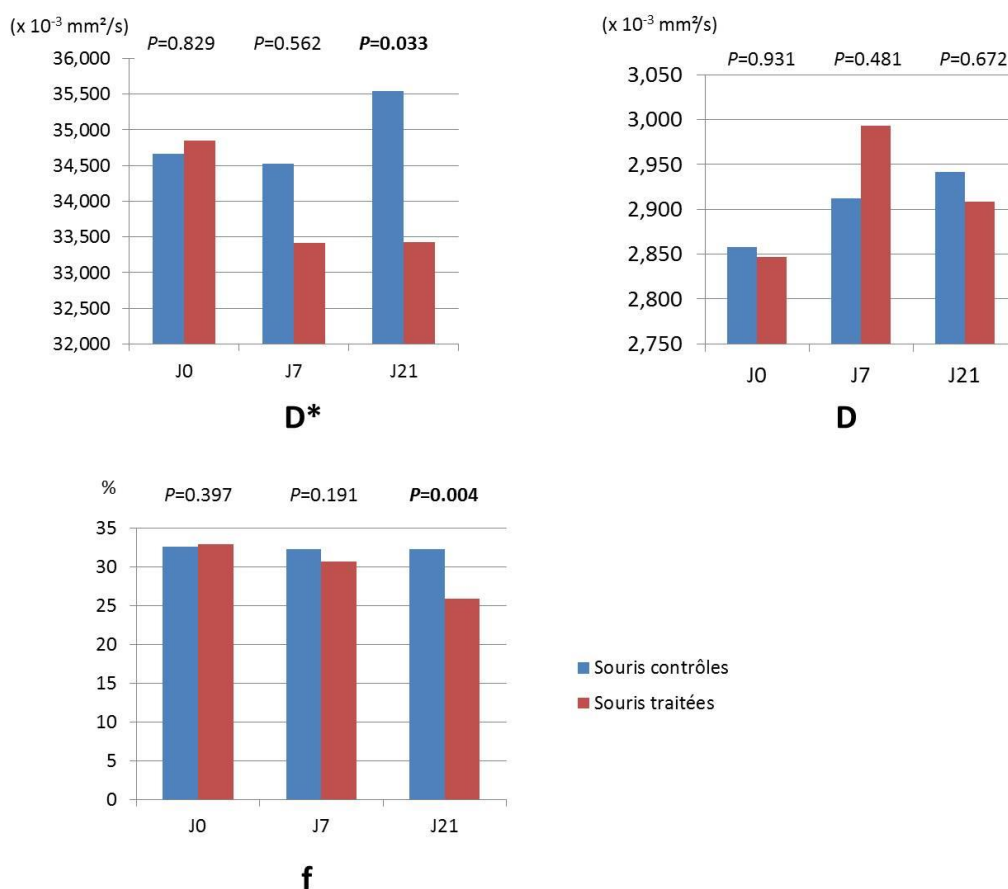


Figure 26. Diagrammes de l'évolution des paramètres IVIM dans les 2 groupes au cours du temps.

En immunofluorescence, la densité micro-vasculaire à J21 était plus élevée chez les souris témoins que chez les souris traitées (1.59 ± 0.73 vs. 0.68 ± 0.45 u.a., $P=0.0005$) (Figure 27)

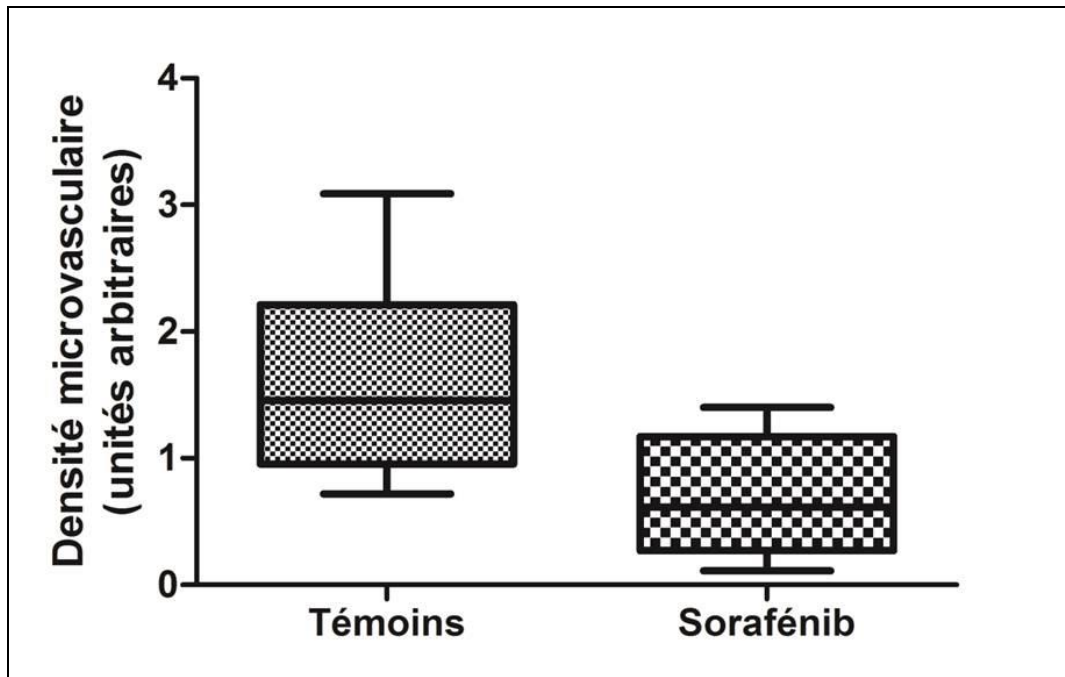


Figure 27. Boite à moustache représentant la densité micro-vasculaire à J21. Elle était inférieure chez les souris traitées que chez les souris témoins (1.59 ± 0.73 vs. 0.68 ± 0.45 u.a., $P=0.0005$).

Les taux sanguins des marqueurs sériques de l'angiogenèse étaient très significativement inférieurs chez les souris traitées (figure 28).

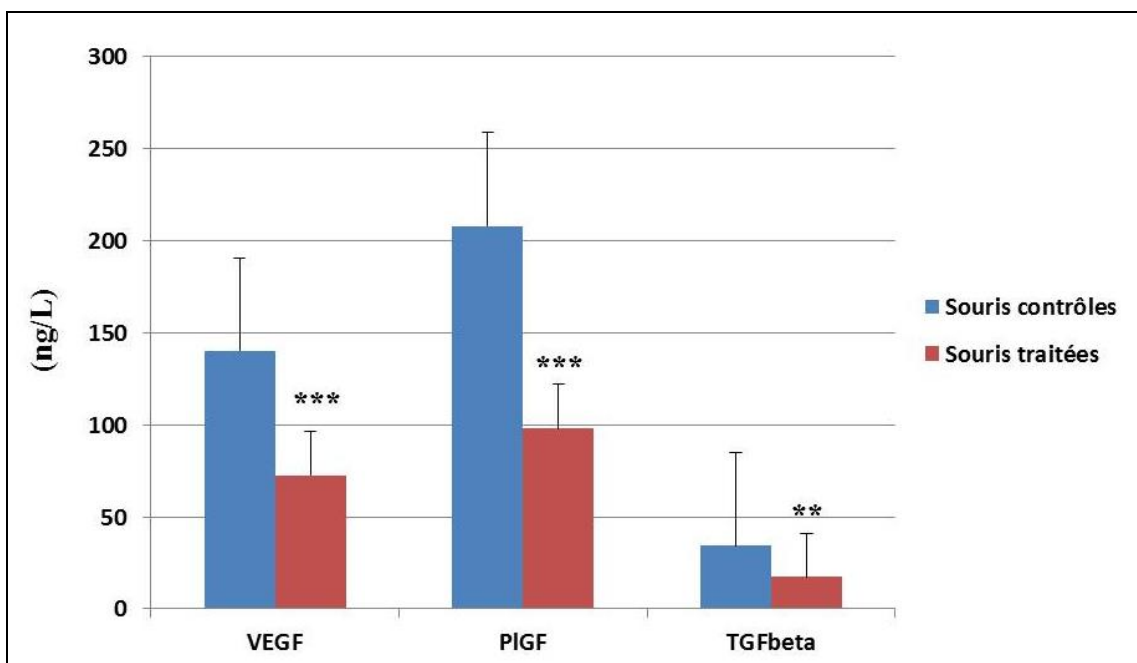


Figure 28. Analyse des marqueurs sériques de l'angiogenèse (VEGF, PlGF et TGF- β). Le niveau d'expression de VEGF, PlGF et TGF- β étaient significativement diminués chez les souris traitées par sorafénib (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ souris traitées vs souris témoins, test t de Student)

Le volume tumoral ainsi que la mesure du plus grand diamètre de la tumeur sur les images pondérées en T2-TSE n'était pas significativement différent entre les deux groupes au cours du suivi (figure 29).

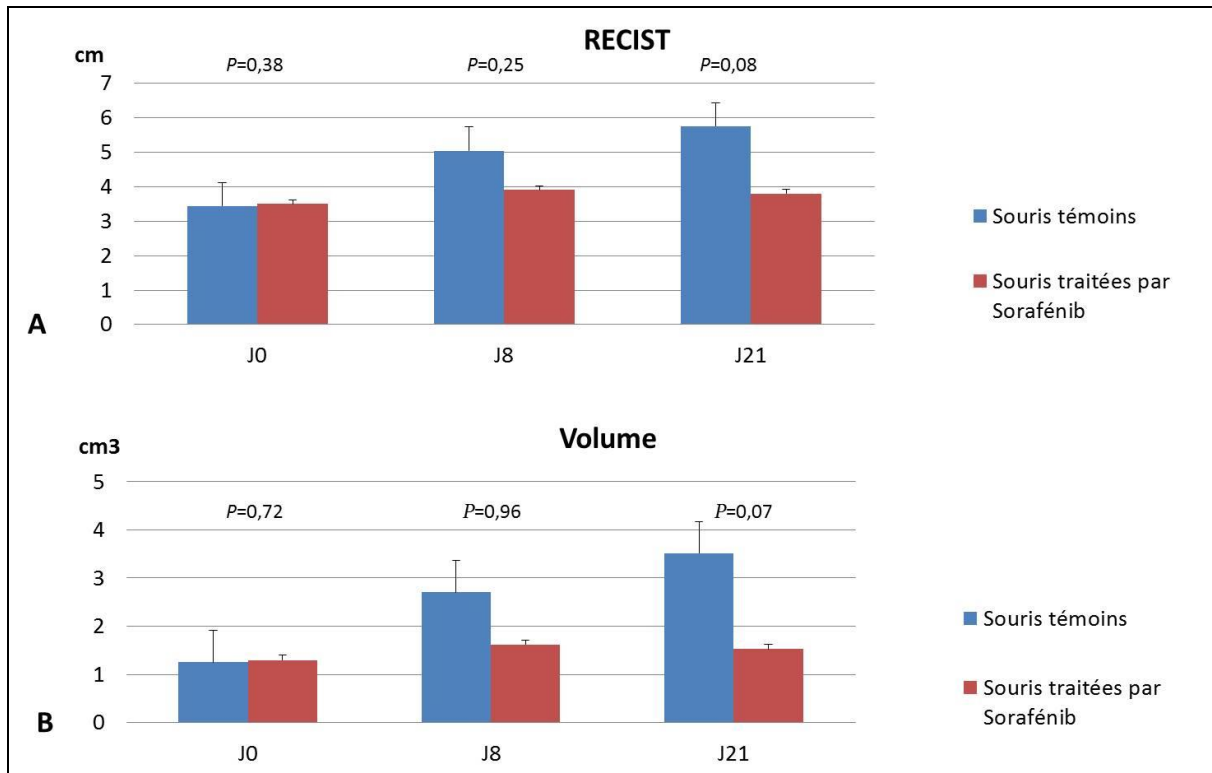


Figure 29. Evolution du volume tumoral et du plus grand diamètre de la tumeur (critère RECIST) au cours du suivi. La différence n'atteignait pas la significativité, y compris à J21.

3.2.2.4 Conclusion :

Dans cette expérience, nous avons pu suivre les paramètres IVIM dans le modèle murin de PMP. Nous avons ainsi montré chez les souris traitées par anti-angiogéniques une décroissance de f de D^* , de la densité micro-vasculaire au sein de la tumeur et des marqueurs sériques de l'angiogénèse. Ces diminutions sont mesurable plus précocement que la modification morphologique de la tumeur qui semble se produire plus tardivement. Par ailleurs, il semble se produire une augmentation de D à J7 en particulier chez les souris traitées, mais cette augmentation de perdure pas à J21 et il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes au cours du suivi. Dans la plupart des études ayant suivi des patients ou des souris sous traitements anti-angiogéniques, on observe fréquemment une augmentation de D en rapport avec la nécrose tumorale associés et la décroissance de f et D^*

(219, 220). Cette différence pourrait en partie être expliquée par notre modèle et la nature peu cellulaire du PMP, donc peu sujet à la nécrose, alors que sa richesse vasculaire en fait un excellent modèle pour explorer l'angiogenèse. L'objectif de futures recherches sera d'expliquer cette évolution (c.f. perspectives).

4. Perspectives

4.1 Projet Evaluation quantitative de la microcirculation tumorale et de la réponse à un traitement anti-angiogénique dans un modèle murin de PMP par IRM de perfusion, de diffusion multi-b (IVIM) et analyse de texture tridimensionnelle.

Projet de master 2 qui sera réalisé d'octobre 2016 à juin 2017 par Maxime BARAT au sein de l'unité INSERM U965 sous la codirection du Dr Anthony DOHAN et du Pr Philippe SOYER.

L'objectif de ce master sera de suivre longitudinalement le PMP murins au cours du traitement à la fois en IRM multiparamétrique, en histologie et immunohistochimie. Les souris auront donc des biopsies chirurgicales au cours du suivi, et les résultats des analyses histologiques et immuno-histochimiques seront corrélés aux paramètres d'imagerie fonctionnelle. Cela nous permettra de mieux comprendre les mécanismes d'actions du traitement anti-angiogénique et d'expliquer les évolutions observées des différents biomarqueurs obtenus en IRM fonctionnelle. Plusieurs techniques d'imagerie fonctionnelle seront utilisées : la méthode IVIM, l'IRM de perfusion dynamique, et l'analyse d'histogramme tridimensionnelle.

4.1.1 Résumé du projet :

Le pseudomyxome péritonéal (PMP) est un cancer rare du péritoine, à développement invasif local dont le traitement de référence est la chirurgie de cytoréduction associée la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale. Chez les patients pour lesquels la résection complète est impossible, aucune chimiothérapie adjuvante n'a montré une réelle efficacité. Une étude menée sur modèle murin par l'unité INSERM U965 de l'hôpital Lariboisière a mis en évidence une efficacité des anti-angiogéniques, en particulier du Bévacicumab et le sorafénib. L'objectif de ce master sera d'évaluer la réponse aux traitements anti-angiogéniques dans ce modèle murin de PMP avec de nouveaux outils d'imagerie : l'IRM de perfusion dynamique, l'IRM de diffusion multi-b, et l'analyse de texture tridimensionnelle.

Trois groupes de 10 souris nues seront greffées en orthotopie avec du PMP issue d'un même modèle de PMP. Les animaux auront tous une IRM de baseline 4 semaines après

la greffe, et une biopsie chirurgicale sera réalisée pour chaque animal pour évaluer la densité micro-vasculaire (DMV) et la nécrose tumorale. Puis les 10 souris seront traitées par sorafenib, 10 par bevacizumab et 10 par placebo. Une IRM et une biopsie chirurgicale seront répétées à 8 semaines de la greffe puis une dernière IRM sera réalisée à 12 semaines et les animaux seront sacrifiés. Les résultats quantitatifs d'imagerie fonctionnelle seront corrélés aux marqueurs angiogéniques sériques, à l'évolution de la DMV, au volume et au poids tumoral à la date du sacrifice.

4.1.2 Etat de la question

Le PMP est un cancer rare du péritoine, provenant de la perforation d'une tumeur mucineuse appendiculaire et développant une carcinose mucineuse^{1,2}. Le traitement de référence actuel, consiste en une chirurgie de cytoréduction tumorale avec exérèse de toutes les lésions macroscopiques, associée à une chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale^{3,4}. Chez les patients pour lesquels la résection complète est impossible, aucune chimiothérapie adjuvante n'a montré une réelle efficacité.

Une étude menée sur modèle murin par l'unité INSERM U965 de l'hôpital Lariboisière a mis en évidence une forte angiogenèse tumorale et une efficacité des anti-angiogéniques, en particulier du Bévacizumab⁵. Ce modèle murin orthotopique de PMP, reproductible et reproduisant les caractéristiques tumorales humaines, est un excellent modèle d'angiogenèse tumorale relativement pure.

L'IRM de perfusion dynamique permet de quantifier la perfusion tumorale et la perméabilité des tumeurs. L'IRM de diffusion multi-b (IVIM) permet de mesurer des paramètres quantitatifs qui reflètent la cellularité, la nécrose et la fibrose dans les tissus tumoraux. Son utilisation dans l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie a déjà été étudiée dans de nombreuses localisations tumorales.

L'analyse de texture est une nouvelle technique en plein développement qui a pour l'instant été évaluée avec succès dans le foie, le rein, le poumon, les tumeurs ORL et le cerveau. Il s'agit d'une méthode de post-traitement des images qui permet de quantifier la distribution spatiale de l'intensité des différents pixels de l'image, et donc de donner une mesure quantitative de l'hétérogénéité des tumeurs⁶.

1. Ronnett BM, Shmookler BM, Diener-West M, Sugarbaker PH, Kurman RJ. Immunohistochemical evidence supporting the appendiceal origin of pseudomyxoma peritonei in women. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16:1-9.
2. Szych C, Staebler A, Connolly DC, Wu R, Cho KR, Ronnett BM. Molecular genetic evidence supporting the clonality and appendiceal origin of Pseudomyxoma peritonei in women. *Am J Pathol* 1999;154:1849-55.
3. Ronnett BM, Yan H, Kurman RJ, Shmookler BM, Wu L, Sugarbaker PH. Patients with pseudomyxoma peritonei associated with disseminated peritoneal adenomucinosis have a significantly more favorable prognosis than patients with peritoneal mucinous carcinomatosis. *Cancer* 2001;92:85-91.
4. Miner TJ, Shia J, Jaques DP, Klimstra DS, Brennan MF, Coit DG. Long-term survival following treatment of pseudomyxoma peritonei: an analysis of surgical therapy. *Ann Surg* 2005;241:300-8.
5. Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: An in vivo model to test anti-angiogenic drug effects. Dohan A, Lousquy R, Eveno C, Goere D, Broqueres-You D et al. *Am J Pathol* 2014 ;184(7):1920-9.
6. Sala E, Kataoka MY, Priest AN et al (2012) Advanced ovarian cancer: multiparametric MR imaging demonstrates response- and metastasis-specific effects. *Radiology* 2012;263:149-59

4.1.3 Objectif du projet

L'objectif de ce master sera d'évaluer un traitement anti-angiogénique, le sorafenib, sur ce modèle murin de PMP et de quantifier la réponse au traitement avec de nouveaux outils d'imagerie : l'IRM de perfusion dynamique, l'IRM de diffusion multi-b, et l'analyse de texture tridimensionnelle. Il permettra donc d'ouvrir la voie à un nouveau traitement efficace pour les patients non résecable. Par ailleurs, ce modèle murin d'angiogenèse permettra la mise au point et l'évaluation d'une nouvelle méthode de quantification de la réponse aux traitements anti-angiogéniques.

4.1.4 Méthodologie

Trois groupes de 10 souris nudes seront greffées en orthotopique avec du PMP issue d'un même modèle de PMP. Les animaux auront tous

- une IRM de baseline 4 semaines après la greffe, comportant des séquences T2, de perfusion et d'IVIM
- une biopsie chirurgicale sera réalisée pour chaque animal pour évaluer la densité micro-vasculaire (DMV).

- Puis les 10 souris seront traitées par sorafenib, 10 par bevacizumab et 10 par placebo.
- Une IRM et une biopsie chirurgicale seront répétées à 8 semaines de la greffe puis une dernière IRM sera réalisée à 12 semaines et les animaux seront sacrifiés.
- Les tumeurs seront segmentées sur les images T2, et les cartographies des différents paramètres de perfusion (flux sanguin tumoral (TBF), volume sanguin tumoral (TBV), temps de transit moyen (MTT), et le produit perméabilité par surface) et des paramètres IVIM (D et D* et f) seront analysées avec le logiciel d'analyse de texture développé par l'équipe de McGill University.
- Les paramètres quantitatifs qui seront mesurés seront : la valeur moyenne du TBF, du TBV, du MTT, du produit perméabilité par surface, de D, D*, f, et pour chacun de ces paramètres, les 25^e et 75^e percentiles, l'écart type, l'aplatissement, la symétrie et l'entropie.
- Les valeurs quantitatives obtenues seront corrélées aux marqueurs angiogéniques sériques, à l'évolution de la DMV évaluée par immunofluorescence après marquage au CD₃₁, au volume tumoral à la date du sacrifice évaluée sur l'IRM et au poids de la tumeur.

4.1.5 Résultats attendus

- Cette étude pourrait ouvrir la voie à un essai clinique évaluant l'efficacité du sorafenib chez les patients avec PMP irrésécable. Actuellement, aucun traitement n'a fait la preuve de son efficacité chez ces patients, et le sorafenib a déjà l'AMM pour le traitement d'autres tumeurs digestives (CHC notamment)
- Cette étude permettra de valider de nouveaux critères d'imagerie fonctionnelle comme biomarqueur de la réponse aux biothérapies. Ces critères pourront ensuite être transposés aux études cliniques humaines.
- La collaboration internationale mise en œuvre dans le cadre de cette étude, permettra d'évaluer ces nouvelles techniques de traitement computationnel des images tridimensionnelles dans de nombreuses autres localisations tumorales.

4.2 Applications translationnelles : validation d'un nouveau mode d'évaluation de l'agressivité des PMP par échographie-Doppler des vaisseaux mésentériques

Notre travail sur la souris a montré que l'échographie Doppler permettait le suivi du développement et de l'angiogenèse tumorale chez le modèle murin de PMP et permettait de quantifier la réponse aux traitements anti-angiogéniques. Le PMP est une maladie pour laquelle aucun critère d'imagerie n'a été validé pour l'évaluation de la réponse. En effet, les critères morphologiques RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor) ne s'appliquent qu'aux tumeurs solides (129). Ces critères ne sont pas validés dans le cadre de la carcinose péritonéale.

Le PMP est une carcinose mucineuse rare limitée à la cavité péritonéale et dont le pronostic est lié à l'envahissement local et la compression des organes digestif. Le seul traitement curatif actuellement disponible est la chirurgie de cytoréduction péritonéale complète associée à la chimiothérapie hyperthermique intra péritonéale qui permet d'obtenir une survie prolongée. Du fait du caractère peu cellulaire de cette tumeur qui va sécréter une très importante quantité de mucine, mais avec relativement peu de cellules tumorales, les chimiothérapies classiques sont peu efficaces et aucune n'a montré d'efficacité pour prolonger la survie. Plusieurs études ont suggéré un rôle important de l'angiogenèse dans le développement de cette maladie, avec une importante expression de marqueurs de l'angiogenèse et une efficacité des traitements anti-angiogéniques chez des modèles murins et dans certains rapports de cas chez des patients (221-223).

Lorsque la résection est incomplète ou que l'extension de la maladie est trop importante pour envisager un traitement chirurgical, il reste peu d'options thérapeutiques. En cas de PMP de haut grade, certaines équipes vont proposer des chimiothérapies identiques à celles utilisées dans le cadre des cancers colorectaux et parfois des traitements par anti-angiogéniques. Toutefois tous les PMP ne vont pas avoir la même évolutivité. Le grade histologique semble être un facteur pronostique important mais l'agressivité et la survie sont variables pour les PMP de même grade (224). Chez certains patients, la maladie va évoluer très lentement ou être stable pendant plusieurs années. Ces patients bénéficieraient donc d'une pause thérapeutique. En revanche, chez d'autres patients, l'évolution de la maladie va être beaucoup plus rapide et provoquer des signes cliniques en quelques mois. Ces patients pourraient bénéficier d'un traitement. Toutefois, il n'existe pas à l'heure actuelle de critères

clairs et validés permettant d'évaluer la progression ou la réponse à un traitement dans cette maladie.

De nombreuses études ont montré que l'échographie Doppler était un outil permettant de monitorer les flux dans les vaisseaux digestifs que ce soit dans les pathologies tumorales ou inflammatoires (152, 154, 155, 157, 223, 225, 226). Les principaux avantages de cette technique sont un large accès, son faible coût, son caractère non-invasif et la possibilité d'obtenir une valeur quantitative des flux sanguins. Son seul réel inconvénient est son caractère opérateur dépendant.

Nous sommes donc en train de conduire une étude prospective depuis janvier 2012 dont l'objectif est double:

- Evaluer l'échographie Doppler en préopératoire pour prédire l'extension, le grade et la résecabilité de la maladie.
- Evaluer l'échographie Doppler en postopératoire pour évaluer l'évolutivité de la maladie résiduelle

4.2.1 Patients et méthodes

Depuis janvier 2012, 54 patients ont été inclus : 41 patients ont eu une échographie Doppler avec débitmétrie de l'AMS en préopératoire (figure 1), dans le mois précédent une chirurgie de cytoréduction, et 44 patients ont eu une débitmétrie dans les 6 mois suivant l'intervention. Parmi les 54 patients, 31 patients ont eu la débitmétrie avant et après la chirurgie, 10 uniquement avant et 13 uniquement après.

Les patients ont été classés en 3 groupes pronostiques:

1. Groupe 1: patients qui ont eu une résection complète (CC0 ou CC1) avec CHIP, sans récurrence dans les deux ans : n=22.
2. Groupe 2: Patient avec résection incomplète (CC2 ou 3) et vivants à 2 ans de la chirurgie et avec peu de symptômes cliniques (Performance Status=0, ou 1) : n= 20
3. Groupe 3: Patient avec résection incomplète résiduelle (CC2 ou 3) décédés à 2 ans ou vivant avec des symptômes cliniques majeurs (Performance Status >1) : n= 11

4.2.2 Résultats préliminaires

Débitmétrie de baseline:

Le débit préopératoire était corrélé linéairement à au PCI chirurgical ($r=0.65$, $p<0.001$, Figure 2). Tous les patients ayant un PMP de haut grade avaient un débit élevé comparativement aux PMP de bas grade sans que la différence n'atteigne la significativité (511 ± 168 vs 452 ± 180 mL/min, $P=0.497$)

L'ICP était différent entre le groupe 1 et le groupe 2 (18 ± 12 vs 31 ± 7 , $p=0.008$) ainsi qu'entre le groupe 1 et le groupe 3 (18 ± 12 vs 33 ± 6 , $p=0.007$). Il n'y avait pas de différence entre le groupe 2 et le groupe 3 ($p=0.371$).

Le débit dans l'AMS avait tendance à être plus bas chez les patient du groupe 1 que chez les patients du groupe 2 (394 ± 163 vs 511 ± 140 mL/min, $p=0.069$, figure 3) mais était significativement plus bas dans le groupe 1 que dans le groupe 3 (394 ± 163 vs 575 ± 181 mL/min, $p=0.008$). Il n'y avait pas de différence entre le groupe 2 et le groupe 3.

Débitmétrie postopératoire:

Après résection complète, le débit de l'AMS n'était pas différent d'une valeur normale (236 ± 44 , $P=0.095$ (Figure 3).

Il y avait une diminution significative du débit chez les patients du groupe 2 en postopératoire (diminution de 511 à 414 mL/min ; $P=0.029$). Il n'y avait pas de diminution du débit dans le groupe 3 (diminution de 575±181 à 633±143 mL/min ; $P=0.404$).

- Dans le groupe 1, La débitmétrie postopératoire était significativement diminuée par rapport aux valeurs préopératoires (diminution de 394±163 à 205±46 mL/min ; $P < 0.001$)
- Dans le groupe 2, (maladie faiblement agressive), il y avait une diminution significative du débit en postopératoire (diminution de 511 à 414 mL/min ; $P=0.029$).
- Dans le groupe 3 (maladie agressive), il n'y avait pas de diminution du débit (diminution de 575±181 à 633±143 mL/min ; $P=0.404$)

Les débits postopératoires étaient plus élevée dans le groupe 2 que dans le groupe 1 (414 ± 95 vs 205 ± 46 mL/min ; $P<0.001$), et dans le groupe 3 que dans le groupe 2 (633 ± 143 vs 414 ± 95 mL/min, $P<0.001$).

4.2.3 Discussion et conclusions

L'échographie Doppler de l'AMS semble être un outil puissant pour évaluer l'agressivité tumorale. En effet, d'après nos résultats préliminaires, il est possible de différencier les patients ayant une maladie très agressive des patients ayant une maladie plus « quiescente ». On peut donc construire un score pronostique incluant les valeurs de Doppler, ainsi que les données chirurgicales, et pathologiques permettant d'identifier les malades le plus à risque de développer une maladie agressive et pour lesquels on pourra proposer une chimiothérapie en post-opératoire. Les patients ayant une maladie quiescente, vont peu bénéficier de la chimiothérapie, et pourraient donc avoir une pause thérapeutique. C'est résultats, ainsi que le modèle que nous proposerons restent à être validés sur une cohorte différente de patients.

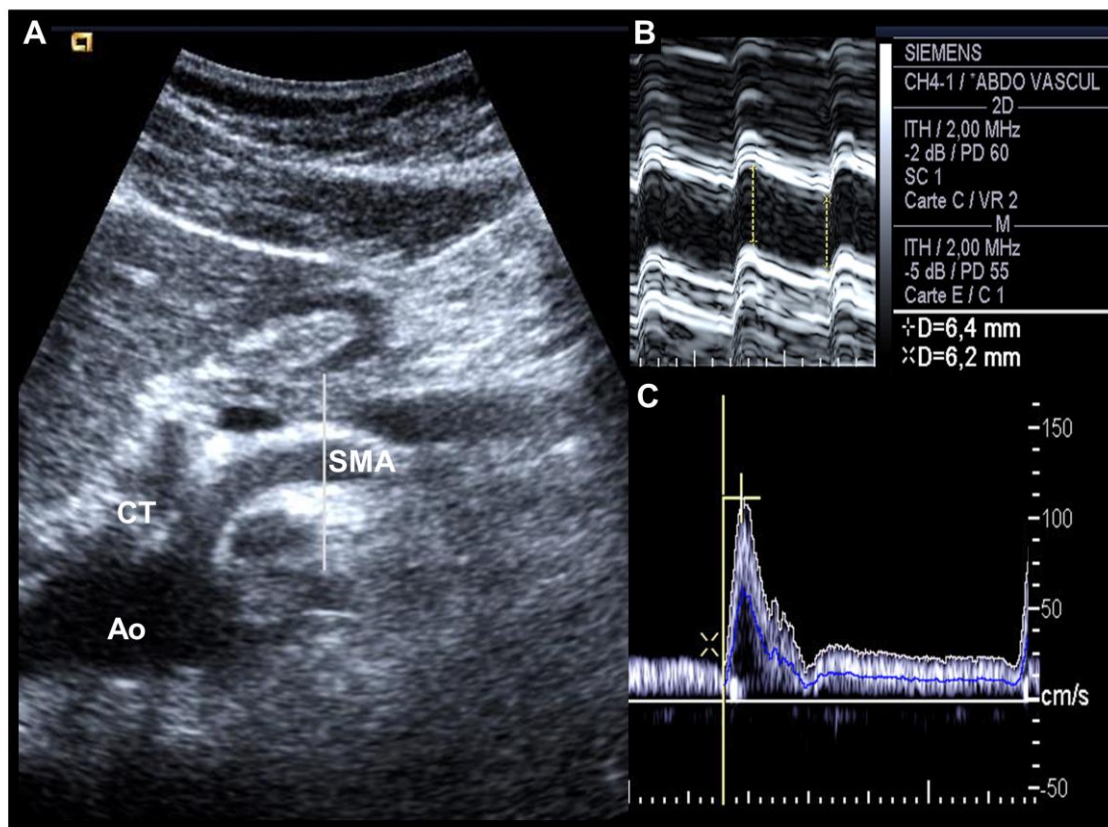


Figure 1: Superior mesenteric artery (SMA) examination by ultrasound Doppler imaging. **A:** Anterior sagittal cross sectional view of the abdomen for visualization of the SMA in its long axis. White line indicates the M-mode position on the screen. **B:** after activation of the M-mode the systolic and diastolic inner diameters of the SMA are measured. **C:** after activation of pulsed Doppler, the Doppler sample volume was placed and adjusted to the arterial section of the SMA, 2 to 3 centimeters after its origin, proximal to any side branches. A spectral analysis of the Doppler blood flow velocity waveforms is then recorded and Spatial-average-time-average blood flow velocity is calculated and is the computed-derived value calculated by integrating the area under instantaneous mean velocity curve (blue line) for blood flow volume calculation. White line is representative of the time-average maximal velocity (maximum velocity per unit time is a computer-derived value calculated by integrating all the area under envelop of the waveform) different from the spatial-average-time-average blood flow velocity.

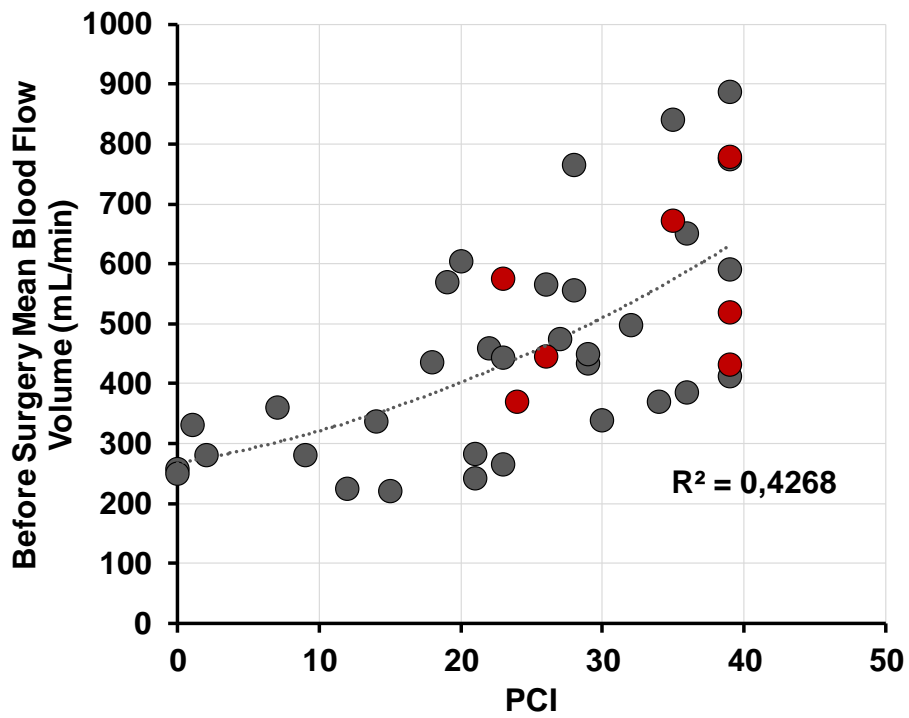


Figure 2: linear regression between blood flow volume (BFV) measured in the superior mesenteric artery (SMA) before application of the surgical treatment. BFV in SMA elevated with IPC ($r=0.65$, $p<0.001$), illustrative of the extension of the tumor vascular network branched on the superior mesenteric artery network with the increase of tumor location in the abdominal cavity (● low grade, ● high grade).

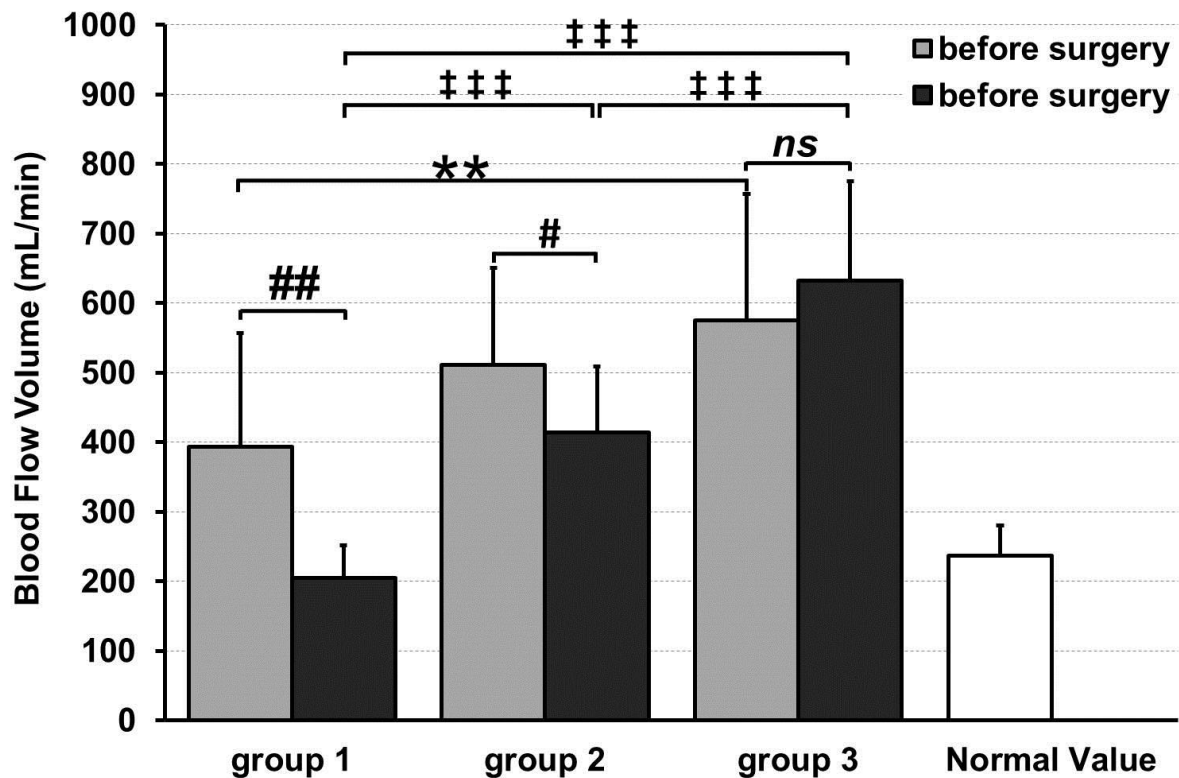


Figure 3 : Evolution of the blood flow volume (BFV) in the superior mesenteric artery (SMA) following the surgical treatment.

Before surgery, patients with completeness of cytoreductive surgery (CCR0) and absence of recurrence within two years (group 1) presented elevated BFV (394 +/-163 mL/min, $p<0.001$) compared to normal value (236+/-44 mL/min). This elevation was less important than in patients without completeness of cytoreductive surgery (CCR1-3) and with active progressive disease (group 3, 575+/-181 mL/min, $p=0.003$).

- In group 1 patients, the BFV in the SMA dropped to normal values (205+/-46 vs 394+/-163 mL/min before surgery, $p<0.001$).
- In group 2 patients, (weakly active progressive disease, the BFV in the SMA lightly decreased from 511+/-140 to 414+/-195 mL/min ($p=0.029$).
- In group 3 patients (active progressive disease), the BFV in the SMA was not changed after surgical treatment.

Moreover, the post-surgical treatments BFV values were more elevated in group 2 than group 1 patients (414+/-95 vs 205+/-46 mL/min, $p<0.001$), and in group 3 than group 2 patients (633+/-143 vs 414+/-95 mL/min, $p<0.001$).

(** $p<0.01$, baseline BFV in the SMA related to the patients group; # $p<0.05$; ## $p<0.01$, BFV measured before and after surgery ; ‡‡‡ $p<0.001$, BFV measured after surgical treatment related to patients group)

4.3 Prédiction de la survie à 2 ans chez les patients atteints de CP non résecable

Il s'agit d'une étude pilote réalisée chez 24 patients. Les résultats seront présentés au 10th *International Congress on Peritoneal Surface Malignancies*, November 17-19, 2016 Washington, DC, USA. L'objectif était d'évaluer l'analyse d'histogramme sur la TDM de baseline chez des patients ayant une CP irrésécable et de construire un modèle prédictif de la survie. Nous avons utilisé un logiciel d'analyse d'histogramme qui a montré des résultats prometteurs dans de nombreuses études : TexRAD® Ltd, Cambridge, UK

Prediction of 2-years survival in patients with non resectable peritoneal carcinomatosis from colorectal origin using functional imaging: Ancillary study of a multicenter prospective study (PRODIGE 9)

DOHAN Anthony¹, GALLIX Benoit², REINHOLD Caroline², GUIU Boris^{3,4}, LE MALICOT Karine³, BENNOUNA Jaafar⁵, GHIRINGHELLI François⁶, BOIGE Valérie⁷, TAIEB Julien⁸, BOUCHE Olivier⁹, FRANCOIS Eric¹⁰, PHELIP Jean-Marc¹¹, BOREL Christian¹², FAROUX Roger¹³, SEITZ Jean-François¹⁴, JACQUOT Stéphane¹⁵, GENET Dominique¹⁶, LEPAGE Come^{17,19}, SOYER Philippe¹, HOEFFEL Christine²⁰, APARICIO Thomas²¹

¹ Hôpital Lariboisière, Service de Radiologie Viscérale et Vasculaire, INSERM U965, Paris

² McGill University Health Center - Montreal - Canada

³ Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (FFCD), Dijon

⁴ Département de Radiologie, CHU de Montpellier

⁵ Institut de cancérologie de l'Ouest, Centre René Gauducheau- Service d'Oncologie, Saint Herblain

⁶ Centre Georges-François Leclerc, Service Oncologie, Dijon

⁷ Institut Gustave Roussy, Service d'HGE, Villejuif

⁸ Hôpital Européen Georges Pompidou, Service HGE, Paris

⁹ CHU Reims, Service oncologie digestive, Reims

¹⁰ Centre Antoine Lacassagne, Service d'Oncologie, Nice

¹¹ CHU de Saint Etienne - Hôpital Nord, Service HGE, Saint Priest en Jarez

¹² Centre Paul Strauss, Service d'Oncologie, Strasbourg

¹³ CH Les Oudairies - Service d'HGE, La Roche sur Yon

¹⁴ CHU la Timone, Service d'HGE et d'Oncologie, Marseille

¹⁵ Centre de Cancérologie du Grand Montpellier, Montpellier

¹⁶ Clinique F.Chenieux, Limoges

¹⁷ Département de Gastroenterologie, Dijon

¹⁸ Centre Léon Bérard, Lyon

¹⁹ INSERM U866, Dijon

²⁰ Service de radiologie de l'Hôpital Maison Blanche, CHU, Reims

²¹ Hôpital Avicenne, Département de Gastroenterologie, Bobigny

Background

Peritoneal carcinomatosis (PC) is a frequent and severe evolution of colorectal cancer (CRC), which is associated with poor survival (5.2 months). The assessment of response to chemotherapy is difficult and is based on morphological changes on computed tomography

(CT). Recently, new non-invasive and innovative functional imaging techniques such as texture analysis (TA) have been developed to obtain early information regarding tumor response to therapy.

Purpose

To determine whether texture analysis (TA) on pre-treatment and two months post-chemotherapy computed tomography (CT) images can predict 2-year survival in patients with metastatic non resectable colo-rectal cancer (CRC) and peritoneal carcinomatosis (PC) nodules treated by Folfiri and bevacizumab.

Patients and Methods

This is an ancillary study from PRODIGE-9 multicenter prospective study for which 494 patients with metastatic CRC treated by Folfiri and bevacizumab had been enrolled. In 24 patients who had PC nodules greater than 300 mm², TA was performed by two abdominal radiologists in consensus using TexRAD® software on the dominant PC nodule during the venous phase of a contrast-enhanced CT examination, at baseline and two months post-chemotherapy. PC nodules surface area, baseline TA parameters and their changes from baseline were correlated with the 2-year survival status. Receiver operating characteristic (ROC) curves were performed and the 2 strongest parameters were incorporated into a multivariate logistic regression model to identify predictive factors for 2-year survival and their odd-ratios (OR). A score combining these 2 factors was built and optimal cutoff values for predicting 2-year survival status was determined with ROC curve analysis. Survival was estimated with the Kaplan-Meier method and compared between groups with the log-rank test.

Results

The strongest predictive factors for 2-year survival status were two baseline parameters: baseline mean value (ssf=0)(AUC=.72;(.44-.1.00)) and the baseline skewness value (ssf=6) (AUC=.77;(.50-.1.00)). On ROC curve analysis, optimal cut-off values were determined. A baseline mean value (ssf=0)<27 UH yielded a sensitivity of 83.3% and a specificity of 66.6%. A baseline skewness (ssf=6) value <0 yielded a sensitivity of 66.7% and a specificity of 83.3%. Patients with only mean value (ssf=0)<27 UH or baseline skewness (ssf=6) value <0 but not both simultaneously had a higher overall survival rate (median=2.0 year vs 1.1 years, *P*=.01).

Conclusion

TA parameters on baseline CT may be able to predict which patient will have a long overall survival in metastatic CRC with PC nodules treated by Folfiri and bevacizumab. These results need to be replicated in further studies.

Clinical Relevance statement:

Contrast-enhanced computed tomography texture analysis performed on peritoneal carcinomatosis nodules from non resectable metastatic colo-rectal cancer treated by Folfiri and bevacizumab allows prediction of patients 2-year survival.

Supported by ROCHE

Figure 1. PC lesion in the pouch of Douglas on CT (A, arrow). Manual segmentation and texture analysis with TexRAD® on CT (B).

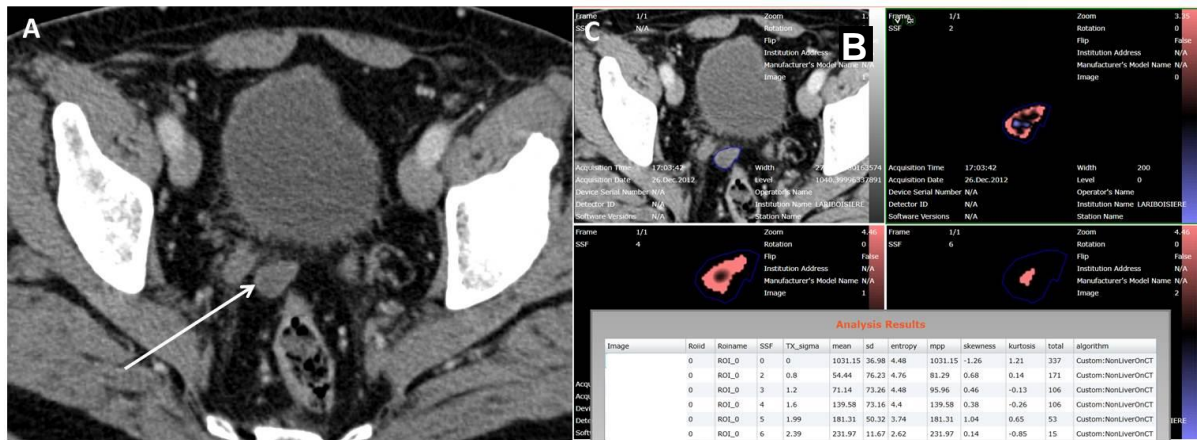


Figure 2. ROC curves of the texture parameters to predict 2-year-survival status

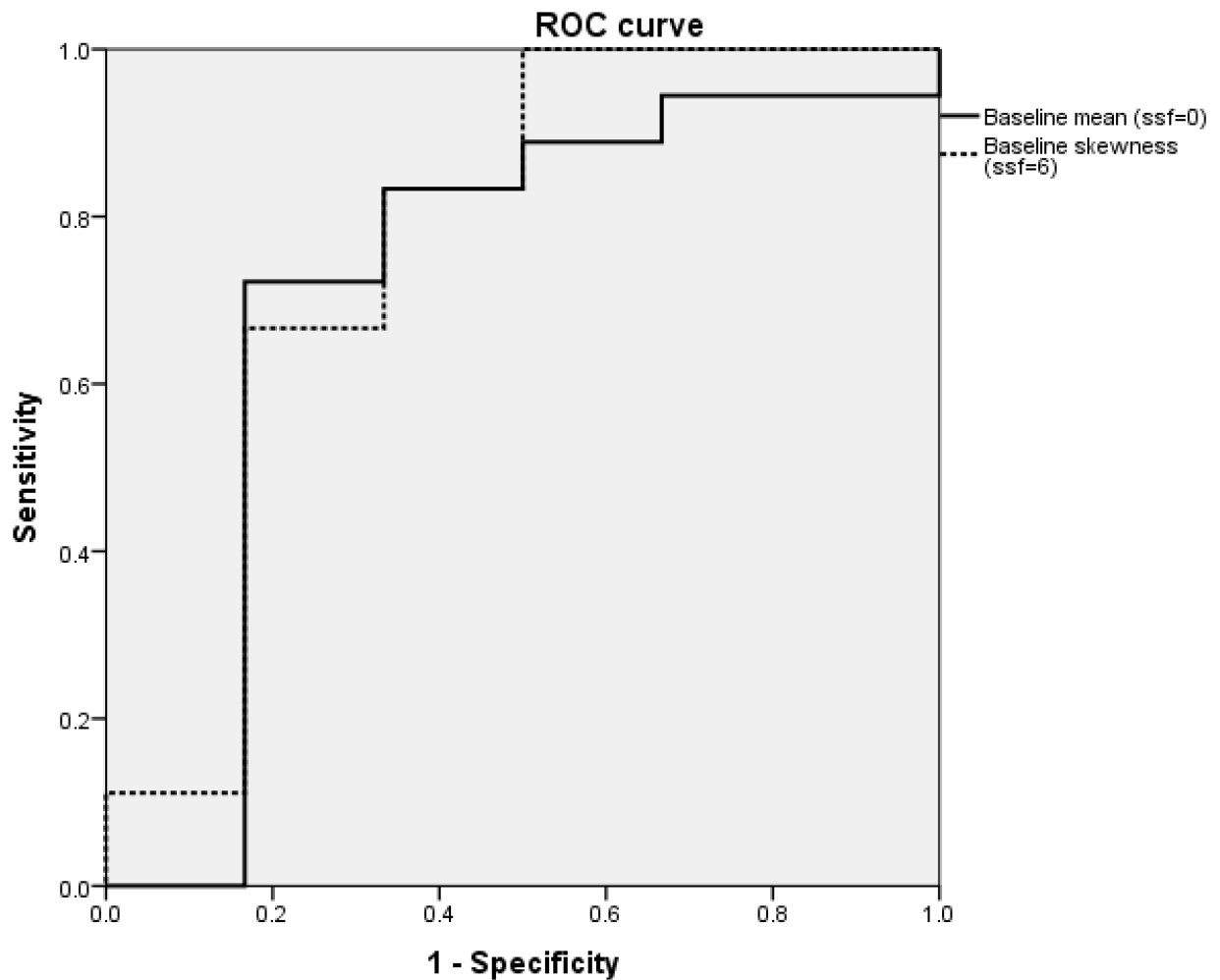
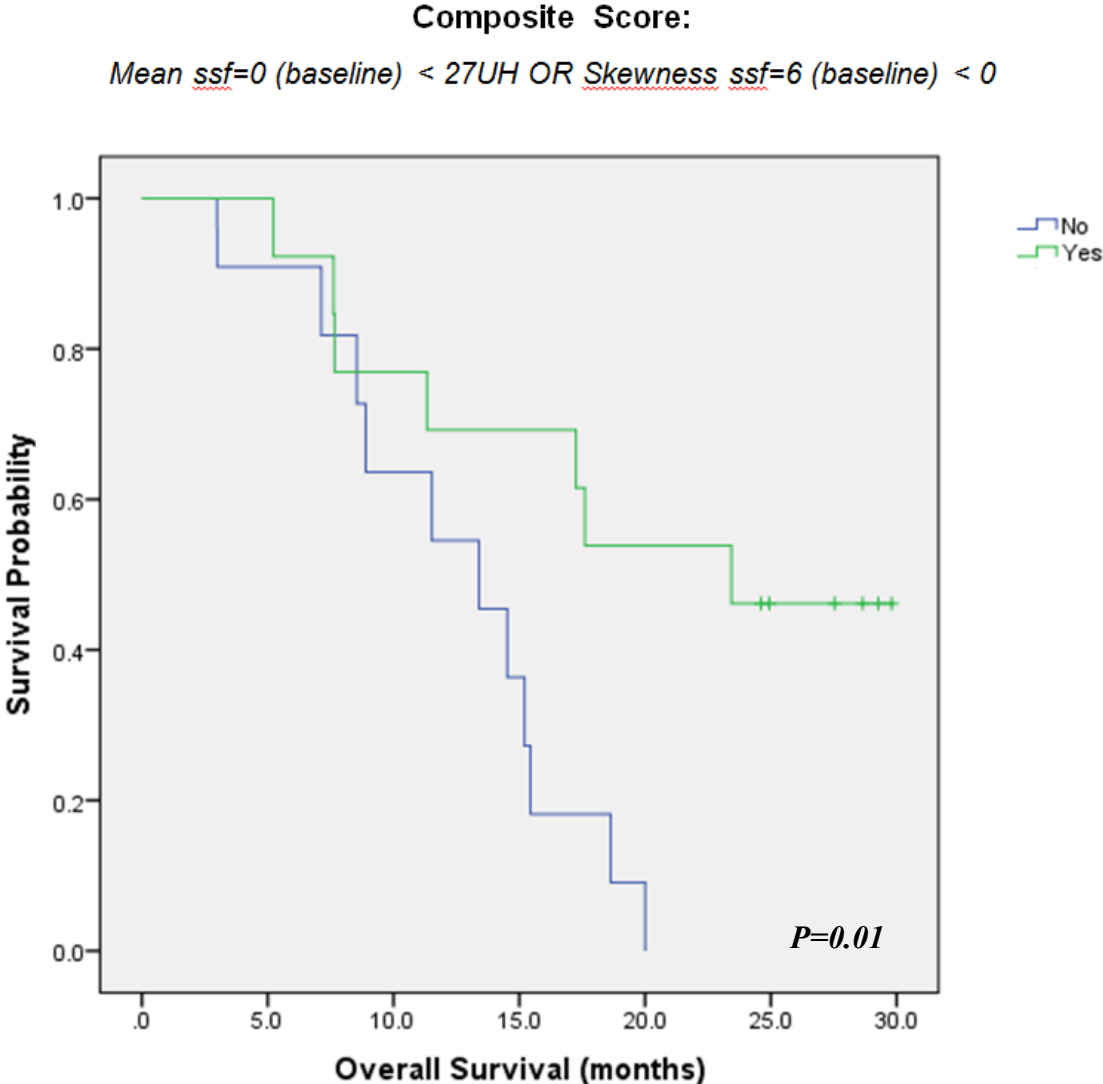


Figure 3. Kaplan-Meier survival diagram shows that patients with only mean value ($ssf=0$) <27 UH or baseline skewness ($ssf=6$) value <0 but not both simultaneously had a higher overall survival rate (median=2.0 year vs 1.1 years; $P=.01$).



Conclusion

L'imagerie fonctionnelle est promise à prendre une part de plus en plus importante dans l'évaluation et le suivi des patients en cancérologie. Au-delà du bilan morphologique qui deviendra de plus en plus précis grâce notamment à l'amélioration de la résolution des différentes techniques, le développement de techniques fonctionnelles et la validation de biomarqueurs quantitatifs permettant d'établir des algorithmes de suivi, et des modèles prédictifs. A cet égard, l'échographie Doppler qui est l'une des premières techniques d'imagerie fonctionnelle pourrait avoir un rôle à jouer. Toutefois, son caractère opérateur dépendant reste une limite à son développement en dehors des centres spécialisés.

Les techniques d'imagerie de perfusion (échographie de contraste, TDM et IRM de perfusion) font l'objet de nombreuses recherches actuellement. Leurs limites majeures sont les difficultés d'acquisition, le manque de résolution temporelle en IRM, l'irradiation en TDM, le manque de standardisation en échographie de contraste, qui tend à diminuer grâce à plusieurs travaux français multicentriques récents (161, 227, 228). De plus, ces techniques requièrent un post-traitement mathématique complexe et des logiciels dédiés dont l'utilisation reste complexe et peu répandue. La simplification et la standardisation du post traitement leur permettront, dans un avenir proche, d'avoir une place en pratique clinique, comme c'est déjà le cas dans le cerveau, mais aussi à un moindre degré dans la prostate (229-233).

L'IRM de diffusion a été la première technique d'imagerie fonctionnelle réellement validée à grande échelle. En effet, son utilisation a révolutionné la prise en charge de l'accident vasculaire cérébral ischémique à la phase aiguë, et tous les constructeurs proposent désormais des outils de quantification simples, fiables et automatiques pour mesurer l'ADC. Malgré un manque de standardisation persistant, notamment en raison des différentes valeurs de b utilisées et des différents champs magnétiques des différentes machines, l'ADC coefficient apparent de diffusion est l'un des biomarqueurs les plus utilisés et les plus étudiés dans l'abdomen (234-238). Son utilisation en tant que biomarqueur de la réponse aux traitements en cancérologie n'est pas encore largement répandue et des études de grande échelle sont encore nécessaires.

Les techniques d'imageries fonctionnelles en IRM sans injection telles que l'IRM de diffusion multi- b avec extraction des paramètres IVIM ou d'autres techniques telles que l'arterial spin labelling (ASL), ou la quantification de l'effet BOLD (Blood Oxygen Level

Dependant) restent aujourd'hui du domaine de la recherche dans l'abdomen. La méthodologie IVIM a déjà été étudiée dans le foie pour évaluer la fibrose ainsi que la stéatose (239, 240). Toutefois, l'acquisition, le post-traitement et l'analyse des résultats restent chronophages et difficiles à diffuser à la pratique courante. De plus, les constructeurs ne proposent pas ces séquences cliniques, mais souvent uniquement dans le cadre de la recherche. Elles sont plus facilement disponibles sur les IRM de recherche dédiées aux petits animaux, mais les résultats en sont plus difficilement transposables à l'être humain.

L'analyse d'histogrammes reste une technologie confidentielle et très récente. De plus en plus de logiciels sont disponibles pour réaliser ces analyses, mais ces dernières manquent totalement de standardisation. La plupart des logiciels nécessitent une segmentation manuelle et laborieuse, et l'analyse des paramètres extraits des histogrammes nécessite un grand nombre de patients, ce que peu d'études ont proposé pour l'instant. Dans la plupart des études publiées, le nombre de paramètres évalués frôle, voire dépasse, le nombre de patients inclus, ce qui conduit à démultiplier le risque de première espèce de ces analyses. Toutefois, dans un avenir proche, probablement que des outils de segmentation automatisés, tridimensionnels et performants seront disponibles, et que des grandes bases de données permettront de valider certains de ces paramètres qui pourront être inclus dans nos algorithmes de suivi et aider à la décision thérapeutique, notamment avec le développement de modèles prédictifs multiparamétriques, permettant de prédire l'efficacité de certains traitements et de proposer une stratégie thérapeutique personnalisée à chaque patient.

L'un des objectifs de cette thèse était de réfléchir à la place de l'angiogenèse dans la carcinose péritonéale et aux méthodologies qui pourraient permettre de l'évaluer et d'avoir une application future chez ces patients. L'ensemble de ces réflexions nous ont conduit à proposer une étude nationale multicentrique prospective sur l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie dans la carcinose péritonéale chez les patients candidats à la chirurgie de cytoréduction avec CHIP (projet présenté en annexe, déposé au PHRC-K 2016).

L'objectif principal de cette étude sera de prédire la survie globale à 3 ans chez les patients ayant une CP candidats à une chirurgie de cytoréduction avec CHIP en se basant sur la réponse fonctionnelle évaluée par les variations des paramètres d'imagerie fonctionnelle (PIF) après chimiothérapie néoadjuvante (IRM de diffusion, TEP et analyse de texture sur les images de TDM, d'IRM de diffusion et de TEP). Secondairement, la réponse fonctionnelle (variation des PIF) sera corrélée à la réponse histologique évaluée sur la pièce de résection chirurgicale. Par ailleurs, la réponse fonctionnelle devrait permettre de prédire l'évolution clinique des patients selon 4 catégories: résection complète avec survie prolongée sans

récidive, résection complète avec récidive au cours du suivi, résection incomplète, et progression rapide sous chimiothérapie nécessitant d'annuler la chirurgie. Une autre partie des analyses cherchera à montrer si les valeurs initiales des PIF peuvent prédire également la survie globale à 3 ans, la réponse histologique et la réponse clinique. De plus, la valeur initiale des PIF devrait permettre de prédire la réponse objective mesurée selon les critères classiques (RECIST1.1, marqueurs sériques). Une analyse en sous-groupe permettra d'évaluer la valeur pronostique des PIF chez les patients ayant une CP modérément étendue (index de carcinose péritonéal (ICP<10/39) ou très étendue (ICP>10/39). Enfin, les performances de chacune des 3 modalités d'imagerie pour évaluer la cartographie des lésions et l'ICP chirurgical seront évaluées.

L'étude sera conduite dans 5 centres prenant chacun en charge un nombre important de patients et sont tous membres actifs du Réseau National des Maladies Rares du Péritoine.

Les résultats de cette étude devraient permettre de valider des critères d'évaluation radiologique fiable dans la CP, permettant ainsi de sélectionner les patients qui bénéficieront le plus d'une chirurgie lourde. Les patients ayant un moins bon pronostic pourront se voir proposer une intensification thérapeutique et d'emblée des chimiothérapies plus lourdes, avec l'ajout éventuellement de biothérapies.

Bibliographie

1. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Gomel V. Role of the peritoneal cavity in the prevention of postoperative adhesions, pain, and fatigue. *Fertil Steril*. 2016.
2. Koninckx PR, Heyns W, Verhoeven G, Van Baelen H, Lissens WD, De Moor P, et al. Biochemical characterization of peritoneal fluid in women during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51(6):1239-44.
3. Mynbaev OA, Molinas CR, Adamyan LV, Vanacker B, Koninckx PR. Pathogenesis of CO(2) pneumoperitoneum-induced metabolic hypoxemia in a rabbit model. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 2002;9(3):306-14.
4. Sugarbaker PH. Peritoneum as the first-line of defense in carcinomatosis. *J Surg Oncol*. 2007;95(2):93-6.
5. Elias D, Goere D. [Treat the peritoneum with respect! It's our first line of defense against carcinomatosis]. *J Chir (Paris)*. 2007;144(4):275-6.
6. Ceelen WP, Bracke ME. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol*. 2009;10(1):72-9.
7. Wang W, Li X, Zheng D, Zhang D, Huang S, Zhang X, et al. Dynamic changes of peritoneal macrophages and subpopulations during ulcerative colitis to metastasis of colorectal carcinoma in a mouse model. *Inflamm Res*. 2013;62(7):669-80.
8. Strohlein MA, Siegel R, Jager M, Lindhofer H, Jauch KW, Heiss MM. Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28:18.
9. Gujar S, Dielschneider R, Clements D, Helson E, Shmulevitz M, Marcato P, et al. Multifaceted therapeutic targeting of ovarian peritoneal carcinomatosis through virus-induced immunomodulation. *Mol Ther*. 2013;21(2):338-47.
10. Flatmark K, Guldvik IJ, Svensson H, Fleten KG, Florenes VA, Reed W, et al. Immunotoxin targeting EpCAM effectively inhibits peritoneal tumor growth in experimental models of mucinous peritoneal surface malignancies. *Int J Cancer*. 2013;133(6):1497-506.
11. Glehen O, Mohamed F, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from digestive tract cancer: new management by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia. *Lancet Oncol*. 2004;5(4):219-28.
12. Elias D, Glehen O, Pocard M, Quenet F, Goere D, Arvieux C, et al. A comparative study of complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemotherapy to treat peritoneal dissemination from colon, rectum, small bowel, and nonpseudomyxoma appendix. *Ann Surg*. 2010;251(5):896-901.
13. Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, Bleichrodt RP. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann Surg*. 2006;243(2):212-22.
14. Jayne DG, Fook S, Loi C, Seow-Choen F. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*. 2002;89(12):1545-50.
15. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaun D, Gargi T, Tredan O, et al. Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene*. 2012;31(30):3516-24.
16. Ferlicot S, Vincent-Salomon A, Medioni J, Genin P, Rosty C, Sigal-Zafrani B, et al. Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Cancer*. 2004;40(3):336-41.

17. Brucher BL, Piso P, Verwaal V, Esquivel J, Derraco M, Yonemura Y, et al. Peritoneal carcinomatosis: cytoreductive surgery and HIPEC--overview and basics. *Cancer Invest.* 2012;30(3):209-24.
18. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Ann Surg.* 1995;221(1):29-42.
19. Sugarbaker PH, Schellinx ME, Chang D, Koslowe P, von Meyerfeldt M. Peritoneal carcinomatosis from adenocarcinoma of the colon. *World J Surg.* 1996;20(5):585-91; discussion 92.
20. Eveno C, Passot G, Goere D, Soyer P, Gayat E, Glehen O, et al. Bevacizumab doubles the early postoperative complication rate after cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(6):1792-800.
21. Prada-Villaverde A, Esquivel J, Lowy AM, Markman M, Chua T, Pelz J, et al. The American Society of Peritoneal Surface Malignancies evaluation of HIPEC with Mitomycin C versus Oxaliplatin in 539 patients with colon cancer undergoing a complete cytoreductive surgery. *J Surg Oncol.* 2014;110(7):779-85.
22. Simkens GA, van Oudheusden TR, Luyer MD, Nienhuijs SW, Nieuwenhuijzen GA, Rutten HJ, et al. Serious Postoperative Complications Affect Early Recurrence After Cytoreductive Surgery and HIPEC for Colorectal Peritoneal Carcinomatosis. *Ann Surg Oncol.* 2014.
23. Yan TD, Deraco M, Baratti D, Kusamura S, Elias D, Glehen O, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: multi-institutional experience. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6237-42.
24. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
26. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res.* 2007;138(2):284-90.
27. Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;29(3):209-48.
28. Jimenez WA, Sardi A, Ledakis P, Nieroda C, Sittig M, Gushchin V. The role of VEGFR-2 expression in outcomes and survival of patients with peritoneal carcinomatosis from appendiceal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2013.
29. Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(1-2):143-62.
30. Zhou Y, Wen F, Zhang P, Tang R, Li Q. Matrix protein of vesicular stomatitis virus: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation. *Cancer Gene Ther.* 2013;20(3):178-85.
31. Maeno H, Ono T, Dhar DK, Sato T, Yamanoi A, Nagasue N. Expression of hypoxia inducible factor-1alpha during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver Int.* 2005;25(5):1002-9.
32. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-6.
33. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-57.
34. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401-10.
35. Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H, Kaisaki S, Suzuki H, Fukatsu K, et al. Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by

- fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. *J Surg Res.* 2003;115(1):113-20.
36. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002;20(21):4368-80.
 37. McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol.* 2000;156(2):383-8.
 38. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001;7(11):1194-201.
 39. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):835-45.
 40. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221-8.
 41. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
 42. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5(4):434-8.
 43. Rafii S, Lyden D. Cancer. A few to flip the angiogenic switch. *Science.* 2008;319(5860):163-4.
 44. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer.* 2002;2(11):826-35.
 45. Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell.* 2008;13(3):181-3.
 46. Audollent R, Eveno C, Contreres JO, Hainaud P, Rampanou A, Dupuy E, et al. Bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursors cells enhance the metastasis of colon cancer in an orthotopic murine model. *Int J Cancer.* 2011;129(9):2304-5.
 47. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer.* 2010;127(10):2323-33.
 48. Naik RP, Jin D, Chuang E, Gold EG, Tousimis EA, Moore AL, et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107(1):133-8.
 49. Richter-Ehrenstein C, Rentzsch J, Runkel S, Schneider A, Schonfelder G. Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106(3):343-9.
 50. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia.* 2006;8(2):79-88.
 51. Massard C, Borget I, Le Deley MC, Taylor M, Gomez-Roca C, Soria JC, et al. Prognostic value of circulating VEGFR2+ bone marrow-derived progenitor cells in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48(9):1354-62.
 52. Malka D, Boige V, Jacques N, Vimond N, Adenis A, Boucher E, et al. Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann Oncol.* 2012;23(4):919-27.
 53. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, et al. Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(3):763-8.

54. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.
55. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res*. 2006;66(23):11089-93.
56. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
57. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*. 2007;137(6):491-502.
58. Sun B, Zhang S, Ni C, Zhang D, Liu Y, Zhang W, et al. Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow. *Stem Cells Dev*. 2005;14(3):292-8.
59. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*. 2006;80(3):267-74.
60. Annabi B, Naud E, Lee YT, Eliopoulos N, Galipeau J. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem*. 2004;91(6):1146-58.
61. Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res*. 2005;11(21):7749-56.
62. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, Noel D. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2006;82(8):1060-6.
63. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-63.
64. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008;68(11):4331-9.
65. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res*. 2009;69(4):1255-8.
66. Hurst DR, Welch DR. A MSC-ing link in metastasis? *Nat Med*. 2007;13(11):1289-91.
67. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8(2):98-101.
68. Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat AM, Simon A, Ducros E, et al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One*. 2008;3(12):e3894.
69. Kang N, Gores GJ, Shah VH. Hepatic stellate cells: partners in crime for liver metastases? *Hepatology*. 2011;54(2):707-13.
70. Ishigami SI, Arai S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998;78(10):1379-84.
71. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer*. 1998;77(6):998-1002.
72. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*. 1995;55(18):3964-8.

73. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, et al. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 2001;61(24):8664-7.
74. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* 2002;62(2):506-11.
75. Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS, Hong SH. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology.* 1998;55(6):575-81.
76. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer.* 1996;77(8 Suppl):1722-8.
77. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg.* 1995;222(6):695-9.
78. Li L, Wang L, Zhang W, Tang B, Zhang J, Song H, et al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2004;24(3b):1973-9.
79. Chia CS, Glehen O, Bakrin N, Decullier E, You B, Gilly FN, et al. Intraperitoneal Vascular Endothelial Growth Factor: A Prognostic Factor and the Potential for Intraperitoneal Bevacizumab Use in Peritoneal Surface Malignancies. *Ann Surg Oncol.* 2015;22 Suppl 3:S880-7.
80. Sugarbaker PH. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of gastrointestinal cancers with peritoneal metastases: Progress toward a new standard of care. *Cancer Treat Rev.* 2016;48:42-9.
81. Sugarbaker PH. Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43 Suppl:S15-25.
82. Elias D, Gilly F, Boutitie F, Quenet F, Bereder JM, Mansvelt B, et al. Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):63-8.
83. Bakrin N, Bereder JM, Decullier E, Classe JM, Msika S, Lorimier G, et al. Peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for advanced ovarian carcinoma: a French multicentre retrospective cohort study of 566 patients. *Eur J Surg Oncol.* 2013;39(12):1435-43.
84. Quenet F, Goere D, Mehta SS, Roca L, Dumont F, Hessissen M, et al. Results of two bi-institutional prospective studies using intraperitoneal oxaliplatin with or without irinotecan during HIPEC after cytoreductive surgery for colorectal carcinomatosis. *Ann Surg.* 2011;254(2):294-301.
85. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, et al. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(20):3737-43.
86. Glehen O, Gilly FN, Boutitie F, Bereder JM, Quenet F, Sideris L, et al. Toward curative treatment of peritoneal carcinomatosis from nonovarian origin by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy: a multi-institutional study of 1,290 patients. *Cancer.* 2010;116(24):5608-18.
87. Sugarbaker PH. New standard of care for appendiceal epithelial neoplasms and pseudomyxoma peritonei syndrome? *Lancet Oncol.* 2006;7(1):69-76.

88. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(12):1208-15.
89. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2008;371(9617):1007-16.
90. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2343-51.
91. Taieb J, Artru P, Paye F, Louvet C, Perez N, Andre T, et al. Intensive systemic chemotherapy combined with surgery for metastatic colorectal cancer: results of a phase II study. *J Clin Oncol.* 2005;23(3):502-9.
92. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229-37.
93. Bloemendaal AL, Verwaal VJ, van Ruth S, Boot H, Zoetmulder FA. Conventional surgery and systemic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a prospective study. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31(10):1145-51.
94. Bijelic L, Kumar AS, Stuart OA, Sugarbaker PH. Systemic Chemotherapy prior to Cytoreductive Surgery and HIPEC for Carcinomatosis from Appendix Cancer: Impact on Perioperative Outcomes and Short-Term Survival. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:163284.
95. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(35):5705-12.
96. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(26):2484-96.
97. Vergote I, Trope CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(10):943-53.
98. Rose PG, Nerenstone S, Brady MF, Clarke-Pearson D, Olt G, Rubin SC, et al. Secondary surgical cytoreduction for advanced ovarian carcinoma. *N Engl J Med.* 2004;351(24):2489-97.
99. Leung KL, Kwok SP, Lam SC, Lee JF, Yiu RY, Ng SS, et al. Laparoscopic resection of rectosigmoid carcinoma: prospective randomised trial. *Lancet.* 2004;363(9416):1187-92.
100. Allen VB, Gurusamy KS, Takwoingi Y, Kalia A, Davidson BR. Diagnostic accuracy of laparoscopy following computed tomography (CT) scanning for assessing the resectability with curative intent in pancreatic and periampullary cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013(11):CD009323.
101. Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res.* 1996;82:359-74.
102. Verwaal VJ, van Tinteren H, van Ruth S, Zoetmulder FA. Predicting the survival of patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin treated by aggressive cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Br J Surg.* 2004;91(6):739-46.
103. Gilly FN, Carry PY, Sayag AC, Brachet A, Panteix G, Salle B, et al. Regional chemotherapy (with mitomycin C) and intra-operative hyperthermia for digestive cancers with peritoneal carcinomatosis. *Hepatogastroenterology.* 1994;41(2):124-9.

104. Kajitani T. The general rules for the gastric cancer study in surgery and pathology. Part I. Clinical classification. *Jpn J Surg.* 1981;11(2):127-39.
105. Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F, Ercoli A, Lorusso D, Rossi M, et al. A laparoscopy-based score to predict surgical outcome in patients with advanced ovarian carcinoma: a pilot study. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(8):1156-61.
106. Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, Yan TD, Alexander R, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. Society of Surgical Oncology. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(1):128-33.
107. de Bree E, Koops W, Kroger R, van Ruth S, Witkamp AJ, Zoetmulder FA. Peritoneal carcinomatosis from colorectal or appendiceal origin: correlation of preoperative CT with intraoperative findings and evaluation of interobserver agreement. *J Surg Oncol.* 2004;86(2):64-73.
108. Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, Goere D, Malka D, Lumbroso J, et al. Staging of peritoneal carcinomatosis: enhanced CT vs. PET/CT. *Abdom Imaging.* 2008;33(1):87-93.
109. Schmidt S, Meuli RA, Achtari C, Prior JO. Peritoneal carcinomatosis in primary ovarian cancer staging: comparison between MDCT, MRI, and 18F-FDG PET/CT. *Clin Nucl Med.* 2015;40(5):371-7.
110. Pasqual EM, Bertozzi S, Bacchetti S, Londero AP, Basso SM, Santeufemia DA, et al. Preoperative assessment of peritoneal carcinomatosis in patients undergoing hyperthermic intraperitoneal chemotherapy following cytoreductive surgery. *Anticancer Res.* 2014;34(5):2363-8.
111. Coakley FV, Choi PH, Gougoutas CA, Pothuri B, Venkatraman E, Chi D, et al. Peritoneal metastases: detection with spiral CT in patients with ovarian cancer. *Radiology.* 2002;223(2):495-9.
112. Marin D, Catalano C, Baski M, Di Martino M, Geiger D, Di Giorgio A, et al. 64-Section multi-detector row CT in the preoperative diagnosis of peritoneal carcinomatosis: correlation with histopathological findings. *Abdom Imaging.* 2010;35(6):694-700.
113. Soyer P, Boudiaf M, Place V, Sirol M, Pautrat K, Vignaud A, et al. Preoperative detection of hepatic metastases: comparison of diffusion-weighted, T2-weighted fast spin echo and gadolinium-enhanced MR imaging using surgical and histopathologic findings as standard of reference. *Eur J Radiol.* 2011;80(2):245-52.
114. Nougaret S, Reinhold C, Mikhael HW, Rouanet P, Bibeau F, Brown G. The use of MR imaging in treatment planning for patients with rectal carcinoma: have you checked the "DISTANCE"? *Radiology.* 2013;268(2):330-44.
115. Nougaret S, Reinhold C, Alsharif SS, Addley H, Arceneau J, Molinari N, et al. Endometrial Cancer: Combined MR Volumetry and Diffusion-weighted Imaging for Assessment of Myometrial and Lymphovascular Invasion and Tumor Grade. *Radiology.* 2015;276(3):797-808.
116. Low RN, Barone RM, Lucero J. Comparison of MRI and CT for predicting the Peritoneal Cancer Index (PCI) preoperatively in patients being considered for cytoreductive surgical procedures. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(5):1708-15.
117. Menassel B, Duclos A, Passot G, Dohan A, Payet C, Isaac S, et al. Preoperative CT and MRI prediction of non-resectability in patients treated for pseudomyxoma peritonei from mucinous appendiceal neoplasms. *Eur J Surg Oncol.* 2016;42(4):558-66.
118. Low RN, Barone RM, Gurney JM, Muller WD. Mucinous appendiceal neoplasms: preoperative MR staging and classification compared with surgical and histopathologic findings. *AJR Am J Roentgenol.* 2008;190(3):656-65.
119. Torkzad MR, Casta N, Bergman A, Ahlstrom H, Pahlman L, Mahteme H. Comparison between MRI and CT in prediction of peritoneal carcinomatosis index (PCI) in patients

undergoing cytoreductive surgery in relation to the experience of the radiologist. *J Surg Oncol.* 2015;111(6):746-51.

120. Yoshida T, Tanaka H, Kuroda H, Shimizu J, Horio Y, Sakao Y, et al. Standardized uptake value on (18)F-FDG-PET/CT is a predictor of EGFR T790M mutation status in patients with acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer.* 2016;100:14-9.

121. Lee JW, Seo KH, Kim ES, Lee SM. The role of 18F-fluorodeoxyglucose uptake of bone marrow on PET/CT in predicting clinical outcomes in non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Eur Radiol.* 2016.

122. Groheux D, Hindie E, Giacchetti S, Hamy AS, Berger F, Merlet P, et al. Early assessment with 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography can help predict the outcome of neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Eur J Cancer.* 2014;50(11):1864-71.

123. Pfannenbergh C, Konigsrainer I, Aschoff P, Oksuz MO, Zieker D, Beckert S, et al. (18)F-FDG-PET/CT to select patients with peritoneal carcinomatosis for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(5):1295-303.

124. Soussan M, Des Guetz G, Barrau V, Aflalo-Hazan V, Pop G, Mehanna Z, et al. Comparison of FDG-PET/CT and MR with diffusion-weighted imaging for assessing peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal malignancy. *Eur Radiol.* 2012;22(7):1479-87.

125. Li J, Yan R, Lei J, Jiang C. Comparison of PET with PET/CT in detecting peritoneal carcinomatosis: a meta-analysis. *Abdom Imaging.* 2015;40(7):2660-6.

126. Dubreuil J, Giammarile F, Rousset P, Bakrin N, Passot G, Isaac S, et al. FDG-PET/ceCT is useful to predict recurrence of Pseudomyxoma peritonei. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2016;43(9):1630-7.

127. Sotoudeh H, Sharma A, Fowler KJ, McConathy J, Dehdashti F. Clinical application of PET/MRI in oncology. *J Magn Reson Imaging.* 2016;44(2):265-76.

128. Samarin A, Burger C, Wollenweber SD, Crook DW, Burger IA, Schmid DT, et al. PET/MR imaging of bone lesions--implications for PET quantification from imperfect attenuation correction. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;39(7):1154-60.

129. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.

130. Arredondo J, Gonzalez I, Baixauli J, Martinez P, Rodriguez J, Pastor C, et al. Tumor response assessment in locally advanced colon cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Gastrointest Oncol.* 2014;5(2):104-11.

131. Villeneuve L, Thivolet A, Bakrin N, Mohamed F, Isaac S, Valette PJ, et al. A new internet tool to report peritoneal malignancy extent. *Peritoneal Malignancy Stage Evaluation (PROMISE) application.* *Eur J Surg Oncol.* 2016;42(6):877-82.

132. Rudin M. Imaging readouts as biomarkers or surrogate parameters for the assessment of therapeutic interventions. *Eur Radiol.* 2007;17(10):2441-57.

133. Garcia-Figueiras R, Goh VJ, Padhani AR, Baleato-Gonzalez S, Garrido M, Leon L, et al. CT perfusion in oncologic imaging: a useful tool? *AJR Am J Roentgenol.* 2013;200(1):8-19.

134. Wagner M, Doblaz S, Daire JL, Paradis V, Haddad N, Leitao H, et al. Diffusion-weighted MR imaging for the regional characterization of liver tumors. *Radiology.* 2012;264(2):464-72.

135. Ellingson BM, Malkin MG, Rand SD, Connelly JM, Quinsey C, LaViolette PS, et al. Validation of functional diffusion maps (fDMs) as a biomarker for human glioma cellularity. *J Magn Reson Imaging.* 2010;31(3):538-48.

136. Chen L, Zhang J, Chen Y, Wang W, Zhou X, Yan X, et al. Relationship between apparent diffusion coefficient and tumour cellularity in lung cancer. *PLoS One*. 2014;9(6):e99865.
137. White NS, McDonald CR, Farid N, Kuperman J, Karow D, Schenker-Ahmed NM, et al. Diffusion-weighted imaging in cancer: physical foundations and applications of restriction spectrum imaging. *Cancer Res*. 2014;74(17):4638-52.
138. Bilici A, Ustaalioglu BB, Seker M, Canpolat N, Tekinsoy B, Salepci T, et al. Clinical value of FDG PET/CT in the diagnosis of suspected recurrent ovarian cancer: is there an impact of FDG PET/CT on patient management? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(7):1259-69.
139. Munk Jensen M, Erichsen KD, Bjorkling F, Madsen J, Jensen PB, Sehested M, et al. Imaging of treatment response to the combination of carboplatin and paclitaxel in human ovarian cancer xenograft tumors in mice using FDG and FLT PET. *PLoS One*. 2013;8(12):e85126.
140. Coudert B, Pierga JY, Mouret-Reynier MA, Kerrou K, Ferrero JM, Petit T, et al. Use of [(18)F]-FDG PET to predict response to neoadjuvant trastuzumab and docetaxel in patients with HER2-positive breast cancer, and addition of bevacizumab to neoadjuvant trastuzumab and docetaxel in [(18)F]-FDG PET-predicted non-responders (AVATAXHER): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(13):1493-502.
141. Sabet A, Meyer C, Aouf A, Ghamari S, Pieper CC, Mayer K, et al. Early post-treatment FDG PET predicts survival after Y microsphere radioembolization in liver-dominant metastatic colorectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014.
142. Maffione AM, Chondrogiannis S, Capirci C, Galeotti F, Fornasiero A, Crepaldi G, et al. Early prediction of response by (1)(8)F-FDG PET/CT during preoperative therapy in locally advanced rectal cancer: a systematic review. *Eur J Surg Oncol*. 2014;40(10):1186-94.
143. Humbert O, Cochet A, Coudert B, Berriolo-Riedinger A, Kanoun S, Brunotte F, et al. Role of Positron Emission Tomography for the Monitoring of Response to Therapy in Breast Cancer. *Oncologist*. 2015.
144. Yossi S, Krhili S, Muratet JP, Septans AL, Campion L, Denis F. Early Assessment of Metabolic Response by 18F-FDG PET During Concomitant Radiochemotherapy of Non-Small Cell Lung Carcinoma Is Associated With Survival: A Retrospective Single-Center Study. *Clin Nucl Med*. 2014.
145. Avril N, Sassen S, Schmalfeldt B, Naehrig J, Rutke S, Weber WA, et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy by sequential F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with advanced-stage ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7445-53.
146. Brynolfsson P, Nilsson D, Henriksson R, Hauksson J, Karlsson M, Garpebring A, et al. ADC texture--an imaging biomarker for high-grade glioma? *Med Phys*. 2014;41(10):101903.
147. Tian F, Hayano K, Kambadakone AR, Sahani DV. Response assessment to neoadjuvant therapy in soft tissue sarcomas: using CT texture analysis in comparison to tumor size, density, and perfusion. *Abdom Imaging*. 2014.
148. Simpson AL, Adams LB, Allen PJ, D'Angelica MI, DeMatteo RP, Fong Y, et al. Texture Analysis of Preoperative CT Images for Prediction of Postoperative Hepatic Insufficiency: A Preliminary Study. *J Am Coll Surg*. 2014.
149. Ngkelo A, Richart A, Kirk JA, Bonnin P, Vilar J, Lemitre M, et al. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J Exp Med*. 2016;213(7):1353-74.
150. Poittevin M, Bonnin P, Pimpie C, Riviere L, Sebric C, Dohan A, et al. Diabetic microangiopathy: impact of impaired cerebral vasoreactivity and delayed angiogenesis after

- permanent middle cerebral artery occlusion on stroke damage and cerebral repair in mice. *Diabetes*. 2015;64(3):999-1010.
151. Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guerin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med*. 2013;19(10):1273-80.
152. Eveno C, Le Henaff C, Audollent R, Soyer P, Rampanou A, Nemeth J, et al. Tumor and non-tumor liver angiogenesis is traced and evaluated by hepatic arterial ultrasound in murine models. *Ultrasound Med Biol*. 2012;38(7):1195-204.
153. Galaup A, Gomez E, Souktani R, Durand M, Cazes A, Monnot C, et al. Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4. *Circulation*. 2012;125(1):140-9.
154. Berge M, Allanic D, Bonnin P, de Montrion C, Richard J, Suc M, et al. Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling. *J Hepatol*. 2011;55(4):866-75.
155. Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, Oura H, Tijeras-Raballand A, Schmidt T, et al. Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PlGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell*. 2010;141(1):178-90.
156. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhelawon B, Taleb S, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest*. 2010;120(2):422-32.
157. Barral M, Raballand A, Dohan A, Soyer P, Pocard M, Bonnin P. Preclinical Assessment of the Efficacy of Anti-Angiogenic Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Ultrasound Med Biol*. 2016;42(2):438-46.
158. Schrope BA, Newhouse VL. Second harmonic ultrasonic blood perfusion measurement. *Ultrasound Med Biol*. 1993;19(7):567-79.
159. Frinking PJ, Bouakaz A, Kirkhorn J, Ten Cate FJ, de Jong N. Ultrasound contrast imaging: current and new potential methods. *Ultrasound Med Biol*. 2000;26(6):965-75.
160. Pitre-Champagnat S, Leguerney I, Bosq J, Peronneau P, Kiessling F, Calmels L, et al. Dynamic contrast-enhanced ultrasound parametric maps to evaluate intratumoral vascularization. *Invest Radiol*. 2015;50(4):212-7.
161. Lassau N, Chapotot L, Benatsou B, Vilgrain V, Kind M, Lacroix J, et al. Standardization of dynamic contrast-enhanced ultrasound for the evaluation of antiangiogenic therapies: the French multicenter Support for Innovative and Expensive Techniques Study. *Invest Radiol*. 2012;47(12):711-6.
162. Lavisse S, Lejeune P, Rouffiac V, Elie N, Bribe E, Demers B, et al. Early quantitative evaluation of a tumor vasculature disruptive agent AVE8062 using dynamic contrast-enhanced ultrasonography. *Invest Radiol*. 2008;43(2):100-11.
163. de Bazelaire C, Siauve N, Fournier L, Frouin F, Robert P, Clement O, et al. Comprehensive model for simultaneous MRI determination of perfusion and permeability using a blood-pool agent in rats rhabdomyosarcoma. *Eur Radiol*. 2005;15(12):2497-505.
164. Brix G, Bahner ML, Hoffmann U, Horvath A, Schreiber W. Regional blood flow, capillary permeability, and compartmental volumes: measurement with dynamic CT--initial experience. *Radiology*. 1999;210(1):269-76.
165. St Lawrence KS, Lee TY. An adiabatic approximation to the tissue homogeneity model for water exchange in the brain: I. Theoretical derivation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(12):1365-77.
166. Larsson HB, Stubgaard M, Frederiksen JL, Jensen M, Henriksen O, Paulson OB. Quantitation of blood-brain barrier defect by magnetic resonance imaging and gadolinium-DTPA in patients with multiple sclerosis and brain tumors. *Magn Reson Med*. 1990;16(1):117-31.

167. de Bazelaire C, Calmon R, Thomassin I, Brunon C, Hamy AS, Fournier L, et al. Accuracy of perfusion MRI with high spatial but low temporal resolution to assess invasive breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2011;11:361.
168. Buckley DL. Uncertainty in the analysis of tracer kinetics using dynamic contrast-enhanced T1-weighted MRI. *Magn Reson Med*. 2002;47(3):601-6.
169. Li X, Rooney WD, Springer CS, Jr. A unified magnetic resonance imaging pharmacokinetic theory: intravascular and extracellular contrast reagents. *Magn Reson Med*. 2005;54(6):1351-9.
170. Padhani AR, Hayes C, Assersohn L, Powles T, Makris A, Suckling J, et al. Prediction of clinicopathologic response of breast cancer to primary chemotherapy at contrast-enhanced MR imaging: initial clinical results. *Radiology*. 2006;239(2):361-74.
171. Weinmann HJ, Laniado M, Mutzel W. Pharmacokinetics of GdDTPA/dimeglumine after intravenous injection into healthy volunteers. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1984;16(2):167-72.
172. Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, Knopp MV, et al. Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusable tracer: standardized quantities and symbols. *J Magn Reson Imaging*. 1999;10(3):223-32.
173. Badea CT, Drangova M, Holdsworth DW, Johnson GA. In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. *Phys Med Biol*. 2008;53(19):R319-50.
174. Kan Z, Phongkitkarun S, Kobayashi S, Tang Y, Ellis LM, Lee TY, et al. Functional CT for quantifying tumor perfusion in antiangiogenic therapy in a rat model. *Radiology*. 2005;237(1):151-8.
175. Kan Z, Kobayashi S, Phongkitkarun S, Charnsangavej C. Functional CT quantification of tumor perfusion after transhepatic arterial embolization in a rat model. *Radiology*. 2005;237(1):144-50.
176. Dighe S, Blake H, Jeyadevan N, Castellano I, Koh DM, Orton M, et al. Perfusion CT vascular parameters do not correlate with immunohistochemically derived microvessel density count in colorectal tumors. *Radiology*. 2013;268(2):400-10.
177. Park CM, Goo JM, Lee HJ, Kim MA, Kim HC, Kim KG, et al. FN13762 murine breast cancer: region-by-region correlation of first-pass perfusion CT indexes with histologic vascular parameters. *Radiology*. 2009;251(3):721-30.
178. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Aubin ML, Vignaud J, Laval-Jeantet M. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*. 1988;168(2):497-505.
179. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*. 1986;161(2):401-7.
180. Norris DG. The effects of microscopic tissue parameters on the diffusion weighted magnetic resonance imaging experiment. *NMR Biomed*. 2001;14(2):77-93.
181. Cercueil JP, Petit JM, Nougaret S, Soyer P, Fohlen A, Pierredon-Foulongne MA, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging in the liver: comparison of mono-, bi- and tri-exponential modelling at 3.0-T. *Eur Radiol*. 2015;25(6):1541-50.
182. Le Bihan D. Diffusion/perfusion MR imaging of the brain: from structure to function. *Radiology*. 1990;177(2):328-9.
183. Schreuder SM, Lensing R, Stoker J, Bipat S. Monitoring treatment response in patients undergoing chemoradiotherapy for locally advanced uterine cervical cancer by additional diffusion-weighted imaging: A systematic review. *J Magn Reson Imaging*. 2014.

184. Fu C, Feng X, Bian D, Zhao Y, Fang X, Du W, et al. Simultaneous changes of magnetic resonance diffusion-weighted imaging and pathological microstructure in locally advanced cervical cancer caused by neoadjuvant chemotherapy. *J Magn Reson Imaging*. 2014.
185. Gowdra Halappa V, Corona-Villalobos CP, Bonekamp S, Li Z, Reyes D, Cosgrove D, et al. Neuroendocrine liver metastasis treated by using intraarterial therapy: volumetric functional imaging biomarkers of early tumor response and survival. *Radiology*. 2013;266(2):502-13.
186. Schneider MJ, Cyran CC, Nikolaou K, Hirner H, Reiser MF, Dietrich O. Monitoring early response to anti-angiogenic therapy: diffusion-weighted magnetic resonance imaging and volume measurements in colon carcinoma xenografts. *PLoS One*. 2014;9(9):e106970.
187. Mungai F, Pasquinelli F, Mazzone LN, Virgili G, Ragozzino A, Quaia E, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the prediction and assessment of chemotherapy outcome in liver metastases. *Radiol Med*. 2014;119(8):625-33.
188. Sala E, Priest AN, Kataoka M, Graves MJ, McLean MA, Joubert I, et al. Apparent diffusion coefficient and vascular signal fraction measurements with magnetic resonance imaging: feasibility in metastatic ovarian cancer at 3 Tesla: technical development. *Eur Radiol*. 2010;20(2):491-6.
189. Okamura S, Sumie S, Tonan T, Nakano M, Satani M, Shimose S, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging predicts malignant potential in small hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2016;48(8):945-52.
190. Li X, Zhang K, Shi Y, Wang F, Meng X. Correlations between the minimum and mean apparent diffusion coefficient values of hepatocellular carcinoma and tumor grade. *J Magn Reson Imaging*. 2016.
191. Kokabi N, Ludwig JM, Camacho JC, Xing M, Mittal PK, Kim HS. Baseline and Early MR Apparent Diffusion Coefficient Quantification as a Predictor of Response of Unresectable Hepatocellular Carcinoma to Doxorubicin Drug-Eluting Bead Chemoembolization. *J Vasc Interv Radiol*. 2015;26(12):1777-86.
192. Wu LA, Chang RF, Huang CS, Lu YS, Chen HH, Chen JY, et al. Evaluation of the treatment response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer using combined magnetic resonance vascular maps and apparent diffusion coefficient. *J Magn Reson Imaging*. 2015;42(5):1407-20.
193. Joo I, Lee JM, Han JK, Choi BI. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging for monitoring the therapeutic efficacy of the vascular disrupting agent CKD-516 in rabbit VX2 liver tumors. *Radiology*. 2014;272(2):417-26.
194. Kyriazi S, Collins DJ, Messiou C, Pennert K, Davidson RL, Giles SL, et al. Metastatic ovarian and primary peritoneal cancer: assessing chemotherapy response with diffusion-weighted MR imaging--value of histogram analysis of apparent diffusion coefficients. *Radiology*. 2011;261(1):182-92.
195. Kim JH, Joo I, Kim TY, Han SW, Kim YJ, Lee JM, et al. Diffusion-Related MRI Parameters for Assessing Early Treatment Response of Liver Metastases to Cytotoxic Therapy in Colorectal Cancer. *AJR Am J Roentgenol*. 2016;207(3):W26-32.
196. Stephen RM, Jha AK, Roe DJ, Trouard TP, Galons JP, Kupinski MA, et al. Diffusion MRI with Semi-Automated Segmentation Can Serve as a Restricted Predictive Biomarker of the Therapeutic Response of Liver Metastasis. *Magn Reson Imaging*. 2015;33(10):1267-73.
197. Tomura N, Narita K, Izumi J, Suzuki A, Anbai A, Otani T, et al. Diffusion changes in a tumor and peritumoral tissue after stereotactic irradiation for brain tumors: possible prediction of treatment response. *J Comput Assist Tomogr*. 2006;30(3):496-500.

198. Hordonneau C, Buisson A, Scanzi J, Goutorbe F, Pereira B, Borderon C, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in ileocolonic Crohn's disease: validation of quantitative index of activity. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(1):89-98.
199. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C, Roth AD, Andres A, Audard V, et al. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Ann Oncol.* 2007;18(2):299-304.
200. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology.* 2005;47(2):141-6.
201. Passot G, You B, Boschetti G, Fontaine J, Isaac S, Decullier E, et al. Pathological response to neoadjuvant chemotherapy: a new prognosis tool for the curative management of peritoneal colorectal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(8):2608-14.
202. Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer.* 2000;88(2):358-63.
203. Smeenk RM, van Velthuysen ML, Verwaal VJ, Zoetmulder FA. Appendiceal neoplasms and pseudomyxoma peritonei: a population based study. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(2):196-201.
204. Smeenk RM, Verwaal VJ, Zoetmulder FA. Pseudomyxoma peritonei. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(2):138-45.
205. Baratti D, Kusamura S, Milione M, Pietrantonio F, Caporale M, Guaglio M, et al. Pseudomyxoma Peritonei of Extra-Appendiceal Origin: A Comparative Study. *Ann Surg Oncol.* 2016.
206. Ronnett BM, Kurman RJ, Zahn CM, Shmookler BM, Jablonski KA, Kass ME, et al. Pseudomyxoma peritonei in women: a clinicopathologic analysis of 30 cases with emphasis on site of origin, prognosis, and relationship to ovarian mucinous tumors of low malignant potential. *Hum Pathol.* 1995;26(5):509-24.
207. Ronnett BM, Shmookler BM, Diener-West M, Sugarbaker PH, Kurman RJ. Immunohistochemical evidence supporting the appendiceal origin of pseudomyxoma peritonei in women. *Int J Gynecol Pathol.* 1997;16(1):1-9.
208. Carr NJ, Sobin L. Tumors of the appendix. WHO Classification of tumors of the digestive system (World Health Organization Classification of tumors, vol 3). 4th ed IARC Press ed. Lyon, France: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND; 2010. p. 122-5.
209. Elias D, Gilly F, Quenet F, Bereder JM, Sideris L, Mansvelt B, et al. Pseudomyxoma peritonei: a French multicentric study of 301 patients treated with cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol.* 2010;36(5):456-62.
210. Smeenk RM, Verwaal VJ, Antonini N, Zoetmulder FA. Survival analysis of pseudomyxoma peritonei patients treated by cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg.* 2007;245(1):104-9.
211. Elsayes KM, Staveteig PT, Narra VR, Leyendecker JR, Lewis JS, Jr., Brown JJ. MRI of the peritoneum: spectrum of abnormalities. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;186(5):1368-79.
212. Manfredi R, Graziani R, Motton M, Mantovani W, Baltieri S, Tognolini A, et al. Main pancreatic duct intraductal papillary mucinous neoplasms: accuracy of MR imaging in differentiation between benign and malignant tumors compared with histopathologic analysis. *Radiology.* 2009;253(1):106-15.
213. Passot G, Glehen O, Pellet O, Isaac S, Tychyj C, Mohamed F, et al. Pseudomyxoma peritonei: role of 18F-FDG PET in preoperative evaluation of pathological grade and potential for complete cytoreduction. *Eur J Surg Oncol.* 2010;36(3):315-23.

214. Delhorme JB, Elias D, Varatharajah S, Benhaim L, Dumont F, Honore C, et al. Can a Benefit be Expected from Surgical Debulking of Unresectable Pseudomyxoma Peritonei? *Ann Surg Oncol*. 2016;23(5):1618-24.
215. Eveno C, Gaujoux S, Tobelem G, Pocard M. Did animal offer relevant model for Bevacizumab testing? *Br J Cancer*. 2008;99(9):1555; author reply 6.
216. Liang WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, et al. Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem*. 2006;281(2):951-61.
217. Weber GF, Chousterman BG, He S, Fenn AM, Nairz M, Anzai A, et al. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science*. 2015;347(6227):1260-5.
218. Eveno C, Hainaud P, Rampanou A, Bonnin P, Bakhouch S, Dupuy E, et al. Proof of prometastatic niche induction by hepatic stellate cells. *J Surg Res*. 2015;194(2):496-504.
219. Cui Y, Zhang C, Li X, Liu H, Yin B, Xu T, et al. Intravoxel Incoherent Motion Diffusion-weighted Magnetic Resonance Imaging for Monitoring the Early Response to ZD6474 from Nasopharyngeal Carcinoma in Nude Mouse. *Sci Rep*. 2015;5:16389.
220. Joo I, Lee JM, Grimm R, Han JK, Choi BI. Monitoring Vascular Disrupting Therapy in a Rabbit Liver Tumor Model: Relationship between Tumor Perfusion Parameters at IVIM Diffusion-weighted MR Imaging and Those at Dynamic Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology*. 2016;278(1):104-13.
221. Sun WL, Hutarew G, Gradl J, Gratzl M, Denz H, Fiegl M. Successful antiangiogenic combination therapy for pseudomyxoma peritonei with bevacizumab and capecitabine. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(15):1459-62.
222. Flatmark K, Davidson B, Kristian A, Stavnes HT, Forsund M, Reed W. Exploring the peritoneal surface malignancy phenotype--a pilot immunohistochemical study of human pseudomyxoma peritonei and derived animal models. *Hum Pathol*. 2010;41(8):1109-19.
223. Dohan A, Lousquy R, Eveno C, Goere D, Broqueres-You D, Kaci R, et al. Orthotopic animal model of pseudomyxoma peritonei: An in vivo model to test anti-angiogenic drug effects. *Am J Pathol*. 2014;184(7):1920-9.
224. Kusamura S, Baratti D, Hutanu I, Gavazzi C, Morelli D, Iusco DR, et al. The role of baseline inflammatory-based scores and serum tumor markers to risk stratify pseudomyxoma peritonei patients treated with cytoreduction (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(8):1097-105.
225. Bonnin P, Coelho J, Pocard M, Levy BI, Marteau P. Anti-TNFalpha therapy early improves hemodynamics in local intestinal and extraintestinal circulations in active Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7(6):451-9.
226. Bonnin P, Villemain A, Vincent F, Debbabi H, Silvestre JS, Contreres JO, et al. Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(4):561-70.
227. Lassau N, Coiffier B, Kind M, Vilgrain V, Lacroix J, Cuinet M, et al. Selection of an early biomarker for vascular normalization using dynamic contrast-enhanced ultrasonography to predict outcomes of metastatic patients treated with bevacizumab. *Ann Oncol*. 2016.
228. Lassau N, Bonastre J, Kind M, Vilgrain V, Lacroix J, Cuinet M, et al. Validation of dynamic contrast-enhanced ultrasound in predicting outcomes of antiangiogenic therapy for solid tumors: the French multicenter support for innovative and expensive techniques study. *Invest Radiol*. 2014;49(12):794-800.
229. Vajapeyam S, Stamoulis C, Ricci K, Kieran M, Young Poussaint T. Automated Processing of Dynamic Contrast-Enhanced MRI: Correlation of Advanced Pharmacokinetic Metrics with Tumor Grade in Pediatric Brain Tumors. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016.

230. O'Neill AF, Qin L, Wen PY, de Groot JF, Van den Abbeele AD, Yap JT. Demonstration of DCE-MRI as an early pharmacodynamic biomarker of response to VEGF Trap in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016.
231. Yuan Q, Costa DN, Senegas J, Xi Y, Wiethoff AJ, Rofsky NM, et al. Quantitative diffusion-weighted imaging and dynamic contrast-enhanced characterization of the index lesion with multiparametric MRI in prostate cancer patients. *J Magn Reson Imaging*. 2016.
232. Haris M, Husain N, Singh A, Awasthi R, Singh Rathore RK, Husain M, et al. Dynamic contrast-enhanced (DCE) derived transfer coefficient (k_{trans}) is a surrogate marker of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression in brain tuberculomas. *J Magn Reson Imaging*. 2008;28(3):588-97.
233. Fusco R, Sansone M, Petrillo M, Setola SV, Granata V, Botti G, et al. Multiparametric MRI for prostate cancer detection: Preliminary results on quantitative analysis of dynamic contrast enhanced imaging, diffusion-weighted imaging and spectroscopy imaging. *Magn Reson Imaging*. 2016;34(7):839-45.
234. Padhani AR, Koh DM, Collins DJ. Whole-body diffusion-weighted MR imaging in cancer: current status and research directions. *Radiology*. 2011;261(3):700-18.
235. Padhani AR, Liu G, Koh DM, Chenevert TL, Thoeny HC, Takahara T, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations. *Neoplasia*. 2009;11(2):102-25.
236. Dohan A, Taylor S, Hoeffel C, Barret M, Allez M, Dautry R, et al. Diffusion-weighted MRI in Crohn's disease: Current status and recommendations. *J Magn Reson Imaging*. 2016.
237. Sutter O, Soyer P, Shotar E, Dautry R, Guerrache Y, Place V, et al. Diffusion-weighted MR imaging of uterine leiomyomas following uterine artery embolization. *Eur Radiol*. 2016.
238. Dohan A, Eveno C, Oprea R, Pautrat K, Place V, Pocard M, et al. Diffusion-weighted MR imaging for the diagnosis of abscess complicating fistula-in-ano: preliminary experience. *Eur Radiol*. 2014;24(11):2906-15.
239. Guiu B, Petit JM, Capitan V, Aho S, Masson D, Lefevre PH, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging in nonalcoholic fatty liver disease: a 3.0-T MR study. *Radiology*. 2012;265(1):96-103.
240. Luciani A, Vignaud A, Cavet M, Nhieu JT, Mallat A, Ruel L, et al. Liver cirrhosis: intravoxel incoherent motion MR imaging--pilot study. *Radiology*. 2008;249(3):891-9.

Annexes

Annexe n°1 : Valeur ajoutée de l'IRM dans le bilan préopératoire des carcinoses péritonéales

Article soumis à *Annals of Surgical Oncology*

Sequential application of MDCT and MR imaging has incremental value in the preoperative estimation of peritoneal carcinomatosis index

Anthony Dohan, Christine Hoeffel, Philippe Soyer, Anne Sophie Jannot, Pierre-Jean Valette, Arnaud Thivolet, Guillaume Passot, Olivier Glehen, Pascal Rousset,

Abstract

Objective: To determine the incremental value of magnetic resonance imaging (MRI) as compared to multidetector-row computed tomography (MDCT) in the preoperative estimation of peritoneal carcinomatosis index (PCI).

Methods: The MDCT and MRI examinations of 28 patients with peritoneal carcinomatosis were evaluated. MDCT were first analyzed by two observers who determined a first PCI (PCI_{MDCT}). Then, the two observers reviewed MRI examinations in combination with MDCT and determined a second PCI ($PCI_{MDCT+MRI}$). Sensitivity, specificity and accuracy of the two imaging sets were determined using surgery as a reference standard.

Results: For both readers an increased sensitivity was obtained using MRI and MDCT (63% to 81% for reader 1; 44% to 81% for reader 2). The number of true-positive findings increased from 106 to 125 for reader 1 ($P=0.046$) and from 117 to 132 for reader 2 with the adjunct of MRI ($P=0.105$). Regarding incremental value of MRI, the difference $PCI_{MDCT+MRI}-PCI_{Ref}$ was lower than $PCI_{MDCT}-PCI_{Ref}$ in 10/28 (36%) for reader 1 and 11/28 (39%) patients for reader 2 ($P=0.002$ and $P=0.0006$, respectively). The increase in sensitivity was greater for patients with moderate volume of disease.

Conclusion: The combination of MDCT and MRI improves the performances of experienced readers in the preoperative estimation of PCI by comparison to MDCT alone.

Keywords: Peritoneal carcinomatosis; Diffusion-weighted magnetic resonance imaging; HIPEC; Resectability; Peritoneal carcinomatosis Index

INTRODUCTION

The prognosis of patients with peritoneal carcinomatosis (PC) has been subjected to recent major changes with the introduction of cytoreductive surgery (CRS), which is used in association with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). This treatment, when feasible, is currently a well-established option for patients with PC (1-5). Optimal selection, however, remains critical among patients with PC in whom curative CRS can be anticipated. Peritoneal carcinomatosis index (PCI) is the most commonly used surgical variable to quantify the extent of PC and anticipate the effectiveness of tumor reduction. PCI, varying from 1 to 39, combines the distribution of peritoneal implants in 13 abdominal and pelvic areas with the largest tumor size per region being scored from zero to 3 (6). In this regard, depending on the primary tumor, some threshold PCI values according to PC etiology may contraindicate CRS (PCI > 15 for gastric cancer, PCI > 20 for colorectal cancer depending on the patient's status and surgical team's experience) (1,5). For these reasons, accurate preoperative determination of PCI is critical to optimize the selection of patients who will benefit from CRS. Another issue to avoid also includes erroneously stratifying a case as inoperable, when in fact a patient actually has a resectable PC.

Currently, multidetector-row computed tomography (MDCT) remains the reference imaging examination for the evaluation of patients with PC, thanks to its availability and high spatial resolution. However, MDCT has limited contrast resolution and underestimates the extent of disease (2-4,7). Researchers have shown a high degree of sensitivity of magnetic resonance imaging (MRI) in the detection of peritoneal implants (8,9). At the same time, other groups have found similar degrees of performances for MRI and MDCT for peritoneal implant detection by experienced readers (10,11).

Optimal evaluation of patients with PC who are candidates to CRS with HIPEC is paramount (12). In clinical practice, MDCT is performed first and MRI is kept as a second line examination and used as a problem solving tool in selected patients when MDCT is equivocal. We assume that MDCT and MRI should be regarded as complementary techniques and that MRI should be used in especially in patients with an intermediate burden of PC to better select resectable patients. However, the added value of MRI combined with MDCT in patients with PC by comparison of MDCT alone has not yet been formally evaluated.

This study was thus performed to determine the incremental value of MRI by comparison to MDCT alone for expert readers in the preoperative determination of PC resectability, using surgical PCI as a standard of reference.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This retrospective study was approved by the institutional review board of our institution. Informed consent was obtained from all patients who were included in our prospective database. A total of 28 consecutive patients (20 women, 8 men) with a mean age of 56 years \pm 11 (SD) (range: 29 - 69 years) were selected from a prospectively maintained database of patients who were planned to undergo CRS with HIPEC, with a curative intent for secondary PC between June 2009 to November 2012. In this database from a single tertiary center, all selected patients were scheduled to undergo MDCT and MRI with diffusion-weighted imaging (DWI) examinations of the abdomen and pelvis within two days of surgery (13).

In our clinical practice, patients are planned to undergo CRS with HIPEC based on the decision of a multi-disciplinary tumor board. There is no clear threshold for tumor burden to

decide to attempt for complete CRS in our institution and the decision is based on patient's clinical status, pathology of the PC, extent of the disease on imaging data or previous surgeries and deep involvement of some regions such as porta hepatis or mesentery root. We already perform routinely MRI pre-operatively as we already have experienced the improvement of pre-operative staging of the PC lesions.

The primary tumors were ovarian serous carcinoma (10 patients), non-mucinous adenocarcinoma of the colon (9 patients), pseudomyxoma peritonei (PMP) (5 patients), gastric non-mucinous adenocarcinoma (3 patients) and appendiceal non-mucinous adenocarcinoma (1 patient).

Ten patients did not have any pre-operative treatment, nor neoadjuvant chemotherapy or surgery: 5/5 PMP patients, 3/10 patients with ovarian serous carcinoma and 2/9 patients with non-mucinous adenocarcinoma of the colon.

Imaging protocols

MDCT protocol. All MDCT studies were performed with the same protocol. A single source CT unit equipped with 40 rows of detectors (Brilliance™, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) was used in all patients with the following parameters: voltage, 120 kVp; automatic tube current modulation; axial resolution, 0.75-mm; beam collimation, 40 x 0.625 mm ; gantry rotation time, 0.4 sec; pitch, 0.874. A tube current modulation technique was used to decrease radiation dose. All patients underwent iodinated contrast material-enhanced MDCT through the thorax, abdomen and pelvis. A mechanical power injector (OptiVantage®, Mallinckrodt-Tyco/Healthcare, Cincinnati, OH, USA) was used to administrate 90-140 mL of nonionic iodinated contrast material intravenously according to patient's body weight (Iobitridol, Xenetix 350®, Guerbet, Roissy-Charles de Gaulle, France) at a rate of 3 mL/sec. The acquisition of contrast material-enhanced MDCT data started 60 seconds after the start of intravenous contrast material administration. MDCT scanning was performed in a cephalocaudal direction, during one breath-hold, with the patient in supine position.

After imaging acquisition, MDCT data was reconstructed in the transverse plane with a thickness of 1.5-mm at 0.75-mm intervals. A second set was obtained at a thickness of 0.6-mm at 0.5-mm intervals for multiplanar reconstructed views.

MRI protocol. MRI examinations were performed at 1.5-T (Achieva®, Philips Medical Systems) using a surface coil containing 16 elements. These sequences covered the entire peritoneal cavity. Intravenous administration of 1-mg of an antiperistaltic agent (Glucagon®, Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark) was performed immediately before MR image acquisition. For all patients, MRI protocol included T2-weighted TSE MRI in the transverse plane, frequency-selective fat-suppressed T1-weighted water only selection (WATS) in the transverse plane, DWI with background body signal suppression (DWIBS), and MRI in the transverse plane using two b-values (0 and 1000 s/mm²). Dynamic fat-suppressed T1-weighted images were obtained in the transverse and coronal planes 5 minutes after intravenous administration of a gadolinium chelate (Multihance®, Bracco, Milan, Italy) at a dose of 0.2 mL/kg. All sequences were acquired using a slice thickness of 6-mm and an intersection gap of 1-mm. The average examination time was 30 minutes. The MRI protocol is provided in detail in Table 1.

Image analysis

For each patient the radiological PCI was evaluated using dedicated software, developed at our institution and now available online, that provides a standardized collection form to evaluate PCI (PROMISE®) (14). Briefly, the PCI was calculated considering the lesion size (LS) of the largest implant that was scored as lesion size 0 through 3 (LS-0 to LS-3) for each of the 13 regions. An LS-0 signified no visible implants. LS-1 referred to implants that were visible up to 0.5 cm in greatest diameter. LS-2 corresponded to nodules greater than 0.5 cm and up to 5 cm. LS-3 referred to implants measuring 5 cm or more in diameter. If an organ was coated by tumor implants (confluent disease) or if there was tissue adhesions or scalloping on an organ surface, the region was also scored as LS-3 (5).

For this retrospective study, MDCT examinations were first reviewed using a picture archiving and communication system (PACS) workstation ((Viewforum® v6.3; Philips Medical Systems) by two expert abdominal radiologists with 8 (Reader 1) and 19 (Reader 2) years of experience in reading MDCT and MRI examinations of the abdomen. The two radiologists worked independently. For each patient, all imaging findings and implant descriptions for the 13 regions were reported in the software, which provided a standardized report and calculated the global PCI (Fig. 1). Transverse 1-mm thickness MDCT images and 3-mm thickness multiplanar reconstructions were analyzed first and reports generated by the software. A second session was organized one month later to avoid recall bias and MRI examinations, using all MR sequences, were analyzed in combination with MDCT. All images were analyzed by the readers without any information relative to the patients except the nature of the primary tumor. The two observers were also aware of the overall goal of the study.

Reading criteria were defined in a consensus among both readers by comparing surgical findings in image analysis in a training cohort of ten patients who were not included in the study.

On MDCT images, peritoneal lesions were considered as true peritoneal implants when readers saw peritoneal nodules, focal thickening of the peritoneum (> 1mm and or irregular), or non-equivocal fat stranding in the area. Fat stranding was quantitatively evaluated using a score of 2 for focal infiltration and a score of 3 for diffuse infiltration. From this first set (set 1), a first PCI was estimated by the software for each reader working independently (PCI_{MDCT}).

During the second reading session, readers had access to MDCT and MRI examinations. On morphological sequences, peritoneal implants were reported using the same criteria as those considered for MDCT. On DWI, peritoneal implants were reported in cases of hyperintense on high b-value images peritoneal lesions that were visible on any morphological sequence or when they were visible on MDCT images. All additional lesions not seen on MDCT set (set 1) that were depicted owing to the use of MRI, were reported in the software to produce a second set (set 2). Readers could not change the results of the first reading session during the second one. From set 2, a second PCI was then estimated by the software for each reader working independently ($PCI_{MDCT+MRI}$).

Standard of Reference

Intraoperative findings combined with the results of histopathological analysis of resected specimens during CRS (PCI_{Ref}) were used as the standard of reference. Surgery was performed by the same expert surgeon with more than 15 years of experience in CRS with HIPEC, who also determined the PCI_{Ref} . The quantification of PCI_{Ref} was reported prospectively by the surgeon using the same software, by region analysis.

Statistical analysis

Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy were calculated for each imaging set and for each reader, using a region by region analysis in a binary fashion (presence or absence of tumor implants). Agreement in PCI estimation between the two readers was assessed with the weighted Cohen κ (kappa) statistic. The results of the Cohen κ (kappa) statistic were calculated along with 95% confidence intervals (CIs). Degrees of agreement were categorized as follows: κ values of 0.00 - 0.20 were considered to indicate poor agreement; κ values of 0.21 - 0.40, fair agreement; κ values of 0.41 - 0.60, moderate agreement; κ values of 0.61 - 0.80, good agreement; κ values of 0.81 - 0.99, excellent agreement and κ value of 1, perfect agreement (15). For inter-observer agreement, the mean difference, 95% limits of agreement were calculated. Bland-Altman plots were used to determine whether the difference was influenced by the magnitude of the measurements (16,17).

The absolute differences $PCI_{MDCT}-PCI_{Ref}$ and $PCI_{MDCT+MRI}-PCI_{Ref}$ were calculated for reader 1 and compared using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test for paired data. Variation in sensitivity for reader 1 was studied using McNemar test. Agreement between reader 1 evaluation and the standard of reference was assessed for each set with the weighted Cohen κ (kappa) statistic. All statistical tests were two-tailed and significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of the two imaging sets for each reader depicting the presence of peritoneal implants in each of the 13 regions are reported in Table 2. For both readers, the highest incremental value for MRI in terms of sensitivity was observed for implants located in region 3 (upper left quadrant); the sensitivity rose from 63% (10/16) to 81% (13/16) for reader 1 and from 44% (7/16) to 81% (13/16) for Reader 2 (Fig. 2 and 3). For regions 0 (central quadrant) and 6 (pelvis) an increase in sensitivity was achieved only for Reader 1 (from 75% (15/20) to 90% (18/20) and from 63% (12/19) to 79% (15/19)). In terms of specificity, there was no significant improvement for Reader 1 and specificity decreased for Reader 2, especially in regions 6 and 7 (pelvis and lower right quadrant) from 56% (5/9) to 33% (3/9) and from 82% (9/11) to 55% (6/11), respectively.

Inter-observer agreement was moderate for both sets with a kappa value of 0.56 (95%CI: 0.27-0.84) and 0.60 (95%CI: 0.32-0.88) respectively (Tables 3, 4). The limits of agreement between the readers for each set are reported in Fig. 4.

Among the 190 regions with tumor implants found during surgery (mean: 6.8 regions per patient), the number of involved regions preoperatively depicted with imaging increased with the adjunct of MRI from 106 to 125 ($P < 0.001$). Additional lesions were found on Set 2 by comparison with set 1 in 12/28 patients (43%). Concerning the incremental value of MRI, the absolute difference $PCI_{MDCT+MRI}-PCI_{Ref}$, was lower than $PCI_{MDCT}-PCI_{Ref}$ (3.96 ± 4.10 vs 4.89 ± 4.73 ; $P = 0.01$). The difference increased with an overestimation in 1/28 patients (3%) for Reader 1. $PCI_{MDCT+MRI}$ underestimated the actual PCI (i. e., PCI_{Ref}) in 16/28 patients (57%) for reader 1. Agreement between each set and standard of reference is reported in Table 5. Agreement was moderate for Set 1, (kappa = 0.47; 95%CI: 0.21-0.72) and for Set 2, (kappa = 0.54; 95%CI: 0.28-0.80).

DISCUSSION

Our results show that sequential application of MDCT and MRI has an incremental value in the preoperative estimate of PCI. We demonstrated the added value of MRI in terms of increased sensitivity in regions 0 (central quadrant), 6 (pelvis) and region 3 (upper left quadrant). We found also that this combination allows for an improved preoperative quantitative evaluation of PCI.

$PCI_{MDCT+MRI}-PCI_{Ref}$ significantly decreased compared to $PCI_{MDCT}-PCI_{Ref}$ indicating a clear added value of MRI to approach surgical PCI. MRI identified more lesions than MDCT. The specificity of MRI was, however, slightly decreased, especially for Reader 2 who was more confident with MDCT than with MRI. Torkzad et al. reported a similar sensitivity and no difference in terms of evaluation of PCI between MDCT and MRI alone with an experienced reader (11). Conversely, Low et al. showed significantly better performances for MRI alone as compared to MDCT alone in PC (9). After categorizing 22 patients in 3 categories: small volume tumor (PCI 0-9), moderate volume (PCI 10-20), and large volume (PCI > 20), they reported an appropriate categorization of patients in 20 patients (91%) with MRI and in 11 patients (50%) with MDCT only (9). They also reported a global sensitivity and specificity of 95% and 70%, respectively, with MRI and 55% and 86%, respectively, with MDCT. For Low et al., MRI was definitely superior to MDCT but in our study and for Torkzad et al., the added value is less marked. The performances of MRI in the study by Low et al. may be explained by a difference in experience of readers, which is a critical issue in MRI of the peritoneum. Another difference is also the inclusion criteria; in the study by Low et al., the majority of patients had appendiceal neoplasms with PMP (77%) (6,9). The added value of MRI in PMP is well demonstrated as compared to PC from other origins, because of the high signal of mucinous content and high contrast resolution of MRI (18). Moreover, our results may be explained by a recruiting bias: our center is a tertiary referral center and a high proportion of patients have already been operated on several times or previously received chemotherapy. In the context of recurrence or partial response to chemotherapy, lesions are often smaller or less attenuating on MDCT, with a decreased cellularity, which may impair the performances of imaging (19).

In our study, we found that PCI was preoperatively underestimated in two thirds of patients despite the combination of MRI with MDCT. Our results, however, show that the added value of MRI is maximal for patients with an intermediate PCI. It is less marked for patients with very high or very low PCI. We can assume that these patients are those for whom a surgical strategy is more difficult to determine and for whom a better evaluation of the disease is needed. Several studies have evaluated the added value of positron emission tomography-computed tomography (PET-CT) in PC (20-22). They uniformly found that PET-CT detects additional lesions compared to MDCT, but these additional lesions had a limited impact on patient management. In our study, MRI seems to have the same limitation. When grouping patients in 3 categories (low, intermediate and high PCI, which correspond more or less to resectable / indeterminate / unresectable diseases), MRI resulted in correct upstaging in only 3 patients and erroneous upstaging in 2 patients.

Indeed, another critical issue of preoperative staging is the overestimation of lesions, which may erroneously mark a patient as inoperable who is actually operable. False-positive findings are an issue that has also been reported for PET-CT in PC (20,21). Concerning MRI, false-positive findings are mainly caused by lesions detected with DWI. Although DWI has shown great capacities in detecting malignancies in several organs such as the liver, it should be interpreted with caution (23-26). Several causes of restricted diffusion have been reported, which may mimic malignancy, including inflammatory nodes, abscesses or post-operative

changes, especially at the site of the primary tumor in cases of metachronous PC. In our experience, another cause of PCI overestimation irrespective of the imaging technique is that some peritoneal thickening measuring more than 5 cm on imaging, which are scored at 3/3, may be clusters of small individual nodules which are surgically scored from 1 to 2. Moreover, fat stranding is difficult to score adequately on imaging and may correspond to smaller lesions at surgery, with some retraction or fluid effusion.

Concerning the results according to PC origin, our results are consistent with those of previous studies, with a global underscoring of PCI for PC from ovarian and digestive origins (11,27,28). For PMP patients, the trend was most often up-scoring especially for reader 2 who was less experienced to PMP on MRI. This is probably because PMP is rich in mucinous component that is hyperintense on T2-weighted images, and thus easier to detect than other types of PC with MRI, and the presence of ascites without solid component may be erroneously considered as tumor lesions. For PC of ovarian origin, all studies and our results uniformly found an underestimation of PC, mainly because tumor implants presented as small and multi-nodular lesions rather than bulky masses (29,30).

Regarding inter-observer variability, we found a good to excellent inter-observer agreement for both sets in regions 0, 1, 2, 3, 5, 7, and 8 and for global PCI evaluation. On the contrary, interobserver agreement was poor for MDCT and MRI in regions 10 and 11 and moderate in region 12. These results show that the regions near the small bowel serosa are the most challenging and also that experienced readers do not have the same performance. These findings suggest that multi-institutional studies with surgical correlation and specialized clinical research groups are needed to improve the evaluation of PC. Other researchers have reported similar results with a mild correlation between several readers for evaluation of PCI with CT or MRI independently, but no study has ever evaluated the agreement between readers for the combination of MDCT and MRI in such cases (28). Soussan et al. reported good inter-observer agreement for MRI and excellent for PET-CT in PC (26).

Our study has several limitations. First, we included a limited number of patients in this preliminary study. Using our correlation software, we tried to have a perfect correlation with the surgical standard of reference. Third, the causes of PC in our study are heterogeneous. This is because we wanted to evaluate the added value of MRI in the general case of PC in terms of sensitivity and not for a specific pathology. We agree that further multicenter studies dedicated to each specific etiology should be conducted with more focus on the evaluation of standardized resectability criteria. Finally, patients were not given oral contrast material prior to MDCT and MRI examinations. Further researches are thus needed to assess the value of enteral contrast agents that might help better depict small bowel serosal implants.

In conclusion, the combination of MDCT and MRI improves the performances of experienced readers in the preoperative estimation of PCI by comparison to MDCT alone.

REFERENCES

1. Chua TC, Al-Zahrani A, Saxena A, et al. Determining the association between preoperative computed tomography findings and postoperative outcomes after cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy for pseudomyxoma peritonei. *Ann Surg Oncol* 2011;18(6):1582-1589.
2. de Bree E, Koops W, Kroger R, van Ruth S, Witkamp AJ, Zoetmulder FA. Peritoneal carcinomatosis from colorectal or appendiceal origin: correlation of preoperative CT with intraoperative findings and evaluation of interobserver agreement. *J Surg Oncol* 2004;86(2):64-73.

3. Esquivel J, Chua TC, Stojadinovic A, et al. Accuracy and clinical relevance of computed tomography scan interpretation of peritoneal cancer index in colorectal cancer peritoneal carcinomatosis: a multi-institutional study. *J Surg Oncol* 2010;102(6):565-570.
4. Koh JL, Yan TD, Glenn D, Morris DL. Evaluation of preoperative computed tomography in estimating peritoneal cancer index in colorectal peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol* 2009;16(2):327-333.
5. Sugarbaker PH. Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol* 1998;14(3):254-261.
6. Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 1996;82:359-374.
7. Yan TD, Morris DL, Shigeki K, Dario B, Marcello D. Preoperative investigations in the management of peritoneal surface malignancy with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: Expert consensus statement. *J Surg Oncol* 2008;98(4):224-227.
8. Low RN, Barone RM. Combined diffusion-weighted and gadolinium-enhanced MRI can accurately predict the peritoneal cancer index preoperatively in patients being considered for cytoreductive surgical procedures. *Ann Surg Oncol* 2012;19(5):1394-1401.
9. Low RN, Barone RM, Lucero J. Comparison of MRI and CT for predicting the Peritoneal Cancer Index (PCI) preoperatively in patients being considered for cytoreductive surgical procedures. *Ann Surg Oncol* 2015;22(5):1708-1715.
10. Qayyum A, Coakley FV, Westphalen AC, Hricak H, Okuno WT, Powell B. Role of CT and MR imaging in predicting optimal cytoreduction of newly diagnosed primary epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96(2):301-306.
11. Torkzad MR, Casta N, Bergman A, Ahlstrom H, Pahlman L, Mahteme H. Comparison between MRI and CT in prediction of peritoneal carcinomatosis index (PCI) in patients undergoing cytoreductive surgery in relation to the experience of the radiologist. *J Surg Oncol* 2015;111(6):746-751.
12. Najah H, Lo Dico R, Griénay M, Dohan A, Dray X, Pocard M. Single-incision flexible endoscopy (SIFE) for detection and staging of peritoneal carcinomatosis. *Surg Endosc* 2015.
13. Mohkam K, Passot G, Cotte E, et al. Resectability of peritoneal carcinomatosis: learnings from a prospective cohort of 533 consecutive patients selected for cytoreductive surgery. *Ann Surg Oncol* 2016;23(4):1261-1270.
14. Villeneuve L, Thivolet A, Bakrin N, et al. A new internet tool to report peritoneal malignancy extent. *PeRitOneal Malignancy Stage Evaluation (PROMISE) application*. *Eur J Surg Oncol* 2016.
15. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 1977;33(2):363-374.
16. Bland JM, Altman DG. Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;22(1):85-93.
17. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307-310.
18. Menassel B, Duclos A, Passot G, et al. Preoperative CT and MRI prediction of non-resectability in patients treated for pseudomyxoma peritonei from mucinous appendiceal neoplasms. *Eur J Surg Oncol* 2016;42(4):558-566.

19. Mazzei MA, Khader L, Cirigliano A, et al. Accuracy of MDCT in the preoperative definition of Peritoneal Cancer Index (PCI) in patients with advanced ovarian cancer who underwent peritonectomy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *Abdom Imaging* 2013;38(6):1422-1430.
20. Anthony MP, Khong PL, Zhang J. Spectrum of (18)F-FDG PET/CT appearances in peritoneal disease. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193(6):W523-529.
21. Audollent R, Eveno C, Dohan A, et al. Pitfalls and mimickers on (18)F-FDG-PET/CT in peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: An analysis from 37 patients. *J Visc Surg* 2015;152(5):285-291.
22. Dubreuil J, Giammarile F, Rousset P, et al. FDG-PET/ceCT is useful to predict recurrence of Pseudomyxoma peritonei. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016.
23. Kyriazi S, Collins DJ, Morgan VA, Giles SL, deSouza NM. Diffusion-weighted imaging of peritoneal disease for noninvasive staging of advanced ovarian cancer. *Radiographics* 2010;30(5):1269-1285.
24. Low RN, Gurney J. Diffusion-weighted MRI (DWI) in the oncology patient: value of breathhold DWI compared to unenhanced and gadolinium-enhanced MRI. *J Magn Reson Imaging* 2007;25(4):848-858.
25. Low RN, Sebrechts CP, Barone RM, Muller W. Diffusion-weighted MRI of peritoneal tumors: comparison with conventional MRI and surgical and histopathologic findings--a feasibility study. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193(2):461-470.
26. Soussan M, Des Guetz G, Barrau V, et al. Comparison of FDG-PET/CT and MR with diffusion-weighted imaging for assessing peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal malignancy. *Eur Radiol* 2012;22(7):1479-1487.
27. Klumpp B, Aschoff P, Schwenzer N, et al. Correlation of preoperative magnetic resonance imaging of peritoneal carcinomatosis and clinical outcome after peritonectomy and HIPEC after 3 years of follow-up: preliminary results. *Cancer Imaging* 2013;13(4):540-547.
28. Klumpp BD, Schwenzer N, Aschoff P, et al. Preoperative assessment of peritoneal carcinomatosis: intraindividual comparison of 18F-FDG PET/CT and MRI. *Abdom Imaging* 2013;38(1):64-71.
29. Queiroz MA, Kubik-Huch RA, Hauser N, et al. PET/MRI and PET/CT in advanced gynaecological tumours: initial experience and comparison. *Eur Radiol* 2015;25(8):2222-2230.
30. Fehniger J, Thomas S, Lengyel E, et al. A prospective study evaluating diffusion weighted magnetic resonance imaging (DW-MRI) in the detection of peritoneal carcinomatosis in suspected gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol* 2016.

Table 1: Peritoneal MRI protocol at 1.5 Tesla

MR sequence	TR (ms)	TE (ms)	Matrix	Nex	Thickness (mm)	Gap (mm)	FOV (cm) RLxAPxFH
Axial T2-WI	580	80	324x252	1	6	0.9	39x27.9x27.9
Axial T1-WI WATS	252	5	260 x 168	1	6	1	39x28.2x27.9
Axial DWIBS	12050	75	152 x 150	7	6	1	37.5x30x24.4
Axial T1-WI IV+	252	5	260 x 168	1	6	1	39x28.2x27.9
Coronal T1-WI IV+	106	5.3	260x123	2	6	1	28.2x23.9x39

Notes. TR indicates repetition time; TE indicates echo time; FOV indicates field of view; Nex indicates number of signal averaging; WI indicates weighted images; DWIBS indicates diffusion-weighted MRI with background body signal suppression; WATS indicates water only selection; IV+ indicates after intravenous administration of a gadolinium chelate.

Table 2A. Sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (Ac) for each region (Reg) for reader 1.

	MDCT only (Set 1)					MDCT + MRI (Set 2)				
	Se	Sp	PPV	NPV	Ac	Se	Sp	PPV	NPV	Ac
<i>Region 0</i>	0.75	0.88	0.94	0.58	0.79	0.90	0.88	0.95	0.78	0.89
<i>Reg 1</i>	0.71	1.00	1.00	0.69	0.82	0.82	1.00	1.00	0.79	0.89
<i>Reg 2</i>	0.85	0.87	0.85	0.87	0.86	0.92	0.87	0.86	0.93	0.89
<i>Reg 3</i>	0.63	0.58	0.67	0.54	0.61	0.81	0.50	0.68	0.67	0.68
<i>Reg 4</i>	0.43	0.93	0.86	0.62	0.68	0.50	0.93	0.88	0.65	0.71
<i>Reg 5</i>	0.67	0.77	0.77	0.67	0.71	0.73	0.77	0.79	0.71	0.75
<i>Reg 6</i>	0.63	1.00	1.00	0.56	0.75	0.79	1.00	1.00	0.69	0.86
<i>Reg 7</i>	0.65	0.64	0.73	0.54	0.64	0.76	0.64	0.76	0.64	0.71
<i>Reg 8</i>	0.36	0.94	0.80	0.70	0.71	0.45	0.94	0.83	0.73	0.75
<i>Reg 9</i>	0.36	0.93	0.83	0.59	0.64	0.43	0.86	0.75	0.60	0.64
<i>Reg 10</i>	0.33	0.95	0.75	0.75	0.75	0.33	0.95	0.75	0.75	0.75
<i>Reg 11</i>	0.17	1.00	1.00	0.62	0.64	0.17	0.94	0.67	0.60	0.61
<i>Reg 12</i>	0.38	0.93	0.83	0.64	0.68	0.46	0.93	0.86	0.67	0.71

Table 2B. Sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (Ac) for each region (Reg) for reader 2.

	MDCT only (Set 1)					MDCT + MRI (Set 2)				
	Se	Sp	PPV	NPV	Ac	Se	Sp	PPV	NPV	Ac
<i>Region 0</i>	0.70	0.75	0.88	0.50	0.71	0.70	0.75	0.88	0.50	0.71
<i>Reg 1</i>	0.76	0.73	0.81	0.67	0.75	0.88	0.64	0.79	0.78	0.79
<i>Reg 2</i>	0.77	0.87	0.83	0.81	0.82	0.85	0.67	0.69	0.83	0.75
<i>Reg 3</i>	0.44	0.83	0.78	0.53	0.61	0.81	0.75	0.81	0.75	0.79
<i>Reg 4</i>	0.57	0.93	0.89	0.68	0.75	0.64	0.79	0.75	0.69	0.71
<i>Reg 5</i>	0.53	0.85	0.80	0.61	0.68	0.60	0.77	0.75	0.63	0.68
<i>Reg 6</i>	0.95	0.56	0.82	0.83	0.82	0.95	0.33	0.75	0.75	0.75
<i>Reg 7</i>	0.59	0.82	0.83	0.56	0.68	0.71	0.55	0.71	0.55	0.64
<i>Reg 8</i>	0.36	0.94	0.80	0.70	0.71	0.45	0.82	0.63	0.70	0.68
<i>Reg 9</i>	0.64	0.93	0.90	0.72	0.79	0.64	0.86	0.82	0.71	0.75
<i>Reg 10</i>	0.56	0.89	0.71	0.81	0.79	0.56	0.84	0.63	0.80	0.75
<i>Reg 11</i>	0.33	1.00	1.00	0.67	0.71	0.33	1.00	1.00	0.67	0.71
<i>Reg 12</i>	0.54	0.93	0.88	0.70	0.75	0.62	0.93	0.89	0.74	0.79

Table 3. Inter-observer agreement between two independent readers in 28 patients with peritoneal carcinomatosis

Reader 1 \ Reader 2	$0 \leq PCI_{MDCT} < 11$	$11 \leq PCI_{MDCT} < 21$	$21 \leq PCI_{MDCT}$	Total
$0 \leq PCI_{MDCT} < 11$	17	3	0	20
$11 \leq PCI_{MDCT} < 21$	1	3	2	6
$21 \leq PCI_{MDCT}$	0	0	2	2
<i>Total</i>	18	6	4	28

Note. A kappa value of 0.56 (95% CI: 0.27-0.84) indicates mild inter-observer agreement:

Reader 1 \ Reader 2	$0 \leq PCI_{MDCT+MRI} < 11$	$11 \leq PCI_{MDCT+MRI} < 21$	$21 \leq PCI_{MDCT+MRI}$	Total
$0 \leq PCI_{MDCT+MRI} < 11$	15	4	0	19
$11 \leq PCI_{MDCT+MRI} < 21$	1	4	1	6
$21 \leq PCI_{MDCT+MRI}$	0	0	3	3
<i>Total</i>	16	8	4	28

Note. A kappa value of 0.60 (95% CI: 0.32-0.88) indicates mild inter-observer agreement:

Table 4. Inter-observer agreement for PCI evaluation for each region.

	Mean difference	95% limits of agreement
Set 1		
Region 0	-0.07±0.98	-1.99 to 1.85
Region 1	0.29±1.01	-1.70 to 2.27
Region 2	-0.04±0.79	-1.59 to 1.52
Region 3	-0.25±0.84	-1.90 to 1.40
Region 4	0.18±0.94	-1.67 to 2.03
Region 5	-0.14±1.04	-2.19 to 1.90
Region 6	1.00±1.22	-1.39 to 3.39
Region 7	-0.18±0.94	-2.03 to 1.67
Region 8	-0.04±0.92	-1.84 to 1.77
Region 9	0.36±0.87	-1.35 to 2.06
Region 10	0.43±1.10	-1.73 to 2.59
Region 11	0.29±0.90	-1.47 to 2.04
Region 12	0.07±0.94	-1.77 to 1.91
Global PCI	1.89±5.35	-8.59 to 12.38
Set 2		
Region 0	-0.21±1.07	-2.30 to 1.88
Region 1	0.36±1.06	-1.72 to 2.44
Region 2	0.07±0.86	-1.61 to 1.75
Region 3	-0.18±0.82	-1.78 to 1.43
Region 4	0.25±0.97	-1.65 to 2.15
Region 5	-0.07±1.05	-2.13 to 1.99
Region 6	0.71±1.08	-1.41 to 2.84
Region 7	-0.07±0.90	-1.83 to 1.69
Region 8	0.00±0.67	-1.31 to 1.31
Region 9	0.32±0.90	-1.45 to 2.09
Region 10	0.46±1.10	-1.70 to 2.63
Region 11	0.25±0.93	-1.57 to 2.07
Region 12	0.14±1.11	-2.04 to 2.32
Global PCI	2.04±4.58	-6.95 to 11.02

Table 5. Agreement between Reader 1 and surgical exploration.

		standard of reference			Total
		$0 \leq PCI_{Ref} < 11$	$11 \leq PCI_{Ref} < 21$	$21 \leq PCI_{Ref}$	
Reader 1					
<i>Set 1</i>	$0 \leq PCI_{MDCT} < 11$	16	3	1	20
	$11 \leq PCI_{MDCT} < 21$	0	2	4	6
	$21 \leq PCI_{MDCT}$	0	0	2	2
	<i>Total</i>	16	5	7	28
<i>Set 2</i>	$0 \leq PCI_{MDCT+MRI} < 11$	16	3	0	19
	$11 \leq PCI_{MDCT+MRI} < 21$	0	2	4	6
	$21 \leq PCI_{MDCT+MRI}$	0	0	3	3
	<i>Total</i>	16	5	7	28

Note. For Set 1, mild agreement: kappa = 0.47 ± 0.13 [0.21-0.72]. For Set 2, mild agreement: kappa = 0.54 ± 0.13 [0.28-0.80].

Figure legends

Figure 1. Screenshot of the automatized online reporting system.

PROMISE Evaluations - Start a New Evaluation Scores Description Contact Us Disclaimer

MRI

- Please choose the involved anatomic structures at the bottom of this page

Region 0 - Central

PCI = 7 / 39

Region 0 : 1
Region 1 : 0
Region 2 : 0
Region 3 : 0
Region 4 : 0
Region 5 : 0
Region 6 : 3
Region 7 : 0
Region 8 : 1
Region 9 : 1
Region 10 : 1
Region 11 : 0
Region 12 : 0

Other Scores

Click on the score to calculate
Gilly = Stage NA/4
SPCI = NA/21

Summary

* If your browser does not support the image script, use the following menu

Regions

Peritoneal implant(s)
 0 1 2 3
 + than 3

Largest positive implant (mm):
4

Tumoral probability
Certain

Diffusion weighted imaging
Hyperintensity
 No Yes
ADC

Thickening of visceral / parietal peritoneum
 No Yes

Length of the thickening (mm):
1

Tumoral probability
Certain

Diffusion weighted imaging
Hyperintensity
 No Yes
ADC

Infiltration of adipose tissue (mesentery, mesocolon, ligaments, omentum)
 No Yes

• Focal Diffuse
 Retraction

Tumoral probability
Certain

Diffusion weighted imaging
Hyperintensity
 No Yes
ADC

Mucinous / Ascites fluid
 Free Loculated

None
 Minimal vol.
 Significant vol.

Tumoral probability
Doubtful

Diffusion weighted imaging
Hyperintensity
 No Yes

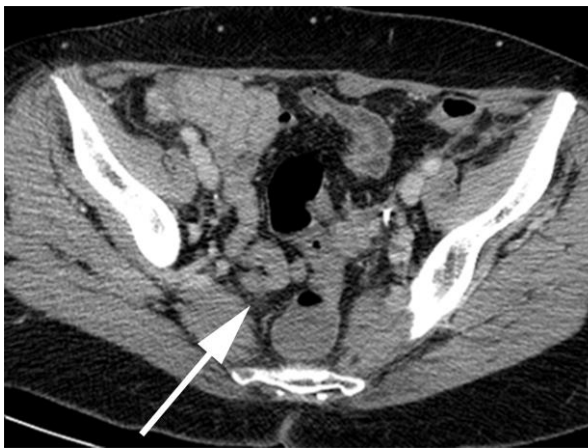
Figure 2. 54-year-old man with peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer and a surgical PCI of 16/39.

A. MDCT shows isoattenuating nodule (arrow) abutting the small bowel, that was not detected by both readers on MDCT.

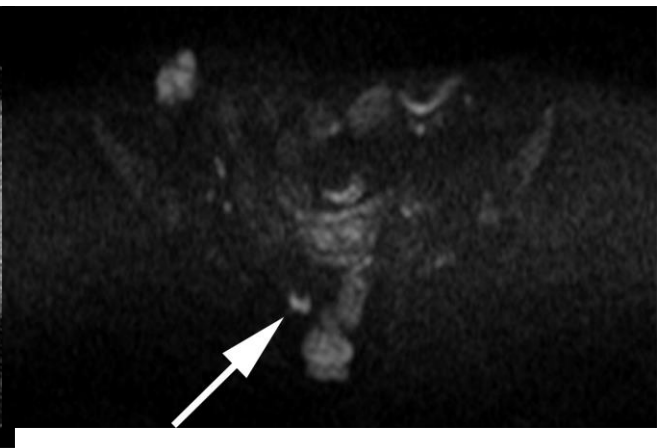
B. Diffusion weighted MR image ($b=1000 \text{ s/mm}^2$) shows hyperintense nodule indicating restricted diffusion (arrow).

C. On T2-weighted image, the nodule (arrow) is hypointense.

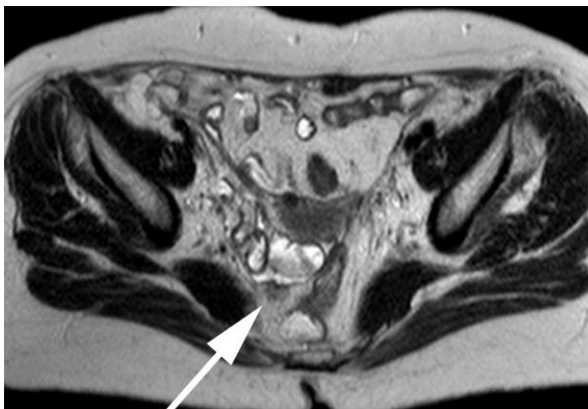
D. On fat-suppressed T1-weighted image obtained after intravenous administration of a gadolinium chelate the nodule shows enhancement. The nodule was detected on MRI by both readers: For reader 1, the PCI was 11/36 with imaging set 1 and 12/36 with imaging set 2; For reader 2, the PCI was 6/39 with imaging set 1 and 10/39 with imaging set 2.



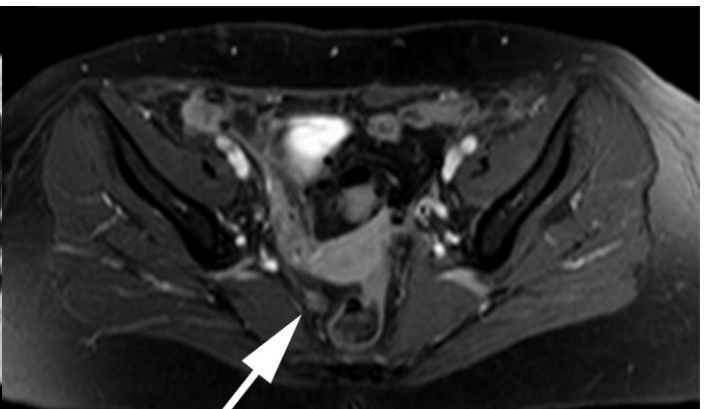
A



B



C



D

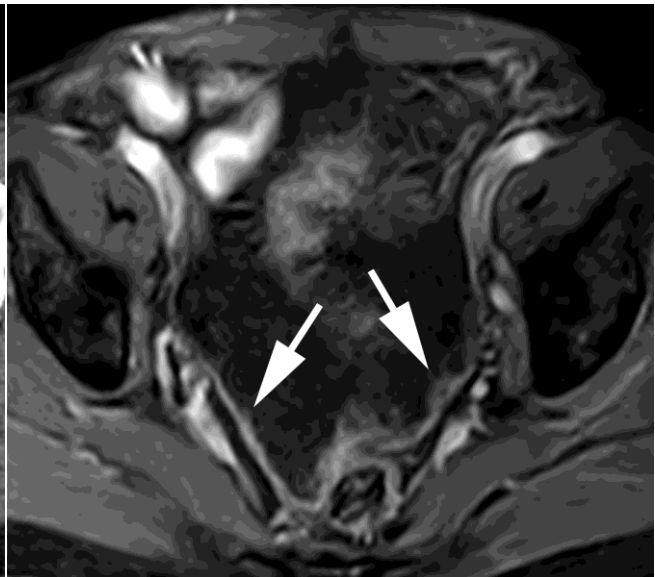
Figure 3. 64-year-old patient with pseudomyxoma peritonei and surgical PCI of 21/39

A. Undetected parietal involvement on MDCT by both readers (arrow)

B. Detection of a diffuse parietal thickening (arrows) scored 3/3 by both readers on MRI. For reader 1, the was 18/36 with imaging set 1 and 20/36 with imaging set 2; For reader 2, the PCI was 13/39 with imaging set 1 and 17/39 with imaging set 2.

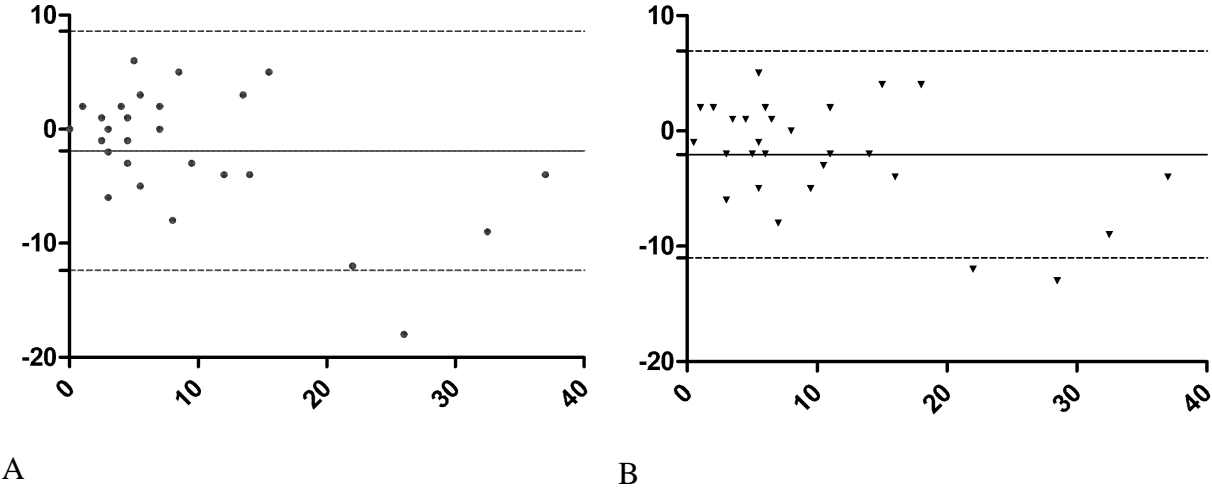


A



B

Figure 4. Bland–Altman plots show interobserver agreement for set 1 (A) and set 2 (B)



Annexe n°2 : PHRC-K POSITIF

Il s'agit d'une Proposition d'étude nationale multicentrique prospective sur l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie dans la carcinose péritonéale chez les patients candidats à la chirurgie de cytoréduction avec CHIP (projet déposé au PHRC-K 2016)

Full title	PredictiOn of 3-years SurvIval and response after neoadjuvant therapy In peritoneal carcinomaTosis from colorectal origIn using Functional imaging.
Acronym	POSITIF01
Sponsor	Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Scientific justification	Tumor response to neoadjuvant chemotherapy is an independent predictive factor of better outcome in patients with peritoneal carcinomatosis (PC) from colorectal origin
Primary objective and assessment criterion	To assess the capability of changes in functional imaging parameters (FIP) (DWIMRI, ¹⁸ FDG-PET/CT and texture analysis on CT, DWIMR and or ¹⁸ FDG-PET images) after neoadjuvant chemotherapy to predict the overall 3 years survival in patients with PC candidates for CRS with HIPEC. The main judgement criterion will be PC related mortality at three years.
Secondary objectives and assessment criteria	<p><i>Secondary objectives</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - To assess the capability of changes in FIP <ol style="list-style-type: none"> 1. To evaluate pathological response at the time of surgery 2. To predict outcome of patients categorized into four categories: complete surgical resection and long term survival with no recurrence, complete surgical resection and recurrence, incomplete surgical resection, and progression under neoadjuvant chemotherapy impairing surgery - To assess the capability of FIP at baseline evaluation to predict: <ol style="list-style-type: none"> 1. The pathological response at the time of surgery 2. The objective morphological response according to the classical criteria (RECIST1.1, blood markers) 3. The overall 3 years survival in patients with PC candidates for CRS with HIPEC. 4. Outcome of patients categorized into four categories: complete surgical resection and long term survival with no recurrence, complete surgical resection and recurrence, incomplete surgical resection, and progression under neoadjuvant chemotherapy impairing surgery. - To evaluate separately the prognostic value of FIP in patients with little PCI (below 10) and with a high PCI (above 10) - Correlation between radiological and surgical PCI <p><i>Secondary end points</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pathological grading of response: it will be possible in 95% of the patients included (because only 5% of patients do not have surgery finally in our experience).

	<ol style="list-style-type: none"> 2. Objective response according to RECIST 1.1 criteria at the end of neoadjuvant chemotherapy 3. CRS performed or not 4. Progression under neoadjuvant chemotherapy impairing surgery 5. Complete/incomplete CRS with/without HIPEC on operating report 6. Recurrence during follow-up 7. Surgical PCI
Experimental design	<p>A prospective multicentric interventional cohort study for the beginning and an observational multicentric cohort study for the follow-up. Patients will have at baseline, prior to neoadjuvant treatment, an abdominopelvic CT, DWIMRI, and ¹⁸FDG-PET/CT in one of the 5 recruiting centers and this evaluation will be repeated at the end of neoadjuvant chemotherapy. Examinations carried out are already used for the monitoring of patients with PC treated by chemotherapy in reference centers and considered as part of routine care, except the initial MRI and ¹⁸FDG-PET/CT which are non-invasive.</p>
Population involved	<p>Patient with PC from colorectal origin candidates for CRS with HIPEC</p>
Inclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> - Older than 18 years - Referred to a tertiary reference center - WHO status ≤ 2 - Signed informed consent - PC from CRC with histological proof - Receive 3 months of neoadjuvant chemotherapy (6 cycles \pm 1 cycle) among the following: <ul style="list-style-type: none"> - Fluoropyrimidine and oxaliplatin (FOLFOX or XELOX) \pm bevacizumab - Fluoropyrimidine and oxaliplatin (FOLFOX or XELOX) \pm anti-EGFR antibody - Fluoropyrimidine and CPT11 (FOLFIRI) \pm bevacizumab - Fluoropyrimidine and CPT11 (FOLFIRI) \pm anti-EGFR antibody - Fluoropyrimidine and oxaliplatin and CPT11 (FOLFIRINOX) \pm bevacizumab - Be candidates for CRS with HIPEC at the end of the chemotherapy: in tertiary reference centers (more than 50 HIPEC per year), only 5% of patients planned for surgery are not operated finally because of major progression of the disease. These patients will be also included. - Patients are candidates for HIPEC if they have PC only or PC with limited number of liver metastasis or lung metastasis (no more than one other site of metastases besides the peritoneum) - Not have chemotherapy for PC prior to the inclusion. Adjuvant chemotherapy after resection of the primary tumor is possible if it is finished since more than 6 months at the time of inclusion. - Have at least one measurable peritoneal lesion (target lesions must be at least 10 mm² in size)

Non-inclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> - Rare malignant peritoneal tumors: pseudomyxoma peritonei, mesothelioma peritonei and sarcomatosis peritonei. - Contraindication to the chemotherapy (pregnancy, allergy, impairment of cardiac, renal or liver function) - Major alterations of blood tests (neutrophil < 1500/mm³, platelet count < 100 000 /mm³, hemoglobin < 9 g/dL, bilirubin total > 1.5 N, estimated glomerular filtration rate < 60 mL/min) - Cardiac impairment: uncontrolled hypertension, myocardial infarction in the 6 preceding months, heart failure with Reduced left ventricular ejection fraction (<45%). - More than 2 metastatic sites - Follow-up not possible for psychological or geographical reasons
Other procedures added by the research	Baseline MRI with diffusion weighted images (DWIMRI) the day of inclusion. Baseline ¹⁸ FDG-PET/CT in the first week after inclusion.
Risks added by the research	DWIMRI is non-invasive, non-radiating and do not require administration of intra-venous contrast. ¹⁸ FDG-PET/CT is non-invasive and already used is every day practice to rule-out extra-peritoneal pathology pre-operatively.
Number of subjects chosen	180 (A rate of 5% of inconclusive or infeasible MRI and ¹⁸ FDG-PET/CT has been taken into account).
Number of centres	5 (nationale study)
Research period	<ul style="list-style-type: none"> - Anticipated inclusion duration: 18 months (78 weeks) - Duration of participation : 36 months (156 weeks) - Total duration : 54 months (244 weeks)
Number of inclusions expected per center and per month	2-3
Statistical analysis	<p>The primary analysis is based on the full analysis set_population and the primary endpoint that is the three year overall survival.</p> <p>The potential predictive values of changes in quantitative FIP evaluated with functional imaging after chemotherapy compared to baseline will be evaluated using a multivariate Cox analysis model. To test the specific benefit of FIP in addition to information based on usual evaluation of patients, variables already known to affect overall survival will be forced in this model.</p> <p>A sample size of N=180 patients will allow a 80% power to detect a potential role of a DMWRI parameters as a predictor of response with an odds ratio = 2 by a multivariate logistic regression at a 5% two-sided significance level and considering a squared multiple correlation of variables in the model at 20%. (A rate of 5% of inconclusive or infeasible MRI or ¹⁸FDG-PET/CT has been taken into account).</p>
Funding source	<i>PHRC-INCA</i>

Annexe n°3 : TDM de perfusion chez la souris

Dynamic Contrast enhanced CT-scan experiments – Work in progress

Then we tried to perform dynamic contrast-enhanced CT (DCE-CT) with a clinical CT-scanner. To date, DCE imaging using CT or MRI have been used to assess *in vivo* angiogenesis by monitoring changes in tumor physiology and heterogeneity in response to anti-angiogenic therapies.

One of our main issues was vascular access in nude mice which may be very difficult and time consuming. We first tried to implant a venous access device (Microport for Vascular Access, Braintree Scientific, Inc.) (Fig. 1).

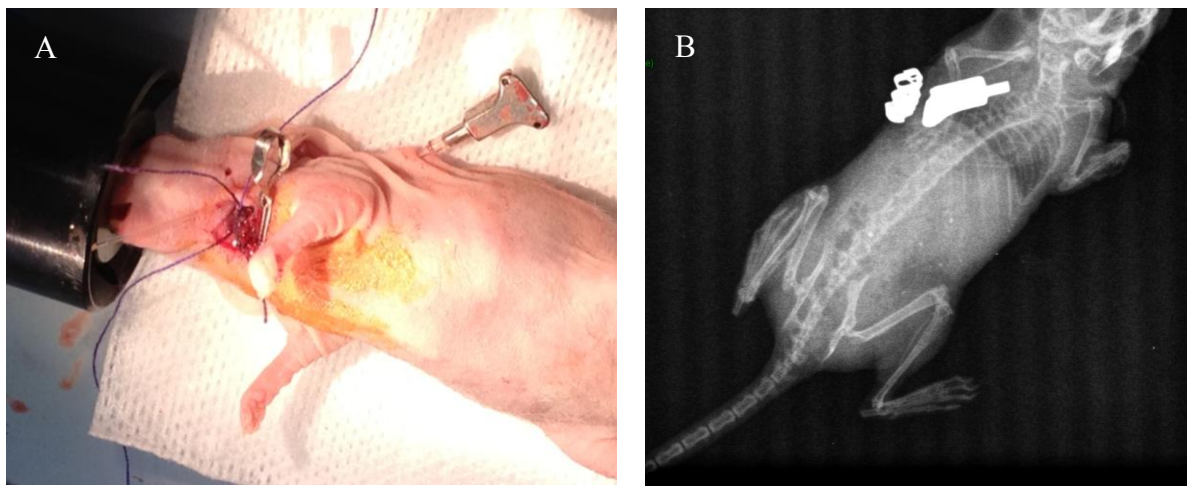


Figure 1. (A) Surgical implantation of the venous access device. (B) Post implantation control X-rays.

The time needed for implantation and the cost of the device (80€ each piece) led us to seek an alternative. We finally managed to catheterize mice tail with a 27 Gauges butterfly catheter (Harvard Apparatus®).

After that, we needed a programmable infusion pump to inject a small quantity of contrast at very low rate (about 0,5 mL/minute). The cost of commercially available devices led us to design a “home-made” micro-injector with Lego Technic® (Fig. 2, 3).



Figure 2. “Home-made” micro-injector. Four rates of injection are available (zoom on the gearbox).



Figure 3. Catheterization of mouse tail connected to the infusion pump.

Preliminary experiment: each mouse was anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). A 27 gauge butterfly catheter flushed with heparin and filled with Xenetix® 300 (Guerbet) was inserted into the tail vein and secured (fig. 3). The mouse was positioned within a clinical multi-slice CT scanner (Sensation 64, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) to contain the whole body of the mouse (fig 4.). A 0,2 bolus of contrast agent was infused intravenously at a rate of 0,5 mL/min using the” home-made micro-injector”, and CT images (80kV, 80 mAs, 3x2,4-mm slices) were acquired every second over a 60 seconds time frame (fig. 5).

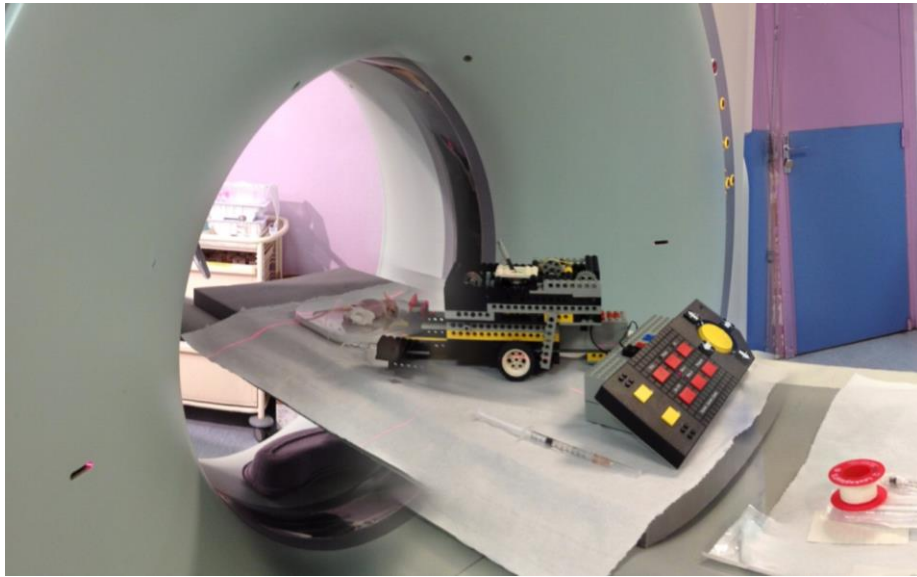


Figure 4. Positioning of the rodent in clinical CT-scan.

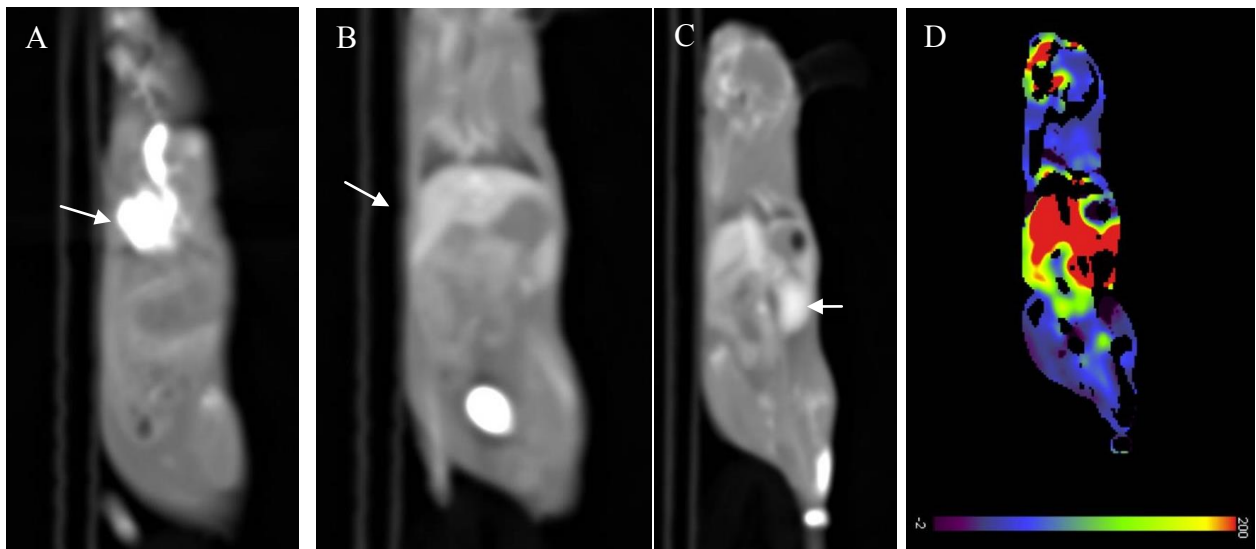


Figure 5. Dynamic contrast-enhanced CT images. **(A)** Early acquisition showing enhancement of heart (arrow) and superior vena cava. **(B)** Venous phase: enhancement of the liver (arrow). Contrast in the bladder is secondary to a previous injection. **(C)** Later phase: enhancement of left kidney (arrow). **(D)** Example of parametric map that could be obtained (body PCT®, Siemens healthcare).

Diagnostic, caractérisation et suivi de la carcinose péritonéale - apports de l'imagerie fonctionnelle

RÉSUMÉ

L'évaluation de la carcinose péritonéale (CP) reste difficile et peu standardisée. Nous avons évalué différentes techniques de suivi de la CP en imagerie fonctionnelle, afin de mieux comprendre l'évolution microcirculatoire de la maladie, la valeur des différents biomarqueurs disponibles et essayer de construire une méthodologie d'évaluation multiparamétrique fonctionnelle.

Le pseudomyxome péritonéale (PMP) est une tumeur rare du péritoine, au sein de laquelle l'angiogenèse tumorale semble jouer un rôle prépondérant. Nous avons établi un modèle murin orthotopique de PMP. Nous avons suivi la perfusion tumorale par échographie Doppler de l'artère mésentérique supérieure (AMS), et montré une accélération des flux au sein de l'AMS accompagnant le développement de la tumeur, ainsi qu'une diminution de ces flux chez les souris traitées par bévacizumab.

Puis, nous avons évalué la microcirculation au sein même de la tumeur. Nous avons ainsi pu montrer dans le modèle murin de PMP et dans un modèle de carcinose murine une bonne reproductibilité pour mesurer la valeur du coefficient apparent de diffusion dans la tumeur ainsi que les paramètres de microcirculation extraits par la méthode Intra-Voxel Incoherent Motion (IVIM) en utilisant une séquence d'imagerie par résonance magnétique (IRM) de type HASTE avec un équipement clinique standard à 1.5T. Nous avons ensuite appliqué la méthode IVIM pour le suivi de PMP de souris traitée par anti-angiogénique (sorafénib). Nous avons montré à 3 semaines de traitement, une diminution de la fraction de perfusion intra-tumorale ainsi qu'une diminution du coefficient de diffusion lié à la perfusion chez les souris traitées, sans différence significative de taille de la tumeur entre les souris traitées et non traitées.

L'application de ces méthodes d'imagerie fonctionnelle, combinées entre elles pourraient permettre de construire des modèles prédictifs et de suivi chez les patients atteints de PMP et de proposer des stratégies thérapeutiques personnalisées très précocement au cours de la maladie.