



HAL
open science

Caractérisation au moyen d'outils mathématiques des effets vasculaires du bevacizumab à des fins d'optimisation des protocoles thérapeutiques dans le cas des tumeurs cérébrales

Karima El Alaoui-Lasmali

► **To cite this version:**

Karima El Alaoui-Lasmali. Caractérisation au moyen d'outils mathématiques des effets vasculaires du bevacizumab à des fins d'optimisation des protocoles thérapeutiques dans le cas des tumeurs cérébrales. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0023 . tel-01753330

HAL Id: tel-01753330

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01753330>

Submitted on 4 Sep 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Caractérisation au moyen d'outils mathématiques des
effets vasculaires du bevacizumab à des fins
d'optimisation des protocoles thérapeutiques dans le cas
des tumeurs cérébrales

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 4 avril 2017

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lorraine

(mention : Sciences de la Vie et de la Santé)

par

Karima EL ALAOUI LASMAILI

Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	Andréas Bikfalvi, MD, PU Gilles Pagès, DR	INSERM U1029, Bordeaux INSERM U1081, UMR CNRS 7284, Nice
<i>Examineurs :</i>	Sébastien Benzekry, CR El-Hadi Djermoune, MCF Jacques Felblinger, PU-PH Nathalie Lassau, MD	INRIA, Equipe MONC, Bordeaux UMR CNRS 7039, CRAN, Nancy INSERM U947, IADI, Nancy UMR CNRS 8081, IGR, Paris
<i>Invité :</i>	François Plénat, PU-PH émérite	CHRU Brabois, Nancy
<i>Directrice de thèse :</i>	Béatrice Faivre, PU-PharmD	UMR CNRS 7039, CRAN, Nancy
<i>Co-directrice de thèse :</i>	Noémie Thomas, MCF	UMR CNRS 7039, CRAN, Nancy

Mis en page avec la classe thesul.

Remerciements

Et si c'était à refaire, est-ce que je referais une thèse ? Oui, parce que j'aime la recherche mais aussi parce que je vous ai rencontrés, vous, qui m'avez soutenue, encouragée et guidée tout au long de ce parcours, merci.

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs. Merci au Professeur Andréas Bikfalvi pour avoir accepté de juger mon travail et pour le temps que vous y avez consacré. Je remercie également le Docteur Gilles Pagès pour l'enthousiasme avec lequel vous avez suivi mes travaux suite à votre présence à mon comité de suivi de thèse, merci pour la pertinence de vos commentaires, pour vos encouragements et votre soutien.

Merci aux examinateurs qui ont accepté de faire partie de ce jury pluridisciplinaire. Merci au Professeur Jacques Felblinger d'avoir également participé à mon comité de suivi de thèse. Merci au Docteur Nathalie Lassau de me faire l'honneur de juger ce travail en apportant vos compétences cliniques. Merci au Docteur Sébastien Benzekry d'avoir accepté avec beaucoup d'enthousiasme de juger mon travail et en particulier les travaux interdisciplinaires qui en découlent. Merci au Docteur El-Hadi Djermoune d'avoir accepté de représenter la facette traitement de signal sur laquelle reposent mes travaux de thèse.

Je remercie chaleureusement le Professeur François Plénat que je suis ravie de compter parmi les membres de mon jury de thèse. Merci d'avoir consacré autant de temps à regarder des coupes histologiques avec moi et de m'avoir appris à les lire. Je vous remercie également d'avoir continué à travailler avec moi durant votre éméritat et d'avoir contribué à la relecture de certains chapitres de mon manuscrit.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Professeur Béatrice Faivre ainsi que ma co-encadrante de thèse, le Docteur Noémie Thomas pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et pour m'avoir aidé à le mener à terme. Noémie, tu m'as initiée au monde de la recherche, merci de m'avoir fait comprendre la place importante que tiennent la communication et le travail d'équipe dans la recherche. Béatrice, j'ai un profond respect pour vous et vous suis énormément reconnaissante pour la confiance et la bienveillance que vous avez à mon égard ; au-delà de votre implication continue dans mon travail, vous avez été là dans les meilleurs moments comme dans les moments les plus difficiles pour m'écouter, partager, discuter et rire, sans oublier de travailler, merci tout plein.

Je remercie El-Hadi Djermoune et Jean-Baptiste Tylcz sans qui ce travail n'aurait pas eu lieu de cette façon. Sans vous, je n'aurais eu que de belles images à présenter. Merci pour tout le travail de traitement de signal que vous avez effectué et pour votre disponibilité tout au long de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement Dominique Meng pour la délicatesse avec laquelle vous avez pris soin de mes petites souris et pour m'avoir transmis vos connaissances techniques en histologie et immunohistochimie. J'ai adoré travailler avec vous, discuter avec vous et profiter de petites pauses café au relais H.

Je tiens à remercier mes collègues de l'équipe BEAM avec qui j'ai pu passer de nombreux moments agréables. Je pense en particulier à Valérie, Flora, Meriem, Paul et Jean-Baptiste. Je

n'oublie pas de mentionner Typhaine que j'ai eu en stage et qui m'a aidé à finir une partie de mes expérimentations en immunohistochimie, merci d'avoir fait ces quelques comptages et montages d'images.

De toutes les rencontres que j'ai pu faire pendant ma thèse, j'ai surtout été marquée par Magali et Tiphaine, merci d'avoir été là et de m'avoir aidée à avancer au décours de nombreuses discussions scientifico-psycho-philo-socio-culturelles, merci pour votre ouverture d'esprit et votre capacité à rire de tout et même de nous.

Merci à tous mes collègues de la faculté de Pharmacie qui m'ont accueillie à bras ouverts, vous faites de cet endroit un lieu où il fait bon travailler et d'où je n'ai guère envie de partir. Géraldine, tu es un rayon de soleil, ma grande-soeur par procuration et de temps à autre ma psy, merci d'avoir joué tous ces rôles et avant tout merci d'avoir été une amie qui m'a réconfortée et encouragée. Je n'oublie surtout pas Isabelle, Nathalie, Pauline, Marine et Gabriel avec qui je suis toujours ravie de partager quelques instants. Julien, c'est un réel plaisir d'enseigner en TP d'hématologie à tes côtés, j'adore ta philosophie de l'enseignement et grâce à toi je ne peux plus voir un test de groupage sanguin raté sans penser au test de Rorschach. Emilie, quelle joie d'avoir pu te connaître davantage cette année, j'espère que nous pourrons continuer à enseigner et à travailler ensemble. Chantal, votre sourire communicatif et votre bonne humeur à toute épreuve m'ont beaucoup aidé à surmonter les petits stress du quotidien du doctorant.

Merci à celles que je n'oublierais pas et qui ne m'ont pas oubliée malgré l'intensité de travail que demande une thèse : Sofia, Céline, Leila, Fatima et Sandra.

A mon père, merci d'avoir toujours eu confiance en moi, d'avoir toujours été fier de moi et d'avoir soutenu tous mes choix. Même étant absent, tes enseignements ont jusqu'au aujourd'hui perduré dans le temps. Merci de m'avoir inculqué cette ouverture d'esprit et la capacité de remise en question dont tu as toujours fait preuve.

A toi, *Ludovico*, pour m'avoir accompagnée mélodieusement tout au long de la rédaction de ce manuscrit.

A toi, cher lecteur, chère lectrice, pour l'intérêt que tu portes à ce travail.

A **Toi**, simplement.

*"Le premier savoir est celui de l'ignorance,
c'est le début de l'intelligence"*
Socrate, V^e s. av. J.-C.

Sommaire

Table des figures	xi
Liste des tableaux	xv
Introduction et Objectifs	xvii

Partie I Etat de l'art

Chapitre 1 Les mécanismes de l'angiogenèse tumorale	1
1.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles des capillaires sanguins sains et tumoraux	2
1.1.1 Les cellules endothéliales	2
1.1.2 Les péricytes	3
1.1.3 La membrane basale	3
1.1.4 Caractéristiques particulières des capillaires sanguins tumoraux	4
1.2 Les principaux acteurs de l'angiogenèse	5
1.2.1 La famille des VEGF	6
1.2.2 La voie VEGF/VEGFR-1	7
1.2.3 La voie VEGF/VEGFR-2	8
1.2.4 Les autres facteurs pro-angiogènes	9
1.2.5 Les facteurs anti-angiogènes endogènes	10
1.3 Processus de l'angiogenèse par bourgeonnement	11
1.3.1 De la quiescence endothéliale à l'initiation de l'angiogenèse tumorale	11
1.3.2 Déstabilisation des vaisseaux sanguins sains et formation de vaisseaux sanguins tumoraux	12
1.4 Microenvironnement, angiogenèse et progression tumorale	15
1.4.1 La matrice extracellulaire	15
1.4.2 Les Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs	16
1.4.3 Les intégrines	16

1.4.4	Les plaquettes	16
1.4.5	Rôle de l'inflammation	17
1.4.6	Rôle du monoxyde d'azote	18
1.5	Rôle des vésicules extracellulaires dans l'angiogenèse tumorale	19
1.6	Réseau vasculaire lymphatique et progression tumorale	21
1.6.1	Acteurs de la lymphangiogenèse tumorale	21
1.6.2	Vaisseaux lymphatiques et progression tumorale	22
Chapitre 2 Les thérapies anti-angiogènes et leurs effets		25
2.1	Les agents anti-angiogènes et leurs utilisations	26
2.1.1	Les thérapies ayant des cibles extracellulaires	26
2.1.2	Les thérapies ayant des cibles intracellulaires	30
2.2	Effets indésirables liés à l'utilisation d'anti-angiogènes	32
2.3	Effets des thérapies anti-angiogènes sur le réseau vasculaire tumoral et sur la croissance tumorale	33
2.3.1	Effets de la thérapie anti-angiogène sur la structure du réseau vasculaire tumoral	35
2.3.2	Effets de la thérapie anti-angiogène sur la fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux	35
2.3.3	Effets de la thérapie anti-angiogène sur la croissance tumorale	38
2.3.4	Association des thérapies anti-angiogènes avec des thérapies conventionnelles	39
2.4	Les marqueurs de réponse aux thérapies anti-angiogènes : entre "normalisation" et résistance	41
2.4.1	Mise en évidence de marqueurs de réponse au moyen des méthodes d'imagerie	42
2.4.2	Les facteurs de croissance	42
2.4.3	Recrutement de cellules pour favoriser la croissance vasculaire et tumorale	43
2.4.4	Augmentation des capacités métastatiques	44
Chapitre 3 La thérapie photodynamique		45
3.1	Principe	45
3.2	Facteurs qui affectent l'efficacité de la PDT	46
3.2.1	Le photosensibilisateur et sa localisation	47
3.2.2	Les espèces réactives de l'oxygène	47
3.3	Effets vasculaires et cellulaires de la PDT	48

3.3.1	Impact sur les cellules tumorales	49
3.3.2	Impact sur la vascularisation	49
3.3.3	Impact sur l'inflammation et l'immunité	49
3.4	La thérapie photodynamique appliquée au cancer	50
3.4.1	Cancers concernés	50
3.4.2	La thérapie photodynamique en association à la thérapie anti-angiogène	51
 Chapitre 4 Modèles d'étude des mécanismes d'angiogenèse et du remodelage vasculaire		53
4.1	Les modèles <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	53
4.2	Les modèles <i>in vivo</i>	54
4.3	Les modèles mathématiques	56
4.3.1	Modélisation de l'angiogenèse tumorale	57
4.3.2	Modélisation de l'effet du traitement	60
 Matériels et Méthodes		63
		65
1	Introduction	65
2	Animaux et préparation des xénogreffes	66
2.1	Animaux	66
2.2	Anesthésie des animaux et prévention de la douleur	66
2.3	Préparation des xénogreffes à partir des cellules U87MG	66
2.4	Implantation des fragments tumoraux en chambre dorsale pour le suivi de la vascularisation	67
2.5	Implantation des fragments tumoraux en sous-cutané pour le suivi de la croissance tumorale	68
3	Expérimentations sur les souris portant des chambres dorsales	68
3.1	Observation du réseau vasculaire par microscopie intravitale en lumière transmise	69
3.2	Evaluation de la perméabilité vasculaire <i>in vivo</i> par microscopie intravitale	69
3.3	Evaluation de la perfusion vasculaire <i>ex vivo</i>	69
3.4	Etude du réseau vasculaire et du tissu tumoral <i>ex vivo</i> par histologie et immunohistochimie	70
4	Schémas thérapeutiques testés	72
4.1	Traitement anti-angiogène	72

4.2	Séquences d'association bevacizumab et thérapie photodynamique . . .	72
5	Profil d'expression des récepteurs au VEGF par les cellules U87	74
5.1	Extraction des protéines et dosage	74
5.2	Western blot	74
Partie II Résultats		77
Chapitre 1 Observations morphologiques du réseau vasculaire sain et tumoral par microscopie intravitale		81
1.1	Réseau vasculaire sain	81
1.2	Mise en place du réseau vasculaire tumoral	82
1.3	Cas des tumeurs non traitées	83
1.4	Cas des tumeurs traitées	85
1.4.1	Différents cas de figure d'évolution du réseau vasculaire sous l'effet du traitement	87
1.4.2	Effets du bevacizumab sur les vaisseaux en dehors de la tumeur	87
1.5	Discussion	87
Chapitre 2 Développement d'un algorithme de traitement d'images pour caractériser le réseau vasculaire		91
2.1	Cahier des charges - Présentation du projet	91
2.1.1	Contexte	91
2.1.2	Objectifs	92
2.1.3	Description des outils d'analyse du réseau vasculaire existants	92
2.2	Procédure de traitement des images	93
2.3	Procédure de validation et critères d'acceptation	96
2.4	Discussion	96
Chapitre 3 Identification de la période de "normalisation" vasculaire à l'aide de l'algorithme de traitement d'images		97
3.1	Caractérisation structurale et morphologique des vaisseaux	97
3.1.1	Choix de la zone d'intérêt à étudier	98
3.1.2	L'étude du ratio V/T est un indicateur de l'évolution de la vascularisation tumorale	99
3.1.3	Caractéristiques fines du réseau vasculaire tumoral associées à la "normalisation" vasculaire	101
3.2	Evaluation des effets du bevacizumab par analyse immunohistochimique . . .	104

3.3	Caractérisation de la fonctionnalité vasculaire	105
3.4	Discussion	106
Chapitre 4 Modulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse au cours du traitement		113
4.1	Les médiateurs de l'angiogenèse	113
4.1.1	VEGF et ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2	113
4.1.2	NO synthase endothéliale (eNOS)	116
4.1.3	Interleukine-8	116
4.2	Effet du bevacizumab sur l'autophagie	117
4.3	Bevacizumab et réseau vasculaire lymphatique	118
4.4	Discussion	118
Chapitre 5 Evaluation du bénéfice thérapeutique de la "normalisation" sur la thérapie photodynamique		121
5.1	Effets vasculaires de la PDT	121
5.2	Effets du bevacizumab et de la PDT sur la croissance tumorale	122
5.3	Séquences de traitement associant le bevacizumab et la PDT, effets sur la croissance tumorale	122
5.4	Effets respectifs du bevacizumab et de la PDT	124
5.5	Discussion	125
Chapitre 6 Modélisation de la réponse tumorale vasculaire au traitement		127
6.1	Introduction et objectifs du modèle	127
6.2	Modélisation de l'évolution du rapport V/T	127
6.3	Modélisation de l'évolution des paramètres vasculaires discriminants de la "normalisation"	130
6.4	Conclusions et perspectives	130
Discussion générale		131
Bibliographie		135
Annexes		157
Annexe A A new algorithm for a better characterization and timing of the anti-VEGF vascular effect named "normalization", Angiogenesis, 2016		157

Annexe B Data-driven modeling and characterization of anti-angiogenic molecule effects on tumoral vascular density, Biomedical Signal Processing and Control, 2015	173
---	------------

Table des figures

1	Développement tumoral avant et après l'activation du processus d'angiogenèse . . .	xvii
1	Comparaison de la structure des vaisseaux sanguins normaux et des vaisseaux sanguins tumoraux.	3
2	Comparaison du recouvrement en péricytes des vaisseaux sanguins normaux et des vaisseaux sanguins tumoraux.	4
3	Composition et origine des vaisseaux sanguins tumoraux	5
4	La famille des VEGFs et leurs récepteurs	6
5	Variants d'épissage du VEGF	7
6	Voies de signalisation activées par la liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-2 et à ses co-récepteurs	8
7	Libération graduelle des facteurs pro-angiogènes au cours du développement tumoral	9
8	Mécanismes moléculaires de la quiescence endothéliale	11
9	Rôle du facteur HIF-1 α dans la stimulation de l'angiogenèse	12
10	Processus de l'angiogenèse tumorale	13
11	Importance du microenvironnement tumoral dans l'angiogenèse	15
12	Mécanismes d'action du monoxyde d'azote impliqués dans la progression et la régression tumorale	19
13	Facteurs, récepteurs et acides nucléiques transportés par les vésicules extracellulaires tumorales (TEVs) et ayant un rôle dans l'angiogenèse	20
14	Comparaison de la structure d'un vaisseau lymphatique et d'un capillaire sanguin	21
15	Microenvironnement tumoral et lymphangiogenèse	22
16	Principales thérapies anti-angiogènes commercialisées et leurs cibles dans la signalisation de l'angiogenèse	26
17	Effets indésirables provoqués par le blocage de la voie VEGF/VEGFR-2.	32
18	Différents effets pouvant être causés par les thérapies anti-angiogènes sur le réseau vasculaire tumoral	34
19	Diagramme de Jablonski montrant les états d'excitations du photosensibilisateur sous l'effet de la lumière	46
20	Effets vasculaires et cellulaires de la PDT	48
21	Effets de la PDT sur l'inflammation	50
22	Effets de la PDT sur l'immunité anti-tumorale	51
23	Méthodes pour observer le réseau vasculaire <i>in vivo</i> à l'aide de fenêtres intravitales	55
24	Automate cellulaire conçu sur la base d'un réseau vasculaire observé en chambre dorsale	57

25	Simulation de la croissance vasculaire	58
26	Modélisation 3D de la vascularisation saine et tumorale	59
27	Dimension fractale mesurée en fonction de la complexité d'un objet	60
28	Réseau vasculaire sain et tumoral	60
1	Schéma simplifié du protocole de préparation des xénogreffes de glioblastome et leur utilisation	65
2	Souris avec chambre dorsale après chirurgie	67
3	Expérimentations réalisées sur le réseau vasculaire tumoral	68
4	Séquences de traitement faisant intervenir l'association bevacizumab et PDT pour des tumeurs implantées en sous-cutané dans le pli inguinal	72
1	Observation du réseau vasculaire sain en chambre dorsale par microscopie intravitale	82
2	Mise en place du réseau vasculaire tumoral	83
3	Evolution du réseau vasculaire d'une tumeur non traitée en microscopie intravitale	84
4	Observation du réseau vasculaire tumoral	85
5	Evolution du réseau vasculaire d'une tumeur traitée en microscopie intravitale . .	86
6	Observation de vaisseaux sanguins d'une tumeur traitée avec et sans agent de contraste	87
7	Exemples d'évolution du réseau vasculaire tumoral sous l'effet du traitement par bevacizumab	88
8	Modification du réseau vasculaire sain autour de la tumeur lors du traitement anti-angiogène	88
9	Déroulement de l'analyse du réseau vasculaire avec Angiosys	92
10	Exemple de résultat obtenu après analyse du réseau vasculaire avec Wimasis	93
11	Application des filtres de Savitzky-Golay	94
12	Exemple de résultat obtenu après application des filtres de Savitzky-Golay sur une image de tumeur	94
13	Etapes d'analyse du réseau vasculaire tumoral avec l'algorithme	95
14	Evaluation de la qualité de squelettisation du réseau vasculaire	96
15	Choix de la zone d'intérêt du réseau vasculaire à étudier	98
16	Evolution et quantification du réseau vasculaire et de la croissance tumorale . . .	100
17	Quantification des embranchements et comparaison au réseau vasculaire sain . . .	101
18	Quantification de la longueur vasculaire comparaison au réseau vasculaire sain . .	102
19	Quantification des bourgeons vasculaires et comparaison au réseau vasculaire sain	102
20	Analyse immunohistochimique du réseau vasculaire tumoral au cours du traitement par bevacizumab et comparaison au réseau vasculaire sain	105
21	Réponse vasculaire et tissulaire au traitement par bevacizumab	107
22	Schéma simplifié des voies de signalisation étudiées	114
23	Expression du VEGF au sein des tumeurs sans traitement au cours du traitement par bevacizumab	115
24	Expression des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et du co-récepteur NRP-1 dans les cellules U87	115
25	Expression de la NO synthase endothéliale sans traitement et au cours du traitement par bevacizumab	116

26	Expression de l'interleukine-8 sans traitement et au cours du traitement par bevacizumab	117
27	Expression d'un marqueur de l'autophagie (Bnip3l) sans traitement et au cours du traitement par bevacizumab	117
28	Vaisseaux lymphatiques au cours du traitement par bevacizumab	118
29	Observation des effets vasculaires de la PDT <i>in vivo</i>	122
30	Effets d'une monothérapie de bevacizumab ou de la PDT sur la croissance tumorale	123
31	Effets de l'association du bevacizumab et de la PDT sur la croissance tumorale .	123
32	Survie des animaux ayant été traités par le bevacizumab et la PDT	124
33	Coloration d'un ganglion lymphatique au bleu de Toluidine montrant la présence de mastocytes	125
34	Représentation schématique simplifiée du modèle mathématique boîte noire . . .	128
35	Structure du modèle	129
36	Données expérimentales et simulées de l'évolution du rapport V/T pour les tumeurs contrôles et traitées	129
37	Schéma récapitulatif de ce travail de thèse	134

Liste des tableaux

1	Principaux facteurs pro- et anti-angiogènes	5
2	Facteurs pro- et anti-angiogènes contenus dans les granules de sécrétion des plaquettes	17
3	Cibles moléculaires et indications thérapeutiques des principales thérapies anti-angiogènes commercialisées	27
4	Etudes cliniques ayant mené à l'autorisation de mise sur le marché du bevacizumab	28
5	Etudes cliniques ayant mené à l'autorisation de mise sur le marché du ramucirumab	29
6	Essais cliniques conduits avec l'aflibercept	30
7	Etudes cliniques ayant mené à l'autorisation de mise sur le marché des MKI . . .	31
8	Modification de la morphologie et de la fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral traité avec des doses uniques de thérapie anti-angiogène dans les études précliniques	36
9	Modification de la morphologie et de la fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral traité avec des doses multiples de thérapie anti-angiogène dans les études précliniques	37
10	Protocoles d'association des thérapies anti-angiogènes avec radiothérapie, des agents de chimiothérapie ou des thérapies ciblées en préclinique	40
11	Effets cytotoxiques et cytoprotecteur du monoxyde d'azote	48
12	Applications cliniques approuvées de la PDT dans le cancer	51
13	Exemples de modèles d'étude de l'angiogenèse <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	54
14	Méthodes d'imagerie couramment utilisées pour étudier l'angiogenèse <i>in vivo</i> et en clinique	56
1	Anticorps primaires utilisés pour l'étude du réseau vasculaire et du tissu tumoral	71
1	Corrélations entre les paramètres vasculaires quantifiés dans les réseaux vasculaires sains et de tumeurs traitées.	103
2	Quantification du nombre de vaisseaux sanguins sur des coupes immunohistochimiques de tumeurs et comparaison aux réseaux vasculaires sains.	104

Introduction et Objectifs

La croissance tumorale requiert la création d'un réseau vasculaire *via* le processus d'angiogénèse. Sans ce réseau, les tumeurs ne se développent pas au-delà d'une taille de 1 à 2 mm de diamètre et se nourrissent en oxygène et en nutriments par diffusion. La sécrétion en continu de facteurs pro-angiogènes par les cellules tumorales en souffrance impose une angiogénèse et un remodelage vasculaire permanents ne permettant pas d'aboutir à un réseau vasculaire stable et fonctionnel en tout point du tissu tumoral. Cela ne représente cependant pas un frein à la croissance tumorale mais réduit l'efficacité des chimiothérapies et thérapies par rayonnement pour lesquelles le réseau vasculaire joue un rôle primordial dans la distribution des agents de chimiothérapie et dans l'oxygénation tissulaire.

Les recherches menées par Judah Folkman au début des années 1970 ont montré que la stimulation de l'angiogénèse passe par la libération par les cellules tumorales de facteurs spécifiques, qu'il avait nommés *Tumor-Angiogenesis Factor* (TAF) et se présente comme un déclencheur de la progression tumorale (Figure 1). Ainsi, Judah Folkman proposait pour la première fois d'inhiber les mécanismes d'angiogénèse de façon à prévenir la formation de vaisseaux sanguins tumoraux et ainsi empêcher la croissance des tumeurs nouvellement formées [1, 2].

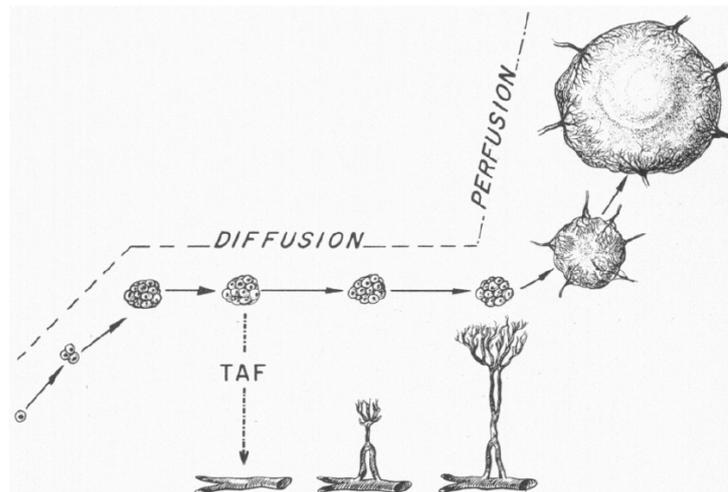


FIGURE 1 – Développement tumoral avant et après l'activation du processus d'angiogénèse. Tiré de [1]

La découverte du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [3], de son rôle pro-angiogène [4] et de l'effet anti-tumoral de son inhibition [5] ont promu le développement des thérapies anti-angiogènes. Le premier agent anti-angiogène produit a été le bevacizumab (anti-VEGF, Avastin),

administré en association à la chimiothérapie dans l'objectif de supprimer l'irrigation vasculaire tumorale pour asphyxier la tumeur et aboutir à son éradication. Cependant, les résultats mitigés et moins concluants que prévu ont remis en question les mécanismes de fonctionnement de ces thérapies et leur réelle efficacité clinique.

En 2001, Rakesh Jain propose que le réseau vasculaire tumoral serait amélioré temporairement sous l'effet de la thérapie anti-angiogène, phénomène qu'il qualifie de "normalisation" vasculaire. Cela représente un changement de paradigme dans la façon de concevoir la thérapie anti-angiogène qui servirait non plus à détruire le réseau vasculaire pour asphyxier la tumeur mais à accroître l'efficacité de la chimiothérapie et des thérapies par rayonnements.

Afin d'utiliser les thérapies anti-angiogènes à bon escient, il est indispensable d'élucider les mécanismes de la "normalisation", d'identifier la posologie permettant d'aboutir à ce phénomène et de savoir quand il apparaît et pendant combien de temps il persiste.

L'absence de consensus dans la littérature quant à la "normalisation" nous mène aux objectifs de ces travaux de thèse qui sont dans un premier temps de mettre en évidence la période de "normalisation" vasculaire sous l'effet du bevacizumab. Pour cela, le réseau vasculaire de tumeurs greffées dans des chambres dorsales portées par des souris *nude* sera étudié sur les plans morphologique et fonctionnel à l'aide d'outils biologiques et mathématiques. Ainsi des paramètres discriminants de l'état de "normalisation vasculaire" pourront être identifiés par comparaison à un réseau vasculaire sain.

Dans un second temps, le bénéfice thérapeutique apporté par la "normalisation" vasculaire sera évalué sur la croissance tumorale en associant le bevacizumab et la thérapie photodynamique. Cette dernière repose sur l'efficacité cytotoxique en présence d'oxygène, d'un agent photosensibilisant injecté par voie systémique et dont la distribution au sein de la tumeur dépend de la vascularisation tumorale.

Enfin, les données vasculaires acquises au cours de ces travaux serviront à l'élaboration d'un modèle mathématique de croissance vasculaire prenant en compte ou non l'effet du traitement, dans un objectif de prédiction précoce de la réponse au traitement.

Ce manuscrit est organisé en trois parties.

La première partie est un état de l'art présentant tout d'abord les mécanismes de l'angiogenèse tumorale. Puis les thérapies anti-angiogènes, leurs mécanismes d'actions ainsi que leurs effets sur la vascularisation et la croissance tumorale sont présentés. Un chapitre est ensuite dédié à la thérapie photodynamique, à la description de ses effets vasculaires et tumoraux et à son application clinique dans le cadre du traitement des cancers. Enfin, un dernier chapitre expose brièvement des moyens d'étudier l'angiogenèse tumorale au travers de différents types de modèles.

La seconde partie est consacrée à la présentation des méthodes mises en oeuvre pour mener à bien les expérimentations présentées dans ce travail.

La troisième partie présente les résultats expérimentaux acquis au cours de ce travail.

Première partie

Etat de l'art

Chapitre 1

Les mécanismes de l'angiogenèse tumorale

Sommaire

1.1	Caractéristiques structurales et fonctionnelles des capillaires sanguins sains et tumoraux	2
1.1.1	Les cellules endothéliales	2
1.1.2	Les péricytes	3
1.1.3	La membrane basale	3
1.1.4	Caractéristiques particulières des capillaires sanguins tumoraux . .	4
1.2	Les principaux acteurs de l'angiogenèse	5
1.2.1	La famille des VEGF	6
1.2.2	La voie VEGF/VEGFR-1	7
1.2.3	La voie VEGF/VEGFR-2	8
1.2.4	Les autres facteurs pro-angiogènes	9
1.2.5	Les facteurs anti-angiogènes endogènes	10
1.3	Processus de l'angiogenèse par bourgeonnement	11
1.3.1	De la quiescence endothéliale à l'initiation de l'angiogenèse tumorale	11
1.3.2	Déstabilisation des vaisseaux sanguins sains et formation de vaisseaux sanguins tumoraux	12
1.4	Microenvironnement, angiogenèse et progression tumorale . . .	15
1.4.1	La matrice extracellulaire	15
1.4.2	Les Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs	16
1.4.3	Les intégrines	16
1.4.4	Les plaquettes	16
1.4.5	Rôle de l'inflammation	17
1.4.6	Rôle du monoxyde d'azote	18
1.5	Rôle des vésicules extracellulaires dans l'angiogenèse tumorale	19
1.6	Réseau vasculaire lymphatique et progression tumorale	21
1.6.1	Acteurs de la lymphangiogenèse tumorale	21
1.6.2	Vaisseaux lymphatiques et progression tumorale	22

L'organisme nécessite un transport efficace des gaz du sang, des nutriments, des molécules de signalisation et des cellules entre les différents tissus et/ou les différents organes. Ces fonctions sont assurées par les réseaux vasculaires sanguin et lymphatique créés lors du processus

de vasculogenèse au cours de l'embryogenèse et remaniées par les processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse jusqu'à l'âge adulte. Ces processus sont par la suite réactivés lors de phénomènes physiologiques (cicatrisation, cycles menstruels...) et pathologiques (néovascularisation post-ischémique, pathologies oculaires, cancer...). Au cours du développement tumoral, les cellules tumorales et stromales produisent et libèrent des facteurs permettant la mise en place d'un réseau vasculaire *via* le processus d'angiogenèse devenu pathologique. Il se crée ainsi un réseau vasculaire tumoral dont les propriétés structurales et fonctionnelles ne sont plus optimales.

1.1 Caractéristiques structurales et fonctionnelles des capillaires sanguins sains et tumoraux

Les capillaires sanguins sont constitués d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale et entourées de cellules accompagnatrices aux fonctions contractiles, les péricytes. Ces derniers permettent entre autres de réguler le débit sanguin et de maintenir la structure du capillaire. La structure et l'organisation de ces composants sont critiques pour la fonction des capillaires sanguins. Dans un contexte physiologique sain, les vaisseaux sanguins sont stables, c'est-à-dire que les cellules endothéliales qui les composent sont dans un état de quiescence. Elles ne sortent de cet état qu'en cas de renouvellement (*turnover* de 1000 jours) ou si un signal pro-angiogène est émis à proximité. Le réseau vasculaire tumoral diffère du réseau vasculaire sain sur les plans structuraux, morphologiques et fonctionnels [6, 7, 8].

Dans une tumeur solide, le réseau vasculaire présent n'est pas aussi efficace que dans un contexte physiologique. Cela peut s'expliquer d'abord en observant les différences de structures entre ces deux types de réseaux (Figure 1). Les vaisseaux sanguins tumoraux sont aberrants, non stabilisés, perméables et tortueux. L'architecture artériole-capillaire-veinule n'est pas retrouvée dans le réseau vasculaire tumoral et le flux sanguin n'est pas orienté. Les cellules endothéliales ne forment pas une monocouche de cellules jointives et la membrane basale n'est pas continue et présente des différences d'épaisseur le long des capillaires. Les péricytes sont en surnombre ou insuffisants et anormalement liés aux cellules endothéliales (Figure 2). Les fenestrations endothéliales tumorales réduisent considérablement l'efficacité de la barrière endothéliale tumorale. Par conséquent, les échanges entre le compartiment sanguin et tissulaire sont compromis. Des fuites vasculaires vers les tissus augmentent la pression interstitielle dans le tissu tumoral, et inversement, des cellules tumorales vont pouvoir passer dans la circulation sanguine et participer à la dissémination tumorale et à la formation de métastases [7, 9, 10, 11, 12].

1.1.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales normales sont en quiescence dans un vaisseau sain et stable. Elles présentent un phénotype antithrombotique, anti-inflammatoire et vasodilatateur. Ce phénotype peut être altéré lors de contraintes mécaniques (forces de cisaillement modifiées, flux sanguin...) [14].

Des études ont montré que les cellules endothéliales tumorales ont un phénotype particulier et différent de cellules endothéliales normales. Elles sont plus sensibles aux facteurs de croissance et peuvent stimuler leur prolifération et migration de façon autocrine *via* la libération de VEGF. Les cellules endothéliales tumorales présentent un phénotype différent selon le type de tumeur ou selon leur localisation. Lorsqu'elles sont issues de tumeurs métastatiques, ces cellules ont un potentiel invasif et migratoire plus important [11]. Les cellules endothéliales tumorales sont peu

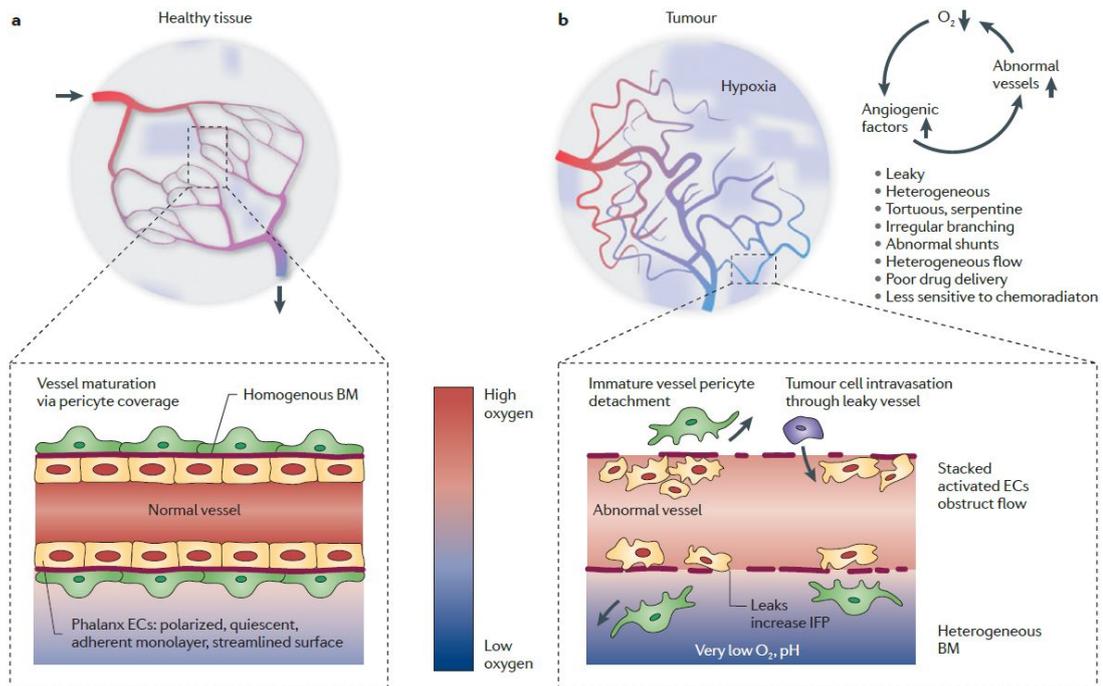


FIGURE 1 – Comparaison de la structure des vaisseaux sanguins normaux et des vaisseaux sanguins tumoraux. (A) Dans les tissus sains, un réseau vasculaire normal est présent où les cellules endothéliales quiescentes sont recouvertes de péricytes nécessaires à la stabilisation du vaisseau. (B) Dans le réseau vasculaire tumoral, les cellules endothéliales sont constamment activées et les vaisseaux ne sont presque pas recouverts par les péricytes. Le réseau vasculaire est tortueux et irrégulier et laisse apparaître des zones d’hypoxie au sein de la tumeur qui sont en partie responsables de la stimulation accrue de l’angiogenèse. Tiré de [13]

jointives laissant un espace pouvant représenter une porte de sortie pour les cellules tumorales et faciliter la formation de métastases [7].

1.1.2 Les péricytes

Les péricytes sont des cellules dites accessoires ou d’accompagnement ayant une fonction contractile. Ils entourent les capillaires et permettent de maintenir la fonction des cellules endothéliales et réguler le débit sanguin. Eberhard *et al.* ont montré que dans les tumeurs du sein ou du côlon, le recrutement des péricytes était plus important que dans des gliomes ou des tumeurs du rein. Les péricytes interagissent mal avec les cellules endothéliales car la voie de signalisation du PDGFR- β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*) nécessaire à leur recrutement est souvent altérée dans les tumeurs. Si le PDGF-B est faiblement exprimé, le recouvrement endothélial par les péricytes est faible et les jonctions entre les cellules endothéliales sont faibles [15, 16].

1.1.3 La membrane basale

La membrane basale est une matrice extracellulaire particulière sur laquelle reposent les cellules endothéliales et les péricytes. Elle est composée de protéines, glycoprotéines et protéoglycannes dont le collagène IV, la laminine, le nidogène, la fibronectine et les protéoglycannes à héparane sulfate. Tous ces composés sont produits par les cellules endothéliales et par les

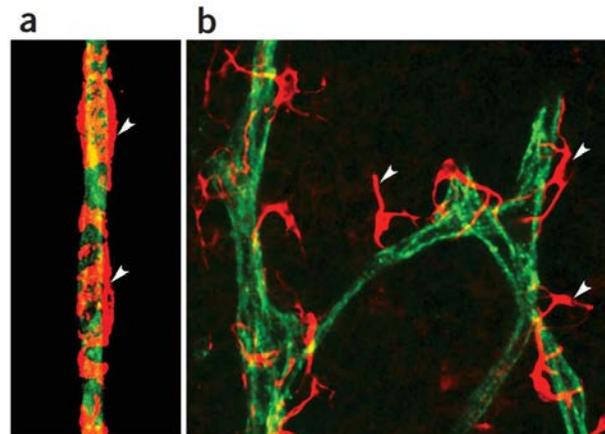


FIGURE 2 – Comparaison du recouvrement en péricytes des vaisseaux sanguins normaux (A) et des vaisseaux sanguins tumoraux (B) par imagerie confocale. Les cellules endothéliales sont marquées par CD31 (vert) et les péricytes par α -SMA (rouge). Tiré de [17]

péricytes. En étudiant ces différents composants, Baluk *et al.* ont montré que les fenestrations endothéliales et l'absence de membrane basale étaient liées. Lorsque l'attachement des péricytes aux cellules endothéliales était défectueux, c'était également le cas pour la membrane basale [18].

La membrane basale des cellules endothéliales et des péricytes a une épaisseur anormale dans les tumeurs. De nombreux facteurs pro- et anti-angiogènes sont enfermés dans la membrane basale physiologique, ce qui en fait un participant actif et régulateur de l'angiogenèse. Le contact des cellules endothéliales avec la membrane basale permet de maintenir les cellules endothéliales en état de quiescence *via* des domaines cryptiques anti-angiogènes des collagènes composant cette membrane basale [7, 16, 19].

1.1.4 Caractéristiques particulières des capillaires sanguins tumoraux

Le fait que le réseau vasculaire tumoral soit aberrant peut conférer à la tumeur une capacité de résistance aux chimiothérapies et radiothérapies. En effet, la pression interstitielle et le taux d'oxygénation tumorale ne favorisent pas la délivrance optimale des agents de chimiothérapie dans la tumeur ni l'efficacité maximale de la radiothérapie [13].

Certaines études suggèrent que les capillaires sanguins tumoraux ne seraient pas uniquement formés de la division de cellules endothéliales issues du capillaire d'origine mais que certaines des cellules endothéliales pourraient avoir une origine différente (Figure 3).

Les tumeurs ont la capacité de recruter à distance des progéniteurs endothéliaux issus de la moelle osseuse en libérant des cytokines telles que le VEGF, le PlGF (*Placental-Derived Growth Factor*) ou SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor-1*). Ce sont des cellules souches hématopoïétiques immatures qui, par le processus de vasculogénèse, participeraient à la néo-vascularisation tumorale [20, 7].

Il a également été proposé que les cellules souches tumorales pouvaient exhiber un phénotype endothélial et ainsi participer à la formation de la paroi endothéliale, phénomène appelé *vascular mimicry*, d'avantage décrit dans les processus de néovascularisation des glioblastomes ([21]. De plus, ces cellules souches tumorales pourraient également se différencier en cellules musculaires lisses et contribuer à la formation de cellules d'accompagnement tels que les péricytes [20].

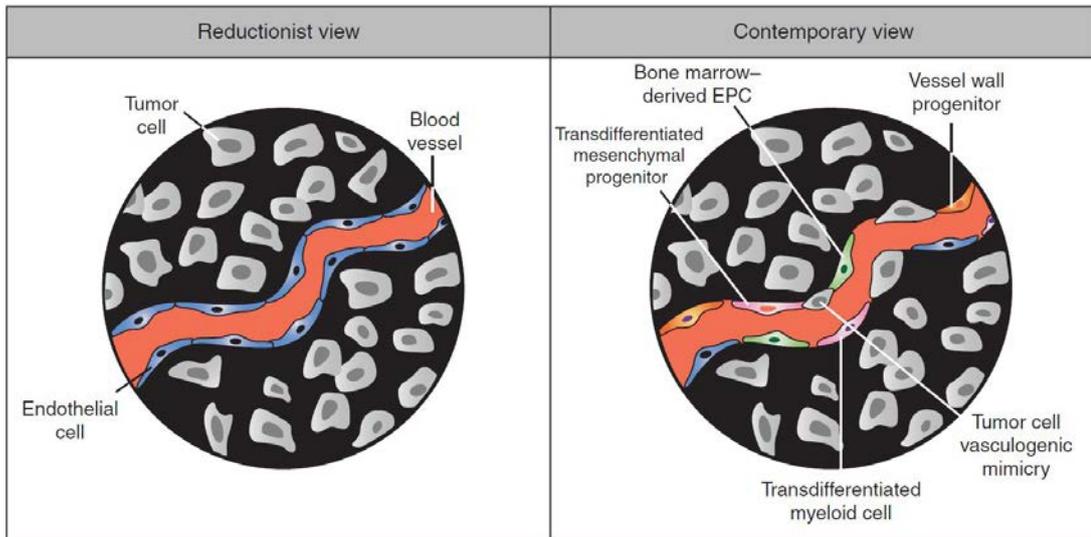


FIGURE 3 – Composition et origine des vaisseaux sanguins tumoraux. Dans une approche simple de l'angiogénèse tumorale, l'endothélium vasculaire n'est formé que de la division des cellules endothéliales. Dans une approche plus moderne, les cellules composant l'endothélium vasculaire auraient des origines variées (précurseurs endothéliaux (EPC), cellules myéloïdes, cellules mésoenchymateuses, cellules tumorales). Tiré de [7]

1.2 Les principaux acteurs de l'angiogénèse

Malgré leurs propriétés néoplasiques, les cellules tumorales ne peuvent pas former une tumeur de taille importante sans l'aide d'un réseau vasculaire. Le processus d'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà établis. Que ce soit dans un contexte physiologique ou tumoral, le processus d'angiogénèse nécessite plusieurs types cellulaires et de nombreux facteurs de croissance qui régulent ce processus. Cela met en jeu des moyens de communications entre cellules tumorales et cellules endothéliales que j'aborderai dans ce chapitre.

Le processus d'angiogénèse est régulé par une juste balance entre les facteurs pro-angiogènes et anti-angiogènes dont les principaux sont résumés dans le tableau 1 [11].

TABLE 1 – Principaux facteurs pro- et anti-angiogènes. D'après [11, 22]

Facteurs pro-angiogènes	Facteurs anti-angiogènes
VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	Angiostatine
Angiopoïétines	Endostatine
FGF (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)	Thrombospondine
PDGF (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)	Tumstatine
PlGF (<i>Placental Growth Factor</i>)	Arresten
TGF- β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)	Canstatine
EGF (<i>Epidermal Growth Factor</i>)	Endorepelline
HGF (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)	Vasoinhibine
Interleukine-8	VEGF-A _{xxx} b
FT (Facteur Tissulaire)	CXCL4
Apeline	

1.2.1 La famille des VEGF

La famille des VEGF comprend cinq membres : VEGF-A, -B, -C, -D et le PlGF. Les VEGF sont produits par les cellules endothéliales, les cellules tumorales mais également par les cellules du microenvironnement tumoral tels que les fibroblastes ou les cellules inflammatoires.

Les différentes isoformes du VEGF peuvent interagir avec les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 ainsi qu'avec les neuropilines-1 et -2 (NRP-1 et NRP-2) qui sont leurs co-récepteurs (Figure 4). En général, lorsque le terme VEGF est utilisé, c'est pour qualifier le VEGF-A qui joue un rôle prédominant dans l'angiogenèse.

Les facteurs PlGF et VEGF-B se fixent au récepteur VEGFR-1 et ont des rôles différents. Par exemple, VEGF-B permet de réguler la vascularisation post-ischémique dans le myocarde. La liaison du PlGF à VEGFR-1 permet de réguler le recrutement des cellules inflammatoires et participe ainsi à l'angiogenèse associée à l'inflammation [23]. Le PlGF est aussi impliqué dans la croissance vasculaire et dans la maturation des vaisseaux sanguins en recrutant des cellules progénitrices (*Bone Marrow-derived Progenitors, BMP*)

Les facteurs VEGF-C et VEGF-D ont une plus grande affinité pour VEGFR-3 présent à la surface des cellules endothéliales lymphatiques et sont donc impliqués dans la lymphangiogenèse (voir section 1.6) [24, 25, 26, 27].

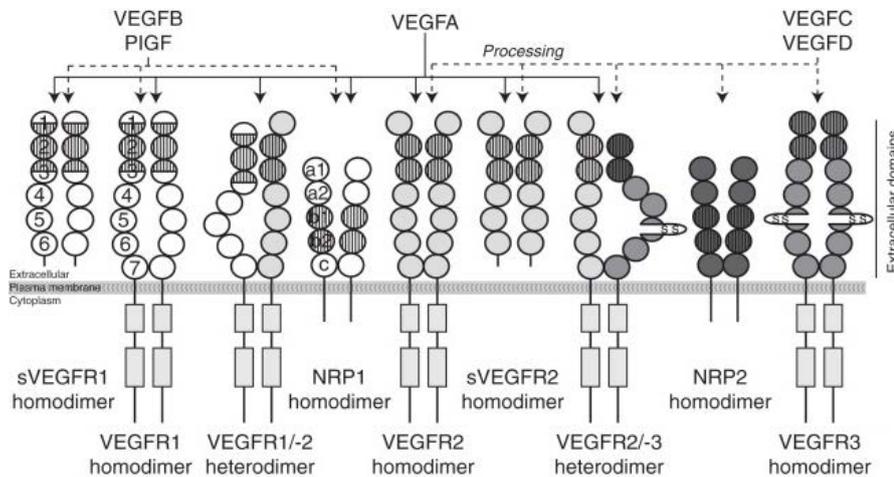


FIGURE 4 – La famille des VEGFs et leurs récepteurs. La liaison des VEGFs avec leurs récepteurs et co-récepteurs initie l' homo- ou hétérodimérisation des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. La protéolyse partielle de VEGF-C et VEGF-D permet leur liaison avec VEGFR-2. Les parties hachurées représentent les domaines nécessaires à la fixation des VEGFs. Tiré de [28]

L'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *vegf* donne lieu à plusieurs variants d'épissage identifiés par leur nombre total d'acides aminés (Figure 5). Les isoformes du VEGF- A_{xxx} sont pro-angiogènes et les plus décrites sont VEGF- A_{121} , VEGF- A_{165} , VEGF- A_{189} et VEGF- A_{206} [26, 29]. Les isoformes identifiées par VEGF- $A_{xxx}b$ ont un rôle anti-angiogène.

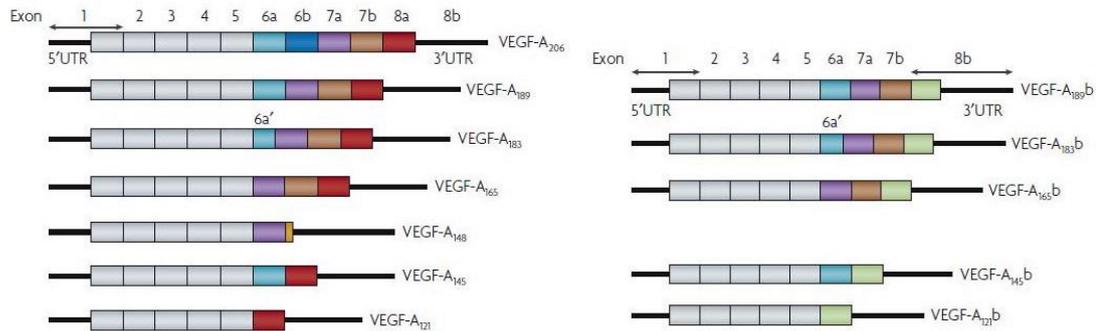


FIGURE 5 – Variants d'épissage du VEGF. Séquences d'ARN messager du gène codant pour VEGF-A présentant les possibilités d'épissage alternatif pour former des isoformes pro-angiogènes (VEGF-A_{xxx}, à gauche) et anti-angiogènes (VEGF-A_{xxx}.b, à droite). Tiré de [29]

Les différentes isoformes pro-angiogènes du VEGF-A ont des effets différents sur l'angiogénèse. Les formes se fixant à NRP-1 et l'héparane-sulfate (VEGF-A₁₆₅ et VEGF-A₁₈₉) induisent la formation d'un réseau vasculaire ramifié avec des vaisseaux sanguins de petit calibre. En revanche l'isoforme VEGF-A₁₂₁ induit la formation d'un réseau vasculaire peu ramifié avec des vaisseaux tortueux et perméables [30].

L'épissage alternatif du VEGF-A_{xxx} donne également lieu à une forme décrite comme ayant des propriétés anti-angiogène, le VEGF-A_{xxx}.b. Sa fonction d'anti-angiogène est due d'une part à l'impossibilité de VEGF-A₁₆₅.b de se lier à NRP-1 en raison de l'absence du site de fixation, et d'autre part à une faible phosphorylation du récepteur VEGFR-2 lorsqu'il s'y fixe en raison d'une conformation différente de celle de VEGF-A₁₆₅.

Dans les cellules endothéliales, VEGF-A₁₆₅.b inhibe certaines des réponses induites par son homologue pro-angiogène telles que la prolifération ou la migration endothéliale induites par VEGF-A₁₆₅a et permet ainsi d'inhiber l'angiogénèse pathologique et de retarder la croissance tumorale dans des modèles tumoraux ayant été transfectés avec VEGF-A₁₆₅.b.

Dans les tissus sains, l'isoforme anti-angiogène représente plus de la moitié du VEGF-A_{xxx} total synthétisé mais cette proportion est plus variable dans les tumeurs. Le VEGF-A₁₆₅.b aurait également un rôle cytoprotecteur vis-à-vis des cellules non endothéliales telles que les cellules épithéliales [29].

Récemment, une nouvelle forme anti-angiogène du VEGF-A a été décrite, le VEGF-Ax qui aurait les mêmes activités anti-angiogènes que le VEGF-A₁₆₅.b [31, 32].

1.2.2 La voie VEGF/VEGFR-1

Le récepteur VEGFR-1 (*Fms-like tyrosine kinase receptor-1*, *Flt-1*) est exprimé par différents types cellulaires (cellules endothéliales, cellules tumorales, monocytes, macrophages...) et est activé par la fixation de ses ligands, VEGF-A, VEGF-B et PlGF. Il existe deux formes du récepteur VEGFR-1, une forme transmembranaire et une forme soluble, sVEGFR-1.

Dans les cellules endothéliales, VEGFR-1 est impliqué dans la régulation du processus d'angiogénèse. La liaison du VEGF-A à VEGFR-1 permet de réguler l'initiation de l'angiogénèse *via* VEGFR-2 car VEGFR-1 régule négativement la signalisation VEGF-A/VEGFR-2 [33].

La forme soluble de ce récepteur, sVEGFR-1, permet de séquestrer le VEGF et ainsi de réduire

la quantité de VEGF-A disponible pour stimuler l'angiogenèse *via* VEGFR-2 [23]. VEGFR-1 permet de guider localement la formation du bourgeon endothélial [34] et contribue à la formation d'un réseau vasculaire stable en maintenant l'intégrité vasculaire et en empêchant le bourgeonnement endothélial excessif [35].

1.2.3 La voie VEGF/VEGFR-2

La liaison du VEGF-A à son récepteur VEGFR-2 (*kinase insert domain containing receptor*, *KDR*) à la surface des cellules endothéliales, induit l'activation de voies de signalisation permettant aux cellules endothéliales de sortir de leur état de quiescence pour se diviser et migrer afin de former des néovaisseaux. C'est la principale voie de stimulation de l'angiogenèse. En effet, les voies de signalisation passant par VEGFR-2 sont impliquées dans la prolifération, la survie, la migration cellulaire et la perméabilité vasculaire *via* la libération de monoxyde d'azote.

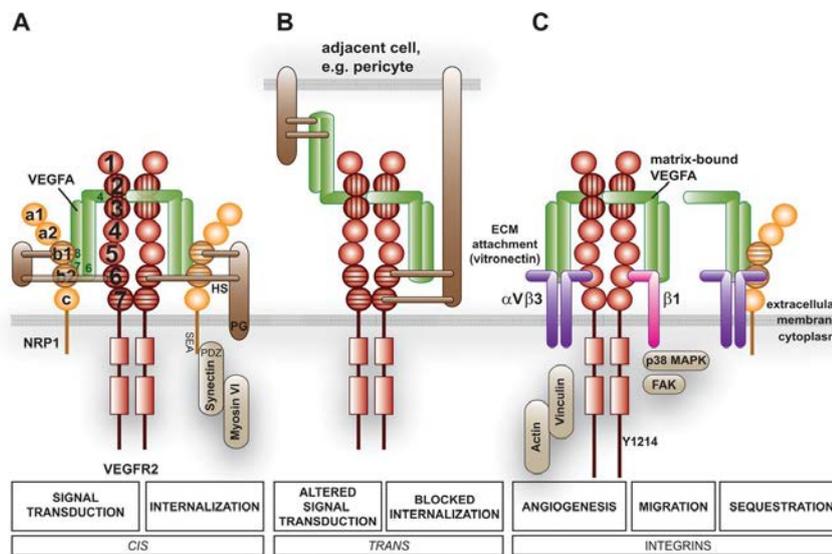


FIGURE 6 – Voies de signalisation activées par la liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-2 et à ses co-récepteurs. **a** En position *cis*, le VEGF-A (en vert) interagit avec le VEGFR-2, les neuropilines-1 (en orange) et avec les protéoglycannes à héparane sulfate (HS, en marron), le signal pro-angiogène est transduit. **b** En position *trans*, le VEGF-A est maintenu entre deux cellules adjacentes par sa liaison au VEGFR-2 et aux protéoglycannes à héparane sulfate. La cellule endothéliale reste en quiescence. **c** Le complexe entre les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (violet) et β_1 (rose), le VEGFR-2 et le VEGF-A piégé dans la matrice extracellulaire induit l'activation des voies de migration cellulaire. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut également séquestrer NRP-1 pour empêcher son interaction avec VEGFR-2. Tiré de [23]

La façon dont le VEGF-A se fixe à son récepteur VEGFR-2 (en *cis* ou en *trans* selon que le VEGF est soluble ou non) et les co-récepteurs impliqués résultent en une signalisation différente (Figure 6). Le signal est transduit lorsque le VEGF-A soluble est lié au VEGFR-2 et maintenu par NRP-1 et des protéoglycannes à héparane-sulfate. La liaison du VEGF-A au VEGFR-2 en *trans* à la jonction entre deux cellules adjacentes (*e.g.* cellule endothéliale et péricyte) maintenu par des protéoglycannes à héparane sulfate empêche l'internalisation du récepteur, le signal pro-angiogène n'est pas transduit et la cellule est maintenue en quiescence.

Le complexe entre les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et β_1 , le VEGFR-2 et le VEGF-A piégé dans la matrice extracellulaire maintient la cellule endothéliale liée à la matrice extracellulaire et induit l'activa-

tion des voies de migration cellulaire. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut également séquestrer NRP-1 pour empêcher son interaction avec VEGFR-2 [23].

1.2.4 Les autres facteurs pro-angiogènes

Au fur et à mesure du développement tumoral de plus en plus de facteurs pro-angiogènes sont produits (Figure 7). Ils sont responsables d'une stimulation exacerbée et continue de l'angiogénèse de façon directe en agissant sur les cellules endothéliales et de façon indirecte en stimulant la prolifération des cellules tumorales et en recrutant des cellules du microenvironnement (*voir section 1.4*).

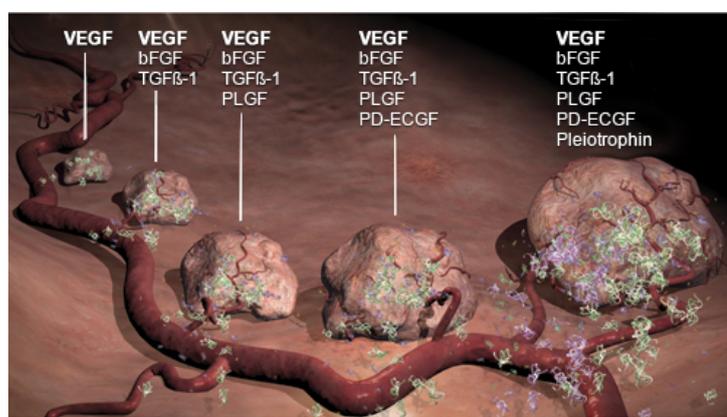


FIGURE 7 – Libération graduelle des facteurs pro-angiogènes au cours du développement tumoral. bFGF : basic Fibroblast Growth Factor, TGF- β : Transforming Growth Factor β , PLGF : Placental Growth Factor, PD-ECGF : Platelet Derived Growth Factor (PDGF) Tiré de [36]

La famille des FGFs

La famille des FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) comprend 23 isoformes qui interagissent avec leurs récepteurs (FGFR-1 à FGFR-4) et avec des protéoglycannes à héparane sulfate (HSPG) pour activer des voies de signalisation impliquées dans la prolifération des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules tumorales. L'isoforme la plus étudiée est FGF2, aussi appelée bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), intervient dans le développement embryonnaire, dans la cicatrisation, dans l'hématopoïèse et dans la progression tumorale.

Le bFGF est produit par les fibroblastes, par les cellules endothéliales et par les cellules tumorales et peut agir de façon autocrine et paracrine sur chacun des types cellulaires pour stimuler leur prolifération.

Le bFGF stimule la libération par les cellules endothéliales de l'activateur du plasminogène (uPA) et de MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) qui dégradent la matrice extracellulaire et stimulent l'angiogénèse. La liaison du bFGF à différents récepteurs transmembranaires ou protéines présentes dans la matrice extracellulaire (intégrine $\alpha_v\beta_3$, héparine, thrombospondine...) permet de contrôler sa biodisponibilité et donc son activité. L'interaction entre le bFGF et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ stimule la prolifération endothéliale *via* la voie des MAP kinases (*Mitogen Activated Protein*) [37, 24, 25, 38].

La famille des PDGFs

La famille des PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) est constituée de quatre isoformes dont PDGF-BB qui a surtout montré son importance dans la maturation des vaisseaux sanguins en parallèle des angiopoïétines et du TGF- β (*Transforming Growth Factor*).

La voie PDGF/PDGFR est impliquée dans l'angiogenèse et la progression tumorale *via* le recrutement des péricytes nécessaires à la maturation des vaisseaux sanguins et le recrutement de fibroblastes associés au cancer (CAFs, voir section 1.4.2). Pour stabiliser les néovaisseaux, les cellules endothéliales libèrent du PDGF-BB qui va agir comme chemoattractant pour recruter les péricytes qui expriment PDGFR- β [24, 39, 40].

1.2.5 Les facteurs anti-angiogènes endogènes

Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse contribuent à la régulation du processus d'angiogenèse et peuvent contribuer à un effet anti-tumoral. Ils sont pour certains dérivés des constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale.

Les thrombospondines font partie d'une famille de glycoprotéines multifonctionnelles pouvant se lier aux molécules de la matrice extracellulaire (collagène IV, fibronectine, héparine, calcium...). La thrombospondine-1 est impliquée dans différents processus tels que la prolifération cellulaire, la réponse inflammatoire et la régulation de l'angiogenèse [41]. La thrombospondine-1 inhibe l'angiogenèse en induisant l'apoptose des cellules endothéliales et en inhibant l'activité des MMPs (MMP-2, MMP-9). L'expression de la thrombospondine-1 par les cellules tumorales est relativement faible et est corrélée avec un potentiel angiogène et métastatique.

L'activité des MMPs est régulée par des TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) qui sont des inhibiteurs endogènes des MMPs. Parmi les isoformes des TIMPs, toutes inhibent les MMPs, mais il a également été montré que leur activité anti-angiogène pouvait être indépendante des MMPs. C'est le cas de TIMP-2 qui inhibe l'angiogenèse par interaction directe avec une intégrine $\alpha_3\beta_1$ sur les cellules endothéliales [41, 42].

Le clivage par des MMPs de certains collagènes de la matrice extracellulaire et de la membrane basale aboutit à la formation de molécules anti-angiogènes. Le clivage du collagène XVIII permet de libérer l'endostatine qui inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales en bloquant le cycle cellulaire en phase G1/S et en inhibant l'activité des MMP-2 [43, 44].

Le clivage des chaînes α_1 , α_2 et α_3 du collagène IV donnent lieu à l'arrestine, la canstatine et la tumstatine, respectivement [41]. Ces molécules inhibent la prolifération et la migration endothéliale, favorisent l'apoptose des cellules endothéliales et inhibent la croissance tumorale [25, 19].

1.3 Processus de l'angiogenèse par bourgeonnement

1.3.1 De la quiescence endothéliale à l'initiation de l'angiogenèse tumorale

La multiplication d'une cellule cancéreuse et l'aboutissement à une masse tumorale marque le début du développement tumoral. Lors de la première phase de développement avasculaire, les cellules se nourrissent en nutriments et en oxygène par diffusion et la tumeur garde une petite taille ne dépassant pas 2 à 3 mm de diamètre. Les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins sains à proximité sont dans un état quiescent maintenu grâce à la signalisation Angiopoïétine-1 (Ang-1)/Tie-2 (*Tyrosine kinase with immunoglobulin-2 and EGF-like domain*) et grâce aux contacts avec la membrane basale. Les cellules endothéliales sont stables, elles ne prolifèrent pas et ne bourgeonnent pas. Ang-1 est exprimée essentiellement par les péricytes et Tie-2 par les cellules endothéliales. Lorsque deux cellules endothéliales sont en contact, Ang-1 est libérée par les péricytes et se fixe à la jonction entre les cellules endothéliales sur les récepteurs Tie-2 (Figure 8). Ce complexe contribue à maintenir l'intégrité vasculaire en activant une voie de signalisation passant par AKT et qui a un effet anti-apoptotique grâce à l'inhibition de la caspase-9 et de *bad*. La stabilité endothéliale est également maintenue grâce à la présence de jonctions VE-cadhérine entre cellules adjacentes. Tant que la signalisation Ang-1/Tie-2 est maintenue, l'internalisation de la VE-cadhérine par la kinase Src est inhibée et le vaisseau reste stable [45].

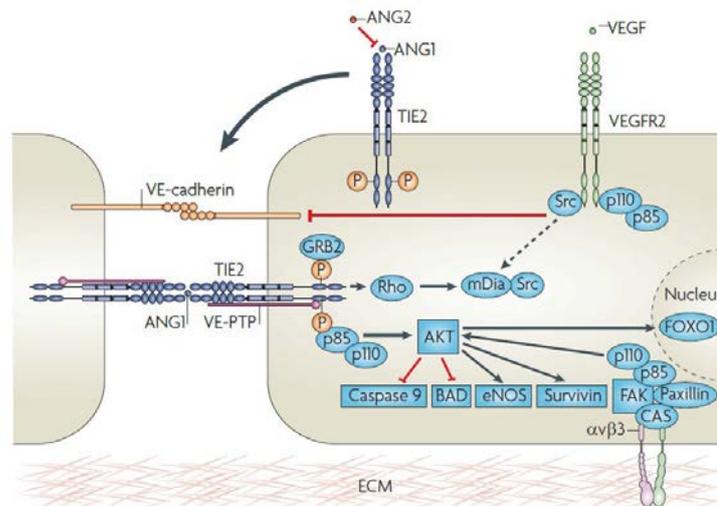


FIGURE 8 – Mécanismes moléculaires de la quiescence endothéliale. Le complexe angiopoïétine-1 (Ang-1)/Tie-2 se positionne entre les cellules endothéliales adjacentes avec une phosphatase (VE-PTP, *vascular endothelial phosphoTyr phosphatase*) et maintient la cellule en quiescence en activant les voies de survie (NO synthase endothéliale, survivin) et en inhibant les voies pro-apoptotiques (caspase-9, *bad*) *via* AKT. En l'absence de signalisation *via* VEGFR-2 l'activité RhoGTPase permet de séquestrer la kinase Src afin d'éviter l'internalisation de la VE-cadhérine et de maintenir la stabilité entre les cellules endothéliales. Tiré de [45].

En proliférant, certaines des cellules de la masse tumorale n'auront plus un apport suffisant en oxygène et vont donc contribuer à la stimulation de l'angiogenèse. L'oxygène joue un rôle primordial dans l'angiogenèse à travers le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia Inducible*

Factor) (Figure 9).

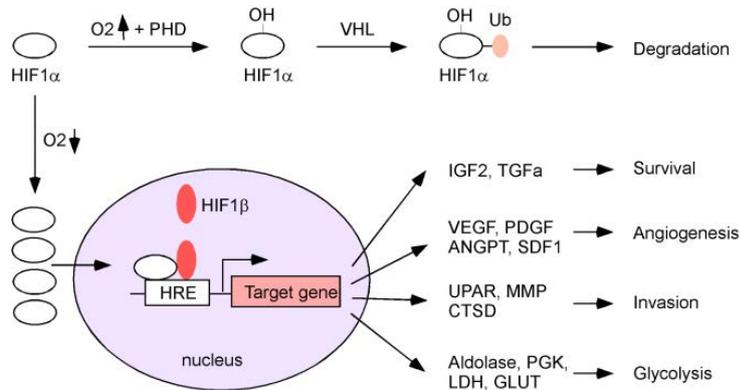


FIGURE 9 – Rôle du facteur HIF-1 α dans la stimulation de l'angiogenèse. En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé sur un résidu proline par une protéine comportant un domaine prolyl-hydroxylase (PHD) puis ubiquitinylé par une ligase (complexe von Hippel-Lindau, VHL) pour être dégradé. En hypoxie, HIF-1 α n'est pas hydroxylé, il s'accumule dans le cytoplasme puis est transloqué vers le noyau où il s'associe à HIF-1 β pour se fixer sur les séquences génomiques HRE (*HIF Response Element*) situées en amont des gènes dont il régule la transcription impliqués dans la survie cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et la glycolyse. (IGF : Insulin-like Growth Factor, TGF : Transforming Growth Factor, PDGF : Platelet-Derived Growth Factor, ANGPT : Angiopoïétine, SDF-1 : Stromal cell-derived Factor-1, UPAR : Urokinase plasminogen activator receptor, CTSD : cathepsin D, PGK : Phosphoglycerate kinase, LDH : Lactate deshydrogenase) Tiré de [46]

HIF-1 α est continuellement exprimé dans le cytoplasme à un niveau basal mais il est aussitôt dégradé lorsque le taux d'oxygène est suffisant. En présence d'oxygène, un résidu proline du facteur de transcription est hydroxylé par des protéines contenant des domaines prolyl-hydroxylase (PHD). Dans cet état, le facteur de transcription se fixe à un complexe von Hippel-Lindau (VHL) dont le rôle est de l'ubiquitiner pour induire sa dégradation par le protéasome.

En absence d'oxygène, HIF-1 α n'est pas hydroxylé, il s'accumule dans le cytoplasme puis est transloqué vers le noyau où il s'associe à HIF-1 β . Ce complexe se fixe sur les séquences génomiques HRE (*HIF Response Element*) situées en amont des gènes dont il régule la transcription.

Les gènes transcrits codent pour des protéines impliquées dans la stimulation de l'angiogenèse, la survie, l'invasion et la glycolyse tels que VEGF, eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) ou encore Glut-1 (*Glucose Transporter-1*) [46]. En réponse, les cellules endothéliales recevant le signal pro-angiogène sortent de l'état de quiescence, prolifèrent et migrent vers la tumeur [47].

1.3.2 Déstabilisation des vaisseaux sanguins sains et formation de vaisseaux sanguins tumoraux

En réponse au signal pro-angiogène, la cellule endothéliale libère l'angiopoïétine-2 (Ang-2) qui est un antagoniste d'Ang-1 et déstabilise la liaison Ang-1/Tie-2. Ainsi, les péricytes recouvrant le capillaire sanguin se détachent, ce qui permet aux cellules endothéliales sous-jacentes de sortir de leur état de quiescence (Figure 10).

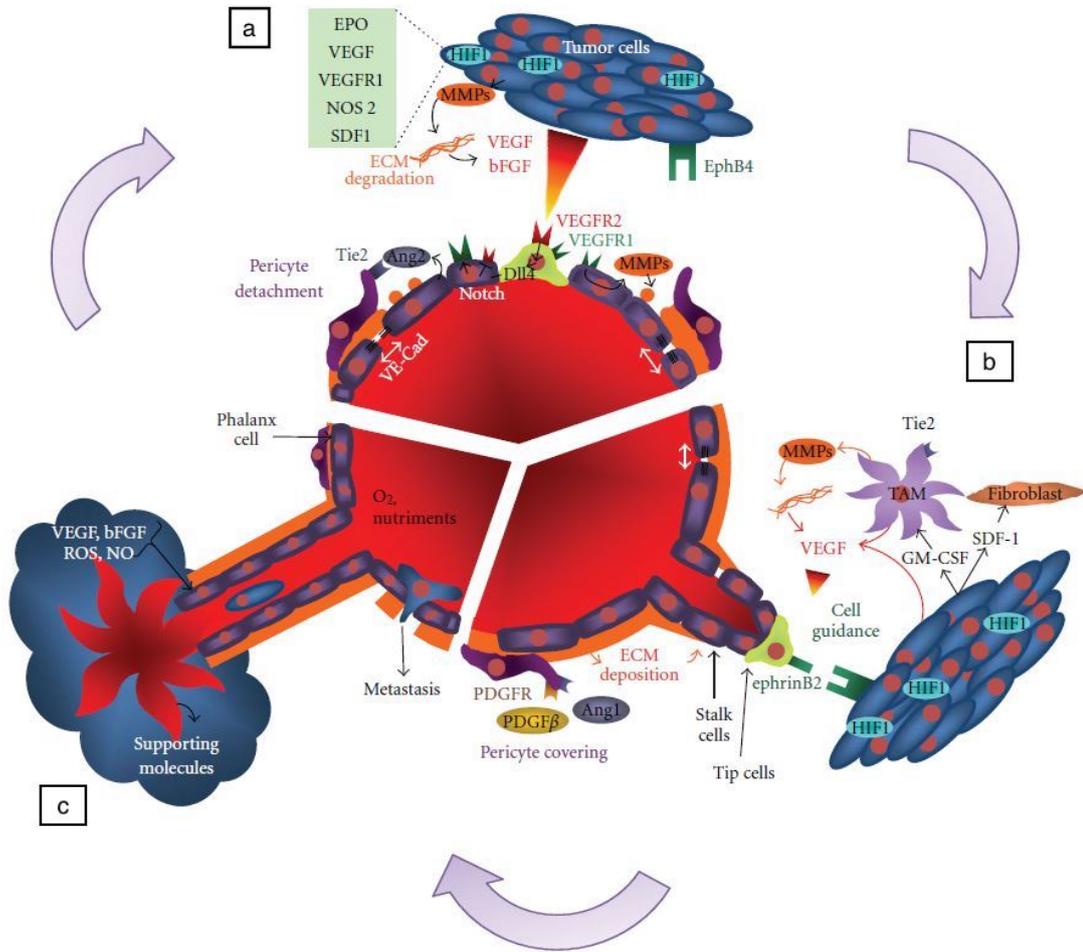


FIGURE 10 – Processus de l'angiogenèse tumorale. **a** L'hypoxie au sein de la tumeur induit l'expression de facteurs pro-angiogènes dont le VEGF et la libération de MMPs. En réponse, un bourgeon endothélial se forme (*tip cell*) et les cellules migrent (*stalk cells*) en suivant le gradient de VEGF. **b** L'élongation du bourgeon endothélial s'accompagne de la formation d'une nouvelle matrice extracellulaire et du recrutement de péricytes *via* la signalisation PDGF-B/PDGFR- β . En parallèle, les facteurs libérés par les cellules tumorales attirent des macrophages (TAM, *Tumor-Associated Macrophages*) et des fibroblastes qui contribuent à la stimulation de l'angiogenèse en libérant d'avantage de facteurs pro-angiogènes. **c** Les capillaires sanguins tumoraux formés sont tortueux et perméables. Les cellules tumorales sont toujours en hypoxie, ce qui provoque une stimulation continue de l'angiogenèse. Tiré de [48]

Ces cellules endothéliales ainsi activées vont libérer des MMPs afin de permettre aux cellules endothéliales de migrer en suivant le gradient de VEGF. Au cours de la croissance tumorale, la membrane basale est dégradée, ce qui permet d'en libérer les molécules pro-angiogènes.

Dans un contexte physiologique normal dans l'angiogenèse par bourgeonnement, la cellule endothéliale ayant reçu le signal pro-angiogène devient une *tip cell* qui est positionnée en tête du bourgeon et guide la formation du néovaisseau, suivie des *stalk cells*. La *tip cell* adopte une morphologie différente et émet des filopodes où sont surexprimés les récepteurs et co-récepteurs lui permettant de se guider au mieux vers le signal pro-angiogène (VEGFR-2, NRP-1). Une seule *tip cell* se forme normalement grâce au mécanisme de régulation faisant intervenir Notch et Dll4

(*delta like canonical Notch ligand 4*). La *tip cell* recevant le signal VEGF le plus important se met à exprimer Dll4 qui se fixe à Notch exprimé par les cellules endothéliales adjacentes. Cela induit une répression de l'expression de VEGFR-2 par ces cellules appelées *stalk cells*. La détermination de la *tip cell* n'est pas définitive et peut changer au cours de l'angiogenèse en fonction du microenvironnement [49, 48, 24, 50]. Ce n'est pas le cas dans l'angiogenèse tumorale. Ce processus d'inhibition n'apparaît pas ou est déficient et la surexpression de nombreux facteurs pro-angiogènes ne permet pas la mise en place d'un gradient. Ainsi, plusieurs cellules se différencient en *tip cells*. Ces nombreuses *tip cells* migrent alors vers la tumeur, conduisant ainsi à la formation de plusieurs vaisseaux sanguins de manière anarchique.

Lorsque l'endothélium est formé, il doit être recouvert par les péricytes permettant de maintenir une cohésion entre les cellules endothéliales. Les péricytes sont des cellules issues de cellules souches mésenchymateuses qui se différencient sous l'effet de TGF- β 1. Les cellules endothéliales produisent et libèrent du PDGF-B qui permet le recrutement des péricytes qui expriment à leur surface le récepteur PDGFR- β . Le recrutement des péricytes est régulé par Ang-1 et Ang-2 [51, 52]. Des études montrent que la prolifération et la migration des péricytes est stimulée par le VEGF en condition hypoxique. De façon indirecte, le monoxyde d'azote libéré par les cellules endothéliales permet de recruter des précurseurs de péricytes [52].

Certaines études montrent que le recrutement des péricytes et la formation de la membrane basale se font de façon concomitante à la formation du bourgeon endothélial [18]. Il a été montré que les péricytes interviennent dans la stabilisation du capillaire et ont également un rôle lors de la formation des nouveaux vaisseaux. Selon Stapor *et al.*, il y aurait plusieurs sous-types de péricytes avec des profils d'expression différents et des fonctions différentes au cours de l'angiogenèse. En effet, il n'existe pas un seul marqueur spécifique permettant d'identifier les péricytes, ils sont reconnus par des marqueurs exprimés également par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (desmine, PDGFR- β), par les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes (actine du muscle lisse (α -SMA)) et par les macrophages, les cellules gliales et les cellules tumorales (NG2, *neuron-glial antigen 2*) [53].

Les interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes régulent la maturation des vaisseaux sanguins en stimulant la formation de la membrane basale [54]. L'assemblage de la membrane basale fait intervenir des intégrines nécessaires à l'assemblage de laminines qui interagissent ensuite avec un réseau de fibres de collagène IV pour former une structure autour du vaisseau [19].

Cependant, du fait de la production incessante de facteurs pro-angiogènes, les vaisseaux ne sont pas stabilisés et ils sont constamment remaniés empêchant les cellules endothéliales d'entrer en quiescence [55]. L'hypoxie générée va induire une stimulation continue de l'angiogenèse, de nouveaux vaisseaux seront donc formés de manière anarchique, de nouvelles zones d'hypoxie vont alors apparaître, tout cela formant une boucle interminable [56, 25].

1.4 Microenvironnement, angiogénèse et progression tumorale

Les mécanismes de l'angiogénèse tumorale sont plus complexes et font intervenir d'autres acteurs. La libération incessante de différents facteurs pro-angiogènes par les cellules tumorales contribue au maintien de l'activité angiogénique, au recrutement de cellules associées au cancer et à la progression tumorale.

Le stroma tumoral représente tous les composants de la tumeur excepté les cellules tumorales, c'est-à-dire les vaisseaux sanguins, la matrice extracellulaire et les cellules stromales (fibroblastes, cellules inflammatoires, mastocytes, cellules souches...). Chacun de ces composants participe à la progression tumorale, depuis la stimulation de l'angiogénèse à la progression métastatique (Figure 11).

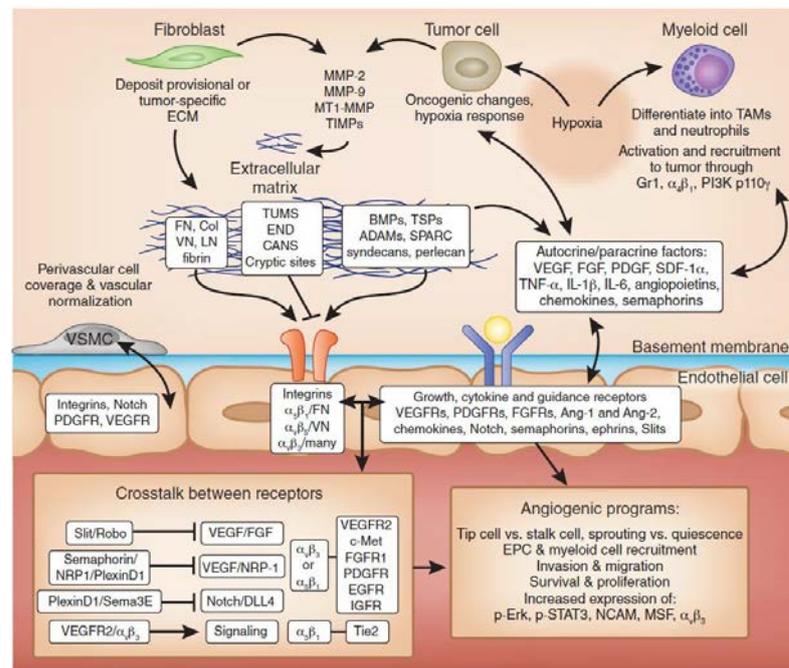


FIGURE 11 – Importance du microenvironnement tumoral dans l'angiogénèse. Les facteurs de croissance séquestrés dans la matrice extracellulaire sont exposés sous l'effet des MMPs libérées par les fibroblastes et les cellules tumorales. Les cellules tumorales recrutent des cellules myéloïdes qui se différencient en macrophages associés aux tumeurs (TAM) et en neutrophiles. Les récepteurs endothéliaux et les intégrines transmettent des signaux pro-angiogènes. Tiré de [50]

1.4.1 La matrice extracellulaire

Elle apporte un maintien à la structure tumorale et son remodelage fait partie intégrante du processus d'angiogénèse, en effet des facteurs angiogènes tels que VEGF et bFGF sont régulés par la matrice et se retrouvent liés aux glycosaminoglycannes à héparane sulfate (HSPG). La dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases matricielles et la plasmine suite à son activation *via* l'activateur du plasminogène permettent de dégrader et remodeler la matrice extracellulaire et ainsi induire la libération de VEGF et bFGF qui stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

La matrice extracellulaire est constamment remodelée au cours de la progression tumorale. En conditions hypoxique, HIF-1 régule l'expression de protéases et de métalloprotéases qui dégradent la matrice extracellulaire et la membrane basale, ce qui facilite la migration des cellules et l'invasion du tissu local [57]. Le remodelage de la matrice extracellulaire est accompagné du recrutement de fibroblastes qui libèrent des MMPs et TIMPs [50].

1.4.2 Les Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs

Les fibroblastes sont recrutés dans les tumeurs et sont appelés fibroblastes associés au cancer ou *Cancer-Associated Fibroblasts* (CAFs). L'origine exacte de ces cellules n'est pas encore déterminée mais les CAFs pourraient dériver de fibroblastes, de cellules souches mésenchymateuses, de cellules souches hématopoïétiques, de cellules épithéliales et de cellules endothéliales. Dans un contexte physiologique, les fibroblastes sont impliqués dans la cicatrisation où après activation et différenciation en myofibroblastes, ils contribuent à la synthèse et au remodelage de la matrice extracellulaire. Une fois le processus terminé, les fibroblastes activés meurent par apoptose, ce qui n'est pas le cas au sein des tumeurs.

Les CAFs sont activés sous l'effet de facteurs de croissance et cytokines libérés par les cellules tumorales tels que TGF- β , bFGF, PDGF et IL-6 dont ils expriment les récepteurs. En réponse, les CAFs sécrètent des facteurs de croissance (VEGF, bFGF, PDGF, SDF-1), des cytokines et des MMPs qui contribuent à la stimulation de l'angiogenèse et à la progression tumorale [58, 59]

1.4.3 Les intégrines

Ce sont des protéines transmembranaires qui permettent l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire en se liant à ses composants (collagène, fibronectine, laminine, vitronectine). Les intégrines sont formées de sous-unités α ou β qui s'associent en dimères aux motifs RGD (arginine-glycine-acide aspartique) des protéines de la matrice extracellulaire. Ces interactions permettent de stimuler les voies de signalisation impliquées dans la survie, la migration ou l'apoptose des cellules endothéliales [41, 50]. En particulier, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est exprimée à la surface des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse tumorale et participe à la progression tumorale. Des interactions entre les intégrines et des récepteurs de facteurs de croissance permettent de maximiser l'activation du récepteur et la transmission du signal [50]. Les intégrines exprimées à la surface des plaquettes pourraient également avoir un rôle dans l'angiogenèse en provoquant la libération des facteurs pro-angiogènes contenus dans les granules α des plaquettes dans la tumeur [60].

Les intégrines ont également un rôle dans la lymphangiogenèse. En particulier, l'intégrine $\alpha_9\beta_1$ est indispensable à la formation d'un réseau lymphatique fonctionnel. En effet, sa fixation au VEGF-C et VEGF-D permet de stimuler la migration cellulaire [60].

1.4.4 Les plaquettes

Dans un contexte physiologique, les plaquettes ont un rôle important dans l'hémostase. Lorsqu'il y a une brèche vasculaire, elles entrent en contact avec les éléments thrombogènes exposés dans la matrice extracellulaire (collagènes, facteur von Willebrand (vWF), thrombospondine, protéoglycannes...). La liaison des plaquettes au collagène *via* l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et le facteur de

von Willebrand (vWF) permet de stabiliser leur adhésion et entraîne leur activation et la modification de leur phénotype vers un phénotype pro-coagulant. L'activation des plaquettes conduit à la libération des granules α , des granules denses et des vésicules extracellulaires appelées microparticules plaquettaires.

Les plaquettes incorporent par endocytose et transportent de nombreux facteurs pro-angiogènes dans leurs granules α tels que le VEGF, le bFGF ou encore l'interleukine-8 (Tableau 2). L'environnement pro-angiogène tumoral induit un phénotype pro-coagulant dans les cellules endothéliales *via* la surexpression du facteur tissulaire (FT), du facteur de von Willebrand et de la P-selectine, ce qui permet d'activer localement les plaquettes qui libèrent les facteurs contenus dans les granules α et participent ainsi à l'angiogenèse et à la progression tumorale.

Paradoxalement, les granules α contiennent également des facteurs anti-angiogènes tels que la thrombospondine-1 et les TIMPs qui inhibent l'angiogenèse et peuvent également inhiber la prolifération tumorale.

Lorsqu'elles atteignent la circulation sanguine, les cellules tumorales peuvent être recouvertes de plaquettes car elles expriment des intégrines plaquettaires ($\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$), ce qui les protège des forces de cisaillement et de l'immunosurveillance. Elles peuvent ainsi migrer et établir de nouveaux sites métastatiques en profitant des facteurs de croissance contenus dans les plaquettes [61, 62, 63]

TABLE 2 – Facteurs pro- et anti-angiogènes contenus dans les granules de sécrétion des plaquettes. D'après [62, 63]

Facteurs pro-angiogènes	Facteurs anti-angiogènes
VEGF	Angiostatine
Ang-1, -2	Endostatine
bFGF, PDGF	Thrombospondine-1
EGF, IGF	PF4 (<i>Platelet Factor 4</i>)
HGF	TIMPs
SDF-1	
MMP-1, -2, -9	
IL-8	
CXCL-7	

1.4.5 Rôle de l'inflammation

Recrutement de cellules inflammatoires

Les molécules pro-angiogènes libérées par les cellules tumorales telles que le VEGF, le FGF, le PDGF et SDF-1 α (*stromal-cell derived factor-1*) agissent comme chimio-attractants pour les cellules myéloïdes qui peuvent se différencier en macrophages associés aux tumeurs (*Tumor-Associated Macrophages, TAM*) ou en polynucléaires neutrophiles qui participent à la stimulation de l'angiogenèse en libérant des cytokines (VEGF-A, VEGF-C, IL-8, TNF- α , MMP-9) [64, 50]. MMP-9 est également impliquée dans la mobilisation des progéniteurs endothéliaux (CD11b⁺) et des leucocytes depuis la moelle osseuse [64]. La présence d'intégrines à la surface des cellules dérivées de la moelle osseuse facilite leur intégration (*homing*) dans la tumeur [60].

Certaines cytokines peuvent avoir une activité immunosuppressive en plus de leur activité pro-angiogène. C'est le cas du VEGF-A, du VEGF-C et du PlGF. Certaines cellules immunitaires expriment les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 et peuvent donc être attirées par le VEGF. Le VEGF peut contribuer à l'accumulation de cellules immunosuppressives (*Myeloid Derived Suppressor Cells*, MDSC) telles que les macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques qui bloquent indirectement la prolifération des lymphocytes T. De plus, le VEGF peut intervenir dans l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques qui deviennent donc peu efficaces pour stimuler l'activation des lymphocytes T et donc la réponse immunitaire spécifique [65, 66].

Interleukine-8 et angiogenèse

Parmi les cytokines pro-inflammatoires libérées, l'interleukine-8 (IL-8 ou CXCL-8) a un rôle dans l'angiogenèse et la progression tumorale. Elle est exprimée sous l'influence de stimuli pro-inflammatoires (TNF- α , *Tumor-Necrosis Factor- α* , IL-1 β) et lors de stress environnementaux tels que l'hypoxie ou l'exposition à un traitement [67, 68]. Dans certaines tumeurs, l'activation constitutive de l'oncogène *ras* induit l'expression de l'IL-8 par les cellules tumorales [69]. Dans ces conditions, les cellules tumorales surexpriment l'interleukine-8 qui va interagir avec tous les types cellulaires du microenvironnement tumoral exprimant ses récepteurs (CXCR1 et CXCR2), à savoir les cellules tumorales, les cellules endothéliales, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages.

Dans les cellules endothéliales, l'IL-8 participe à la stimulation de l'angiogenèse en induisant la phosphorylation de VEGFR-2 en inhibant l'apoptose et en augmentant l'expression de MMP-2 et MMP-9. Dans les cellules tumorales, l'IL-8 est responsable de la stimulation de la prolifération, de la survie, de l'invasion et de la migration cellulaire *via* l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la voie de la FAK (*Focal Adhesion Kinase*), de la kinase Src, la voie des MAP kinases et la voie PI3K/AKT [67, 68].

1.4.6 Rôle du monoxyde d'azote

La stimulation de l'angiogenèse *via* la voie VEGF/VEGFR-2 passe par le monoxyde d'azote, NO. La présence du NO est importante pour le maintien de l'intégrité vasculaire et pour la réponse angiogène [70]. Des études et hypothèses montrent que le NO stimule la prolifération et la migration endothéliale [70, 33].

La fixation de VEGF sur son récepteur induit la production de monoxyde d'azote (NO) par la NO synthase endothéliale (eNOS) qui est libérée dans l'espace vasculaire. La production de NO peut également être stimulée par d'autres facteurs tels que les interleukines 6 et 8 contournant ainsi la voie VEGF/VEGFR-2.

En tant que médiateur cellulaire, le NO active ou inhibe de nombreuses voies de signalisation. Le NO à faible concentration permet de maintenir l'intégrité endothéliale en assurant un effet anti-apoptotique dans ces cellules en inhibant l'activation de la caspase-3. Il intervient dans différents mécanismes impliqués dans l'angiogenèse et participe à la progression tumorale en favorisant la perméabilité vasculaire, le recrutement des péricytes et en diminuant l'agrégation plaquettaire. Il peut également contribuer à la progression métastatique *via* les vaisseaux lymphatiques [71] (Figure 12).

Cependant, à forte concentration, le NO a un effet pro-apoptotique pour les cellules endothéliales et peut participer à la régression tumorale [72]. Ses effets cytotoxiques peuvent participer à la dégradation de certaines cellules stromales et ainsi réduire la quantité de facteurs de croissance

produits, ce qui favoriserait la régression tumorale [71].

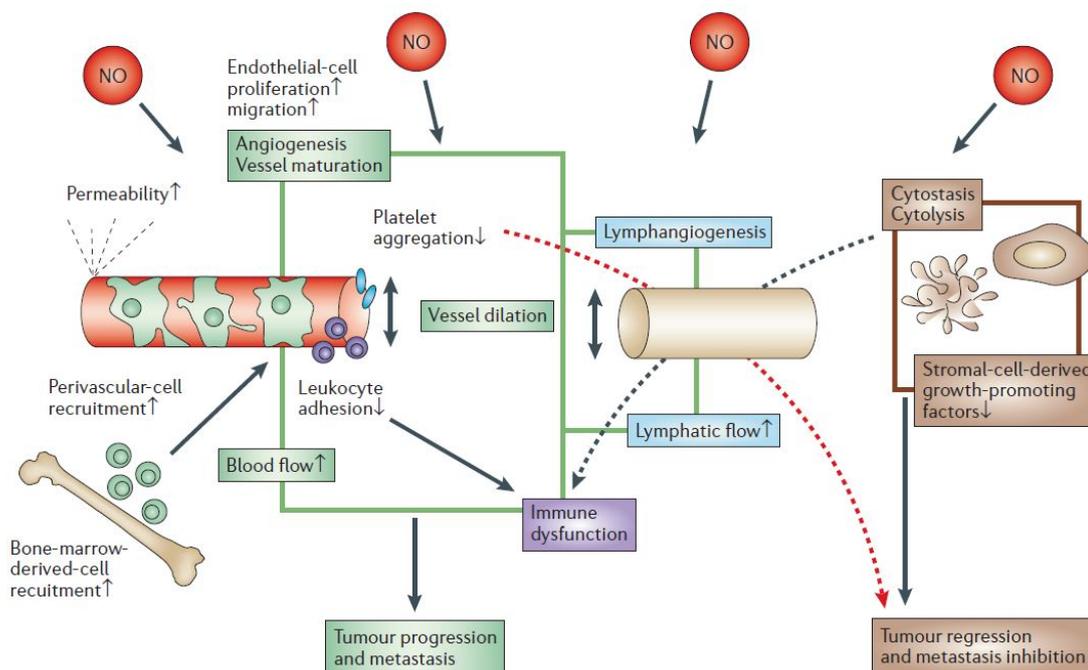


FIGURE 12 – Mécanismes d'action du monoxyde d'azote impliqués dans la progression et la régression tumorale. Le monoxyde d'azote (NO) agit à différents niveaux de la progression tumorale en stimulant l'angiogenèse, en maintenant un phénotype endothélial anti-coagulant et en participant au recrutement de précurseurs myéloïdes. Les effets du NO sur la lymphangiogenèse peuvent contribuer au processus métastatique. Les effets cytotoxiques du NO pourraient d'une part faciliter l'immunosuppression et d'autre part favoriser la régression tumorale *via* un effet cytotoxique sur des cellules stromales productrices de facteurs de croissance. Tiré de [71]

1.5 Rôle des vésicules extracellulaires dans l'angiogenèse tumorale

La communication récécine entre les cellules d'un même environnement ou à distance, se fait *via* la libération de vésicules extracellulaires (taille de 30 à 1000 nm) par les cellules permettant de transférer à d'autres cellules du même type ou non des informations (protéines, récepteurs, acides nucléiques...) capables d'induire des modifications d'activité, de fonctions, voire de phénotype chez les cellules receveuses. Les vésicules extracellulaires libérées par les cellules tumorales (TEVs) ont un impact sur la progression tumorale en interagissant localement avec les cellules du microenvironnement et stimulent la prolifération tumorale, l'angiogenèse et le recrutement de fibroblastes. Les TEVs libérées dans la circulation systémique favorisent la création d'un environnement immunosuppresseur et la formation de niches pré-métastatiques [73].

Il existe plusieurs types de vésicules libérées par les cellules qui se différencient par leur origine cellulaire, leur taille et leur composition. Les microparticules sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique et sont directement libérées dans le milieu extracellulaire. Elles ont une taille de 100 à 1000 nm et leur nom diffère selon la cellule d'origine : microparticules lors-

qu'elles sont relarguées par les cellules sanguines après activation et microvésicules lorsqu'elles sont relarguées par d'autres types cellulaires. Les exosomes sont des nanovésicules contenues dans les corps multivésiculaires intracellulaires du système endosomal. Ce sont des vésicules de plus petite taille (30 à 100 nm) qui sont sécrétées par exocytose et qui font partie des vésicules les plus étudiées.

La fonction des TEVs dépend des molécules qu'elles contiennent et des cellules avec lesquelles elles interagissent. La littérature précise l'importance des TEVs dans l'angiogenèse et le remaniement vasculaire du fait de leur contenu en facteurs impliqués à différents niveaux de ces processus (Figure 13) [74]. Lorsque les cellules tumorales sont en hypoxie, les vésicules libérées sont riches en facteurs pro-angiogènes tels que VEGF, FGF, EGF, IL-6 et IL-8. Leur adhésion aux cellules endothéliales et le transfert de leur contenu sont facilités par la présence de molécules d'adhésion à leur surface. En réponse, le bourgeonnement, la prolifération et la migration endothéliale sont stimulés et les cellules endothéliales surexpriment VEGF et VEGFR-2. Il a également été montré que ces vésicules pouvaient contenir des MMPs et TIMPs et ainsi favoriser l'angiogenèse en induisant un remodelage de la matrice extracellulaire [75, 76].

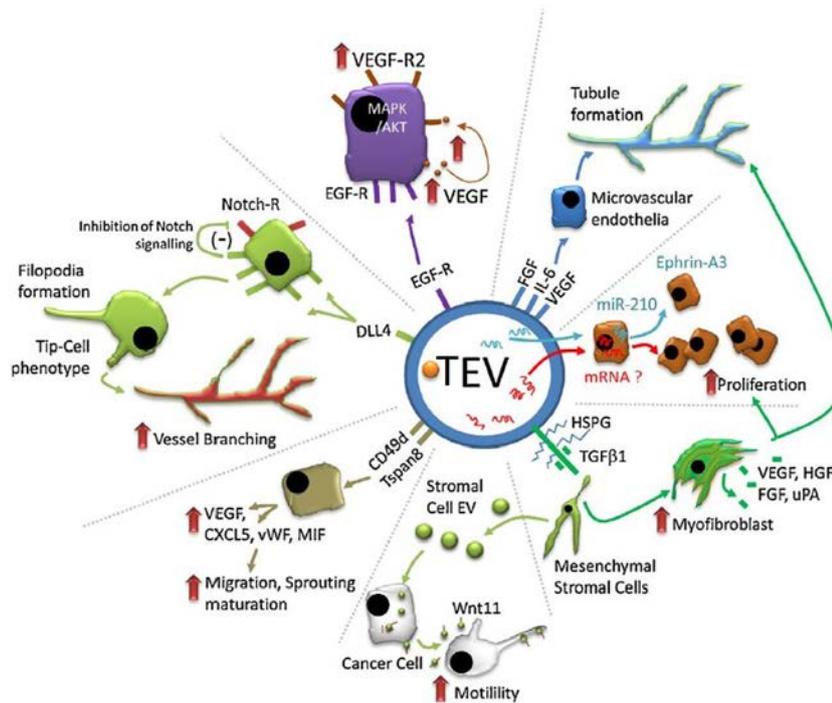


FIGURE 13 – Facteurs, récepteurs et acides nucléiques transportés par les vésicules extracellulaires tumorales (TEVs) et ayant un rôle dans l'angiogenèse. Tiré de [74]

Le microenvironnement tumoral est riche en vésicules extracellulaires participant à la progression tumorale et libérées non seulement par les cellules tumorales mais aussi par les cellules endothéliales, les macrophages et les neutrophiles ayant infiltré la tumeur. Pour contribuer à la survie cellulaire, les cellules peuvent accumuler la caspase-3 dans les TEVs pour empêcher l'entrée en apoptose. De même, il a été montré que les TEVs peuvent agir comme moyen de protection vis-à-vis des agents chimiothérapeutiques en les intégrant pour les exporter hors de la

cellule. Comme les plaquettes, le phénotype pro-coagulant des TEVs peut permettre aux cellules tumorales d'échapper à l'immunosurveillance [77].

1.6 Réseau vasculaire lymphatique et progression tumorale

Il est souvent décrit que la pression interstitielle reste élevée dans les tumeurs à cause de la perméabilité des vaisseaux sanguins et que l'absence d'un réseau lymphatique ou la présence d'un réseau lymphatique inadéquat ne permet pas de réduire cette pression de façon efficace [78]. Contrairement au réseau vasculaire sanguin, le réseau vasculaire lymphatique n'est pas fermé. C'est un réseau vasculaire essentiel au bon fonctionnement d'un tissu car il permet de drainer le liquide interstitiel et de le retourner vers la circulation sanguine. La seconde fonction non négligeable de ce réseau vasculaire est son rôle dans le système immunitaire. Les fluides, les molécules et les cellules dans le tissu passent dans les vaisseaux lymphatiques, sont transportés vers les ganglions où la lymphe est filtrée.

1.6.1 Acteurs de la lymphangiogenèse tumorale

Les vaisseaux lymphatiques ont une morphologie et une structure différentes des vaisseaux sanguins. Ce sont des capillaires formés d'une couche de cellules endothéliales mais ils ne présentent pas de recouvrement par les péricytes comme c'est le cas des capillaires sanguins et leur membrane basale est peu présente (Figure 14) [79].

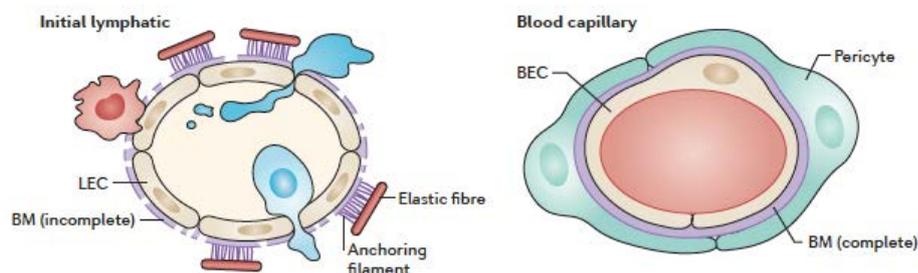


FIGURE 14 – Comparaison de la structure d'un vaisseau lymphatique et d'un capillaire sanguin. La structure des vaisseaux lymphatiques (à gauche) se différencie de celle des capillaires sanguins par l'absence de péricytes et une membrane basale incomplète. Les filaments ancrés dans la membrane basale sont connectés aux fibres élastiques de la matrice et facilitent le transfert du liquide interstitiel et des cellules dans la circulation lymphatique *via* les jonctions lâches inter-endothéliales. LEC : Lymphatic Endothelial Cell, BEC : Blood Endothelial Cell, BM : Basement Membrane. Tiré de [80]

Comme dans l'angiogenèse, la lymphangiogenèse nécessite l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales lymphatiques. Le récepteur majoritairement impliqué dans la lymphangiogenèse est VEGFR-3, dont l'activité est stimulée par la liaison de ses ligands VEGF-C et VEGF-D. La neuropiline-2 agit comme co-récepteur et peut moduler l'activation de ces voies. Une forme soluble du récepteur VEGFR-2 (sVEGFR-2) participe à la régulation de la lymphangiogenèse en séquestrant le VEGF-C [23, 80].

Les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral (macrophages, cellules dendritiques, CAFs, cellules souches mésenchymateuses) produisent de nombreux facteurs impliqués dans la lymphangiogenèse dont les isoformes du VEGF (VEGF-A, -C, D), des facteurs de croissance (bFGF, PDGF, HGF, EGF, TGF- β), des cytokines (IL-6, SDF-1) et des métalloprotéases matricielles (Figure 15). Le rôle de TGF β est controversé mais est proposé comme inhibiteur de la lymphangiogenèse. L'acide hyaluronique présent dans la matrice extracellulaire instaure un environnement favorable à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques qui expriment Lyve-1, un récepteur de l'acide hyaluronique [81, 82, 80].

Une hypothèse concernant les macrophages associés aux tumeurs propose qu'ils puissent se différencier en cellules endothéliales lymphatiques exprimant Lyve-1 et fassent ainsi partie intégrante des vaisseaux lymphatiques [83].

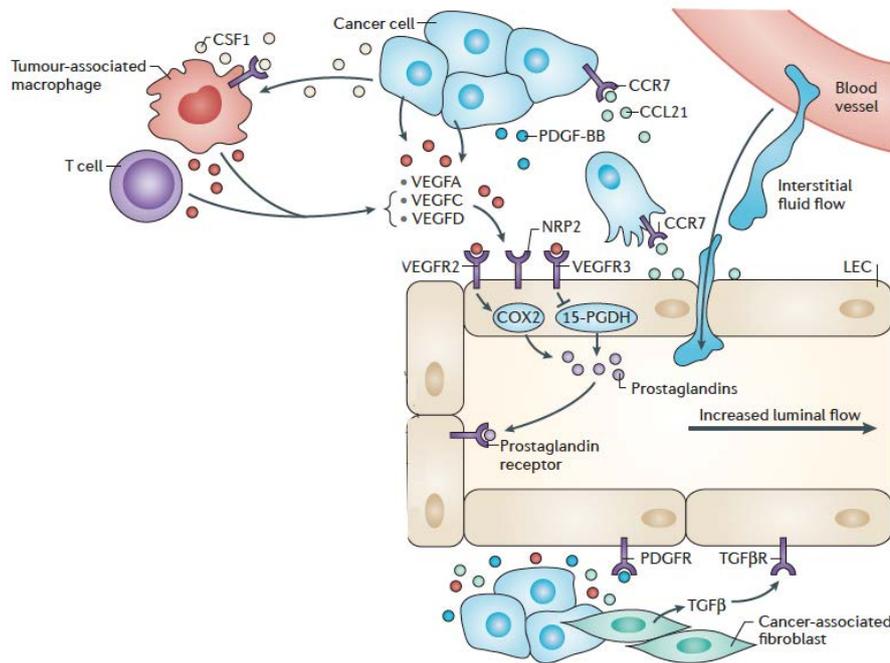


FIGURE 15 – Microenvironnement tumoral et lymphangiogenèse. Les cellules tumorales, les macrophages et les fibroblastes libèrent des facteurs stimulant la lymphangiogenèse (VEGF-A, -C, D, PDGF, FGF, EGF, Ang-2). TGF- β pourrait avoir un rôle inhibiteur. L'interaction entre les cellules tumorales et lymphatiques est facilitée par l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs par les cellules tumorales (CCL21/CCR7). CCL21 : CC-Chemokine Ligand 21, CSF1 : Colony-Stimulating Factor-1. Tiré de [80]

1.6.2 Vaisseaux lymphatiques et progression tumorale

La circulation lymphatique représente une des possibilités de métastase [84]. En effet, en passant dans les vaisseaux lymphatiques, les cellules tumorales peuvent migrer vers les ganglions et créer de nouveaux sites tumoraux. La circulation lymphatique n'étant pas liée au système cardiovasculaire, les forces de cisaillement y sont minimales et les cellules tumorales peuvent y circuler avec moins de risques de mort cellulaire induite par ce stress [81].

Les cellules tumorales profitent de la structure vasculaire lymphatique dont les jonctions

endothéliales sont peu jointives et la membrane basale est incomplète pour passer dans la circulation lymphatique. La signalisation passant par VEGFR-2 et la liaison VEGF-A/VEGFR-3 provoquent une hyperplasie des vaisseaux lymphatiques, ils se dilatent et augmentent de taille pour mieux drainer la tumeur et facilitent ainsi la dissémination tumorale [79, 81].

La lymphangiogenèse peut avoir lieu dans la périphérie tumorale comme au centre de la tumeur. Néanmoins, il est possible que les vaisseaux lymphatiques périphériques aient un rôle plus important dans le processus de métastase car les vaisseaux lymphatiques intratumoraux sont souvent moins fonctionnels ou obstrués par des cellules tumorales infiltrantes [81, 80].

Le rôle des vaisseaux lymphatiques dans le transport des cellules présentatrices d'antigène depuis les tissus vers les ganglions lymphatiques est facilité par l'expression de chimiokines par les cellules endothéliales lymphatiques telles que SDF-1 (aussi appelée CXCL12, *C-X-C motif chemokine 12*) ou CCL21 (*C-C motif chemokine ligand 21*) qui interagissent avec leurs récepteurs CCR7 et CXCR4, respectivement, exprimés par les cellules dendritiques. Ainsi, les cellules tumorales qui surexpriment CCR7 ou CXCR4 peuvent être chimio-attractées vers les ganglions lymphatiques. Inversement, les cellules endothéliales lymphatiques peuvent surexprimer SDF-1 et favoriser ainsi la migration de cellules tumorales exprimant CXCR-4 [81, 80].

L'expression de VEGF-C, VEGF-D et VEGFR-3 dans les tumeurs est corrélée au potentiel métastatique, les cellules tumorales peuvent induire la lymphangiogenèse pour métastaser [81]. Le VEGF-C produit par les cellules tumorales peut augmenter l'expression de MMP-9 et ainsi contribuer à la migration des cellules tumorales [82, 16]. Par ailleurs, Lee *et al.* ont montré dans un modèle de cancer du sein, que les facteurs de croissance produits par les cellules endothéliales lymphatiques pouvaient stimuler la prolifération des cellules tumorales [84].

Chapitre 2

Les thérapies anti-angiogènes et leurs effets

Sommaire

2.1	Les agents anti-angiogènes et leurs utilisations	26
2.1.1	Les thérapies ayant des cibles extracellulaires	26
2.1.2	Les thérapies ayant des cibles intracellulaires	30
2.2	Effets indésirables liés à l'utilisation d'anti-angiogènes	32
2.3	Effets des thérapies anti-angiogènes sur le réseau vasculaire tumoral et sur la croissance tumorale	33
2.3.1	Effets de la thérapie anti-angiogène sur la structure du réseau vasculaire tumoral	35
2.3.2	Effets de la thérapie anti-angiogène sur la fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux	35
2.3.3	Effets de la thérapie anti-angiogène sur la croissance tumorale	38
2.3.4	Association des thérapies anti-angiogènes avec des thérapies conventionnelles	39
2.4	Les marqueurs de réponse aux thérapies anti-angiogènes : entre "normalisation" et résistance	41
2.4.1	Mise en évidence de marqueurs de réponse au moyen des méthodes d'imagerie	42
2.4.2	Les facteurs de croissance	42
2.4.3	Recrutement de cellules pour favoriser la croissance vasculaire et tumorale	43
2.4.4	Augmentation des capacités métastatiques	44

L'idée de cibler les vaisseaux sanguins afin de traiter les tumeurs solides est née dans les années 1970 avec le Dr. Folkman [2]. Depuis, de nombreuses thérapies ciblant les voies de l'angiogenèse ont été développées afin de contrer la stimulation de l'angiogenèse et d'éradiquer les tumeurs. Plus de 40 molécules sont impliquées dans l'angiogenèse tumorale mais la plupart des études se sont focalisées sur le VEGF et ses récepteurs [85]. Il existe deux grandes catégories d'agents ciblant la vascularisation tumorale : les agents anti-angiogènes qui ciblent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et les agents vasculoclastiques (*Vascular Disrupting Agents*, VDA) qui détruisent les vaisseaux sanguins tumoraux [86]. Nous ne traiterons ici que des agents anti-angiogènes.

2.1 Les agents anti-angiogènes et leurs utilisations

La stimulation de l'angiogénèse étant un processus complexe faisant intervenir de nombreux facteurs, elle peut potentiellement être inhibée de diverses façons. La figure 16 illustre les principales molécules anti-angiogènes qui sont utilisées en clinique et leurs cibles dans les voies de signalisation de l'angiogénèse [27]. Ces thérapies se présentent sous la forme d'anticorps monoclonaux, d'inhibiteurs de tyrosine kinase ou encore d'immuno-modulateurs. Ces thérapies ont une ou plusieurs cibles moléculaires et sont indiquées dans le traitement de différents cancers (Tableau 3).

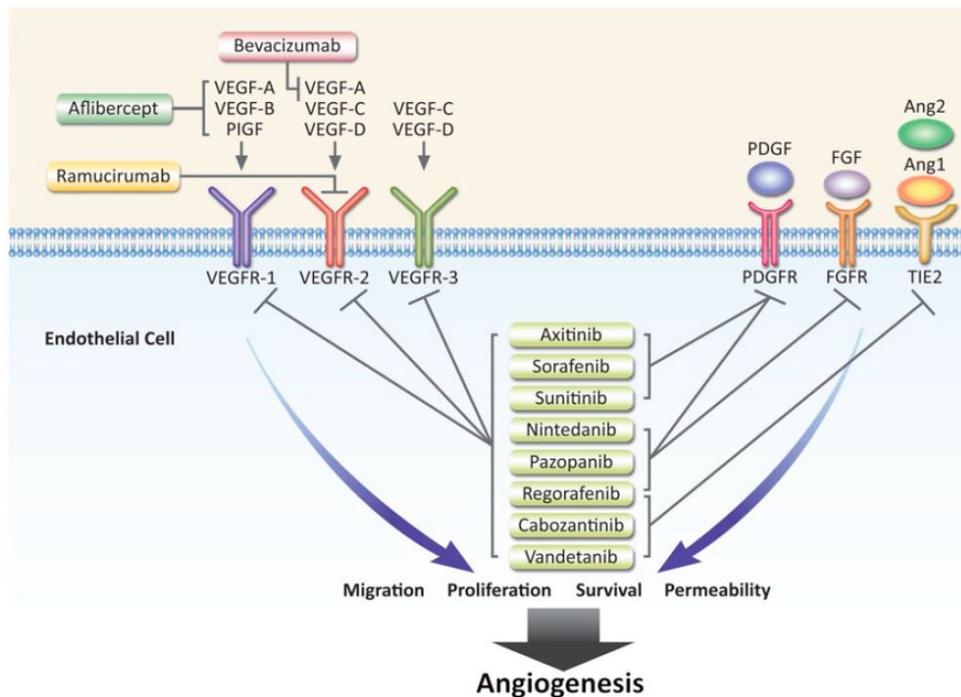


FIGURE 16 – Principales thérapies anti-angiogènes commercialisées et leurs cibles dans la signalisation de l'angiogénèse. Tiré de [27]

2.1.1 Les thérapies ayant des cibles extracellulaires

Bevacizumab (Avastin)

Le bevacizumab (Avastin) est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie à toutes les isoformes du VEGF-A et les empêche d'interagir avec leurs récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 [51] (Figure 16). C'est le premier anti-angiogène à avoir été commercialisé pour une utilisation en thérapie anti-cancéreuse [87].

Son utilisation a d'abord été approuvée pour le traitement en première ligne du cancer colorectal métastatique en association avec une chimiothérapie à base de fluoropyrimidine à la suite des résultats prometteurs de l'essai clinique de Hurwitz [88]. Son utilisation a ensuite été étendue à d'autres cancers (Tableau 3). Les indications thérapeutiques en France (Agence Européenne du Médicament, EMA) et aux Etats-Unis (*Food and Drug Administration*, FDA) sont plus ou moins similaires sauf deux différences majeures. L'utilisation du bevacizumab dans le cancer du

sein métastatique est toujours d'actualité en France mais a été arrêtée par la FDA car au vu de la balance bénéfique/risque, les effets indésirables causés par le traitement ont été jugés trop importants et son efficacité pas assez. Par ailleurs, l'utilisation du bevacizumab dans le traitement du glioblastome est autorisée par la FDA et non par l'EMA.

TABLE 3 – Cibles moléculaires et indications thérapeutiques des principales thérapies anti-angiogènes commercialisées. Abréviations : mAb : anticorps monoclonaux (*monoclonal Antibodies*); MKI : inhibiteurs de tyrosine kinase (*Multi-Kinases Inhibitors*); IMiDs : immunomodulateurs (*Immunomodulatory Derivatives*). D'après [51, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97]

Type	Thérapie	Cibles moléculaires	Indications (EMA)	Indications (FDA)
mAb	bevacizumab (Avastin, Roche)	VEGF	cancer colorectal métastatique cancer du rein métastatique cancer de l'ovaire cancer bronchique non à petites cellules	cancer du sein métastatique glioblastome
	ramucirumab (Cyramza, Lilly)	VEGFR-2	cancer gastrique avancé adénocarcinome de la jonction gastro-œsophagienne	
MKI	axitinib (Inlyta, Pfizer)	VEGFR-1, -2, -3 PDGFR- β c-kit	cancer du rein avancé	
	cabozantinib (Cometriq, Exelixis)	VEGFR-1, -2, -3 c-MET, RET, AXL c-kit, Flt-3, Tie2	cancer médullaire de la thyroïde	
	pazopanib (Votrient, gsk)	VEGFR-1, -2, -3 PDGFR- α , - β c-kit	cancer du rein avancé sarcome des tissus mous	
	sorafenib (Nexavar, Bayer)	VEGFR-1, -2, -3 PDGFR- β FGFR-1, c-kit Flt-3, raf	carcinome hépatocellulaire cancer du rein avancé carcinome thyroïdien avancé	
	sunitinib (Sutent, Pfizer)	VEGFR-1, -2, -3 PDGFR- α , - β Flt-3, c-kit CSF-1R	tumeurs stromales gastro-intestinales cancer du rein avancé ou métastatique	
	vandetanib (Caprelsa, AstraZeneca)	VEGFR-1, -2, -3 EGFR RET, Tie-2	cancer médullaire de la thyroïde	
IMiDs	thalidomide (Thalidomid) lénelidomide (Revlimid) pomalidomide (Pomalyst) (Celgene)	VEGF TNF- α TGF- β IL-6	myélome multiple	
Autres	Affibercept (Zaltrap, Sanofi)	VEGF-A VEGF-B PIGF	cancer colorectal métastatique	

TABLE 4 – Etudes cliniques ayant mené à l'autorisation de mise sur le marché du bevacizumab

Etude	Protocole	Nombre de patients traités ; total	Amélioration PFS (mois)	Amélioration OS (mois)
Cancer colorectal métastatique				
AVF2107g (phase III) 1 ^{re} ligne	bevacizumab 5 mg/kg (2 sem.) + irinotécan + 5-FU	<u>402</u> ; 813	4,4	4,7
AVF0780g (phase II) 1 ^{re} ligne	bevacizumab 5 mg/kg (2 sem.) + 5-FU/AF	<u>35</u> ; 104	3,8	4,1
E3200 (phase III) 2 ^e ligne	bevacizumab 10 mg/kg (2 sem.) + FOLFOX-4	<u>293</u> ; 585	3,0	2,2
ML18147 (phase III) 2 ^e ligne	bevacizumab 5 mg/kg (2 sem.) ou 7,5 mg/kg (3 sem.) + fluoropyrimidine/irinotécan ou oxaliplatine	<u>409</u> ; 819	1,6	1,4
Cancer du sein métastatique				
E2100 (phase III) 1 ^{re} ligne	bevacizumab 10 mg/kg (2 sem.) + paclitaxel	<u>368</u> ; 722	5,5	1,7
Cancer bronchique non à petites cellules				
E4599 (phase III) 1 ^{re} ligne	bevacizumab 15 mg/kg (3 sem.) + carboplatine ou paclitaxel	<u>434</u> ; 878	1,6	2,0
BO17704 (<i>AVAiL</i>) (phase III) 1 ^{re} ligne	bevacizumab 7,5 mg/kg (3 sem.) + cisplatine + gemcitabine	<u>345</u> ; 1043	0,6	0,5
Cancer du rein métastatique				
BO17705 (<i>AVOREN</i>) (phase III) 1 ^{re} ligne	bevacizumab 10 mg/kg (2 sem.) + IFN- α	<u>327</u> ; 649	4,8	2,0
AVF2938 (phase II) 1 ^{re} ligne	bevacizumab 10 mg/kg (2 sem.) + erlotinib	<u>51</u> ; 104	1,4	=
Cancer épithélial de l'ovaire, des trompes de Fallope ou Péritonéal primitif				
GOG-0218 (phase III) 2 ^e ligne	bevacizumab 15 mg/kg (3 sem.) + carboplatine + paclitaxel	<u>625</u> ; 1873	1,0	-1,8
BO17707 (<i>ICON7</i>) (phase III) 2 ^e ligne	bevacizumab 7,5 mg/kg (3 sem.) + carboplatine + paclitaxel	<u>764</u> ; 1528	2,4	-0,6

Bien que les utilisations du bevacizumab soient multiples, son ajout à la chimiothérapie n'apporte qu'un faible bénéfice en matière de survie globale et de survie sans progression comme

le montre le tableau 4 récapitulant les essais cliniques menés ayant participé à son autorisation de mise sur le marché en Europe. Les posologies d'administration varient de 5 mg/kg à 15 mg/kg avec des cycles se répétant toutes les 2 ou 3 semaines, en association avec différentes chimiothérapies. Dans le meilleur des cas, la survie globale des patients est améliorée de 4,7 mois pour des patients atteints de cancer colorectal métastatique et traités en première ligne avec du bevacizumab. Dans le pire des cas, la survie globale (*Overall Survival*, OS) de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, des trompes de Fallope ou péritonéal primitif est même diminuée lorsqu'elles sont traitées en deuxième ligne avec du bevacizumab. La survie sans progression (*Progression Free Survival*, PFS) de la maladie est également variable d'une étude à l'autre et d'un cancer à l'autre. Les bénéfices de l'ajout du bevacizumab aux protocoles classiques de chimiothérapie sont modérés et sont accompagnés d'effets indésirables importants (*voir la section 2.2*).

Ramucirumab (Cyramza)

Le ramucirumab (Cyramza) est un anticorps monoclonal recombinant humanisé qui se lie au domaine extracellulaire de VEGFR-2, empêchant ainsi la fixation des différentes isoformes du VEGF et la transduction du signal (Figure 16) [27, 98].

Son utilisation a été autorisée en 2014 par la FDA et en 2015 par l'EMA, en monothérapie ou en association avec du paclitaxel pour le traitement en deuxième ligne, du cancer gastrique avancé ou d'un adénocarcinome de la jonction gastro-œsophagienne. Les deux études cliniques qui ont contribué à sa mise sur le marché sont décrites dans le tableau 5 [99, 100]. L'amélioration de la survie globale des patients reste faible avec une moyenne de 2,4 mois quand le ramucirumab est associé avec le paclitaxel, et 1,4 mois en monothérapie.

TABLE 5 – Etudes cliniques ayant mené à l'autorisation de mise sur le marché du ramucirumab. D'après [99, 100]

Etude	Protocole	Nombre de patients	Amélioration PFS (mois)	Amélioration OS (mois)	Ref.
RAINBOW (phase III) 2 ^e ligne	Ramucirumab + paclitaxel	327; 655	1,5	2,4	[99]
REGARD (phase III) 2 ^e ligne	Ramucirumab monothérapie	238; 355	0,8	1,4	[100]

Aflibercept - Zaltrap

L'aflibercept est une protéine recombinante humaine qui fonctionne comme un récepteur leurre auquel se fixent VEGF-A, VEGF-B et PlGF et les empêchent ainsi de se fixer à leurs récepteurs respectifs (Figure 16).

Son utilisation est approuvée par l'EMA depuis 2013 pour le traitement en deuxième ligne du cancer colorectal métastatique en association avec une chimiothérapie (FOLFIRI (irinotécan, 5-fluorouracile, acide folinique)) chez des patients résistants ou ayant progressé après une chimiothérapie à base d'oxaliplatine. Chez ces patients, l'étude clinique de phase III ayant contribué à sa mise sur le marché démontre une amélioration de la survie sans progression et de la survie

globale de 2,2 mois et 1,4 mois, respectivement (Tableau 6). Deux autres études pour le cancer du pancréas métastatique et le cancer bronchique non à petites cellules ont montré que l'utilisation d'affibercept était plus délétère et son utilisation dans ces cancers n'est donc pas autorisée [101, 102].

TABLE 6 – Essais cliniques conduits avec l'affibercept.

Etude	Protocole	Nombre de patients	Amélioration PFS (mois)	Amélioration OS (mois)	Ref.
VENICE cancer de la prostate métastatique (phase III) 1 ^{re} ligne	Affibercept + prednisone + docetaxel	612 ; 1224	0,7	0,9	[103]
VANILLA cancer du pancréas métastatique (phase III) 1 ^{re} ligne	Affibercept + gemcitabine	271 ; 546	=	-1,3	[104]
VITAL NSCLC métastatique (phase III) 2 ^e ligne	Affibercept + docetaxel	456 ; 913	1,1	-0,3	[105]
VELOUR mCRC prétraité à l'oxaliplatine (phase III) 2 ^e ligne	Affibercept + FOLFIRI	612 ; 1226	2,2	1,4	[102]

2.1.2 Les thérapies ayant des cibles intracellulaires

Les inhibiteurs de tyrosine-kinase

Les inhibiteurs de tyrosine kinase sont des petites molécules hydrophobes pouvant traverser la membrane plasmique et dont la fonction est d'empêcher la phosphorylation et donc l'activation de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase. Ces molécules ont généralement plusieurs cibles (Figure 16 et Tableau 3) et sont donc appelés MKI (*Multi-Kinases Inhibitors*). Leurs cibles variées permettent à ces molécules d'intervenir sur différentes voies de stimulation de l'angiogenèse dans plusieurs types cellulaires. Ils ciblent tous les récepteurs VEGFR-1, -2 et -3 et ont donc une activité à la fois anti-angiogène et anti-lymphangiogène. Ils agissent également sur le recrutement des péricytes en inhibant l'activité de PDGFR et de Tie-2 [106]. Les cellules tumorales exprimant ces récepteurs sont également ciblées, ce qui génère un effet anti-tumoral.

Le tableau 7 présente une liste non exhaustive de quelques essais cliniques de phase III menés avec les MKI ainsi que leurs résultats sur la survie sans progression et sur la survie globale. Les MKI sont utilisés notamment dans le traitement des cancers qui touchent les organes à fonctions endocrines (rein, thyroïde, pancréas) et dans le sarcome des tissus mous. Ils sont administrés en monothérapie en première ligne ou en deuxième ligne et ont un impact significatif sur la survie sans progression et la survie globale des patients.

TABLE 7 – Etudes cliniques ayant mené à l’autorisation de mise sur le marché des MKI. Abréviations : aRCC : advanced renal cell carcinoma, mRCC : metastatic renal cell carcinoma, PNET : pancreatic neuroendocrine tumors, mHCC : metastatic hepatocellular carcinoma, NC : Not communicated

Type de cancer	Protocole	Nombre de patients traités ; total	Amélioration PFS (mois)	Amélioration OS (mois)	Ref.
aRCC (phase III) 2 ^e ligne	axitinib monothérapie	<u>361</u> ; 723	2,6	0,9	[107]
aRCC (phase III)	sorafenib monothérapie	<u>451</u> ; 903	2,7	3,4	[108]
aRCC et mRCC (phase III) 2 ^e ligne	cabozantinib monothérapie	<u>330</u> ; 658	3,5	4,9	[109]
mRCC (phase III) 2 ^e ligne	sunitinib monothérapie	<u>375</u> ; 750	6	4,6	[110]
mRCC (phase III)	pazopanib monothérapie	<u>290</u> ; 435	5	NC	[111]
mHCC (phase III)	sorafenib monothérapie	<u>150</u> ; 226	1,4	2,3	[112]
PNET (phase III) 2 ^e ligne	sunitinib monothérapie	<u>86</u> ; 171	6,1	NC	[113]
Cancer médullaire thyroïde (phase III) 2 ^e ligne	cabozantinib monothérapie	<u>219</u> ; 330	7,2	NC	[114]
Cancer médullaire thyroïde (phase III) 2 ^e ligne	vandetanib monothérapie	<u>231</u> ; 331	6,2	NC	[114]
Sarcome tissus mous (phase III)	pazopanib monothérapie	<u>246</u> ; 369	3	1,8	[115]

Les IMiDs

Les médicaments immunomodulateurs (IMiDs, *Immunomodulatory Derivatives*) sont des analogues du thalidomide, dérivés de l’acide glutamique, ayant des propriétés immunomodulatrices et anti-angiogènes. Ces molécules sont utilisées dans le traitement des hémopathies malignes comme le myélome multiple en association avec des glucocorticoïdes. Par exemple, l’ajout de thalidomide permet d’améliorer la survie globale et la survie sans progression des patients de 18,4 mois et 9,7 mois, respectivement [116]. En préclinique, ils sont utilisés sur des tumeurs solides pour leurs effets anti-angiogènes ([117, 118]).

L’activité anti-angiogène des IMiDs est due à la modulation des facteurs impliqués dans la stimulation de l’angiogenèse tels que VEGF, TNF- α et b-FGF. Des études *in vitro* ont montré que les IMiDs stimulent le système immunitaire en participant à l’activation des lymphocytes T et des cellules *Natural Killer*. De plus, les IMiDs démontrent une activité anti-proliférative en bloquant le cycle cellulaire en G0/G1 dans les cellules de myélome [93, 119]. Contrairement au

thalidomide, ses dérivés lénalidomide et pomalidomide ont des effets immunomodulateurs plus importants.

2.2 Effets indésirables liés à l'utilisation d'anti-angiogènes

Un équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogènes est nécessaire afin de maintenir les vaisseaux sanguins en état de quiescence. Des facteurs comme le VEGF et les angiopoïétines sont importants dans le maintien de l'intégrité vasculaire. Ainsi, l'administration d'anti-angiogènes peut avoir des conséquences sur les vaisseaux sanguins sains [120]. En effet, des études menées *in vivo* chez la souris ont montré que les vaisseaux sanguins sains régressaient sous l'effet d'un inhibiteur de la voie du VEGF [121]. Une méta-analyse effectuée sur des essais cliniques contrôlés et randomisés dans différents cas de cancers montre que comparé à une chimiothérapie seule, l'adjonction de bevacizumab augmente significativement le risque d'apparition d'effets indésirables graves, surtout lorsqu'il s'agit d'une chimiothérapie à base de taxanes et/ou de sels de platine. Dans cette méta-analyse le risque d'apparition d'effets indésirables graves varie avec le type de tumeurs mais pas avec la dose de bevacizumab [122]. Dans une autre méta-analyse, il apparaît que des doses élevées de bevacizumab contribueraient à augmenter le risque d'apparition d'effets indésirables graves [123].

Certains des effets indésirables fréquemment observés peuvent être expliqués par les conséquences de l'inhibition de la voie de signalisation VEGF/VEGFR2 (Figure 17) [124]

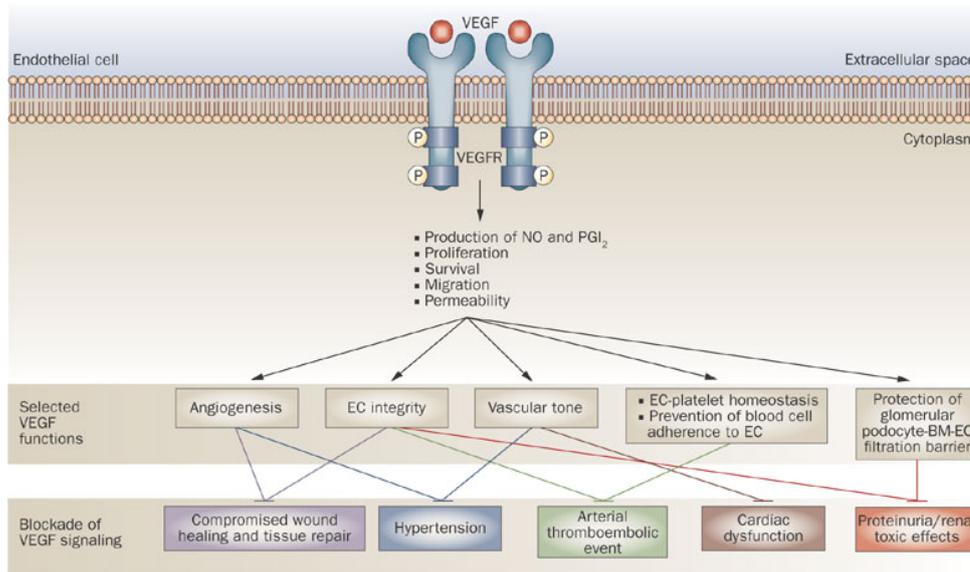


FIGURE 17 – Effets indésirables provoqués par le blocage de la voie VEGF/VEGFR-2. Tiré de [124]

L'hypertension artérielle est l'effet indésirable le plus fréquemment rapporté. L'hypertension est due d'une part à l'effet anti-vasculaire du traitement causant une diminution du nombre de vaisseaux sanguins et donc une restriction du volume de circulation, et d'autre part à la diminution de la quantité de monoxyde d'azote circulant causant ainsi une vasoconstriction [121, 125].

Le monoxyde d'azote joue également un rôle important dans la cicatrisation en assurant une réduction de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène produites et libérées lorsqu'il y a une lésion. En réduisant la quantité présente de monoxyde d'azote par la thérapie anti-angiogène, les espèces réactives de l'oxygène s'accumulent, l'inflammation dure plus longtemps et à pour conséquence d'induire un retard ou un défaut de cicatrisation [125]. La durée de circulation des anticorps monoclonaux étant assez longue (demi-vie de 20 jours pour le bevacizumab), l'administration d'anti-angiogènes ne peut pas se faire avant une opération chirurgicale [121].

De même, les événements thromboemboliques artériels et veineux sont dus à la raréfaction du monoxyde d'azote qui n'est plus présent afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire [125].

Le VEGF étant nécessaire au maintien de l'intégrité endothéliale, l'administration d'anti-VEGF peut empêcher le renouvellement endothélial normal, induire un phénotype pro-coagulant *via* l'exposition de la membrane basale et ainsi provoquer des complications hémorragiques [121].

La filtration glomérulaire peut être affectée lors de la thérapie anti-angiogène et induire une protéinurie. En effet la voie VEGF/VEGFR-2 doit être active afin de maintenir les fenestrations entre les cellules endothéliales glomérulaires pour la filtration sanguine [121, 125].

2.3 Effets des thérapies anti-angiogènes sur le réseau vasculaire tumoral et sur la croissance tumorale

La vascularisation tumorale chaotique ne favorise pas l'efficacité de la chimiothérapie ni des thérapies par rayonnements. D'une part, la pression interstitielle élevée dans le tissu tumoral réduit le passage des molécules du sang vers les tissus [78]. D'autre part, l'oxygénation du tissu tumoral est très hétérogène et de nombreuses zones d'hypoxie voire de nécrose sont présentes. Or, l'efficacité des thérapies par rayonnement dépendant de l'oxygénation du tissu, le taux de mort cellulaire dans un tissu tumoral peu oxygéné est moins important que dans un tissu bien oxygéné [126].

Dans la plupart des essais cliniques présentés précédemment, la réponse globale des patients est améliorée grâce à l'utilisation d'agents anti-angiogènes. Lorsqu'elles ont été développées, ces thérapies étaient utilisées dans le but de détruire le réseau vasculaire tumoral et ainsi de rompre l'apport en oxygène et en nutriments vers la tumeur dans l'espoir que les cellules tumorales finissent par mourir par apoptose ou nécrose et que la tumeur soit éradiquée. Cependant, au vu de l'efficacité modérée de ces thérapies, les recherches menées au cours des 15 dernières années ont permis de mieux comprendre la réponse tumorale engendrée par ces thérapies et de montrer que les vaisseaux sanguins tumoraux n'étaient pas totalement détruits (Figure 18). Au lieu de cela, l'administration d'anti-angiogènes permet de ré-équilibrer partiellement la balance entre facteurs pro- et anti-angiogènes et ainsi aboutir à un phénomène d'amélioration temporaire du réseau vasculaire. Ce phénomène a été proposé par Rakesh Jain en 2001 comme étant une "normalisation" vasculaire, au cours de laquelle les excès de vaisseaux sanguins tumoraux serait éliminé et laisserait place à un réseau vasculaire se rapprochant d'un réseau sain en termes de morphologie et de fonctionnalité [127].

Au cours de ce phénomène d'amélioration vasculaire, les vaisseaux sanguins tumoraux favorisent une circulation sanguine efficace dans la tumeur, ils sont moins perméables et permettent de mieux acheminer les médicaments de chimiothérapie dans le tissu. La circulation sanguine étant améliorée, l'oxygénation du tissu est augmentée, ce qui est en faveur des thérapies par rayonnements [128].

Tous ces effets ont été largement décrits dans la littérature et l'hypothèse de la "normalisation" est devenue un fait accepté par la communauté scientifique. Malgré cela, utiliser la "normalisation" vasculaire pour améliorer l'efficacité des autres thérapies reste encore une difficulté. Tout d'abord, il faut pouvoir savoir quand apparait le phénomène d'amélioration et pour cela il faut disposer de marqueurs fiables de la "normalisation". L'accent est également mis sur l'aspect temporaire de ce phénomène qui conduit à l'apparition de résistance thérapeutique.

Pour tenter de répondre à ces questionnement et tenter de trouver un consensus entre toutes les études précliniques et cliniques sur la définition de la "normalisation", les sections suivantes présentent les effets vasculaires mis en évidence par plusieurs équipes de recherche pour différentes thérapies anti-angiogènes administrées en monothérapie en unidose (Tableau 8) ou en multi-dose (Tableau 9).

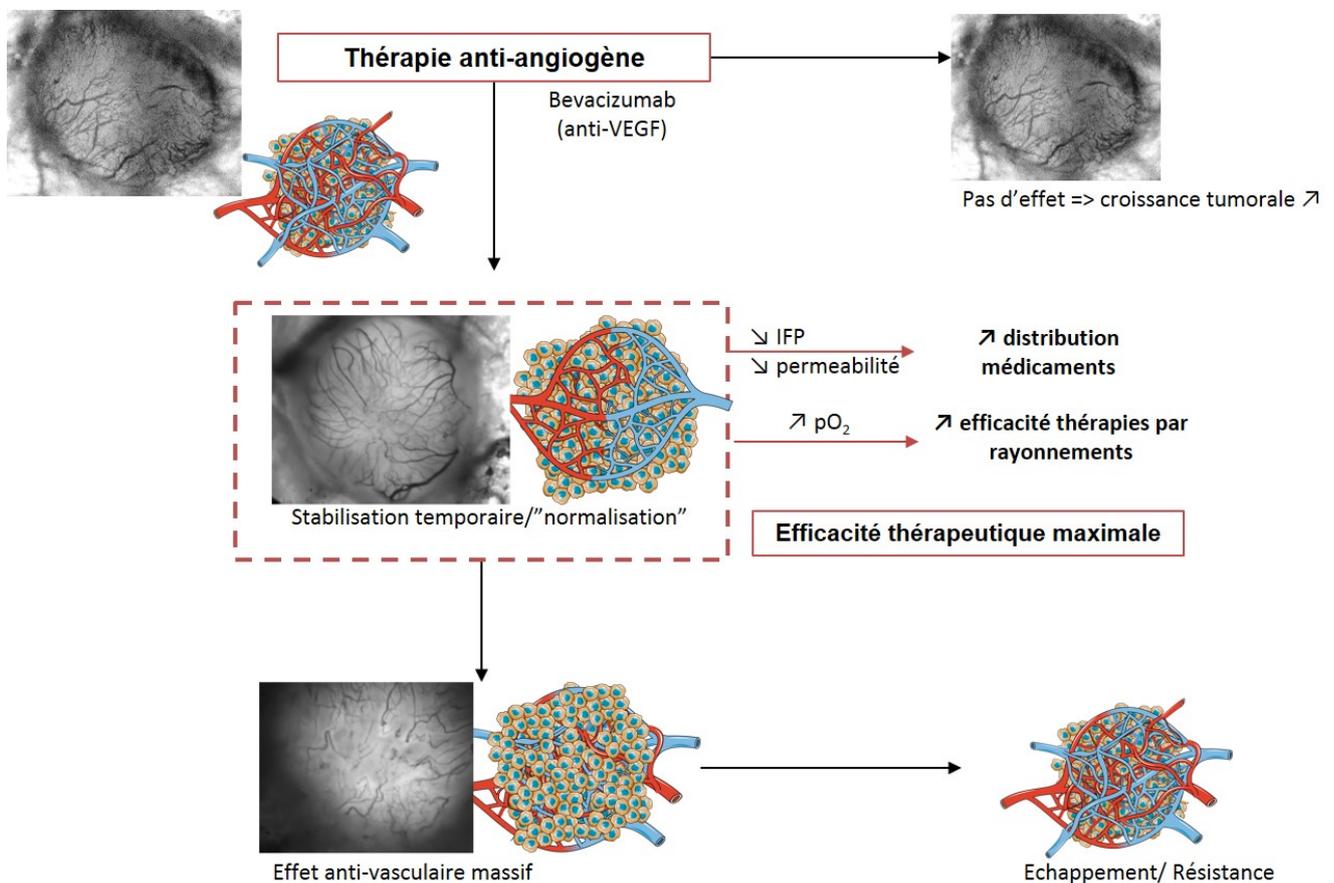


FIGURE 18 – Différents effets pouvant être causés par les thérapies anti-angiogènes sur le réseau vasculaire tumoral. Suite au traitement anti-angiogène, une période de "normalisation" vasculaire peut avoir lieu pendant laquelle la diminution de la pression interstitielle (IFP) et l'augmentation de l'oxygénation (pO₂) permettent d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la chimiothérapie ou des thérapies par rayonnements. Le prolongation de traitement anti-angiogène peut conduire à un effet anti-vasculaire massif et à l'apparition d'un phénomène d'échappement au traitement

2.3.1 Effets de la thérapie anti-angiogène sur la structure du réseau vasculaire tumoral

L'observation du réseau vasculaire tumoral au cours de la thérapie anti-angiogène montre l'impact de ces thérapies sur l'aspect des vaisseaux. Les vaisseaux apparaissent moins tortueux, moins dilatés et sont mieux distribués dans le tissu tumoral [89, 129, 130, 131, 117, 132, 133]. Cela est considéré comme étant un élément de "normalisation" vasculaire. En revanche, même si ces structures se rapprochent de la morphologie de vaisseaux normaux, une fois que la thérapie cesse, les vaisseaux sanguins reprennent leur aspect original [117, 132]. De plus, ce critère reste pour le moins subjectif et difficilement comparable d'une étude à l'autre.

Le dénombrement des vaisseaux sanguins permet de montrer que peu importe la cible de l'anti-angiogène, sa dose et sa fréquence d'administration, la densité vasculaire diminue avec le traitement à cause des effets anti-angiogène (inhibition de la formation des nouveaux vaisseaux) et anti-vasculaire (destruction des vaisseaux sanguins établis). Cependant, il n'est pas possible de déceler quand une densité vasculaire optimale est atteinte si tant est qu'une telle valeur soit définie par rapport à un réseau vasculaire sain.

Dans la littérature, la "normalisation" vasculaire est définie par une augmentation du recouvrement en péricytes des vaisseaux sanguins [128]. En effet, les péricytes représentent un élément de maturation vasculaire important [52]. Le VEGF, qui est surexprimé dans la tumeur, peut inhiber le recrutement des péricytes en induisant la formation d'un complexe entre VEGFR-2 et PDGFR- β . En bloquant la voie VEGF/VEGFR-2 grâce aux agents ciblant cette voie, le récepteur PDGFR- β serait davantage disponible pour permettre le recrutement des péricytes via PDGF-B [9]. L'étude des péricytes est à prendre en compte avec précaution car les péricytes associés aux vaisseaux tumoraux sont souvent peu connectés aux cellules endothéliales et n'assurent donc pas totalement ce rôle de stabilisation vasculaire [12, 134]. Néanmoins, plusieurs études montrent que le dénombrement des péricytes augmente [135, 136, 137, 138, 139] ou stagne [140, 129, 141] au cours du traitement de façon concomitante à la diminution de la densité vasculaire, ce qui peut conduire à des vaisseaux sanguins plus matures. Cependant, cet état de maturation est temporaire et des auteurs montrent qu'il peut être perdu au cours du traitement [135, 136].

2.3.2 Effets de la thérapie anti-angiogène sur la fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux

La fonctionnalité des vaisseaux est définie par leur capacité à délivrer le sang de façon efficace dans tout le tissu et est étudiée directement *via* leur perméabilité ou indirectement *via* leur capacité de perfusion, la pression interstitielle et l'hypoxie. Dans les études précliniques, il a été montré que lors de la thérapie anti-angiogène, l'hypoxie tissulaire diminue de façon temporaire lorsque les vaisseaux sanguins sont dans un état de "normalisation". La comparaison entre les études précliniques où l'agent anti-angiogène n'est administré qu'une seule fois [140, 141] (Tableau 8) ou plusieurs fois [118, 135, 142, 92, 96] (Tableau 9) met en évidence que la diminution de l'hypoxie dure plus longtemps lorsque la thérapie est administrée à plusieurs reprises.

D'autres études précliniques ne montrent pas de modification de l'hypoxie sous l'effet du traitement [143, 132] ou montrent au contraire que le traitement induit une hypoxie [144, 145].

TABLE 8 – Modification de la morphologie et de la fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral traité avec des doses uniques de thérapie anti-angiogène dans les études précliniques. DC101 : Anticorps anti-VEGFR-2, IHC : Immunohistochimie, HP : Hypoxyprobe, CAIX : Carbonic Anhydrase IX, vWF : facteur de von Willebrand, α -SMA : actine du muscle lisse. D’après [136, 141, 140, 129, 130, 133, 97]

Target	Tumor graft model	Anti-angiogenic therapy	Posology	Days of "analysis"	Vascular morphology	Vascular density	Pericyte coverage	Hypoxia	Permeability	Perfusion	IFP	Tumor growth delay (vs controls)	
VEGF	Colorectal (Colo-205 cells; ectopic)	Bevacizumab	5 mg/kg D0	D2; D4; D6	-	\ D4 (IHC, vWF)	\ D6 (IHC, α -SMA)	\ D4 (IHC, HP)	-	-	-	No	
	Glioblastoma (U87 cells; orthotopic)		200 μ g (\approx 10 mg/kg) D0	D0; D2; D5	-	\ D5 (IHC, CD34)	-	\ D2, \ D5 (IHC, HP)	-	-	-	No	
	Rhabdomyosarcoma (RMS cells; orthotopic)		200 μ g (\approx 10 mg/kg) D0	D0; D2; D5; D10	-	\ D2; D6; D10 (IHC, CD34)	\ D5 (IHC, α -SMA)	\ D5 (in vivo, O ₂ probe)	\ D5; D10 (IHC, Evans blue)	-	-	-	Yes
	Neuroblastoma (NB-1691 cells; ectopic)		200 μ g (\approx 10 mg/kg) D0	D1; D3; D7	Normal-like structure, close to that of skin (in vivo, intravital microscopy)	\ D1; D3; D7 (IHC, CD34)	\ D1; D3; D7 (IHC, α -SMA)	-	\ D1; D3; D7 (IHC, Evans blue)	\ D1; D3 (in vivo, ultrasonography)	\ D1; D3; D7 (in vivo, Wick-in-needle)	-	No
	Breast (KPL-4 cells; orthotopic)		10 mg/kg D0	D1; D3; D7	Homogenous vessel architecture (ex vivo, ultramicroscopy)	\ D1; D3; D7 (ex vivo, ultramicroscopy)	-	-	-	\	-	-	No
	Various tumor models (ectopic)		40 mg/kg D0	D3	Homogenous vessel size, reduced tortuosity and diameter (in vivo, intravital microscopy)	\ D3 (IHC, collagen IV)	\ D3 (IHC, α -SMA)	-	\ D3 (in vivo, intravital microscopy)	-	-	\ D3 (in vivo, Wick-in-needle)	-
Other	Colorectal (Colon-26 cells; ectopic)	Semaxanib	5 mg/kg D0	D1	-	\ D1 (IHC, CD31)	\ D1 (IHC, α -SMA)	\ D1 (IHC, CAIX)	-	-	-	No	

Single dose of anti-angiogenic

2.3. Effets des thérapies anti-angiogènes sur le réseau vasculaire tumoral et sur la croissance tumorale

TABLE 9 – Modification de la morphologie et de la fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral traité avec des doses multiples de thérapie anti-angiogène dans les études précliniques. DC101 : anticorps anti-VEGFR-2, 9F1 : anticorps anti-CD146, IHC : Immunohistochimie, HP : Hypoxyprobe, CAIX : Carbonic Anhydrase IX, vWF : facteur de von Willebrand, α -SMA : actine du muscle lisse. D'après [143, 146, 147, 132, 131, 96, 142, 89, 92, 135, 117, 118]

Target	Tumor graft model	Anti-angiogenic therapy	Posology	Days of "analysis"	Vascular morphology	Vascular density	Pericyte coverage	Hypoxia	Permeability	Perfusion	Tumor growth delay (vs controls)	
VEGFR	Colorectal (bevacizumab sensitive LS174T cells; ectopic) 0.4 - 0.6 cm diameter	Bevacizumab	5 mg/kg D0-D10 (2x /w)	D10	-	\ D10 (IHC, 9F1)	-	\ D10 (IHC, HP) \ D10 (IHC, CAIX and GluT1)	-	\ D10 (IHC, Hoechst 33342)	Yes	
	Ovarian (SKOV-3 cells; ectopic)		5 mg/kg D0; D3; D6	D7	No effect (IHC, vWF)	\ D7 (IHC, vWF)	\ D7 (IHC, α -SMA)	-	-	-	No	
	Colorectal (HT-29 cells; ectopic) 200-300 mm ²		200 μ g (=10 mg/kg) D0; D4	D7	-	\ D7 (IHC, CD34, CD105)	\ D7 (IHC, Hoechst 33342)	-	-	-	Yes	
	Epidermis (A-431 cells; ectopic) 100 mm ³		20 mg/kg D1; D4; D11; D18	D0; D7; D14; D21	Evenly distributed, regularly shaped vessels (IHC, CD31)	\ D7; D14 (IHC, CD31)	-	-	\ (IHC, CAIX)	-	Yes: D7; D14 Regrowth: D21	
VEGFR mAb	Spontaneous murine mammary carcinoma (orthotopic) 4 - 5 mm diameter	DC101	10 mg/kg D0; D3; D6; D9	D11	More homogeneous distribution of functional tumor vessels (<i>in vivo</i> , intravital microscopy)	\ D11 (IHC, CD31)	\ D11 (IHC, NG2)	\ D11 (IHC, HP)	-	\ D11 (IHC, Hoechst 33342)	No	
	Glioblastoma (U87 cells; orthotopic) 2 - 2.5 mm diameter		40 mg/kg D0; D3; D6	D-1; D1; D2; D5; D8	Reduced basement membrane thickness (IHC, collagen IV)	\ D5; D8 (IHC, MPLSM angiography)	\ D2; D5 (IHC, NG2)	\ D2; D5 (IHC, HP)	\ (MPLSM, angiography)	-	No	
	Mo squamous cell carcinoma (SCOVII cells; ectopic)		50 mg/kg daily	D2; D4; D7	-	\ D4 (<i>in vivo</i> , MRI)	-	-	\ D2; D4 (<i>in vivo</i> , EPR Oximetry)	-	\ D4; D7 (Gd uptake, DOE MRI)	Yes
	Hu pancreatic adenocarcinoma 6 - 10 days post tumor implantation (MiaPaCa-2 cells; ectopic)		75 mg/kg daily	D0; D4; D8; D18	Reduced tortuosity (IHC, CD31)	-	\ D4 (IHC, α -SMA)	-	-	\ D4 (IF, FITC dextran)	-	-
VEGFR IMKI	Transplantable liver model. Fibrosarcoma (ectopic)	Sorafenib	45 mg/kg daily	D1; D2; D3	-	\ D2 (IHC, CD105)	-	\ D1; D2; D3 (<i>in vivo</i> , EPR Oximetry)	-	\ D2 (IHC, Hoechst 33342)	No	
	Nasopharyngeal (CNE-2 tumor; ectopic) 100 mm ³		20 mg/kg D1-D10	D1; D5; D7; D9	D9: Less tortuous, less irregular, uniform caliber, fewer branches and sprouts (IHC, CD31)	\ D5; D7; D9 (IF, CD31)	\ D5; D9 (IF, NG2)	\ D1; D5 (IF, HP)	-	-	No	
	Nasopharyngeal (5-8F tumor; ectopic) 100 mm ³			D1; D3; D5; D7	-	\ D3; D5; D7 (IF, CD31)	\ D5; D7 (IF, NG2)	\ D1; D3 (IF, HP)	-	-	-	
	Hamster squamous cell carcinoma (tumor induction in cheek pouch)		200 mg/kg D0; D1	D2	D2: Narrow and straightened blood vessels (<i>in vivo</i> , light microscopy)	\ D2 (IHC, Factor VIII and vWF)	-	-	-	\ D2 (IHC, Evans blue)	-	-
Other	Mouse hepatocarcinoma (ectopic) 8 \pm 1 mm	Thalidomide	200 mg/kg daily	D0; D1; D2; D3; D4	-	-	-	\ D2; D3 (IHC, EPR Oximetry)	-	-	-	

Le moment où les tumeurs sont étudiées peut induire des biais dans l'étude, la ré-oxygénation étant temporaire, elle peut passer inaperçue sans un suivi régulier. Heijmen *et al.*, montrent que l'effet sur l'hypoxie dépend aussi du type de marqueur ou de rapporteur de l'hypoxie utilisé. En effet, les rapporteurs de l'hypoxie Glut-1 (transporteur du glucose) et CA-IX (*Carbonic Anhydrase IX*) étudiés sur coupes immunohistochimiques montrent une augmentation de l'hypoxie alors qu'un marquage au pimonidazole ne le montre pas [143]. Ces études soulignent parfaitement la difficulté technique de mettre en évidence un phénomène de "normalisation" vasculaire.

Le rétablissement de l'hypoxie à la fin du traitement peut être dû à l'apparition d'un phénomène de résistance au traitement où les vaisseaux reprennent une morphologie typiquement tumorale, ou à une destruction massive des vaisseaux ne permettant donc pas d'irriguer tout le tissu [148] (*voir la section 2.4*).

La diminution de l'hypoxie est corrélée à la capacité des vaisseaux sanguins à établir une circulation fonctionnelle dans la tumeur permettant à tout le tissu d'être perfusé. Il est primordial pour arriver à ce résultat, que les vaisseaux sanguins ne soient pas perméables. L'excès de VEGF dans la tumeur rend les vaisseaux perméables, les jonctions VE-cadhérines entre les cellules endothéliales sont peu établies et responsables de fuites vasculaires dans le tissu tumoral. Le blocage de la signalisation VEGF/VEGFR-2 permet de restaurer la barrière endothéliales en recréant des jonctions VE-cadherines entre les cellules endothéliales et empêchant ainsi la sortie de plasma et de macromolécules [149]. En effet, plusieurs études ont montré que la perméabilité des vaisseaux sanguins est réduite grâce à la thérapie anti-angiogène qu'elle soit administrée de façon unique ou à plusieurs reprises, menant ainsi à une diminution de la pression interstitielle et donc à une meilleure perfusion [89, 129, 117, 140, 133, 96].

Par ailleurs, l'absence d'un réseau lymphatique fonctionnel participe à maintenir une pression interstitielle élevée dans le tissu [150]. Le réseau lymphatique reste peu étudié dans les tumeurs et encore moins au cours des thérapies anti-angiogènes. Cependant, la surexpression de VEGF-C au cours du traitement par bevacizumab peut induire un phénomène de lymphangiogenèse dans la tumeur [151] et contribuer à la croissance et à la dissémination tumorale.

2.3.3 Effets de la thérapie anti-angiogène sur la croissance tumorale

La plupart des études montrent que la thérapie anti-angiogène inhibe la croissance tumorale par comparaison à des tumeurs non traitées, mais c'est un effet temporaire suivi d'une reprise de croissance. Cet effet est plus prononcé lorsque des doses multiples sont administrées [147, 132, 142, 143] que lorsque le traitement n'a été administré qu'une seule fois [140]. Rylova *et al.* ont montré à ce sujet que lorsque le traitement administré en monothérapie en doses multiples est poursuivi, les tumeurs continuent de proliférer [132].

L'arrêt d'une thérapie anti-angiogène est également néfaste et pourrait exacerber la réponse tumorale. En effet, des mécanismes ont été proposés par lesquels la croissance vasculaire pouvait reprendre rapidement dès l'arrêt du traitement. Les membranes basales et péricytes restant à la suite du traitement pourraient servir à l'élaboration plus rapide de néovaisseaux. De plus, lorsque la thérapie anti-angiogène est stoppée, les vaisseaux sanguins reprennent une morphologie et une fonctionnalité typiques de celles de vaisseaux sanguins tumoraux [117, 134, 152, 153, 154]. Ces phénomènes pourraient être la conséquence d'une augmentation des taux de VEGF plasmatique

2.3.4 Association des thérapies anti-angiogènes avec des thérapies conventionnelles

L'utilisation de la thérapie anti-angiogène pour améliorer la fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral dans le but d'optimiser l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie est une stratégie thérapeutique de plus en plus étudiée étant donné son potentiel à améliorer la distribution de la chimiothérapie et de l'oxygène dans le tissu tumoral.

En préclinique

Plusieurs études précliniques ont montré que l'utilisation de la thérapie anti-angiogène administrée en pré-traitement permettait d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie dans différents types de modèles tumoraux (Tableau 10).

Pour faire ces associations, les auteurs se basent généralement sur un ou plusieurs paramètres référant au caractère "normalisé" du réseau vasculaire. Ce sont le plus souvent des paramètres de fonctionnalité tels que l'oxygénation tissulaire, la perméabilité ou la perfusion. La croissance tumorale est le plus souvent le paramètre suivi pour évaluer l'efficacité de l'association des deux thérapies.

Pour tous les agents anti-angiogènes listés dans le tableau 10, lorsque la radiothérapie est effectuée pendant la période de "normalisation", un délai de croissance tumorale est observé et ce quelque soit le type de tumeur et la dose de radiothérapie [141, 140, 92, 96, 135, 90].

En ce qui concerne les agents de chimiothérapie, leur administration pendant la période de "normalisation" augmente leur disponibilité intra-tumorale et favorise ainsi l'effet cytotoxique [136, 129, 97, 147, 118].

En revanche, deux études précliniques où le bevacizumab a été utilisé pour améliorer la distribution du trastuzumab dans des tumeurs du sein ou de l'ovaire n'ont pas été concluantes [130, 146]. Les auteurs émettent l'hypothèse que la taille imposante de l'anticorps trastuzumab ne permet pas son accumulation dans la tumeur de la même façon qu'une molécule de chimiothérapie. De même, Goldwirt *et al.* ont montré dans des tumeurs cérébrales chez la souris, que la distribution de l'irinotécan et du témozolomide n'était pas améliorée lorsqu'ils étaient administrés seuls ou après une injection de bevacizumab [155].

En clinique

Peu d'essais cliniques ont été conduits de la même façon que les études précliniques présentées en recherchant les paramètres de "normalisation". Une des limites dans la recherche de marqueurs de réponse aux anti-angiogènes chez les patients est que souvent dans les protocoles cliniques, ils reçoivent les anti-angiogènes en combinaison avec de la chimiothérapie ou de la radiothérapie. Ces thérapies peuvent aussi avoir un effet anti-vasculaire en détruisant les cellules endothéliales, ce qui peut entraîner des biais dans l'analyse des résultats.

TABLE 10 – Protocoles d'association des thérapies anti-angiogènes avec radiothérapie, des agents de chimiothérapie ou des thérapies ciblées en préclinique. D'après [141, 140, 92, 96, 135, 90, 136, 129, 97, 147, 118, 130, 146, 131]

Treatment protocol		Tumor model	Parameters in favor of a normalization	Results
D0 bevacizumab 200 µg (≈10 mg/kg)	D2 radiotherapy 10 Gy (0,76 Gy/min)	Glioblastoma (orthotopic)	O ₂	Tumor growth delay
D0 bevacizumab 200 µg (≈10 mg/kg)	D5 radiotherapy 4 Gy	Rabdomyosarcoma (orthotopic)	O ₂ Permeability	Tumor growth delay
D1; D2 sorafenib 45 mg/kg	D3 radiotherapy 20 Gy	Fibrosarcoma (intramuscular)	O ₂	Tumor growth delay
D0; D3; D6 DC101 40 mg/kg	D4 radiotherapy 7 Gy (4,6 Gy/min)	Glioblastoma (orthotopic)	O ₂ Pericytes	Tumor growth delay
D0-D10 endostar 20 mg/kg	D5 radiotherapy 6 Gy (1 Gy/min)	Nasopharyngeal carcinoma (CNE-2) (ectopic)	O ₂ Pericytes	Tumor growth delay
D0-D14 sunitinib 30 mg/kg	D15 radiotherapy 8 Gy (200 cGy/min)	Breast cancer (ectopic)	?	Tumor growth delay (greater when sunitinib is maintained after radiotherapy)
D0 bevacizumab 5 mg/kg	D4 irinotecan 100 mg/kg	Colorectal cancer (ectopic)	O ₂ Pericytes	Better drug delivery in tumor and efficient cytotoxic effect
D0 bevacizumab 200 µg (≈10 mg/kg)	D3 topotecan 1 mg/kg	Neuroblastoma (ectopic)	Permeability Perfusion IFP	Tumor growth delay Increased tumor penetration at day 3
D0 semaxanib 5 mg/kg	D1 paclitaxel 1 mg/kg	Colon carcinoma (ectopic)	O ₂	Tumor growth delay Increased paclitaxel intratumoral distribution
D0; D4 bevacizumab 200 µg (≈10 mg/kg)	D7 irinotecan 100 mg/kg	Colorectal cancer (ectopic.)	Perfusion	Increased intratumoral availability of irinotecan
D1; D2 thalidomide 200 mg/kg	D3 cyclophosphamide 50 mg/kg	Hepatocarcinoma (intramuscular)	O ₂	Tumor growth delay Increased delivery of the active metabolite of cyclophosphamide in tumors
D0 bevacizumab 10 mg/kg	D1; D3 or D7 trastuzumab 2 mg/kg	Breast cancer (orthotopic)	Vascular density and morphology	No effect on tumor growth Less uptake of trastuzumab
D13; D16; D19 bevacizumab 5 mg/kg	D0; D14 trastuzumab 100 µg	Ovarian cancer	Pericytes	No effect on tumor growth Less uptake of trastuzumab
D13; D16; D19; D22 DC101 10 mg/kg	D7; D9; D12; D14 mitomycin C	Breast cancer (orthotopic)	O ₂ Pericytes Perfusion	Tumor growth delay

Quelques études ont été menées avec pour objet de rechercher les paramètres de "normalisation" chez les patients. Ce sont surtout des paramètres de fonctionnalité vasculaire qui sont étudiés. L'étude préliminaire de Willett *et al.* montre que le bevacizumab a des effets "normalisants" sur la densité vasculaire, le recouvrement en péricytes et sur la pression interstitielle mais la perméabilité vasculaire n'est pas modifiée [139, 138, 137]. Dans les études menées par Heist *et al.* et par Wedam *et al.*, l'efficacité de la chimiothérapie a été améliorée grâce à l'administration de bevacizumab. Dans ces études le bevacizumab est poursuivi après le début de la chimiothérapie, ce qui permet de conserver ses effets [156, 157].

Chen *et al.* ont comparé par IRM l'état de "normalisation" des vaisseaux 1h et 24h après

l'administration de bevacizumab. Dans les protocoles courants, la chimiothérapie est administrée 1h après le bevacizumab. Cette étude suggère que le bevacizumab apporte un bénéfice thérapeutique après 1h mais que ce bénéfice est plus important au bout de 24h [158]. De même, Chen *et al.* suggèrent que la fenêtre de "normalisation" efficace après l'administration de bevacizumab se situerait 20h à 24h après son administration [159].

De même que dans les études précliniques, en clinique la thérapie anti-angiogène n'est pas favorable à une association avec des thérapies à base d'anticorps. En effet l'addition du cetuximab (anti-EGFR) ou du panitumumab (anti-EGFR) de façon concomitante au bevacizumab et à une chimiothérapie est plus délétère pour les patients. Leur survie sans progression est améliorée mais pas la survie globale et les effets indésirables sont plus importants et plus délétères [160, 161].

Une récente étude de la littérature conduite par Falk *et al.* se focalise principalement sur les doses de bevacizumab utilisées dans les études précliniques et dans les essais cliniques et soulève des points importants. L'expression de VEGF diffère d'une tumeur à l'autre et les effets du bevacizumab vont donc en dépendre, pourtant ce critère n'est pas pris en compte dans le choix de la posologie. De plus, il n'existe aucun consensus concernant la dose idéale et la durée idéale de bevacizumab à appliquer. Les patients sont traités avec des doses avoisinant les doses maximales tolérées alors qu'il a été démontré que des effets anti-angiogènes sont détectables à de faibles doses (0,3 mg/kg) [162].

Dans les études précliniques citées ici, le phénomène de "normalisation" vasculaire est approuvé mais il est impossible de ressortir de ces études un type de thérapie, une dose et une fréquence d'administration idéales pour aboutir à ce phénomène. En fonction du type d'agent anti-angiogène administré, la durée des effets de la "normalisation" diffère. Le type de tumeur pourrait également avoir une influence sur ces résultats. Les effets des anti-VEGF surviennent plus tard que les inhibiteurs de tyrosine kinase ou que l'anti-VEGFR-2 mais ils sont plus persistant dans le temps (Tableaux 8 et 9).

2.4 Les marqueurs de réponse aux thérapies anti-angiogènes : entre "normalisation" et résistance

Les bénéfices thérapeutiques en matière de survie des patients apportés par la thérapie anti-angiogène sont limités et souvent de courte durée. Malgré les effets bénéfiques qu'ont montré les thérapies anti-angiogènes, en dépit des effets indésirables, la réponse varie en fonction du type de cancer et en fonction des patients. Il existe des patients "répondeurs" chez qui la thérapie aura les effets escomptés mais la réponse ne sera que temporaire car ils finissent par devenir résistants au traitement. Il y a en revanche des patients d'ores et déjà résistants au traitement et sont donc "non-répondeurs" [163, 164]. Cela peut être expliqué par le fait que la tumeur et son microenvironnement mettent en jeu des mécanismes et voies de signalisation permettant de surpasser le blocage par les thérapies anti-angiogènes ciblant la voie VEGF/VEGF-R. Il arrive alors un phénomène d'échappement voire de résistance à la thérapie (Figure 18). Afin d'utiliser au mieux ces thérapies et d'éviter d'induire un échappement ou une résistance, des travaux sont effectués par plusieurs équipes à différentes échelles et dans différentes disciplines pour rechercher des marqueurs de la réponse tumorale à la thérapie anti-angiogène et optimiser au mieux leur utilisation.

2.4.1 Mise en évidence de marqueurs de réponse au moyen des méthodes d'imagerie

L'imagerie est un moyen de mettre en évidence des marqueurs de réponse aux thérapies anti-angiogènes.

Piludu *et al.* montrent que chez des patients ayant un glioblastome, le suivi du volume tumoral total mesuré par IRM (images pondérées en T1) au début du traitement par bevacizumab peut être un facteur prédictif de la survie globale [165].

A l'aide de l'échographie en Doppler (DCE-US, *Dynamic Contrast Enhanced Ultrasonography*), il est possible de mettre en évidence plusieurs paramètres en relation avec le flux sanguin dont le MTT (*Mean Transit Time*, temps de transit moyen) correspondant au temps nécessaire aux hématies pour parcourir un volume déterminé de circulation capillaire. Chez des patients atteints de cancers métastatiques traités au bevacizumab, le MTT est corrélé à une progression tumorale plus tardive [166].

Sorensen *et al.* proposent un index de normalisation vasculaire pour prédire la normalisation chez les patients (*Vascular Normalization Index*, VNI) qui est calculé en utilisant la perméabilité (K^{trans} , constante de transfert du produit de contraste injecté depuis le plasma vers l'espace extravasculaire tumoral), le volume sanguin (*Cerebral Blood Volume*) et le collagène IV circulant. Les changements précoces du VNI dès le début de la thérapie sont corrélés avec la survie sans progression et la survie globale de patients ayant un glioblastome et étant traités avec cediranib [167].

Plusieurs équipes de recherche montrent que la thérapie anti-angiogène a un effet anti-tumoral. Cependant c'est souvent une réponse temporaire dans le sens où ce sont plutôt des délais de croissance qui sont observés. Cela pourrait être dû à la destruction des cellules tumorales sensibles lors de la réponse au traitement, mais qui permettrait la sélection de cellules chimio- et radio-résistantes [164].

2.4.2 Les facteurs de croissance

Au fur et à mesure de la croissance, les cellules tumorales produisent et libèrent de nombreux facteurs pro-angiogènes (Figure 7) et contribuent ainsi à la stimulation continue de l'angiogenèse et de la prolifération tumorale. En inhibant une voie de signalisation particulière, la thérapie anti-angiogène favorise l'expression d'autres molécules impliquées dans la stimulation de l'angiogenèse en dehors de la voie VEGF/VEGFR-2 pouvant ainsi compenser les effets des anti-VEGF et anti-VEGFR-2 : EGF, FGF, TGF, Ang, VEGF-C, VEGF-D, PlGF, IL-8, IL-6 et SDF-1. La proportion de production de ces facteurs dépend de l'hétérogénéité tumorale, du type de tumeur et du type d'anti-angiogène utilisé. Gaustad *et al.* montrent l'importance de l'hétérogénéité tumorale dans la réponse au bevacizumab dans deux modèles précliniques de mélanome, l'un surexprimant VEGF-A davantage que l'autre. Leurs observations en IRM démontrent que le bevacizumab a un effet anti-vasculaire plus important dans les régions où VEGF-A est surexprimée et l'angiogenèse est très stimulée [168]. Cela ne facilite pas l'identification d'un marqueur du processus de réponse à la thérapie anti-angiogène. Ces facteurs peuvent être des marqueurs potentiels d'échappement ou de résistance [169, 170, 171].

Duda *et al.* ont rapporté dans une revue de la littérature différentes molécules pouvant permettre d'établir un pronostic ou de prédire un état de résistance. A titre d'exemples, une forte

concentration de sVEGFR-1 dans le sang avant thérapie peut démontrer une résistance intrinsèque aux anti-VEGF [172]. En revanche, les patients chez qui la thérapie anti-angiogène est efficace montrent une augmentation du collagène IV circulant [167]. La surexpression du PIGF dans la tumeur serait corrélée avec la "normalisation" des vaisseaux sanguins et à une croissance tumorale diminuée [173]. Concernant le VEGF, une augmentation de sa concentration plasmatique circulante indiquerait un pronostic défavorable. Hayashi *et al.* ont montré que lors de l'association bevacizumab-chimiothérapie chez des patients ayant un cancer colorectal métastatique, la concentration de VEGF plasmatique diminue dès le début du traitement mais augmente chez les patients non-répondeurs. Cela suggèrent donc le VEGF comme un potentiel marqueur prédictif [169, 174]. Sachant que le bevacizumab se lie à toutes les isoformes du VEGF-A, D'Alessandris *et al.* suggèrent que chez des patients ayant des plus faibles concentrations de VEGF-A₁₂₁ et VEGF total circulants, davantage de bevacizumab serait disponible pour cibler le VEGF-A₁₆₅ [175]. L'IL-8 pourrait jouer un rôle dans la résistance intrinsèque aux thérapies mais aussi dans la résistance acquise lors de réponses inflammatoires en favorisant le recrutement de cellules myéloïdes pro-angiogènes (CD11⁺b) [171].

Les isoformes pro- et anti-angiogènes du VEGF-A sont importantes dans la réponse au traitement. En effet, le bevacizumab se lie avec la même affinité aux deux isoformes du VEGF-A_{xxx} et si la forme anti-angiogène est majoritairement exprimée, cela pourrait contrebalancer les effets du bevacizumab [29]. A ce sujet, il a été montré chez des patients ayant un cancer colorectal métastatique, qu'un plus faible taux de VEGF-A_{xxx}b par rapport au VEGF-A_{xxx}a est corrélé avec une amélioration de la survie sans progression [176].

2.4.3 Recrutement de cellules pour favoriser la croissance vasculaire et tumorale

Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la résistance. En conditions hypoxiques, il y a une augmentation du recrutement de cellules issues de la moelle osseuse qui sont des progéniteurs (endothéliaux ou précurseurs de péricytes) ou des cellules pouvant moduler l'angiogenèse (cellules myéloïdes CD11⁺b, fibroblastes associés au cancer) [173]. Ce recrutement est stimulé par différents facteurs dont SDF-1, IL-8, PIGF, FGF, VEGF. Les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques) ont un rôle immunosuppresseur et favorisent la prolifération tumorale. Elles sont d'avantage recrutées dans les tumeurs résistantes au traitement par rapport à celles qui y sont sensibles. Les macrophages associés au cancer recrutés au sein de la tumeur libèrent des MMPs et favorisent ainsi la libération de facteurs pro-angiogènes séquestrés dans la matrice extracellulaire [171]. De plus, l'acidité induite par l'hypoxie favoriserait le remodelage de la matrice extracellulaire et la résistance à l'apoptose [173]. Chez des patients atteints de glioblastome récidivant, le dosage de la MMP-2 pourrait permettre de sélectionner les patients susceptibles de mieux répondre au traitement. En effet, une forte concentration de MMP-2 et une faible concentration de MMP-9 dans le sang avant traitement par bevacizumab sont associées à un meilleur taux de réponse et à une augmentation de la PFS et de l'OS. De plus, le dosage de la MMP-2 pourrait être utilisé comme marqueur du suivi de la réponse au traitement car sa concentration plasmatique diminue lors de la progression de la maladie [177].

L'augmentation du recouvrement des capillaires par les péricytes lorsqu'une thérapie anti-angiogène est administrée est synonyme de maturation vasculaire et comme le montrent plusieurs auteurs, cela pourrait également être un synonyme de "normalisation". Or, cela pourrait aussi être un moyen de protection des cellules endothéliales contre la thérapie anti-angiogène et donc un

mécanisme de résistance [171] car les péricytes peuvent activer des voies de signalisation médiées par PDGFR pouvant compenser l'inhibition de la voie VEGF/VEGFR-2 [178]. Le recrutement des péricytes nécessite l'activation de la voie de signalisation du PDGF qui est également impliquée dans la stimulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse et pourrait favoriser les processus de métastase [27].

2.4.4 Augmentation des capacités métastatiques

La thérapie anti-angiogène induisant une destruction des vaisseaux sanguins est responsable de la création de zones d'hypoxie tissulaire qui peuvent favoriser la sélection de sous-populations moins sensibles à l'hypoxie et ayant un profil métastatique dû à des capacités d'invasion et de migration plus importantes [173, 164]. L'augmentation du caractère invasif des tumeurs est lié à l'hypoxie où HIF-1 α favorise la transition épithélio-mésenchymateuse [171]. Certaines études précliniques et cliniques montrent également qu'à la suite de l'arrêt d'une thérapie anti-VEGF dans des cas de glioblastomes, les tumeurs deviennent plus invasives. Cela pourrait être corrélé avec l'efficacité avec laquelle la voie VEGF/VEGFR-2 est inhibée [179, 145]. De plus, les protéines ayant un domaine PHD (*prolyl-hydroxylase domain*) sensible à l'oxygène seraient impliquées dans la "normalisation" du réseau vasculaire mais également dans l'acquisition d'un phénotype plus agressif après la thérapie anti-angiogène [173].

Chapitre 3

La thérapie photodynamique

Sommaire

3.1 Principe	45
3.2 Facteurs qui affectent l'efficacité de la PDT	46
3.2.1 Le photosensibilisateur et sa localisation	47
3.2.2 Les espèces réactives de l'oxygène	47
3.3 Effets vasculaires et cellulaires de la PDT	48
3.3.1 Impact sur les cellules tumorales	49
3.3.2 Impact sur la vascularisation	49
3.3.3 Impact sur l'inflammation et l'immunité	49
3.4 La thérapie photodynamique appliquée au cancer	50
3.4.1 Cancers concernés	50
3.4.2 La thérapie photodynamique en association à la thérapie anti-angiogène	51

3.1 Principe

La thérapie photodynamique (*PhotoDynamic Therapy*, PDT) est une modalité thérapeutique utilisée en dermatologie et en clinique pour le traitement de lésions cutanées superficielles et en ophtalmologie pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge [180]. La PDT est d'ores et déjà utilisée en deuxième ligne dans le traitement de certains cancers et de nombreuses études précliniques visent à optimiser les conditions de son utilisation [181].

L'activité cytotoxique de la PDT repose sur la présence simultanée de trois composants : un photosensibilisateur (PS) ou un précurseur de ce dernier, sensible à la lumière (rayonnements non ionisants), une source de lumière et de l'oxygène qui pris séparément n'ont pas d'action cytotoxique ciblée mais qui une fois réunis, résultent en la formation d'espèces réactives de l'oxygène suite à des réactions de photo-oxydation entre le PS et l'oxygène du milieu après son activation locale par une lumière à une longueur d'onde spécifique du spectre d'absorption du PS [182].

Le PS est administré le plus souvent de manière topique ou systémique et s'accumule, dans des délais de quelques heures à trois jours, avec différents degrés de sélectivité, dans les tissus à traiter. Dans le cas de la PDT appliquée aux tumeurs, le PS inactif est injecté par voie veineuse et après un temps appelé l'Intervalle Drogue Lumière (IDL), intervalle pendant lequel le PS est distribué dans l'organisme, la tumeur est irradiée par une lumière de faible intensité activant

ainsi le PS. Le diagramme de Jablonski présenté en figure 19 décrit ce phénomène. A l'état fondamental, les électrons du PS sont dans un état de basse énergie (état singulet S_0) et passent à un état excité (S_1) suite à l'absorption d'un photon par le PS après irradiation. Dans cet état excité, il peut retourner à son état fondamental stable S_0 en émettant un photon de fluorescence par conversion interne. Lors de sa désexcitation, il peut également subir un retournement de spin ou croisement inter-système menant à son état triplet excité. Le retour de l'état triplet à l'état singulet est une transition interdite qui empêche le PS de se désexciter rapidement une fois l'état triplet atteint. Dans cet état il pourra réagir avec l'oxygène moléculaire. Deux types de réactions vont avoir lieu :

- les réactions de type I où un électron est transféré du PS au substrat cellulaire, formant des chaînes d'auto-oxydation ou des ions radicaux dont le principal est l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ qui est formé par réaction avec l' O_2 , puis cela donne lieu au radical hydroxyle $HO\cdot$ et au peroxyde d'hydrogène ;
- les réactions de type II où un électron est transféré de l'état T1 à l' O_2 pour former de l'oxygène singulet 1O_2 . Ce dernier va ensuite réagir et endommager une molécule biologique voisine (acides aminés, bases nucléiques, lipides) [180, 183].

En fonction du type de photosensibilisateur utilisé, de la dose de lumière et de l'IDL, la proportion de ces réactions sera différente et donc l'effet cytotoxique également [184].

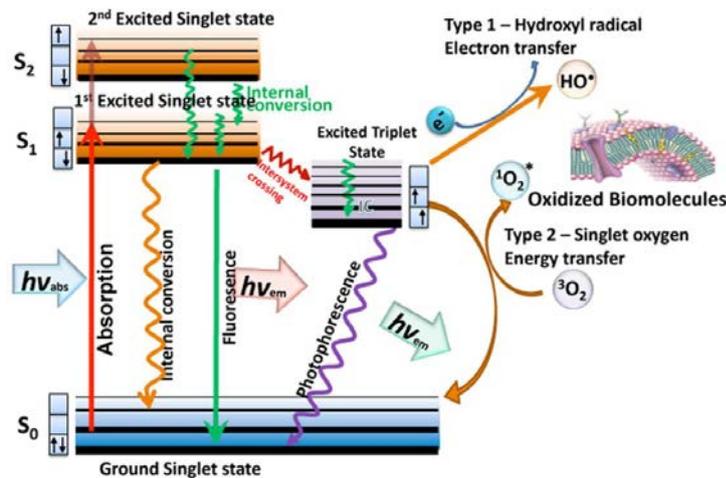


FIGURE 19 – Diagramme de Jablonski montrant les états d'excitations du photosensibilisateur sous l'effet de la lumière. A l'état fondamental, les électrons du photosensibilisateur sont dans un état de basse énergie (état singulet S_0) et passent à un état excité (S_1). En présence d'oxygène, les électrons dans cet état induisent la formation d'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ de radicaux $HO\cdot$ et d'oxygène singulet. Ces espèces réactives de l'oxygène vont ainsi créer des dommages aux biomolécules environnantes. Tiré de [180]

3.2 Facteurs qui affectent l'efficacité de la PDT

Parmi les trois éléments essentiels au bon fonctionnement de la PDT, la lumière et le photosensibilisateur représentent des facteurs extrinsèques qui sont choisis et modulés pour maximiser l'effet thérapeutique. Malgré tout, cet effet dépend de la possibilité de former des espèces réactives de l'oxygène et donc de la concentration d'oxygène moléculaire disponible dans le milieu.

3.2.1 Le photosensibilisateur et sa localisation

La nature chimique du photosensibilisateur, sa taille et la durée de l'IDL gouvernent sa localisation dans la tumeur [184]. Il existe plusieurs types de photosensibilisateurs avec des propriétés physico-chimiques différentes dont la longueur d'onde permettant leur activation. Celle-ci est généralement dans domaine spectral du proche infrarouge où la propagation de la lumière dans les tissus est plus élevée [182].

En fonction de l'IDL choisi, le PS sera présent dans le compartiment vasculaire interstitiel ou intracellulaire (cellules endothéliales et/ou cellules tumorales) et la PDT induira donc des effets vasculaires ou cellulaires, respectivement. La modulation de l'IDL permet donc de choisir un ciblage vasculaire (IDL court) ou cellulaire (IDL long) [185].

Le temps nécessaire à la localisation souhaitée du PS dépend de plusieurs paramètres. Une fois injecté dans la circulation sanguine le PS peut se fixer aux protéines et/ou aux cellules circulantes et se fixer aux parois vasculaires et pénétrer dans les tissus. La rétention dans le tissu dépend de la facilité d'élimination du photosensibilisateur du tissu. Dans les tumeurs, le photosensibilisateur s'accumule de façon sélective dans le tissu. Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène [186, 185] :

- la présence de vaisseaux sanguins perméables dans la tumeur. Le PS lié à l'albumine peut facilement traverser les fenestrations endothéliales et pénétrer dans le tissu tumoral ;
- la surexpression des récepteurs aux LDL (*Low Density Lipoprotein*) par les cellules tumorales. En se fixant aux lipoprotéines LDL dans le sang, le PS sera acheminé vers la tumeur ;
- le faible drainage lymphatique ;
- l'acidité tumorale plus élevée qui pourrait piéger les PS anioniques ;
- les macrophages associés aux tumeurs qui peuvent accumuler jusqu'à 13 fois plus de PS que les cellules cancéreuses ;

Au niveau intracellulaire, le PS va se localiser à différents endroits, de la membrane plasmique aux organelles (lysosomes, mitochondrie, appareil de Golgi) et ainsi créer des dommages lorsqu'il sera activé [186]. Il existe différents types de PS, les plus simples sont des molécules simples et répondent aux critères de localisation énoncés ci-dessus. Les PS les plus complexes comportent dans leur structure des molécules d'adressage pour cibler des cellules ou des récepteurs particuliers et peuvent également comporter des agents pour leur suivi par IRM (gadolinium).

3.2.2 Les espèces réactives de l'oxygène

La création d'espèces réactives de l'oxygène est primordiale pour créer un effet cytotoxique. Les cellules tumorales produisent des molécules anti-oxydantes tels que le glutathion ou la vitamine C pouvant contrer cet effet [182].

Le monoxyde d'azote est un médiateur important dans le stress oxydant induit par la PDT. En fonction de sa concentration, il peut protéger la cellule du stress oxydatif, ou au contraire favoriser un stress plus important résultant en la mort cellulaire (Tableau 11). A forte concentration, l'activité métabolique des cellules est réduite, ce qui permet à la PDT d'avoir une efficacité anti-tumorale plus importante. Cela a notamment été montré lors d'études *in vivo* où la PDT a été combinée à l'administration d'un donneur de NO [187, 188]. En revanche, un rôle cytoprotecteur du NO a également été mis en évidence lorsque la PDT induit une faible production de NO, celui-ci augmente la prolifération cellulaire et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse

[189, 187].

TABLE 11 – Effets cytotoxiques et cytoprotecteur du monoxyde d’azote. D’après [189]

Faible concentration de NO	Forte concentration de NO
↑ Prolifération ↑ Angiogenèse ↑ Invasion ↑ Métastases ↑ Cytoprotection ↓ Apoptose	↑ Dommages conséquents à l’ADN ↑ Stress oxydant ↑ Cytotoxicité ↑ Apoptose
↓ Effets pro-tumoraux Activation des voies oncogènes	↓ Effets anti-tumoraux Mort cellulaire

3.3 Effets vasculaires et cellulaires de la PDT

Pour que les conditions optimales de la PDT soient rencontrées, le réseau vasculaire va jouer un rôle important. En effet, les vaisseaux sanguins vont permettre d’acheminer le photosensibilisateur jusqu’aux cellules tumorales où l’oxygène permettra la formation d’espèces réactives de l’oxygène.

Les effets anti-tumoraux de la PDT sont dus à la combinaison de 3 mécanismes distincts mais entremêlés aux niveaux (Figure 20) [184, 190, 186] :

- cellulaire *via* la mort cellulaire induite par les espèces réactives de l’oxygène dans les cellules tumorales
- vasculaire *via* les dommages causés aux vaisseaux sanguins et les conséquences sur l’apport en oxygène et nutriments aux tumeurs
- immunitaire *via* l’activation du système immunitaire par les cellules endommagées

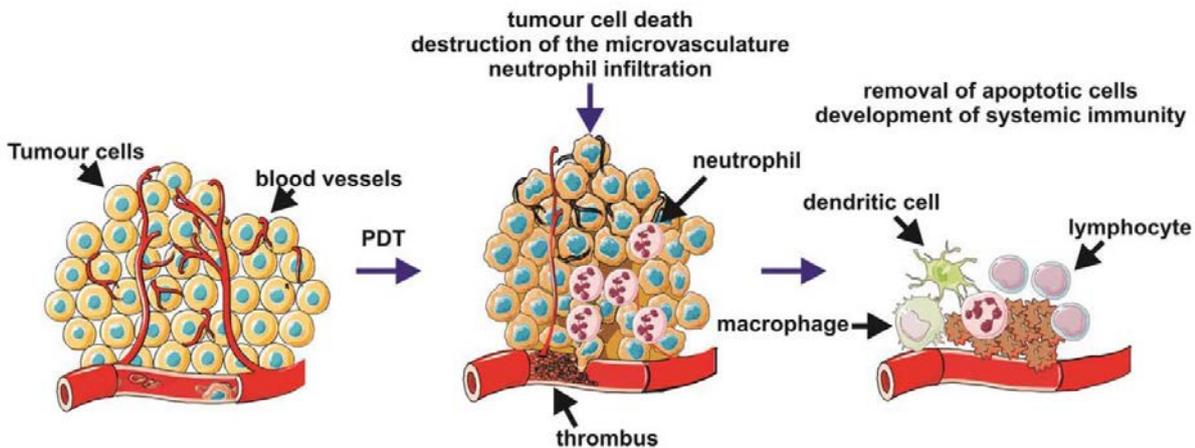


FIGURE 20 – Effets vasculaires et cellulaires de la PDT. Le photosensibilisateur s’accumule dans la tumeur et après son irradiation, il s’active et réagit avec l’oxygène pour former des espèces réactives de l’oxygène. Les dommages moléculaires induisent la mort cellulaire par apoptose, nécrose ou autophagie et s’accompagne d’une réaction inflammatoire locale. Tiré de [182]

3.3.1 Impact sur les cellules tumorales

Les espèces réactives de l'oxygène créées vont oxyder les biomolécules et tout cet ensemble va engendrer un stress oxydant prolongé dans les cellules tumorales ayant accumulé le PS. Ainsi les biomolécules oxydées vont altérer les fonctions cellulaires, les organelles et les membranes plasmiques, conduisant ainsi à la mort cellulaire [183] par différents mécanismes : l'apoptose, la nécrose et la mort cellulaire par autophagie [182, 190].

L'effet cytotoxique direct de la PDT envers les cellules tumorales est insuffisant pour aboutir à une éradication tumorale complète car il est limité par la distribution intratumorale du photosensibilisateur et par la concentration en oxygène. La distribution du PS a un impact sur l'effet cytotoxique, les cellules tumorales les plus éloignées des vaisseaux recevront d'une part moins de PS et d'autre part moins d'oxygène, ce qui implique un effet cytotoxique moindre. L'oxygène, par lequel l'activité cytotoxique est assurée, étant peu présent dans les tumeurs solides généralement hypoxiques, est rapidement consommé par les réactions photochimiques [184]. D'autre part, les cellules tumorales survivantes peuvent activer des mécanismes d'adaptation (ou des voies de survie) *via* la restauration de leur homéostasie redox, l'activation de voies de survie ou encore l'autophagie [183].

3.3.2 Impact sur la vascularisation

L'effet anti-vasculaire de la PDT a une influence capitale dans la réponse au traitement : un dommage immédiat aux cellules endothéliales vasculaires sera responsable d'une altération de l'homéostasie vasculaire conduisant à la vasoconstriction, à la formation de thrombus *via* l'adhésion et à l'activation des plaquettes, à la modification de la perméabilité vasculaire ainsi qu'à la chimioattraction de leucocytes. L'occlusion des vaisseaux peut être suffisante pour provoquer une nécrose tissulaire ischémique. Ces effets découlent de la libération de thromboxane suite à la formation du thrombus ainsi que de l'inhibition de la production ou de la libération de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales. Cela a pour effet l'induction d'une hypoxie intense, d'une part limitant la formation de ROS et d'autre part, induisant la stimulation de l'angiogenèse *via* la libération de VEGF, de MMPs, de la cyclo-oxygénase-2 ou encore de cytokines par les cellules tumorales souffrant du manque d'oxygène [186, 191]. La libération de médiateurs tels que PGE₂ ou le VEGF confortent cet aspect pro-angiogène [190].

Ainsi, la PDT peut être responsable d'une augmentation de la stimulation de l'angiogenèse tumorale [191] surtout lorsque la dose de lumière utilisée est élevée.

3.3.3 Impact sur l'inflammation et l'immunité

La PDT déclenche une réaction inflammatoire aigüe dans les tissus normaux et tumoraux [190]. Les cellules tumorales qui meurent par apoptose, nécrose ou autophagie libèrent des DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) et des TAA (*Tumor-Associated Antigens*) qui alertent la réponse immunitaire [183]. Deux effets de la PDT sur le système immunitaire sont considérés dans la réponse anti-tumorale : la réaction inflammatoire induite par la PDT et la génération d'une réponse immunitaire à long terme dirigée contre les cellules tumorales (Figure 21) [186, 190]. Les cellules endothéliales et tumorales lésées libèrent entre autre de l'HSP70 (*Heat Shock Protein 70*) qui se lie à ses récepteurs à la surface des cellules présentatrices d'antigène pour activer et induire la maturation des cellules dendritiques. Des cytokines sont également libérées par ces cellules telles que les interleukines (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β). La PDT induit la libération de médiateurs de l'inflammation dont le principal est NF κ B (*Nuclear Factor κ B*).

Tous ces médiateurs de l'inflammation libérés permettent un recrutement massif des cellules immunitaires dans la tumeur [192].

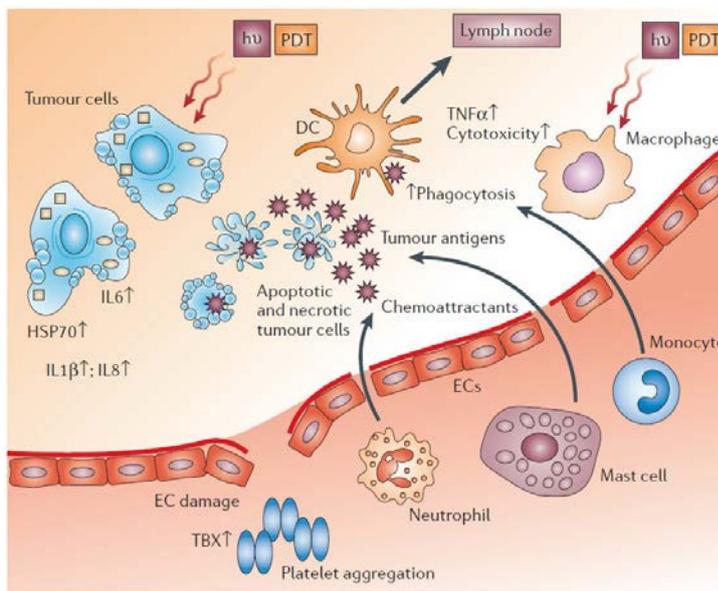


FIGURE 21 – Effets de la PDT sur l'inflammation. Les dommages aux cellules endothéliales activent une cascade d'évènements conduisant à la stimulation d'une inflammation locale et à l'agrégation plaquettaire *via* l'exposition du facteur tissulaire et la libération de thromboxane A2 (TBX). La libération de cytokines par les cellules tumorales endommagées et les molécules libérées par cellules nécrotiques et apoptotiques favorisent un état inflammatoire avec infiltration de cellules de l'inflammation (neutrophiles, mastocytes, monocytes). Tiré de [190]

L'activation du système immunitaire est nécessaire pour une éradication totale de la tumeur [183]. En effet, la réaction inflammatoire seule est insuffisante et doit être confortée par une réponse immunitaire anti-tumorale à long terme (Figure 22). Une expérience menée par Korbelik *et al.* dans laquelle des souris immunodéprimées et des souris immunocompétentes ont été inoculées avec une même lignée tumorale et traitées par PDT démontre l'importance du système immunitaire et des lymphocytes T dans la réponse à la PDT [193]. Cela a été confirmé par Li *et al.* qui montrent que les souris immunocompétentes ont des tumeurs à croissance beaucoup plus lente. Ils démontrent également que l'immunité est accentuée après PDT et que les lymphocytes T ainsi que le complément C₃ sont nécessaires pour l'inhibition de la croissance tumorale [192].

3.4 La thérapie photodynamique appliquée au cancer

3.4.1 Cancers concernés

La faible pénétration tissulaire des radiations lumineuses (< 10 à 15 mm) explique que les premières indications de la PDT en cancérologie aient été la PDT externe de lésions cutanées superficielles telles que les mélanomes. Les fibres optiques diffusantes pouvant être passées par le canal opératoire des endoscopes, la méthode peut être appliquée à des lésions superficielles des muqueuses des organes creux (*voies digestives, vessie*). Le tableau 12 décrit les cancers pour lesquels la PDT est effectuée avec certains photosensibilisateurs où elle est cliniquement utilisée notamment dans des cas de rechute. Des études précliniques et cliniques visent à élargir les

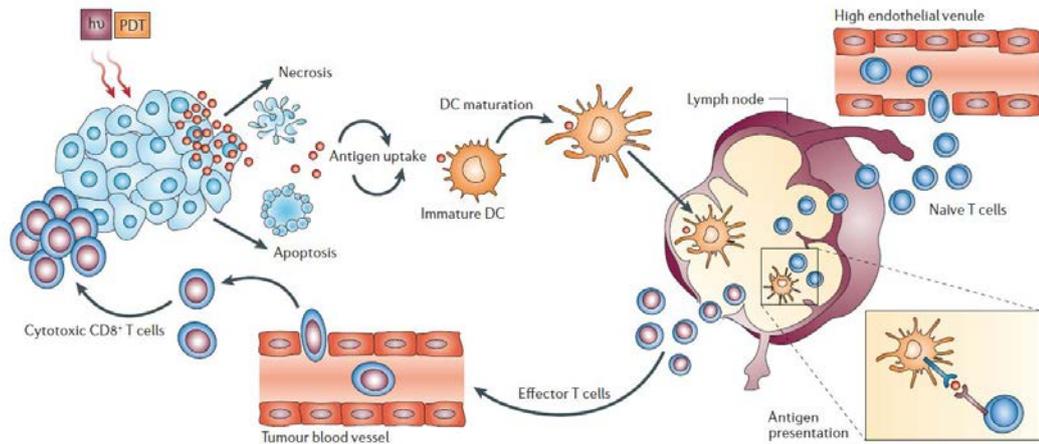


FIGURE 22 – Effets de la PDT sur l’immunité anti-tumorale. Les cellules apoptotiques et nécrotiques produites suite à la PDT libèrent des antigènes qui activent les cellules dendritiques qui se sont accumulées dans la tumeur suite à la réaction inflammatoire. Les cellules dendritiques migrent vers les ganglions lymphatiques où elles deviennent matures et présentent l’antigène aux lymphocytes T naïfs. Ces derniers migrent par chimiotactisme vers la tumeur pour attaquer les cellules tumorales. Tiré de [190]

possibilités d’utilisations de la thérapie photodynamique dans le cancer comme dans le cancer du sein [181] ou dans le glioblastome [188].

TABLE 12 – Application cliniques approuvées de la PDT dans le cancer. D’après [181]

Photosensibilisateur	Cancer	EMA	FDA
Hematoporphyrin (Photofrin)	cancer du poumon endobronchique non à petites cellules, cancer de l’œsophage, cancer de la vessie, cancer de l’estomac cancer du col de l’utérus	✓	✓
Précurseur de la protoporphyrine (5-ALA, Gliolan)	carcinome basocellulaire, tumeurs de la tête et du cou, cancer de la vessie	✓	✓
Chlorine (Foscan)	tumeurs de la tête et du cou, cancer de la prostate, cancer du pancréas	✓	-

3.4.2 La thérapie photodynamique en association à la thérapie anti-angiogène

La thérapie photodynamique est limitée par deux aspects dans les tumeurs : l’hypoxie tumorale et l’effet potentiellement pro-angiogène de la thérapie. L’association de la thérapie photodynamique à la thérapie anti-angiogène pourrait permettre de pallier ces effets et d’outrepasser les limites de cette thérapie.

En fonction de la séquence d’association de ces deux thérapies, la thérapie anti-angiogène

n'aura pas la même utilité. En effet, elle peut être utilisée pour contre-balancer l'effet pro-angiogène de la thérapie photodynamique qui, par ses effets cytotoxiques, induit la libération de molécules pro-angiogènes (VEGF, MMPs, IL-6, IL-8...) par le microenvironnement tumoral [194]. Jiang *et al.* ont montré sur un modèle de glioblastome implanté de façon orthotopique chez la souris, que traiter avec une combinaison d'anti-VEGFR-1 (MF1) et anti-VEGFR-2 (DC101) après la PDT permettait de ralentir la croissance tumorale et prolonger la survie des animaux en comparaison aux monothérapies [195]. Il a également été montré, sur un modèle de cancer de la vessie xénotransplanté chez la souris, que commencer le traitement par bevacizumab le jour où la PDT est effectuée et le poursuivre pendant 1 à 3 mois permet d'aboutir à une régression tumorale quasiment totale et de réduire l'expression de facteurs pro-angiogènes par la tumeur (VEGF, bFGF, EGF, IL-6, IL-8) [191, 196, 197]. De même, d'autres études ont également montré que la combinaison d'agents anti-angiogènes et de la PDT permettait d'accentuer l'effet anti-tumoral [198, 199, 200].

Sur une lignée de cancer ovarien implanté dans un modèle de membrane chorioallantoïde, la combinaison PDT et inhibiteur de tyrosine kinase montre une inhibition de la croissance tumorale importante et augmente l'effet PDT. Cependant, cet effet n'est pas retrouvé lorsque l'anti-angiogène administré est bevacizumab qui semble contre-carrer l'effet PDT [201].

Gamaleia *et al.* proposent d'établir un protocole en suivant le rythme d'expression circadien du VEGF dans leurs modèles de sarcome et de carcinome (*Lewis lung carcinoma*) où l'expression de VEGF est trois fois plus forte à 14h que le reste de la journée. En utilisant un photosensibilisateur couplé à un anticorps anti-VEGF (hematoporphyrine/anti-VEGF), lorsque la PDT est appliquée au moment où la concentration en VEGF est la plus importante, le traitement est plus efficace et induit une inhibition plus forte de la croissance tumorale [202].

Une autre façon d'utiliser la thérapie anti-angiogène en combinaison avec la thérapie photodynamique est d'induire une "normalisation" pour favoriser la distribution de l'agent photosensibilisant dans la tumeur et améliorer ainsi l'oxygénation pour optimiser l'effet thérapeutique. D'après la littérature, seule une étude montre l'efficacité de cette stratégie. Dans cette étude, Weiss *et al.* montrent que sur le modèle de la chambre chorioallantoïde, l'administration d'axitinib ou de sunitinib augmente l'oxygénation de tumeurs de carcinome ovarien xénotransplantées. Lorsque la PDT est réalisée au cours de cette période, la croissance tumorale est significativement ralentie comparée aux tumeurs ayant reçu la PDT hors de la période de "normalisation" [203].

Chapitre 4

Modèles d'étude des mécanismes d'angiogenèse et du remodelage vasculaire

Sommaire

4.1	Les modèles <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	53
4.2	Les modèles <i>in vivo</i>	54
4.3	Les modèles mathématiques	56
4.3.1	Modélisation de l'angiogenèse tumorale	57
4.3.2	Modélisation de l'effet du traitement	60

Pour étudier les mécanismes de l'angiogenèse, le choix du modèle d'étude est primordial et est conditionné par les hypothèses de travail (échelle moléculaire, cellulaire, macroscopique), par les résultats attendus (observation et compréhension d'un phénomène, effet d'un traitement) et par la simplicité de sa mise en oeuvre.

Ce chapitre présente d'une part des modèles biologiques pour l'étude de l'angiogenèse *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* et d'autre part des modèles mathématiques créés à partir d'hypothèses et de données biologiques. Leur pertinence quant à l'étude du phénomène de "normalisation" vasculaire est présentée ainsi que les possibilités de translation des résultats qu'ils permettent d'obtenir vers un contexte clinique.

4.1 Les modèles *in vitro* et *ex vivo*

Les études réalisées sur des modèles *in vitro* et *ex vivo* permettent de mettre en évidence les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la stimulation de l'angiogenèse et dans la réponse au traitement. Ces modèles sont pertinents lorsqu'il s'agit d'étudier la prolifération et la migration des cellules endothéliales. En revanche, ils ne font souvent intervenir qu'un type cellulaire et c'est pourquoi la transposition clinique de résultats issus de ce type de modèles doit être très contrôlée.

Le tableau 13 présente une liste non exhaustive de modèles couramment utilisés pour étudier l'angiogenèse *in vitro* et *ex vivo*.

Ces modèles présentent l'avantage d'être rapide à mettre en oeuvre et d'être peu onéreux. Ils sont davantage dédiés à l'étude des mécanismes simples tels que l'effet des conditions de culture

TABLE 13 – Exemples de modèles d'étude de l'angiogenèse *in vitro* et *ex vivo*. HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells. D'après [204, 205, 54, 206]

	Modèles	Paramètres étudiés
<i>in vitro</i> HUVECs	Tube Formation Assay Chambre de Boyden Prolifération Assay Wound Healing Assay	Tubulogenèse Invasion Prolifération Migration
<i>in vitro</i> Co-culture	Cellules endothéliales/ péricytes	Recrutement des péricytes
<i>ex vivo</i>	Membrane chorioallantoïque Anneau aortique Rétine Cast vasculaire Immunohistochimie	Angiogenèse (macroscopique) Bourgeonnement Hiérarchie vasculaire Architecture vasculaire Densité vasculaire, morphologie

(hypoxie, facteurs de croissance...) sur la prolifération endothéliale mais sont aussi propices à l'évaluation des effets de thérapies anti-angiogènes sur les mécanismes de l'angiogenèse. Cependant, ces modèles ne recréent pas les conditions physiologiques et s'affranchissent d'une part des complications inflammatoires [205] et des contraintes mécaniques et physiques sur les vaisseaux sanguins qui sont importantes dans le maintien de l'intégrité vasculaire.

Dans le cas de l'angiogenèse tumorale et de l'étude de la "normalisation", le microenvironnement joue une part importante dans la stimulation de l'angiogenèse et dans la réponse au traitement et les modèles *in vitro* sont donc moins adaptés pour ce type d'étude.

Le marquage immunohistochimique de la vascularisation de tumeurs *ex vivo* permet une étude des vaisseaux sanguins dans l'environnement tumoral mais nécessite de travailler sur des prélèvements et ne présente pas la possibilité d'observer les changements morphologiques et fonctionnels dans le temps sur une même tumeur.

Le seul modèle *ex vivo* dans lequel un suivi est possible est le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet. C'est un modèle souvent utilisé pour étudier les effets de molécules anti-angiogènes sur les vaisseaux sanguins et l'angiogenèse tumorale lorsqu'une tumeur y est implantée [207].

4.2 Les modèles *in vivo*

Dans le contexte de l'étude de l'angiogenèse tumorale et du remodelage vasculaire lié ou non au traitement, les modèles *in vivo* sont plus adaptés car toutes les interactions entre les cellules endothéliales, les cellules tumorales et le microenvironnement sont possibles. Il y a différentes façons d'étudier l'angiogenèse tumorale *in vivo* qui sont possibles grâce à la diversité de modèles animaux disponibles, de modèles tumoraux et des possibilités d'imagerie.

Le plus souvent, les expérimentations impliquant l'étude de tumeurs chez l'animal se font sur des animaux immunodéficients qui reçoivent des xéno greffes de tumeurs humaines sous la forme de cellules ou de fragment. Ce type d'animaux (*nude* ou SCID, *Severe-Combined Immunodeficiency*) présente l'intérêt de ne pas provoquer de "rejet de greffe" car ils ne possèdent pas les lignées lymphocytaires (T pour *nude*, T et B pour SCID) impliquées dans la réaction immunitaire. Ainsi il est possible d'étudier des tumeurs humaines chez l'animal mais cela requiert de

s'affranchir de la réaction immunitaire anti-tumorale.

Pour prendre en compte cette réponse immunitaire spécifique, d'autres modèles animaux ont été développés, notamment des modèles de tumeurs radio-induites ou chimio-induites chez la souris immunocompétente ou encore des souris transgéniques qui développent spontanément des tumeurs [208, 209].

Les modèles *in vivo* apportent de nombreuses possibilités d'études de l'angiogenèse notamment grâce aux méthodes d'imagerie. Il est possible d'observer le réseau vasculaire au cours du temps sur un même animal grâce à la mise en place par chirurgie, de fenêtres intravitalles (Figure 23). Ces méthodes présentent l'avantage de ne nécessiter qu'une seule étape de chirurgie et permettent des observations répétées du réseau vasculaire pendant plusieurs semaines. Les tumeurs peuvent ainsi être implantées de façon orthotopique dans des chambres intracrânienne, abdominale ou mammaire, pour l'étude de tumeurs cérébrales, de tumeurs de l'intestin, du pancréas et du foie, ou encore de tumeurs mammaires. La chambre dorsale est le modèle de fenêtre intravitalle le moins invasif et permet d'étudier des tumeurs de la peau mais également d'observer la vascularisation de tumeurs implantées de façon hétérotopique [210].

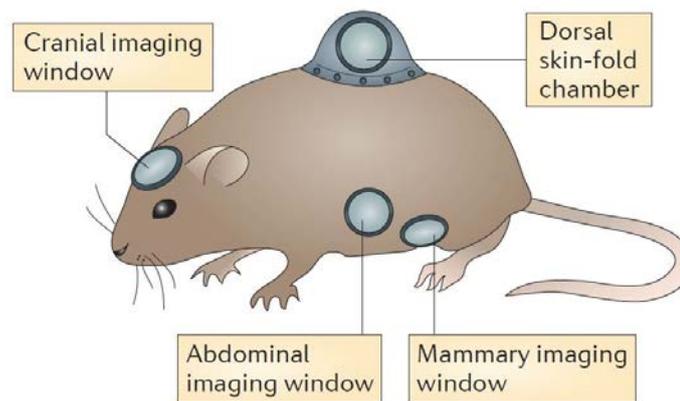


FIGURE 23 – Méthodes pour observer le réseau vasculaire *in vivo* à l'aide de fenêtres intravitalles. Tiré de [210]

Avec la méthode d'imagerie appropriée, ces modèles permettent d'étudier l'architecture et la morphologie du réseau vasculaire ainsi que sa fonctionnalité mais sont bien évidemment strictement précliniques (Tableau 14).

Pour pouvoir appliquer plus facilement en clinique les résultats acquis en préclinique, il est plus simple de passer par l'utilisation de méthodes d'imagerie qui sont déjà utilisées en clinique comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission de positons (TEP), le scanner (CT) ou encore l'échographie Doppler (Tableau 14).

Ces méthodes d'imagerie qui sont appliquées en clinique sont plus appropriées à l'étude de la fonctionnalité du réseau vasculaire en évaluant la perfusion, l'oxygénation ou la perméabilité et nécessitent l'injection d'un agent de contraste. Les méthodes les plus utilisées comme l'IRM ou le scanner ont une résolution ne permettant pas la visualisation individuelle des vaisseaux sanguins. Par exemple, le scanner a été adapté à une utilisation en préclinique pour visualiser les vaisseaux sanguins jusqu'à une résolution de 30 μm (microscanner), mais cela reste encore peu précis car la majorité des vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs sont de type capillaire et

présentent des diamètres inférieurs à 30 μm .

TABLE 14 – Méthodes d'imagerie couramment utilisées pour étudier l'angiogenèse *in vivo* et en clinique. IRM : Imagerie par Résonance Magnétique, TEP : Tomographie par Emission de Positons, DCE-MRI : Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging, BOLD-MRI : Blood Oxygenation Level Dependent Magnetic Resonance Imaging, DCE-US : Dynamic Contrast Enhanced UltraSonography

Méthode d'imagerie		Paramètres relatifs à la "normalisation"	Appliqué en clinique	Ref.
Microscopie intravitale (optique, fluorescence, confocale)		Morphologie vasculaire Architecture vasculaire Perméabilité	–	[211, 212]
		Oxygène	–	[213]
Multiphoton laser scanning microscopy		Morphologie vasculaire Architecture vasculaire Perméabilité	–	[96]
CT-Microscanner		Densité vasculaire	–	[214, 215]
Quantum dots (IRM, TEP, microscopie)		Densité vasculaire Perméabilité	–	[216, 217, 218]
IRM	DCE-MRI	Perfusion Perméabilité	✓	[219]
	BOLD-MRI	Oxygène	✓	
Echographie Doppler	Microbulles	Densité vasculaire	✓	[220]
	DCE-US	Perfusion	✓	[221]
Endomicroscopie		Morphologie vasculaire Embranchements Perméabilité	✓	[222]

4.3 Les modèles mathématiques

Les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse font intervenir des processus qui évoluent dans le temps et dans l'espace et qui peuvent être pris en compte dans des modèles mathématiques à différentes échelles. Ces modèles sont créés à partir de données biologiques admises ou expérimentales et d'hypothèses pouvant être modifiées pour simuler différentes conditions expérimentales (oxygénation, traitement...).

A l'échelle microscopique (*i.e.* cellules), le plus souvent ce sont des automates cellulaires qui sont utilisés. Ils permettent d'étudier le comportement individuel de chaque cellule en prenant en compte leur position dans l'espace et différents facteurs tels que leur état physiologique, la concentration de facteurs de croissance dans le milieu, l'hypoxie...

A l'échelle macroscopique, les modèles sont plus complexes et permettent d'étudier un ensemble de cellules. Il s'agit de mettre en place des équations aux dérivées partielles qui présentent l'avantage de tenir compte du temps et de l'espace. Ainsi, les conséquences des interactions entre la vascularisation, les cellules tumorales et le microenvironnement pourront être étudiées simultanément.

La modélisation *in silico* de l'angiogenèse fait référence à l'utilisation de modèles mathématiques et de simulateurs numériques destinés à comprendre, à reproduire et à prédire les mé-

canismes biologiques impliqués dans l'angiogenèse à différentes échelles (moléculaire, cellulaire, tissulaire).

L'évolution de la croissance tumorale étant parfaitement liée au développement d'un réseau vasculaire, de plus en plus de modèles se focalisent sur l'angiogenèse voire font le lien entre la croissance tumorale et l'évolution du réseau vasculaire. L'étude de la croissance tumorale par modélisation mathématique peut se faire à différentes échelles. Les automates cellulaires prennent en compte les cellules tumorales de façon individuelle ainsi que leurs caractéristiques métaboliques et l'environnement dans lequel elles se développent (facteurs de croissance, hypoxie). A l'échelle tissulaire, l'évolution de la croissance tumorale peut être définie à l'aide d'équations permettant de faire le lien entre la croissance tumorale et d'autres paramètres définis selon le modèle (temps, concentration en facteurs de croissance...).

4.3.1 Modélisation de l'angiogenèse tumorale

Simplification de l'angiogenèse par un modèle d'automate cellulaire

Un modèle de croissance vasculaire développé par Lesart et *al.* souligne l'importance du réseau vasculaire pour le développement tumoral à l'aide d'un modèle numérique conçu sur la base d'un réseau vasculaire observé dans un modèle de chambre dorsale chez la souris. Le modèle s'appuie sur un automate cellulaire sur une grille 2D sur laquelle chaque case représente une cellule pouvant prendre plusieurs états (prolifération, quiescence, apoptose ou nécrose (Figure 24). Chaque case de l'automate peut contenir une cellule tumorale dans un des stades proposés. Pour chaque cellule, le changement de stade est déterminé par un algorithme prenant en compte le stade du cycle cellulaire ainsi que le taux d'oxygénation. Le modèle créé permet ainsi de suivre l'évolution de la croissance tumorale en fonction de la croissance vasculaire en prenant en compte l'évolution dans l'espace des concentrations de VEGF et d'oxygène.

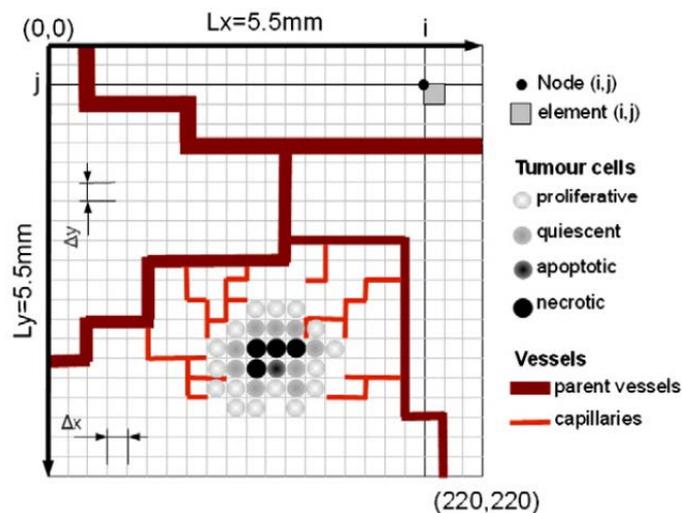


FIGURE 24 – Automate cellulaire conçu sur la base d'un réseau vasculaire observé en chambre dorsale. Les cellules tumorales sont représentées par des ronds et peuvent être à différents stades (en prolifération, quiescente, apoptotique ou nécrotique) selon le taux d'oxygénation qui dépend de la vascularisation. Tiré de [223]

Modélisation du switch angiogénique

La mise en place du réseau vasculaire tumoral commence dès lors que la prolifération tumorale excessive provoque une hypoxie et ainsi la libération de facteurs pro-angiogènes. L'effet de la vascularisation sur la croissance tumorale avasculaire et vasculaire est reproduit dans le modèle de Xu et *al.* et montre que la croissance tumorale augmente lorsque le switch angiogénique est actif [224].

Suite au switch angiogénique, les cellules endothéliales du tissu sain migrent en direction de la source de facteurs de croissance. Trois termes sont généralement utilisés pour modéliser la migration endothéliale afin de prendre en compte le déplacement aléatoire des cellules endothéliales, le chimiotactisme induit par la libération de facteurs de croissance ainsi que l'haptotactisme correspondant à la mobilité directionnelle des cellules endothéliales [225]. Le modèle de Stephanou et *al.* montre la relation entre la migration endothéliale, la dégradation de la matrice extracellulaire et les contraintes mécaniques. La contrainte mécanique est représentée par la rigidité de la matrice extracellulaire ainsi que par l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire. En effet, plus les forces de traction au niveau des *tip cells* sont élevées, moins la matrice extracellulaire est dégradée et donc le réseau vasculaire formé est moins dense et plus organisé (Figure 25).

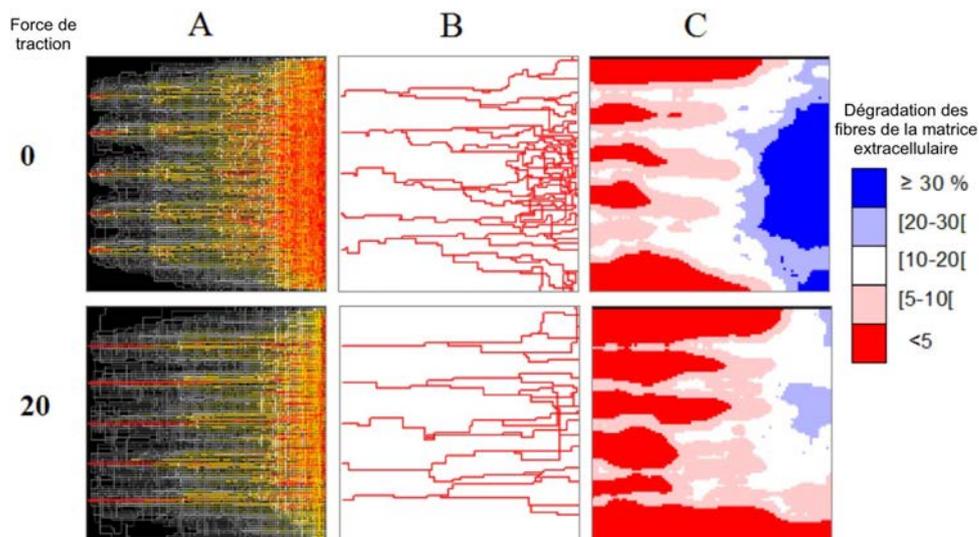


FIGURE 25 – Simulation de la croissance vasculaire. **A** Les simulations ont été effectuées sur un échantillon de 100 réseaux vasculaires superposés pour identifier les trajectoires les plus utilisées (orange). **B** Trajectoire vasculaire la plus utilisée en fonction de la force de traction (faible (0) ou élevée (20)). **C** Pourcentage de dégradation des fibres de la matrice extracellulaire selon les trajectoires vasculaires utilisées et donc selon la force de traction. Tiré de [225]

Modélisation du remodelage vasculaire

Les modèles d'angiogenèse représentent souvent des réseaux vasculaires en deux dimensions, Welter et *al.* ont proposé un modèle en trois dimensions incluant le réseau vasculaire sain, la tumeur et le réseau vasculaire tumoral. Ce modèle met en évidence les différences morphologiques entre ces deux réseaux et reproduit le remodelage vasculaire physiologique qui a lieu dans un réseau vasculaire sain en maintenant la hiérarchie artériole-capillaire-veinule. Une fois que ces

vaisseaux sanguins atteignent la zone tumorale, ils perdent cette hiérarchie, deviennent chaotiques et induisent la formation de zones d'hypoxie (Figure 26) [226].

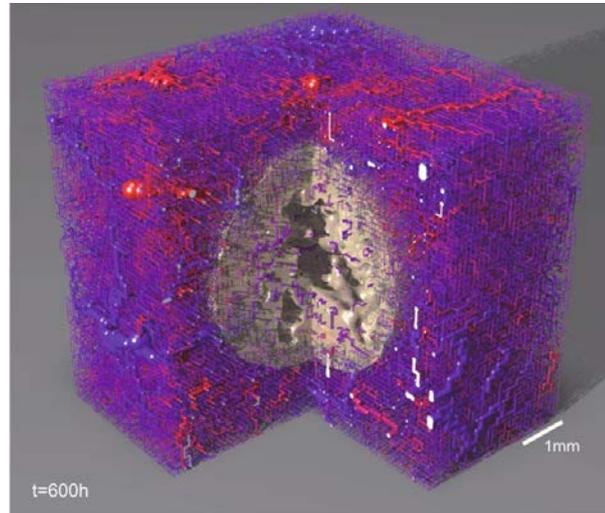


FIGURE 26 – Modélisation 3D de la vascularisation saine et tumorale. Tiré de [226]

Qualification du réseau vasculaire tumoral à l'aide de la géométrie fractale

La géométrie fractale a été introduite comme moyen de mesure morphométrique des structures irrégulières typiques de la croissance tumorale. Celles-ci pouvant être l'irrégularité de l'architecture vasculaire ou encore les modifications morphologiques cellulaires [227]. Le réseau vasculaire répond à des propriétés géométriques pouvant être quantifiées par la géométrie fractale, en effet un objet fractal est caractérisé par quatre propriétés [228] :

- l'irrégularité de sa forme
- l'auto-similarité de sa structure (*i.e.* la structure est composée d'un enchainement de motifs similaires qui se répètent en diminuant de taille)
- sa dimension fractale, qui est un nombre non entier définissant la complexité géométrique de l'objet, c'est-à-dire sa longueur et sa hauteur
- l'échelle : les propriétés mesurées dépendent de l'échelle à laquelle elles sont mesurées

Un réseau vasculaire pourra donc être quantifié par sa dimension fractale qui donnera une indication du degré d'auto-similarité de la structure (Figure 27). Il est ainsi possible d'attribuer une dimension fractale non seulement à un réseau vasculaire observé en deux dimensions comme dans les figures 24 et 25 mais aussi à un réseau vasculaire observé sur coupes de tumeurs où les vaisseaux sanguins sont identifiés par marquage immunohistochimique.

Ainsi l'utilisation de la géométrie fractale peut permettre de comparer deux réseaux vasculaires entre eux *via* leur dimension fractale. Par exemple, Ichim et Dobrescu ont utilisé les images les plus connues pour différencier le réseau vasculaire sain du réseau vasculaire tumoral et en ont calculé la dimension fractale (Figure 28). Ils montrent ainsi que la dimension fractale est plus élevée dans le réseau vasculaire tumoral, ce qui est synonyme d'une plus grande complexité architecturale [230].

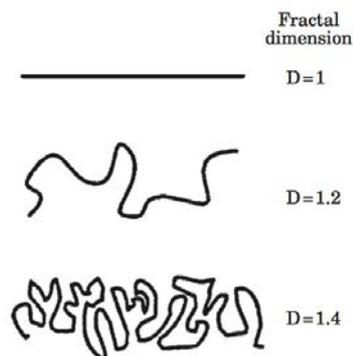


FIGURE 27 – Dimension fractale mesurée en fonction de la complexité d'un objet. Tiré de [229]

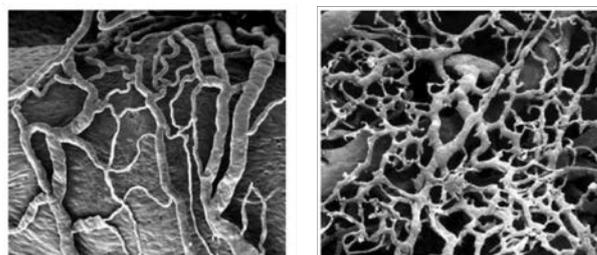


FIGURE 28 – Réseau vasculaire sain et tumoral. Tiré de [230]

Cela souligne le potentiel de l'utilisation de la géométrie fractale pour étudier l'angiogenèse tumorale et la réponse aux traitements anti-angiogènes.

4.3.2 Modélisation de l'effet du traitement

Certains modèles mathématiques de l'angiogenèse tumorale prennent en compte l'effet d'un traitement sur le remodelage vasculaire et ont pour objectif de proposer des protocoles thérapeutiques les plus efficaces possible.

Utiliser des modèles mathématiques permet de simuler différents types de protocoles thérapeutiques et de proposer le modèle le plus pertinent et le plus efficace. Cela a notamment permis à l'équipe de Barbolosi *et al.* de modéliser l'évolution de la croissance tumorale *in silico* sous l'effet de différents protocoles thérapeutiques où la dose d'une chimiothérapie et sa fréquence d'administration sont modifiées. Ils montrent ainsi qu'il n'est pas nécessaire de traiter avec la dose maximale tolérée pour préserver les effets anti-angiogènes et anti-tumoraux d'un traitement et aboutir à l'efficacité thérapeutique maximale [231]. Cela a récemment donné lieu à un essai clinique de phase I qui est en cours [232].

En étudiant plus précisément les effets des thérapies anti-angiogènes, de nouveaux modèles visent à proposer des protocoles de traitement efficaces associant thérapie anti-angiogène et chimiothérapie ou radiothérapie. Différentes approches tentent de répondre à cette problématique en utilisant la croissance tumorale comme critère d'efficacité thérapeutique.

Avant de proposer ces associations thérapeutiques, certains modèles évaluent les effets d'une monothérapie d'un agent anti-angiogène tel que le bevacizumab en modulant la posologie à l'aide d'un modèle pharmacocinétique [233, 234]. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle comportemental pour reproduire l'évolution de la croissance tumorale selon la posologie de bevacizumab admi-

nistrée montre que chez la souris, l'administration quasi-continue de bevacizumab est d'une plus grande efficacité sur la croissance tumorale qu'une administration fractionnée dans le temps [235].

Enfin, les modèles proposant une association entre thérapie anti-angiogène et chimiothérapie [236, 237] ou radiothérapie [238] cherchent à identifier la dose optimale et la durée d'administration de l'agent anti-angiogène nécessaires pour minimiser la croissance tumorale.

Matériels et Méthodes

1 Introduction

Une majorité des expérimentations dans ce travail sont réalisées sur des modèles de tumeurs humaines hétérotopiques obtenus par greffe de cellules de glioblastome multiforme humain (U87MG) chez la souris athymique. Ce type tumoral, classiquement très vascularisé, convient bien à l'étude de l'angiogenèse [239, 240]. Par ailleurs l'expérience de ce modèle dans le laboratoire s'étend sur plusieurs décennies. Des chambres dorsales implantables sont utilisées pour l'analyse du réseau vasculaire tumoral, sous thérapie anti-angiogène ou non, et des greffes inguinales pour le suivi de la croissance tumorale.

Les conditions d'hébergement et les techniques chirurgicales mises en œuvre au laboratoire sont conformes à la législation en vigueur (Directive 2010/63/UE et Décret 2013-118 du 1^{er} février 2013) et ont été validées par le Comité d'Éthique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (CELMEA-2012-0018). Les protocoles expérimentaux mis en œuvre ont été choisis et adaptés de telle sorte que les souffrances et l'inconfort de l'animal soient au maximum réduits.

Les méthodologies mises en œuvre dans ce travail, de la culture cellulaire au suivi tumoral, sont résumées dans le logigramme ci-dessous (Figure 1) :

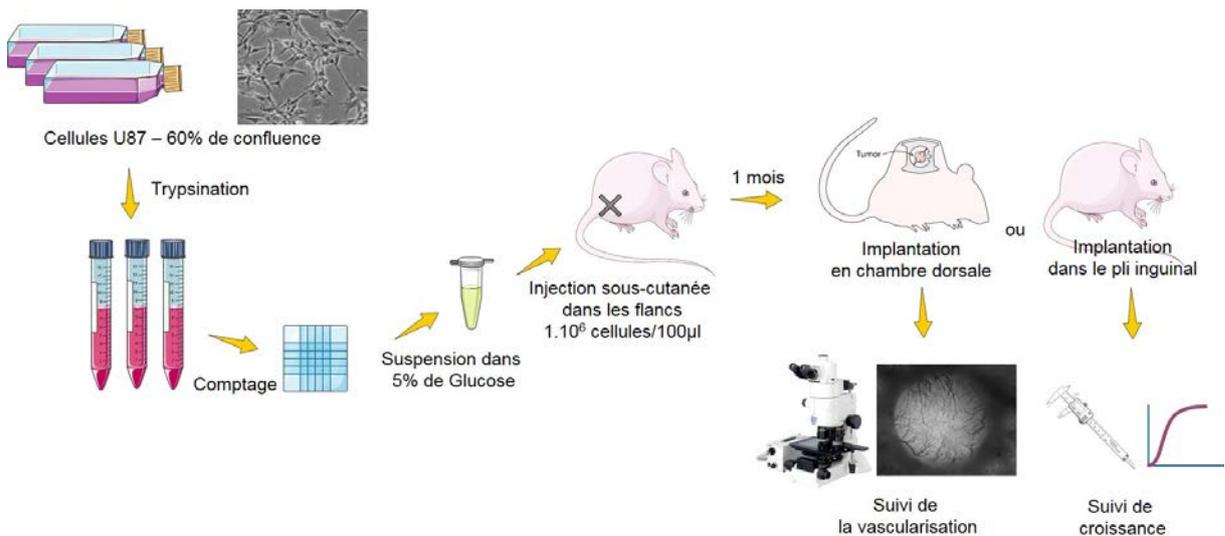


FIGURE 1 – Schéma simplifié du protocole de préparation des xénogreffes de glioblastome et leur utilisation

2 Animaux et préparation des xénogreffes

2.1 Animaux

Les expérimentations sont effectuées sur des souris souris homozygotes BALB/cAnNRj-*Foxn1^{nu}* consanguines femelles âgées de 8 à 10 semaines pesant 25 à 30 g (élevage Janvier, Le Genest St Isle, France). Ces dernières sont hébergés dans une animalerie conventionnelle dans des portoirs ventilés pendant une période d'acclimatation d'au moins 8 jours (Allentown, France) puis dans des cages ouvertes dès le début des expérimentations. La température de l'animalerie est de 25 °C et l'hygrométrie est de 35% et les souris suivent un cycle jour/nuit de 12h. Le poids et le comportement des souris sont suivis quotidiennement.

2.2 Anesthésie des animaux et prévention de la douleur

Les anesthésies sont réalisées par injection intra-péritonéale d'un anesthésique composé d'un anesthésique, la kétamine (90 mg/kg, Imalgène 500, Merial, France) et d'un myorelaxant, la xylazine (8 mg/kg, Rompun 2%, Bayer Health Care, France) en solution dans de l'eau pour préparation injectable. Les souris sont anesthésiées par voie intra-péritonéale (*i.p.*) avec le mélange anesthésique. Lorsque nécessaire, une demi-dose est administrée 30 à 40 minutes après la première injection.

La pose des chambres dorsales est une étape de chirurgie réalisée sous anesthésie générale où la douleur infligée à l'animal est considérée comme étant une douleur modérée (niveau 2). Pour prévenir et soulager la douleur, de la buprénorphine (Buprécare, Axience), un dérivé morphinique, est administrée en sous-cutané en une seule dose de 0,05 mg/kg en préopératoire. Par ailleurs du Méloxicam (Metacam, Boehringer Ingelheim), un anti-inflammatoire non stéroïdien, est administré en sous-cutané à 1 mg/kg en préopératoire puis à 0,5 mg/kg en postopératoire pendant 3 jours.

La souris sont sacrifiées par injection intra-péritonéale d'une surdose de pentobarbital (Céva-Santé, France).

2.3 Préparation des xénogreffes à partir des cellules U87MG

Les cellules U87 (ATCC HTB-14TM) sont cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium High Glucose* (4,5 g/L), PAA Laboratories, GmbH, Allemagne) additionné de 10% de sérum de veau foetal, de 5% de complément (20% acides aminés essentiels, 10% acides aminés non essentiels, 8% L-asparagine, 7,2% L-sérine, 20% L-glutamine, 8% vitamines et 25% pyruvate de sodium, gibco, Life Technologies, France) et de 1% d'antibiotique (mélange Pénicilline-Streptomycine, Sigma-Aldrich, USA), dans les conditions de culture standard : 37°C, 5% CO₂, 95% d'humidité.

A 60 % de confluence, le milieu de culture est retiré puis les cellules sont rincées au PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Dulbecco's PBS (1x), PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Allemagne). Elles sont ensuite décollées de leur support à l'aide d'une solution de Trypsine-EDTA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Après une incubation de 5 minutes, l'activité de la trypsine est inhibée par addition de DMEM complet. Les cellules sont récupérées et centrifugées. Le culot cellulaire est repris dans un volume déterminé de DMEM complet puis les cellules viables sont comptées en cellule de Thoma après coloration au bleu Trypan, un colorant d'exclusion qui ne colore que les cellules mortes.

Les cellules sont ensuite re-suspendues dans du glucose à 5% (m/v) à la concentration de 10.10^6 cellules/mL. Cent μL de cette solution, sont injectés en sous-cutanée dans chacun des flancs d'une souris porte-greffe.

Après 3 à 4 semaines, lorsque le volume tumoral atteint 30 à 50 mm^3 , les souris porte-greffe sont sacrifiées et les tumeurs sont dégreffées pour être utilisées dans des expérimentations de suivi du réseau vasculaire tumoral (implantation en chambre dorsale) ou pour le suivi de la croissance tumorale (implantation dans le pli inguinal).

2.4 Implantation des fragments tumoraux en chambre dorsale pour le suivi de la vascularisation

L'observation du réseau vasculaire sain ou tumoral *in vivo* a été réalisée à l'aide du modèle de la chambre dorsale chez la souris *nude* (Figure 2). C'est un modèle *in vivo* les plus représentatifs de l'angiogenèse [241] permettant d'observer un même réseau vasculaire et son remodelage au cours du temps, par microscopie intravitale, pour le même animal, sans geste invasif supplémentaire après la chirurgie.



FIGURE 2 – Souris avec chambre dorsale après chirurgie

La durée pendant laquelle une souris peut supporter ce dispositif est conditionnée par plusieurs paramètres, notamment l'état physiologique de la souris et la taille de la tumeur. Une même souris peut être suivie pendant une période pouvant aller jusqu'à cinq semaines. L'utilisation des chambres dorsales apporte un avantage non négligeable en accord avec la réglementation éthique. Elles permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser pour visualiser l'évolution dans le temps du réseau vasculaire comparé à l'utilisation de techniques immunohistochimiques.

Les chambres dorsales (APJ Trading, USA) sont formées de deux plaques de titane toutes deux percées d'un trou d'un cm^2 de surface. Ces plaques sont disposées sous anesthésie de chaque côté d'un pli cutané réalisé sur la peau dorsale de la souris. La peau d'une des faces du pli est excisée en suivant le bord de l'orifice qui est ensuite hermétiquement fermé à l'aide d'une lamelle de même diamètre stérile.

Vingt-quatre à 48 heures après la pose de la chambre, la lamelle est retirée et un fragment tumoral de trois \pm un mm^2 est placé au contact du réseau vasculaire du versant de peau restant. Les fragments utilisés sont issus d'une xénogreffe sous cutanée mère comme décrit ci-dessus. La chambre est alors refermée à l'aide d'une nouvelle lamelle de verre stérile. La vascularisation des xénogreffes par les vaisseaux sanguins murins peut ainsi être observée au cours du temps par microscopie intravitale.

2.5 Implantation des fragments tumoraux en sous-cutané pour le suivi de la croissance tumorale

Sous anesthésie, un fragment d'une tumeur mère préalablement dégreffée est implanté dans le pli inguinal gauche d'un autre animal. La croissance tumorale est suivie régulièrement. Pour ce faire, le volume tumoral est mesuré trois à quatre fois par semaine à partir de mesures réalisées au pied à coulisse. La formule de calcul du volume utilisée est la suivante : $V = (l^2 \times L)/2$, avec l la largeur de la tumeur et L , la longueur. Les animaux sont euthanasiés lorsque le volume tumoral atteint 1500 à 1600 mm³ ou devant la constatation de signes apparents de douleur ou de souffrance (dos voûté, amaigrissement, isolement...).

3 Expérimentations sur les souris portant des chambres dorsales

Ces expérimentations ont pour objet la mise en évidence de modifications morphologiques et fonctionnelles du réseau vasculaire tumoral sous l'effet d'un traitement par le bevacizumab, avec comparaison avec un réseau vasculaire non tumoral. Les grandes lignes de cette expérimentation sont résumées dans le logigramme ci-dessous (Figure 3).

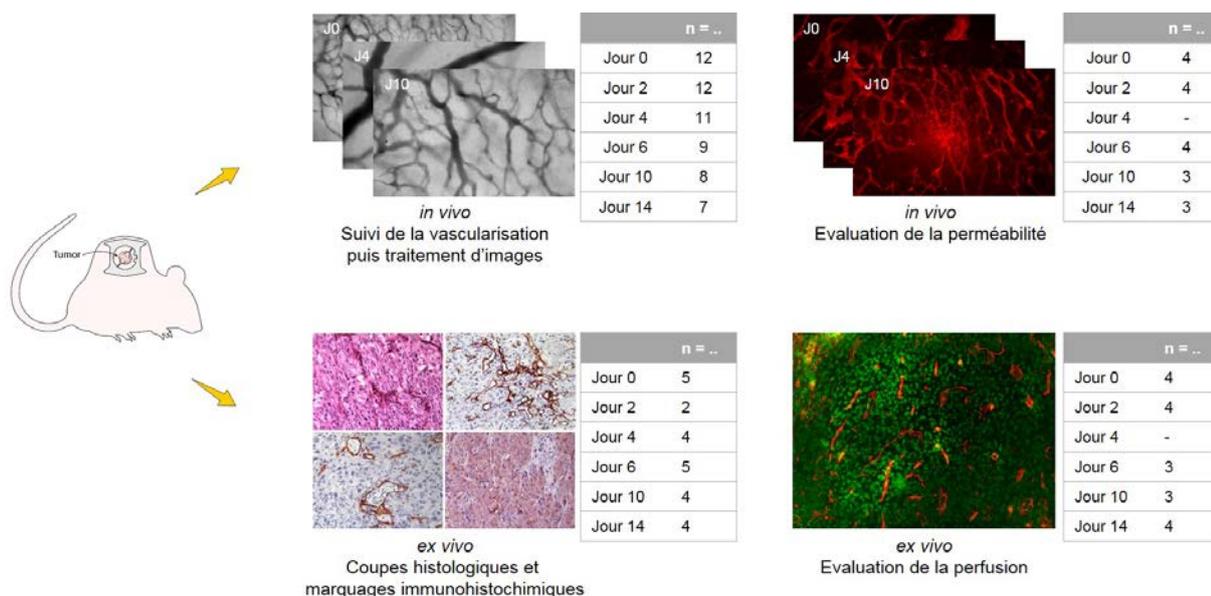


FIGURE 3 – Expérimentations réalisées sur le réseau vasculaire tumoral

Le lit microcirculatoire tumoral est observé au cours du temps par microscopie intravitale après ou sans injection de produits de contraste. Toutes les tumeurs dont le réseau vasculaire est analysé par microscopie intravitale font également l'objet d'une analyse histologique et immunohistochimique. Par ailleurs, cinq souris portant une chambre dorsale sont utilisées pour obtenir des images du réseau vasculaire sain de la peau de la souris avant implantation du fragment tumoral.

Afin de réduire au maximum le nombre des animaux utilisés, une même souris sert à plusieurs expérimentations. Les souris traitées ou non au bevacizumab à partir de j0 sont réparties en différents lots de façon à pouvoir étudier :

- la morphologie des vaisseaux sanguins tumoraux *in vivo* par microscopie intravitale sans agent de contraste et *ex vivo* par marquage immunohistochimique des vaisseaux sur coupe de tumeurs après mise en évidence immunohistochimique de marqueurs endothéliaux et de la membrane basale
- la fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux *in vivo* par microscopie intravitale en analysant le volume de distribution d'un dextran couplé au Texas Red et *ex vivo* par étude du volume de distribution du Hoechst 33342.

3.1 Observation du réseau vasculaire par microscopie intravitale en lumière transmise

L'observation du réseau vasculaire en lumière transmise est effectuée, 3 à 6 fois par semaine, sur des souris anesthésiées, à l'aide d'un microscope Nikon AZ100 (Nikon, France) équipé d'une caméra Digital Light DS-Qi1Mc. Les images acquises à l'aide du logiciel Nis Elements 3.0 (Nikon, France) sont traitées selon un algorithme de traitement d'images développé par notre équipe (El-Hadi Djermoune (MCU) et Jean-Baptiste Tylcz (PhD) afin de caractériser le réseau vasculaire. Le processus de traitement d'images est détaillé dans le chapitre 2 de la partie II.

Vingt souris portant des tumeurs en chambre dorsale sont utilisées pour observer l'évolution du réseau vasculaire tumoral au cours du temps. Douze d'entre elles reçoivent un traitement journalier au bevacizumab ; une observation du réseau vasculaire étant réalisée à J0 avant traitement. Les huit autres souris servent de témoin

3.2 Evaluation de la perméabilité vasculaire *in vivo* par microscopie intravitale

La perméabilité du lit microcirculatoire, sous traitement au bevacizumab ou non, est appréciée par analyse du volume de distribution d'une macromolécule, le dextran. Dans les conditions physiologiques, ce dernier ne diffuse pas hors des vaisseaux. Le dextran est conjugué à une molécule fluorescente le Texas Red (MW 70 kDa, 10 mg/kg, Fisher Scientific, France) permettant son suivi microscopique. Le conjugué est administré par voie veineuse, à la dose de 10 mg/kg, cinq minutes avant d'imager le réseau vasculaire en microscopie intravitale. La visualisation de ce dernier est effectuée en lumière transmise et en fluorescence (filtre TRITC : $\lambda_{exc} = 560/25$ nm, $\lambda_{em} = 607/25$ nm) à l'aide d'un microscope Nikon AZ100 équipé d'un dispositif de visualisation confocale (Revolution DSD, Andor Technology, Oxford Instruments, Royaume-Uni). Les images acquises en fluorescence, artificiellement colorées en cyan à l'aide d'Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA [242]) sont superposées à celles obtenues en lumière transmise afin de mettre en évidence les zones d'extravasation de l'agent de contraste.

3.3 Evaluation de la perfusion vasculaire *ex vivo*

A un moment déterminé, la fraction fonctionnelle du lit microcirculatoire peut ne représenter qu'une part limitée du réseau vasculaire totale. La fraction fonctionnelle peut être évaluée en étudiant l'espace de diffusion du Hoechst 33342 (Bis-Benzidine, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Microm France), un agent intercalant fluorescent qui se fixe à l'ADN double brin. Le colorant qui diffuse librement dans les cellules sort rapidement de la circulation. Il pénètre les cellules pariétales des vaisseaux ainsi que celles situées à proximité de ces derniers. Si la demi-vie du colorant dans la lumière des vaisseaux est inférieure à deux minutes elle est de plus de deux heures en intracellulaire. De ce fait, un gradient de liaison transitoire du colorant dans la paroi

des vaisseaux des vaisseaux perfusé et à leurs alentours se développe. Il peut être utilisé pour estimer la perfusion régionale par microscopie de fluorescence sur coupes de tissus congelés.

Pour ce faire, les souris reçoivent une injection intraveineuse de Hoechst 33342 à la dose de 25 mg/kg et sont sacrifiées 5 minutes plus tard. Cette technique est couplée à la détection des vaisseaux sanguins par mise en évidence immunohistochimique du collagène IV. Les tumeurs sont excisées et congelées dans de l'azote liquide. A partir de cette étape les expérimentations sont réalisées le plus possible à l'obscurité. Des coupes de tumeurs de 5 μm sont réalisées au cryostat puis fixées à l'acétone froid (10 minutes). Le collagène IV est mis en évidence à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique du collagène IV murin (Tableau 2). Ce dernier est mis en évidence par un couple anticorps secondaire de chèvre biotinylé 1/200, E0432, Dako ; streptavidin - Fluorobes 488, 1/8000, FP-BA2221, Fluorobes, Interchim).

Les préparations sont analysées en fluorescence à l'aide d'un microscope Zeiss AxioImagerM1 équipé des filtres DAPI ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 445/50 \text{ nm}$) et FITC ($\lambda_{exc} = 470/40 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525/50 \text{ nm}$) pour visualiser respectivement le marquage nucléaire dû au Hoechst 33342 et le marquage de la membrane basale par le collagène IV.

Des images en mosaïque des préparations immunohistochimiques pour les deux marquages sont de plus réalisées à l'aide du logiciel AxioVision Rel. 4.6 (Carl Zeiss, France). Sur Image J, les signaux correspondant aux marquages du Hoechst 33342 et du collagène IV sont colorés artificiellement respectivement en vert et rouge, afin de faciliter la distinction entre les zones perfusées et non-perfusées.

3.4 Etude du réseau vasculaire et du tissu tumoral *ex vivo* par histologie et immunohistochimie

Toutes les tumeurs étudiées en microscopie intra vitale en lumière transmise sont fixées dans une solution de formol à 4%(m/v) dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4 pendant 16 heures puis incluses en paraffine. Des coupes épaisses de 5 μm sont colorées à l'hématoxyline éosine safran.

Les études immunohistochimiques sont réalisées sur des coupes de la même épaisseur. Après déparaffinage et réhydratation dans un tampon PBS 0,1M ces dernières sont immergées pendant 5 min à 110°C dans un tampon citrate pH 6,1 pour inverser les effets de la fixation formolique. La détection du collagène IV fait exception. Elle ne fait pas appel à une incubation dans un tampon citrate mais à une digestion enzymatique à la collagénase (0,1 mg/mL, 20 min à 37°C) Les anticorps primaires utilisés, l'isotype de ces derniers ainsi que les cibles de ces derniers et leurs dilutions d'utilisation sont listés tableau 1. Les anticorps sont dilués dans un tampon PBS 0,1M contenant 0,3%(m/v) d'albumine sérique bovine ; 0,1%(m/v) d'azide de sodium, 0,06% (m/v) d'n-éthylmaléimide et 20% ((v/v) de glycerol. L'incubation de tous les anticorps primaires est réalisée pendant une nuit à 4°C. Après deux rinçages de 10 min dans un tampon PBST (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.1% (v/v) Tween 20) les activités peroxydasiques endogènes sont inhibées par incubation des coupes dans une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 3% v/v dans l'eau distillée, 20 min). Les coupes sont ensuite rincées dans deux bains de PBST.

La révélation des anticorps primaires fait appel à des méthodologies différentes en fonction de l'espèce ayant servi à l'immunisation.

Les anticorps primaires de lapin sont détectés à l'aide de fragments Fab d'anticorps anti IgG de cette espèce combinés à des polymères d'acides aminés sur lesquels sont greffées des molécules de peroxydase (Histofine Simple StainTM Rabbit (F/414341F, Microm Microtech).

TABLE 1 – Anticorps primaires utilisés pour l'étude du réseau vasculaire et du tissu tumoral

Cible de l'anticorps primaire	Fonction	Isotype	Spécificité	Dilution
CD105 CL8983AP, Cedarlane	Cellules endothéliales activées	IgG rat polyclonal	Souris	$d = 1/30^e$
Desmine clone D33, Dako	Péricytes	IgG souris monoclonal	Humain Souris	$d = 1/400^e$
Collagène IV #20451, Novotec	Membrane basale	IgG lapin polyclonal	Souris	$d = 1/2000^e$
VEGF ab46154, Abcam	Facteur de croissance	IgG lapin polyclonal	Humain Souris	$d = 1/600^e$
VEGFR-1 PA5-16493, Thermo Fischer Scientific	Cellules endothéliales vasculaires	IgG lapin polyclonal	Humain Souris	$d = 1/80^e$
VEGFR-2 MA5-15556, Thermo Fischer Scientific	Cellules endothéliales (<i>tip cells</i>)	IgG lapin monoclonal	Humain Souris	$d = 1/600^e$
Lyve-1 DP3513P, Acris	Cellules endothéliales lymphatiques	IgG lapin polyclonal	Souris	$d = 1/100^e$
Interleukine-8 NBP2-33819, Novus	Méiateur de l'inflammation	IgG lapin polyclonal	Humain	$d = 1/200^e$
Glut-1 E2844, Springbio	Rapporteur de l'hypoxie	IgG lapin polyclonal	Humain	$d = 1/1000^e$
Bnip3l E16842, Eurobio	Marqueur de l'autophagie	IgG lapin polyclonal	Humain	$d = 1/400^e$
eNOS PA1-037, Thermo Fischer Scientific	<i>Nitric Oxide Synthase</i> endothéliale	IgG lapin polyclonal	Humain Souris	$d = 1/100^e$

L'incubation s'effectue pendant une heure à température ambiante. Après deux rinçages dans le tampon PBST, l'activité peroxydasique est révélée, à l'aide du kit ImmPACTTM NovarEDTM (Eurobio) donnant lieu à une coloration rouge des zones de fixation de l'anticorps.

L'anticorps anti CD105 (IgG de rat) est détecté à l'aide d'un système anticorps secondaire anti IgG de rat biotinylé (Southern Biotech n°305208), dilution 1/800) / streptavidine peroxydase (Streptavidine HRP Microm Microtech, F/TS-125-HR, 20 min), l'activité peroxydasique étant révélée à l'aide du kit ImmPACTTM NovarEDTM précédemment cité.

Enfin les anticorps secondaires anti IgG de souris utilisés pour la détection de la desmine sont détectés à l'aide du kit Mousestain Kit (F/414321F, Microm Microtech) en suivant les indications du fournisseur, l'activité peroxydasique étant mise en évidence à l'aide du kit ImmPACTTM NovarEDTM précédemment cité.

Les coupes histologiques sont contre-colorées à l'Hématoxyline de Mayer (Mayer's Hematoxylin, S3309, Dako).

Les images des tumeurs sont acquises à l'aide du microscope Nikon Eclipse E600 (Nikon, France) équipé d'une caméra Digital Light DS-Fi1. Des mosaïques des tumeurs ont été réalisées à l'aide du plugin MosaicJ sur Fiji [243]. La densité vasculaire, analysée sur les préparations après mise en évidence du collagène IV, de VEGFR-2, de CD105, de la desmine et de Lyve-1, est exprimée en nombre de vaisseaux sanguins/mm² de surface tumorale.

La quantification des vaisseaux sanguins sur les réseaux vasculaires sains a été réalisée sur des images de biopsies humaines marquées avec ces mêmes anticorps et tirées de l'Human Protein

4 Schémas thérapeutiques testés

Dans ce travail, l'anticorps anti-VEGF bevacizumab (Avastin, Roche) est administré seul ou en association à la thérapie photodynamique (PDT). Les effets de la thérapie anti-angiogène ont été évalués sur le réseau vasculaire tumoral et sur la croissance tumorale à l'aide du modèle de la chambre dorsale et du modèle de greffe en pli inguinal. Par ailleurs, l'efficacité thérapeutique de différents protocoles associant l'anti-angiogène et la thérapie photodynamique a été évaluée sur la croissance de tumeurs implantées en pli inguinal.

4.1 Traitement anti-angiogène

En l'absence de consensus dans la littérature pré clinique sur les modalités d'application du bevacizumab nous avons opté, dans ce travail, pour une dose journalière unique de 10 mg/kg, administrée par voie intra-péritonéale afin de s'assurer d'observer un effet anti-angiogène marqué.

Dans les cas des xénogreffes dans la chambre dorsale, la revascularisation de la tumeur est suivie par microscopie intravitale. Lorsque la totalité de la surface du fragment tumoral apparaît vascularisée, soit 10 à 14 jours après implantation, les souris greffées sont divisées en 6 lots : 1 lot non traité et 5 lots dans lesquels les souris reçoivent le traitement pendant respectivement 2,4, 6,10 ou 14 jours.

Pour les souris porteuses de tumeurs greffées dans le pli inguinal, le traitement journalier par bevacizumab (10 mg/kg) débute lorsque les tumeurs ont une taille entre 36 et 60 mm³, de façon à correspondre à l'intervalle de temps, défini par l'imagerie intravitale, de 10 à 14 jours nécessaire à la vascularisation des fragments tumoraux. Les groupes de traitement sont décrits ci-après et dans la figure 4.

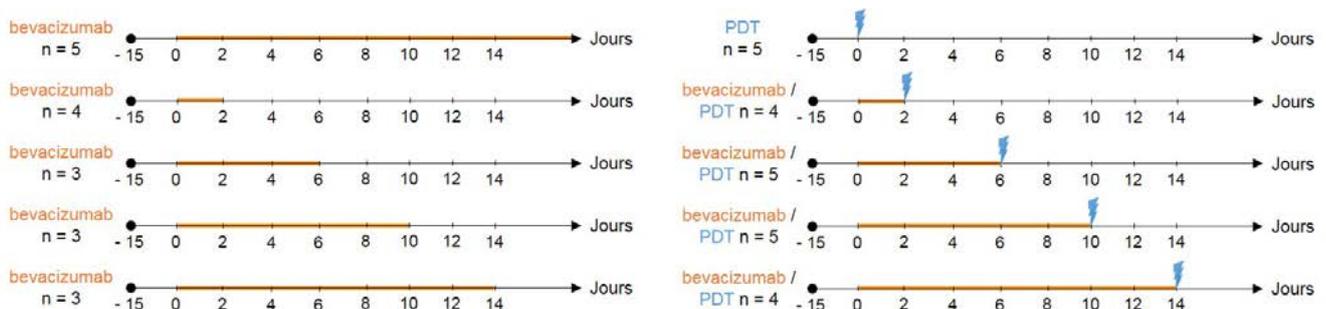


FIGURE 4 – Séquences de traitement faisant intervenir l'association bevacizumab et PDT pour des tumeurs implantées en sous-cutané dans le pli inguinal

4.2 Séquences d'association bevacizumab et thérapie photodynamique

Ces expérimentations ont pour objet d'évaluer l'impact d'un pré-traitement au bevacizumab sur l'efficacité de la thérapie photodynamique (PDT). Nous avons choisi de travailler avec la PDT car cette thérapie nécessite un réseau vasculaire efficace permettant à la fois de délivrer le photosensibilisateur dans toute la tumeur et d'assurer l'oxygénation du tissu.

Cinquante-huit souris au total ont été réparties en 14 groupes dont 10 groupes traités (Figure 4) et 4 groupes contrôles.

Parmi les groupes contrôles :

- un groupe non traité ($n = 8$)
- un groupe ayant reçu une administration de photosensibilisateur à J0 ($n = 3$)
- deux groupes traités au bevacizumab pendant 6 jours et ayant reçu le photosensibilisateur seul ($n = 3$) ou de la lumière seule ($n = 3$) à J6

Parmi les groupes traités (Figure 4) :

- un groupe ayant reçu une monothérapie de bevacizumab de J0 à la mise à mort
- un groupe ayant reçu un traitement photodynamique à J0
- 4 groupes ayant reçu une séquence d'association bevacizumab (2, 6, 10 ou 14 jours) puis un traitement photodynamique
- 4 groupes ayant reçu une monothérapie de bevacizumab pendant 2, 6, 10 ou 14 jours

Conditions de traitement photodynamique

Pour cette étude, la triphénylchlorine (TPC) est choisi comme photosensibilisateur, . Ce dernier, synthétisé par le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Nancy), se présente sous forme lyophilisée. Il est mis en solution dans du DMSO à la concentration de 3mg/mL. Juste avant l'emploi, cette solution est diluée à la concentration de 0,3 mg/mL dans un mélange volume à volume depolyéthylène-glycol 400 (PEG) : éthanol : sérum physiologique (3 : 2 : 5). Il est maintenu à l'abri de la lumière. L'administration se fait par voie veineuse, chez la souris éveillée, à la concentration finale de TPC de 1,75 $\mu\text{mol/kg}$, soit 1,15 mg/mL. Après un intervalle drogue-lumière de 4 heures, la souris est anesthésiée et déposée sur un tapis chauffant en décubitus dorsal. La tumeur est irradiée par une lumière non-ionisante à l'aide d'un laser à 652 nm (diode Biolitec) sur une surface, plus grande que la tumeur, de 1,2 cm^2 .

Les conditions de traitement photodynamique ont été choisies en accord avec les résultats de l'étude de Tirand *et al.* réalisée au laboratoire, de façon à maximiser l'effet thérapeutique pour des tumeurs implantées en sous-cutané dans le pli inguinal [245]. Ces conditions de traitement ont été définies de façon à délivrer une fluence de 120 J/cm^2 et une irradiance de 85 mW/cm^2 avec un temps total d'irradiation de 24 minutes.

La dose de thérapie photodynamique délivrée est calculée selon la quantité d'oxygène singulet générée dans le tissu qui dépend de plusieurs paramètres comme le montre l'équation suivante :

$$\text{Dose photodynamique} \approx [PS] \times \varphi \times t \times \varepsilon \times [{}^3\text{O}_2] \times \Phi_{\Delta}$$

Avec :

- $[PS]$, la concentration de photosensibilisateur présente dans le tissu (en mol/L)
- φ , l'irradiance lumineuse (en W/cm^2) qui correspond à la vitesse à laquelle la lumière est appliquée
- t , le temps d'irradiation (en s)
- $\varphi \times t$, la fluence lumineuse (en J/cm^2) qui correspond à la quantité totale de photons délivrée au cours du traitement
- ε , le coefficient d'extinction molaire du photosensibilisateur à la longueur d'onde d'irradiation de travail ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

-
- $[^3O_2]$, la concentration d'oxygène moléculaire présent dans le tissu (en mol/L)
 - Φ_{Δ} , le rendement quantique en oxygène singulet

Après le traitement, la souris est maintenue à l'obscurité pendant quelques jours pour éviter que l'exposition à la lumière ne provoque des brûlures superficielles de la peau dans le cas où le photosensibilisateur ne serait pas totalement éliminé. De façon à réduire le stress, l'isolement des souris à l'obscurité est le plus possible évité. Pour ce faire, les animaux traités sont maintenus le plus possible en groupe dans la même cage.

5 Profil d'expression des récepteurs au VEGF par les cellules U87

5.1 Extraction des protéines et dosage

Les protéines sont extraites des cellules U87MG en culture à 90% de confluence. Dans un premier temps le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées au PBS. Après grattage des cellules, des extraits cellulaires sont obtenus après grattage des cellules avec un tampon de lyse (Tris-HCl (1M, pH8), NaCl, Nonidet P40, sodium deoxycholate, sodium dodécylsulfate, EDTA (Acide éthylènediamine tétra-acétique, Sigma-Aldrich, USA), cocktails d'inhibiteurs de phosphatases (cocktails 2 et 3, Sigma-Aldrich, USA) et d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche, Switzerland)). Les extraits cellulaires sont ensuite centrifugés pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant contenant les protéines est récupéré.

La concentration protéique totale des extraits est mesurée en utilisant le kit de dosage Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA). La gamme étalon d'albumine et les échantillons dilués au 1/5^e sont mis en contact de la solution de révélation du kit de dosage pendant 30 minutes à 37 °C puis l'absorbance est lue à 562 nm avec le (MultiSkan, MTX Lab Systems, USA).

5.2 Western blot

Les protéines sont séparées par un gel SDS-PAGE composé d'un gel de concentration à 4% et d'un gel de séparation à 8% d'acrylamide/bis 29 : 1 à 30% (Bio-Rad, France). La migration des échantillons se fait pendant 30 minutes à 50 V puis 1h30 à 110 V dans un tampon de migration (50 mM Tris-base, 0,38 M Glycine, 3,5 mM SDS (Sodium DodecylSulfate, Bio-Rad, France). Les protéines sont transférées sur la nuit sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene Fluoride, Amersham HybondTM-P, GE Healthcare, USA) dans un tampon de transfert pH 8,5 (0,5 M Tris-base, 0,13 M Glycine, 13 mM SDS, Sigma-Aldrich, USA). Les membranes sont saturées pendant 1 heure dans une solution de TBST (Tris Buffered Saline Tween 20) 0,1% (60 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, Sigma-Aldrich, USA) additionné de 5% de lait pour bloquer les sites aspécifiques.

Les anticorps primaires sont dilués dans du TBST 0,1% additionné de 5% de lait. L'anticorps anti-VEGFR-1 (rabbit polyclonal, PA5-16493, Thermo Scientific, USA) est dilué au 1/100^e et l'anticorps anti-VEGFR-2 (mouse monoclonal, MA5-15556, Thermo Scientific, USA) ainsi que l'anticorps anti- β -actine (rabbit monoclonal, 4970, Cell Signaling Technology, France) sont dilués au 1/1000^e. L'anticorps anti-NRP-1 (rabbit monoclonal, 3725, Cell Signaling Technology, France) est dilué au 1/1000^e dans du TBST 0,1% additionné de 5% de BSA (Bovin Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA). L'incubation avec les anticorps primaires se fait sur 1 heure à

température ambiante. Après incubation les membranes sont lavées trois fois avec du TBST 0,1%.

L'anticorps secondaire permettant la révélation de la liaison de l'anticorps primaire à sa cible est une Immunoglobuline G anti-lapin couplé à la HRP (*Horseradish peroxidase*, Cell Signaling Technology, France). Il est dilué au 1/10 000^e dans du TBST additionné de 5% de lait puis incubé 1 heure avec la membrane à température ambiante. Les membranes sont ensuite lavées trois fois avec du TBST 0,1%. La révélation de l'anticorps secondaire se fait par chimiluminescence avec le kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, USA) à l'aide de l'analyseur d'image LAS4000 (Fujifilm, Japon).

Les cellules MDA-MB-231 sont utilisées comme contrôle positif pour l'expression de VEGFR-1 et de NRP-1 et les HUVEC comme contrôle positif pour l'expression de VEGFR-2 [246, 247]

Deuxième partie

Résultats

Introduction à la partie résultats La partie résultats se décline en six chapitres permettant de retracer le cheminement effectué au cours de ce travail de doctorat.

Le premier chapitre est dédié aux observations par microscopie intravitale du réseau vasculaire sain et de tumeurs xénogreffées en chambre dorsale, non traitées ou recevant un traitement journalier par l'anti-VEGF bevacizumab. Les résultats présentés mettent en évidence la nécessité de quantifier les modifications morphologiques du réseau vasculaire tumoral au cours du traitement pour pouvoir interpréter ses effets.

Le second chapitre est dédié au développement d'un algorithme dédié au traitement d'images du réseau vasculaire et à la définition de paramètres vasculaires précis permettant de quantifier la vascularisation.

Le troisième chapitre est dédiée à la mise en évidence de la période de "normalisation" du réseau vasculaire tumoral *via* la détection de paramètres discriminants de la "normalisation" par comparaison à un réseau vasculaire sain grâce à l'algorithme de traitement d'images et confortée par l'analyse de la fonctionnalité vasculaire *in vivo* et l'analyse immunohistochimique des vaisseaux sanguins.

Le quatrième chapitre est dédié à la caractérisation par immunohistochimie des effets du bevacizumab sur la réponse tumorale au cours du temps.

Le cinquième chapitre est dédié à la vérification de l'hypothèse du bénéfice du traitement par anti-VEGF, préalablement à la thérapie photodynamique, sur des tumeurs de glioblastome implantées en sous-cutané et en chambre dorsale.

Le sixième chapitre est dédié à un travail pluridisciplinaire visant à développer un modèle mathématique de la réponse tumorale au bevacizumab à partir de nos données biologiques pour simuler *in silico* l'effet thérapeutique dans un objectif de prédiction de la réponse au traitement et de la période de "normalisation".

Chapitre 1

Observations morphologiques du réseau vasculaire sain et tumoral par microscopie intravitale

Sommaire

1.1	Réseau vasculaire sain	81
1.2	Mise en place du réseau vasculaire tumoral	82
1.3	Cas des tumeurs non traitées	83
1.4	Cas des tumeurs traitées	85
1.4.1	Différents cas de figure d'évolution du réseau vasculaire sous l'effet du traitement	87
1.4.2	Effets du bevacizumab sur les vaisseaux en dehors de la tumeur . . .	87
1.5	Discussion	87

Ce premier chapitre a pour objectif de présenter l'intérêt ainsi que les limites du modèle de la chambre dorsale dans l'observation par microscopie intravitale du réseau vasculaire sain et dans le suivi des modifications morphologiques du réseau vasculaire tumoral au cours du temps avec ou sans l'administration d'un traitement anti-angiogène.

1.1 Réseau vasculaire sain

Le réseau vasculaire de la peau observé en chambre dorsale a été choisi comme réseau vasculaire sain de référence comme élément de comparaison aux réseaux vasculaires tumoraux avec et sans traitement.

La mise en place de la chambre dorsale crée un phénomène inflammatoire se traduisant par une vasodilatation parfois accompagnée d'oedèmes. Ce n'est qu'une fois que l'oedème est résorbé et que le réseau vasculaire est stabilisé qu'il est possible de considérer ce réseau vasculaire comme référence.

La figure 1 présente des observations du réseau vasculaire sain dans trois zones différentes retrouvées au sein d'un même champ large d'observation en chambre dorsale montrant la co-existence de vaisseaux sanguins de diamètres différents. Les images du réseau vasculaire sain sont classées en trois catégories :

- la zone de microcirculation (Figure 1A) qui ne comprend que des petits capillaires de diamètre homogène ;
- la zone intermédiaire (Figure 1B) comprenant les petits capillaires et des capillaires de diamètre plus important ;
- la zone large (Figure 1C) comprenant tous les types de vaisseaux sanguins observés en chambre dorsale présentant probablement une hiérarchie artériole-capillaire-veinule. Il n'est cependant pas possible sur ce type d'image de différencier les phénotype artériole et veinule.

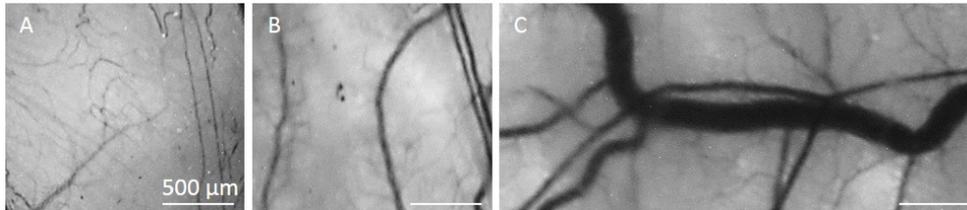


FIGURE 1 – Observation du réseau vasculaire sain en chambre dorsale par microscopie intravitale. L'architecture du réseau vasculaire sain présente une hiérarchie artériole-capillaire-veinule faisant intervenir des vaisseaux de tailles différentes. **a** La microcirculation inclue uniquement les capillaires sanguins. **b**, **c** Les zones plus larges présentent une hiérarchie et prennent en compte les capillaires et des vaisseaux sanguins de plus grand diamètre. Echelle : 500 μm

1.2 Mise en place du réseau vasculaire tumoral

Lorsqu'un fragment tumoral est déposé sur le réseau vasculaire sain de la peau de la souris, des modifications morphologiques de ces vaisseaux sont visibles. Le fragment tumoral provenant d'une tumeur établie chez une autre souris est chimérique. Il comporte des cellules tumorales humaines ainsi qu'une vascularisation et un tissu conjonctif murins. Lorsque le fragment est déposé sur le tissu cutané murin, il possède une vascularisation qui lui est inutile car non reliée au nouveau réseau vasculaire et qui sera donc probablement renouvelée.

Le fragment tumoral stimule l'angiogenèse et en réponse, les cellules endothéliales des vaisseaux de la peau migrent et prolifèrent vers la tumeur (Figure 2). Des hémorragies sont visibles dans le pourtour de la tumeur où les néovaisseaux font leur entrée. La présence d'hémorragies témoigne du caractère très angiogène de la tumeur. Le microenvironnement tumoral étant riche en facteurs pro-angiogènes et en métalloprotéases matricielles, les vaisseaux qui entrent dans la tumeurs vont devenir déstabilisés, d'où les hémorragies. La formation de thrombi à la suite de cela favorise l'action pro-angiogène et ainsi la stimulation de l'angiogenèse.

Dans un premier temps, des ébauches de vaisseaux sont formées dans la périphérie de la tumeur et ne sont pas forcément toutes vascularisées. Ces capillaires sont ensuite rallongés, reliés entre eux et prolongés vers le centre de la tumeur et finissent par former un réseau. Il faut 10 à 14 jours pour que toute la surface tumorale soit irriguée par des vaisseaux sanguins. Par comparaison au réseau vasculaire sain, le réseau vasculaire tumoral ne présente que capillaires sanguins désorganisés de façon chaotique.

A partir du moment où les tumeurs apparaissent entièrement vascularisées, elles sont étudiées avec ou sans l'addition du traitement anti-angiogène, bevacizumab.

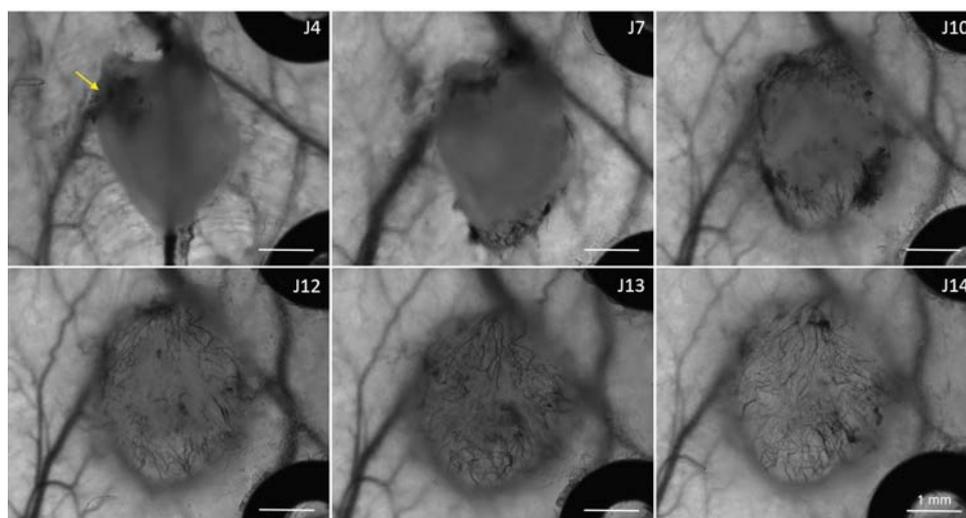


FIGURE 2 – Mise en place du réseau vasculaire tumoral. Le fragment tumoral issu d’une xénotgreffe de glioblastome (lignée U87) déposé à J0 dans la chambre dorsale libère des facteurs pro-angiogènes qui stimulent l’angiogénèse visible par la présence de zones d’hémorragies dès J4 pour cet exemple (flèche). La circulation sanguine dans les capillaires sanguins formés permet de suivre l’évolution progressive du réseau vasculaire tumoral qui ici nécessite 14 jours pour irriguer toute la surface tumorale observée. Echelle : 1 mm

1.3 Cas des tumeurs non traitées

La figure 3 montre l’évolution d’une tumeur portée par une souris n’ayant reçu aucun traitement. A J0, le fragment tumoral est déposé sur le réseau vasculaire cutané. A J10, la tumeur est totalement vascularisée. A partir de cet instant la croissance tumorale augmente considérablement et elle s’accompagne d’une stimulation de l’angiogénèse plus accrue, visible par une dilatation plus importante des vaisseaux sanguins cutanés qui ne cessent de proliférer en direction et au sein de la tumeur. Le réseau vasculaire est continuellement remanié dans la tumeur, ce qui est visible par la modification de la morphologie des vaisseaux. Ce remaniement s’accompagne de l’apparition de thrombi, surtout visibles entre J27 et J31 dans cet exemple, qui se présentent sous la forme d’amas de spots. La présence de ces thrombi accentue le phénomène pro-angiogène, le réseau vasculaire devient plus dense et les vaisseaux sont encore plus dilatés. A partir de J37, la plupart des vaisseaux ne sont plus visibles en microscopie et paraissent partiellement dégradés. Sachant que les vaisseaux observés sont ceux de la périphérie tumorale, à cet instant, ce phénomène n’est pas représentatif de ce qui se passe au cœur de la tumeur et montre qu’un des points limites du modèle de la chambre dorsale est atteint.

L’injection d’un agent de contraste (dextran-TexasRed) avant visualisation du réseau vasculaire en microscopie intravitale en fluorescence met en évidence certains détails morphologiques invisibles en observation en lumière transmise. La figure 4 montre deux champs de réseaux vasculaires de tumeurs non traitées observés en fluorescence et en lumière transmise. La superposition de ces deux images montrent que certains capillaires sanguins ne sont visibles qu’en fluorescence grâce à la circulation de l’agent de contraste qui pourraient correspondre à des néo-vaisseaux dans lesquels le plasma peut circuler mais pas les globules rouges probablement dû à un diamètre vasculaire trop faible. Les capillaires présentent des points de concentration de l’agent de contraste qui pourraient représenter les zones bourgeonnantes.

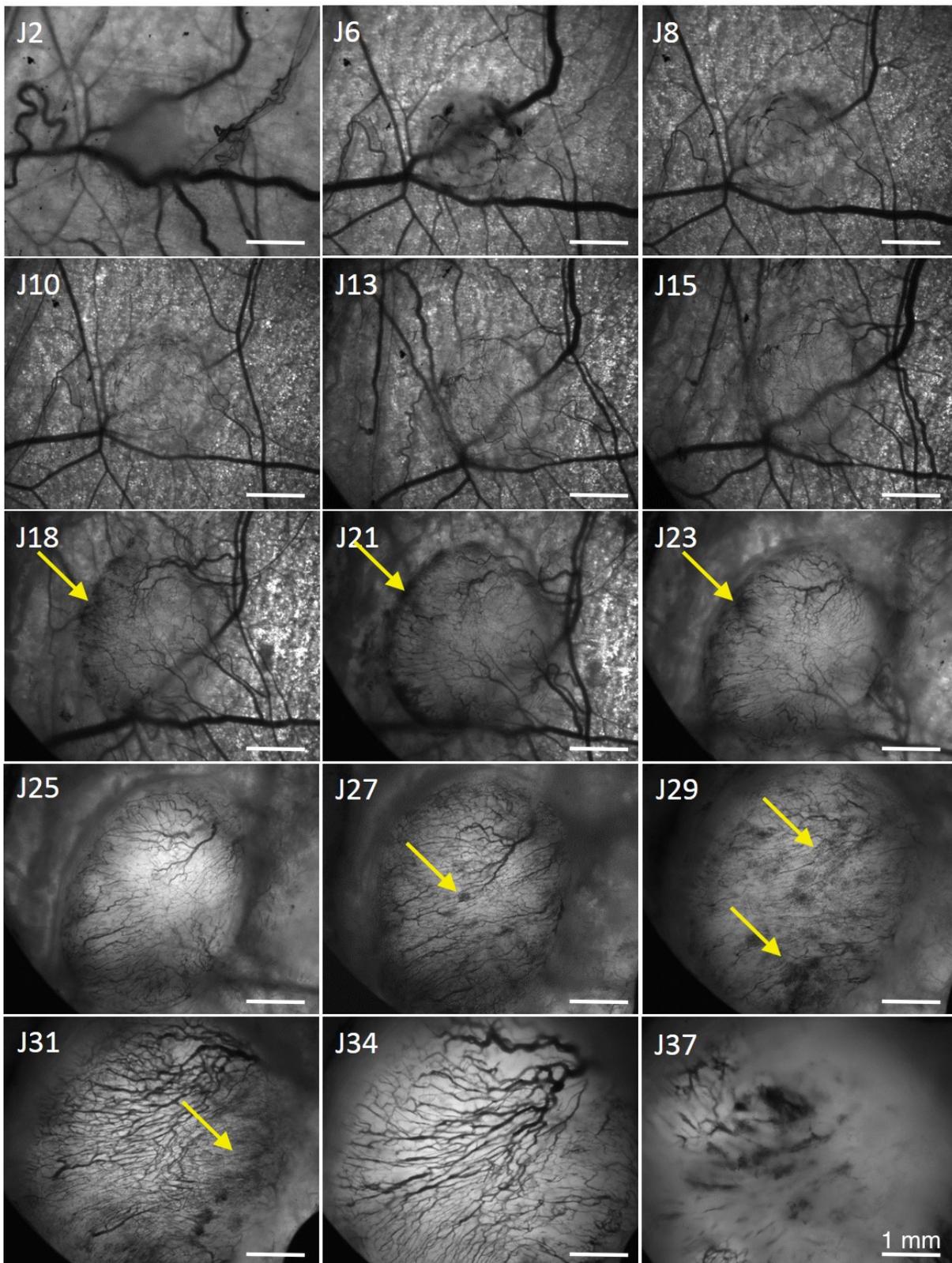


FIGURE 3 – Evolution du réseau vasculaire d'une tumeur non traitée en microscopie intravitale. Les flèches indiquent les zones présentant des thrombi. Echelle : 1 mm

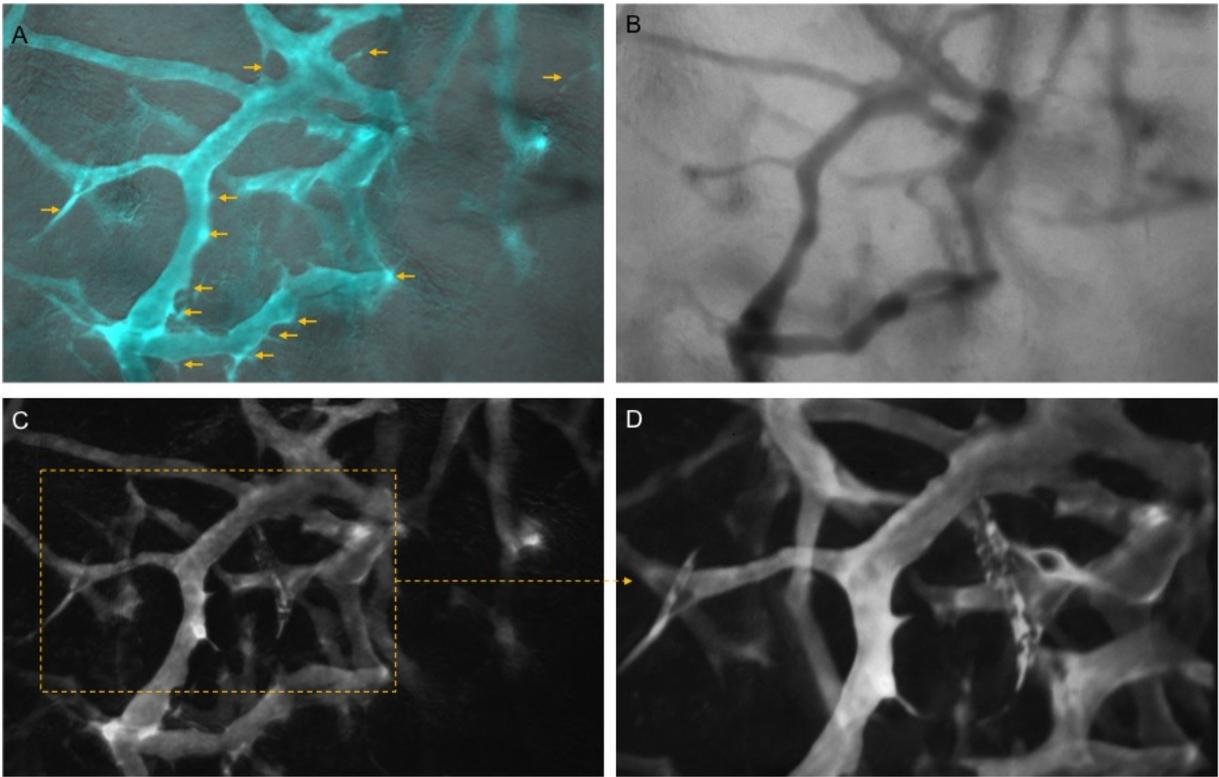


FIGURE 4 – Observation du réseau vasculaire tumoral. Vaisseaux sanguins tumoraux avec et sans injection d’agent de contraste. A gauche, l’image prise en fluorescence après injection de dextran Texas-Red est superposée à l’image prise en lumière transmise montrant ainsi les néo-vaisseaux sanguins et les zones bourgeonnantes

1.4 Cas des tumeurs traitées

En observant la cinétique d’évolution des vaisseaux sanguins dans une tumeur traitée (Figure 5), l’effet du traitement anti-angiogène est constaté par des modifications progressives du réseau vasculaire, les vaisseaux sanguins s’affinent, ils sont moins ramifiés et la densité vasculaire diminue. Au début du traitement, la diminution de la quantité de vaisseaux sanguins ne laisse pas apparaître de zones d’hémorragies, ce qui pourrait être le reflet d’une régression vasculaire. Lorsque le traitement se poursuit, la présence de débris vasculaires témoigne d’une destruction massive des vaisseaux sanguins (bevacizumab J18, flèche) qui laisse apparaître de larges zones avasculaires, désignées par les étoiles dans la figure, qui sont probablement hypoxiques.

L’observation avec injection préalable d’un agent de contraste met en évidence des structures vasculaires dénuées d’hématies, invisibles en lumière transmise, se présentant sous la forme de capillaires très fins et de vaisseaux sans issue (Figure 6). Ces structures représentent probablement des vaisseaux en régression et ne sont observables que pendant les premiers jours de traitement.

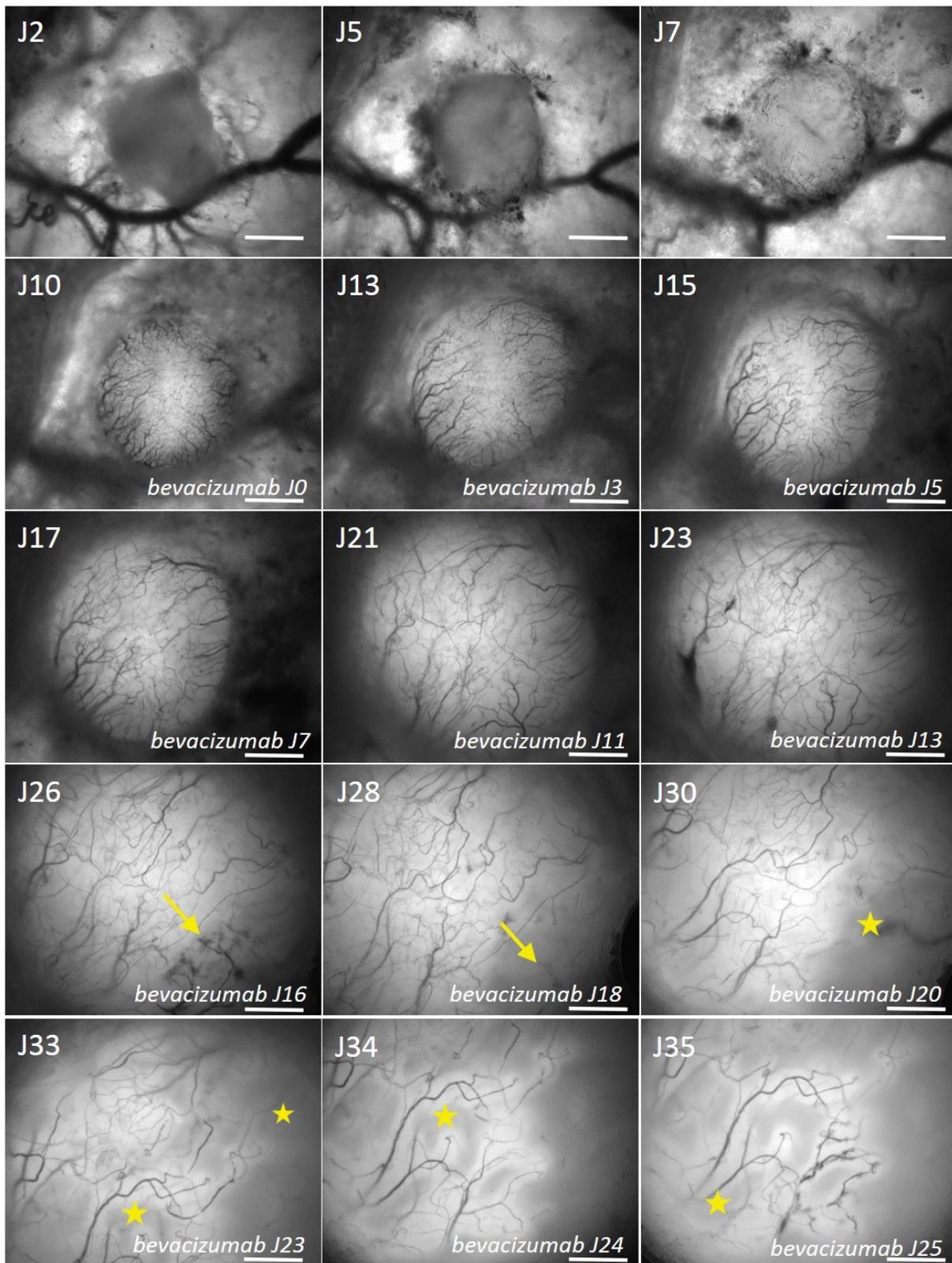


FIGURE 5 – Evolution du réseau vasculaire d'une tumeur traitée en microscopie intravitale. Le bevacizumab est administré par injection intrapéritonéale à 10 mg/kg par jour à partir de J10. Les flèches indiquent les débris vasculaires témoins d'une destruction importante des vaisseaux sanguins qui laisse place à des zones probablement hypoxiques (étoiles). Echelle : 1 mm

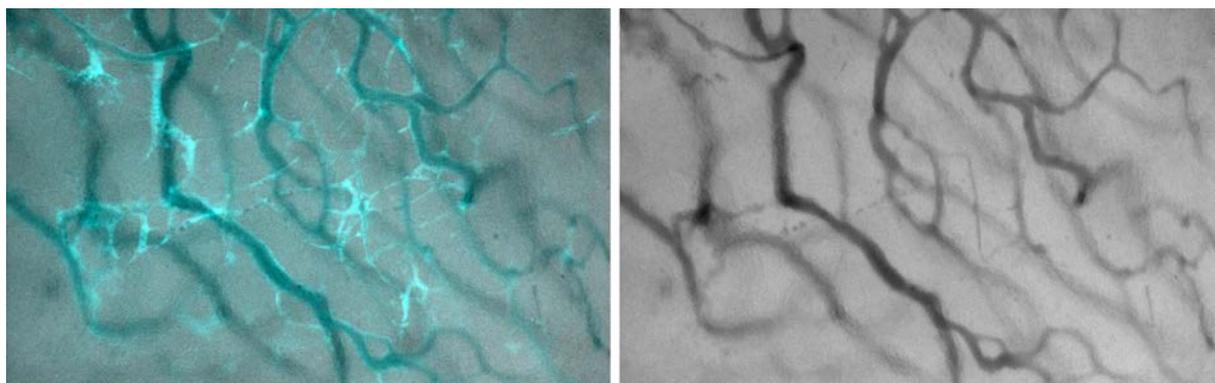


FIGURE 6 – Observation de vaisseaux sanguins avec et sans agent de contraste. A gauche, l'image prise en fluorescence (en cyan) après injection de dextran-TexasRed est superposée à l'image prise en lumière transmise et met en évidence les vaisseaux sanguins en régression. Echelle : 500 μm

1.4.1 Différents cas de figure d'évolution du réseau vasculaire sous l'effet du traitement

La figure 7 montre deux cas d'évolution du réseau vasculaire tumoral sous l'effet du traitement par le bevacizumab. En A, la quantité de vaisseaux sanguins visibles irriguant la tumeur s'amointrit rapidement sous l'effet du traitement et la croissance tumorale est boostée. Ce phénomène s'accompagne de très peu d'hémorragies, ce qui laisse supposer qu'un phénomène de régression vasculaire et de destruction vasculaire apparaissent en même temps. A 14 jours de traitement, quelques travées vasculaires sont encore visibles mais non vascularisées. En B, l'autre cas de réponse, plus fréquent, où en continuité avec les modifications morphologiques, la quantité de vaisseaux sanguins diminue progressivement au cours du temps. Vers 14 jours de traitement, des zones de la tumeur présentent une destruction vasculaire plus importante accompagnée d'hémorragies. Dans ce second cas, le bevacizumab a un effet moins important sur la croissance tumorale.

1.4.2 Effets du bevacizumab sur les vaisseaux en dehors de la tumeur

Sous l'effet du bevacizumab, les vaisseaux tumoraux s'affinent et sont moins nombreux. Cependant, une microvascularisation plus intense dans le pourtour de la tumeur se met en place (Figure 8). Les vaisseaux sanguins murins autour de la tumeur restent dilatés et prolifèrent autour de la tumeur mais contrairement aux tumeurs contrôles, ils ne continuent pas de proliférer pour irriguer la tumeur. Si le bevacizumab ne lie pas le VEGF murin mais uniquement le VEGF humain, il est possible que l'effet anti-angiogène soit visible dans la tumeur mais pas dans le microenvironnement. En effet, si les cellules du microenvironnement associées à la tumeur sécrètent du VEGF qui n'est pas lié par le bevacizumab, les cellules endothéliales continueraient de proliférer. Ainsi, un "tapis" de microvascularisation autour de la tumeur se forme, sans que celui-ci n'irrigue la tumeur.

1.5 Discussion

L'observation du réseau vasculaire tumoral en microscopie intravital au cours du temps met clairement en évidence les modifications morphologiques des vaisseaux sanguins au cours de la

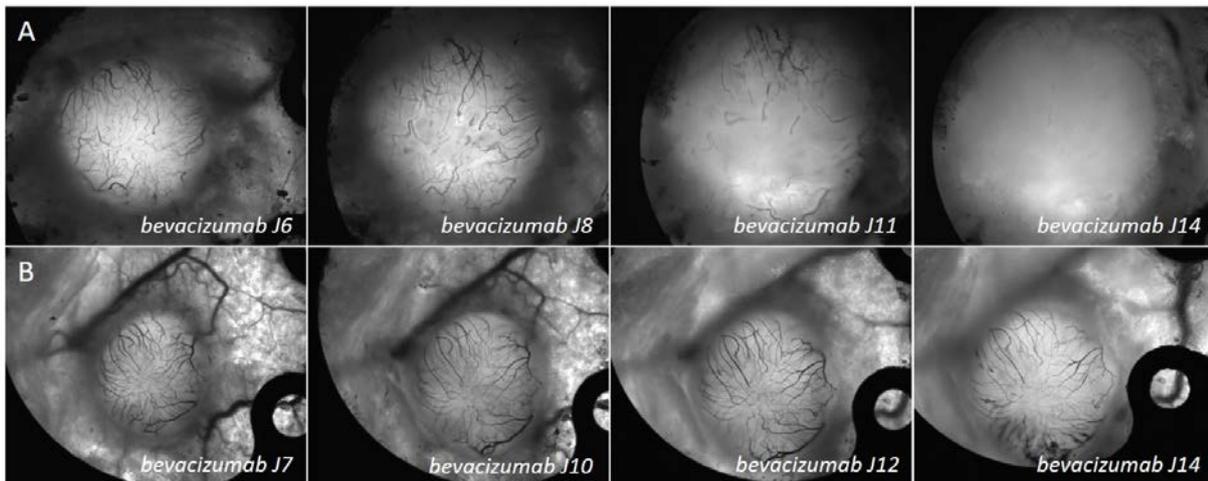


FIGURE 7 – Exemples d'évolution du réseau vasculaire tumoral sous l'effet du traitement par bevacizumab. Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale journalière de bevacizumab à 10 mg/kg. **A** Le réseau vasculaire tumoral est rapidement réduit probablement sous l'effet combiné d'une régression vasculaire accompagné d'une destruction vasculaire visible par la présence d'hémorragies. **B** La morphologie du réseau vasculaire tumoral s'affine au cours du traitement et la densité régresse progressivement en s'accompagnant d'hémorragies.

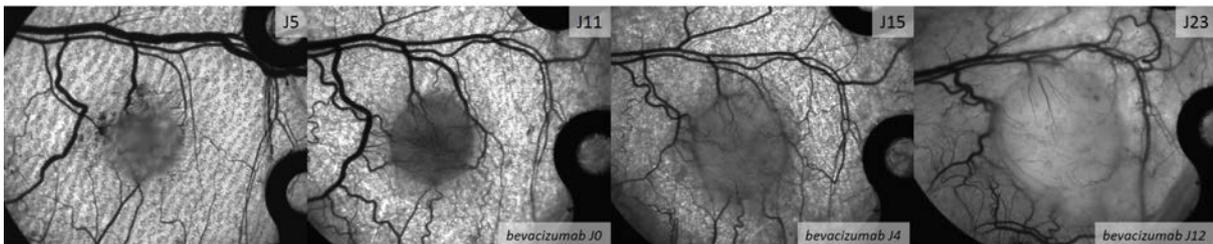


FIGURE 8 – Modification du réseau vasculaire sain autour de la tumeur lors du traitement anti-angiogène

croissance tumorale dans les tumeurs contrôles et traitées (Figures 3 et 5). Dans les tumeurs contrôles, ce remodelage vasculaire est accompagné d'une stimulation accrue de l'angiogenèse visible par la présence de thrombi et l'aspect très dilaté des vaisseaux sanguins qui présentent une forte activité angiogénique. Dans le cas des tumeurs traitées, le remodelage vasculaire est accompagné de la destruction partielle des vaisseaux sanguins et de l'affinement des vaisseaux. L'observation après injection d'un agent de contraste laisse apparaître des vaisseaux sanguins en régression, dépourvus de globules rouges mais où le plasma circule. Ainsi, une hypothèse peut être proposée sur la réponse vasculaire aux effets anti-angiogène et anti-vasculaire du bevacizumab qui pourrait agir en induisant d'abord une fermeture *a priori* temporaire des sphincters précapillaires s'ils sont présents dans ce type de vasculature, mais l'inhibition de l'angiogenèse n'étant pas levée, les vaisseaux sanguins régresseraient. La vérification de cette hypothèse est peu évidente car à notre connaissance, aucune recherche n'a mis en évidence la présence de sphincters précapillaires dans les tumeurs, rôle qui pourrait être joué par les péricytes.

Dans le contexte de l'étude de la "normalisation" vasculaire, les résultats présentés dans ce

chapitre ne permettent pas d'identifier une période où la morphologie du réseau vasculaire tumoral traité ressemble le plus à celle du réseau vasculaire sain par simple comparaison visuelle. Des comparaisons de ce type ont pu être effectuées dans la littérature [117], mais cela reste très subjectif. Concernant la "normalisation", avec ces résultats il n'est possible que d'émettre l'hypothèse que la période de "normalisation" ne pourrait pas se situer au-delà de 20 jours de traitement. En effet, à ce stade la destruction des vaisseaux laisse place à des zones hypoxiques qui risquent en cas d'arrêt du traitement d'induire une angiogenèse réactionnelle très importante et délétère pour le patient.

Pour affiner l'étude morphologique du réseau vasculaire tumoral et pour le comparer de façon efficace à un réseau vasculaire sain, il est nécessaire de pouvoir quantifier les changements morphologiques vasculaires qui ont lieu au cours du temps et sous l'effet du traitement afin de pouvoir potentiellement déterminer une période de "normalisation" vasculaire.

Chapitre 2

Développement d'un algorithme de traitement d'images pour caractériser le réseau vasculaire

Sommaire

2.1	Cahier des charges - Présentation du projet	91
2.1.1	Contexte	91
2.1.2	Objectifs	92
2.1.3	Description des outils d'analyse du réseau vasculaire existants . . .	92
2.2	Procédure de traitement des images	93
2.3	Procédure de validation et critères d'acceptation	96
2.4	Discussion	96

Les observations morphologiques étant insuffisantes pour caractériser les modifications fines du réseau vasculaire au cours du temps et au cours du traitement, il est nécessaire de développer un outil permettant de quantifier des paramètres propres au réseau vasculaire. Ce chapitre est donc dédié à la présentation de l'algorithme de traitement d'images développé spécifiquement pour répondre à cette problématique. Cet algorithme est le fruit d'un travail collaboratif avec El-Hadi Djermoune et Jean-Baptiste Tylcz.

2.1 Cahier des charges - Présentation du projet

2.1.1 Contexte

L'observation par microscopie intravitale du réseau vasculaire de tumeurs implantées sur le réseau vasculaire visible dans la chambre dorsale permet de suivre la mise en place du réseau vasculaire et son remaniement mais les informations obtenues sont d'ordre qualitatives et leur interprétation subjective.

L'intérêt de développer un outil d'analyse du réseau vasculaire est de pouvoir non seulement adapter l'analyse effectuée à d'autres cas de cancers mais aussi à toute maladie pour lesquelles le développement anormal de l'angiogenèse est un enjeu important autant dans les cas précliniques que cliniques.

2.1.2 Objectifs

Le principal objectif est de pouvoir détecter des changements morphologiques fins et de les quantifier de façon spécifique au cours du temps. L'algorithme développé doit être capable de réaliser une analyse automatique du réseau vasculaire, sans avoir à changer les paramètres de l'analyse pour chaque nouveau réseau vasculaire analysé.

Afin de quantifier les changements morphologiques qui ont lieu au sein du réseau vasculaire, il est nécessaire de définir les caractéristiques morphologiques des vaisseaux sanguins à analyser. Le réseau vasculaire est défini par la quantité de vaisseaux sanguins présents pour irriguer le tissu et par le nombre d'embranchements. Un grand nombre d'embranchements témoignera d'une forte angiogenèse. Les vaisseaux sont caractérisés par leur capacité de bourgeonnement, par leur longueur, par leur diamètre et par leur tortuosité. L'objectif est que l'algorithme puisse détecter ces paramètres sur tous les vaisseaux, quel que soit leur taille.

2.1.3 Description des outils d'analyse du réseau vasculaire existants

Il existe des logiciels commerciaux dédiés à l'analyse du réseau vasculaire, tels qu'Angiosys, AngioQuant ou encore Wimasis, mais ils sont d'avantage adaptés à des réseaux vasculaires simples et homogènes comme ceux que l'on retrouve à l'issue de la culture de cellules endothéliales *in vitro* lorsqu'elles forment des réseaux tubulaires. Les images du réseau vasculaire tumoral obtenues en microscopie intravitale étant des images à 2 dimensions, la robustesse de deux logiciels, Angiosys et Wimasis, a été testée face à un réseau vasculaire tumoral, *in vivo*.

La figure 9 montre les différentes étapes de l'analyse d'une image de réseau vasculaire tumoral avec Angiosys. Un masque a été établi pour ne prendre en compte que la tumeur. L'étape critique de l'analyse du réseau vasculaire est l'étape de seuillage qui définit les vaisseaux qui seront pris en compte ou non dans l'analyse. Comme les images sont en niveaux de gris avec des intensités de couleur variables sur toute la surface tumorale, il n'est pas possible d'établir un seuil séparant le tissu tumoral des vaisseaux. Ainsi, les vaisseaux sanguins de petit et gros calibre ne peuvent pas être pris en compte en même temps. Cela introduit donc des erreurs dans la formation du squelette du réseau vasculaire et dans sa quantification.

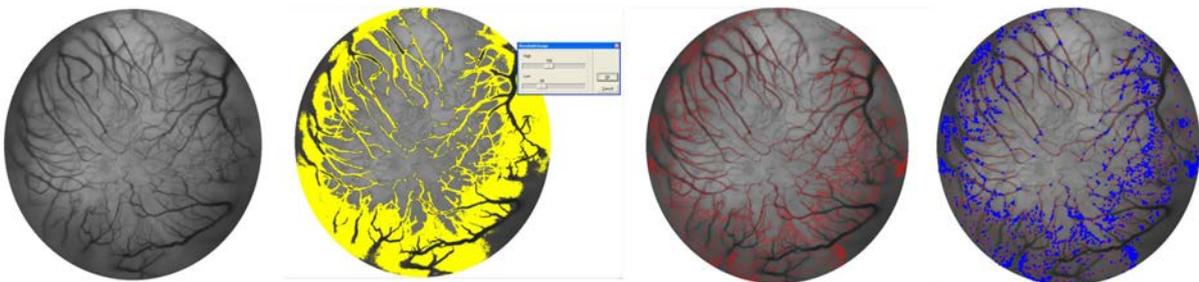


FIGURE 9 – Déroulement de l'analyse du réseau vasculaire avec Angiosys. En jaune, le seuillage est défini manuellement, puis un squelette est formé (en rouge) sur lequel sont quantifiés les embranchements (en bleu)

Un autre exemple d'analyse du réseau vasculaire a été effectuée avec le logiciel Wimasis (Figure 10). Les différences de contraste et de taille entre les vaisseaux sanguins ne permet pas leur détection optimale.

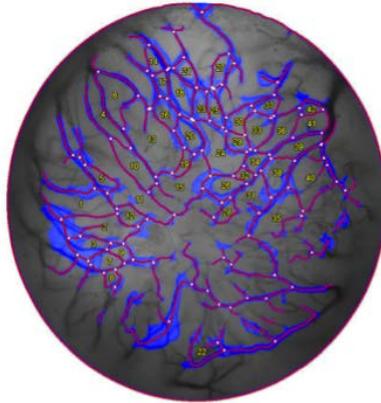


FIGURE 10 – Exemple de résultat obtenu après analyse du réseau vasculaire avec Wimas. La détection des vaisseaux sanguins tumoraux n'est pas optimale, de nombreux vaisseaux sanguins ne sont pas détectés

Ces essais mettent en évidence la nécessité de disposer d'un outil d'analyse du réseau vasculaire spécifique aux réseaux tumoraux rencontrés *in vivo*.

2.2 Procédure de traitement des images

Le traitement d'images permet de récolter des informations sur une image. Pour détecter les structures vasculaires observées sur les images de microscopie intravitale, nous avons développé un algorithme de traitement d'images [212].

Pour identifier les informations vasculaires, l'image en microscopie intravitale est considérée comme étant un tableau de pixels. Chaque pixel ayant une valeur allant de 0 à 255 définissant son intensité en niveau de gris, 0 correspondant au noir et 255 au blanc. Ainsi, les vaisseaux et le tissu tumoral ayant des intensités de gris différentes, nous allons pouvoir séparer l'information vasculaire du tissu en définissant pour chaque pixel son appartenance ou non à un vaisseau sanguin. Pour reconnaître le tissu tumoral, deux filtres de Savitzky-Golay sont appliqués à l'image divisées en tranches de 25 pixels, horizontalement et verticalement. Le filtre fait une régression linéaire sur la valeur des pixels sur chaque tranche de 25 pixels, ce qui génère une courbe avec des hautes et des basses fréquences. Les hautes fréquences correspondent aux pixels d'intensité élevé, c'est-à-dire les vaisseaux et les basses fréquences au tissu et sont ainsi soustraites à l'image (Figures 11 et 12).

Une fois que le réseau vasculaire est séparé du tissu, les vaisseaux sanguins peuvent être extraits pour pouvoir être quantifiés grâce à une première étape de segmentation. La segmentation est définie comme une méthode permettant de diviser l'ensemble des pixels de l'image en deux groupes : appartenant ou non à un vaisseau. Pour cela, un seuil est fixé et permet de ne considérer comme vaisseaux sanguins que les zones où l'intensité des pixels ne dépasse pas 3% de l'intensité maximale des pixels dans l'image originale. Puis, pour réduire la possibilité de détecter des artefacts, une étape de calibration visant à ne retenir que les structures tubulaires est effectuée dans laquelle il est défini un nombre minimum de pixels par ligne et par colonne et une taille minimum à avoir, peut importe la direction. Ces paramètres ont été fixés de façon à extraire toute l'information visible à l'œil nu et ont donc d'abord été définies sur un premier set d'images

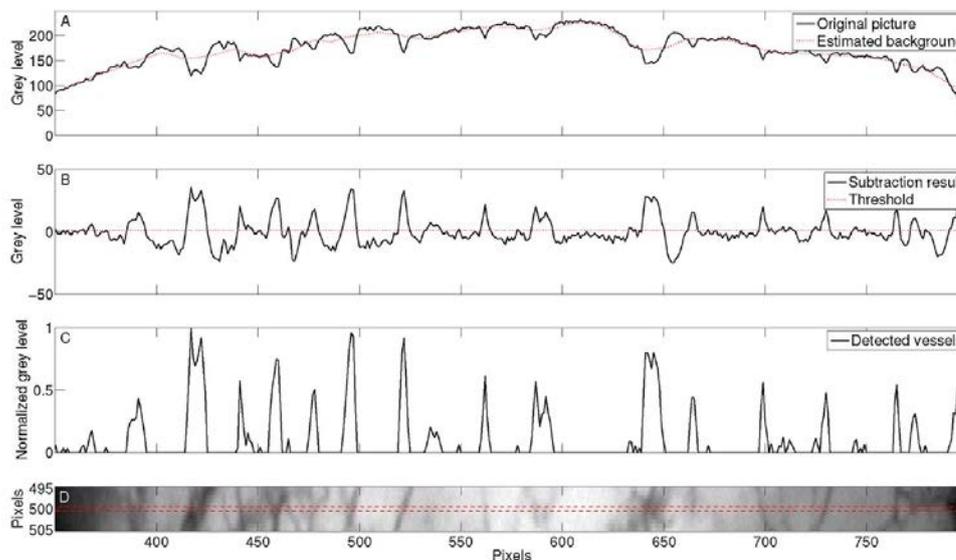


FIGURE 11 – Application des filtres de Savitzky-Golay. **A** La courbe représente les niveaux de gris de l'image. **B** Les basses fréquences (*i.e.* le tissu) ont été soustraites aux hautes fréquences *i.e.* les vaisseaux) puis l'intensité de gris a été normalisée pour ne montrer que les pics correspondants à des vaisseaux sanguins en **C**. **D** Tranche de l'image analysée montrant la correspondance entre les pics en **C** et les vaisseaux sanguins.

et ont ensuite été vérifiées sur un deuxième set d'images. Cependant, si l'analyse ne paraît pas optimale, il est toujours possible de modifier les paramètres d'extraction des vaisseaux d'une image à l'autre.

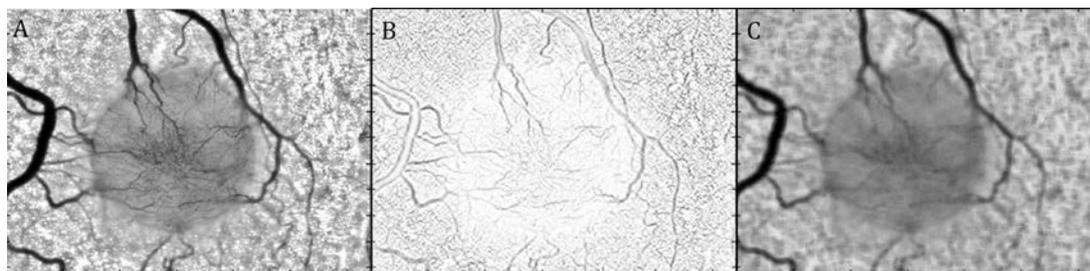


FIGURE 12 – Exemple de résultat obtenu après application des filtres de Savitzky-Golay sur une image de tumeur. **A** Exemple d'image montrant une tumeur, son réseau vasculaire et celui de la peau. **B** Image obtenue après application des filtres de Savitzky-Golay montrant tous les vaisseaux détectés et extraits de l'image originale. **C** Image correspondant aux fréquences non retenues

Comme le montre la figure 12, l'algorithme prend en compte tous les pixels de l'image pour faire l'analyse. Des régions d'intérêts focalisées sur toute ou partie de la tumeur sont donc choisies sur toute ou partie de la tumeur (Figure 13B). Une fois que les vaisseaux ont été extraits, l'étape de segmentation permettant de ne prendre en compte que les structures tubulaires caractérisant les vaisseaux est appliquée (Figure 13D) où deux informations sont extraites :

- la surface vasculaire correspondant à la somme des pixels étant considérés comme vaisseaux sanguins ;

- la surface tumorale correspondant à la somme des pixels faisant partie de la région d'intérêt, *i.e.*, la tumeur

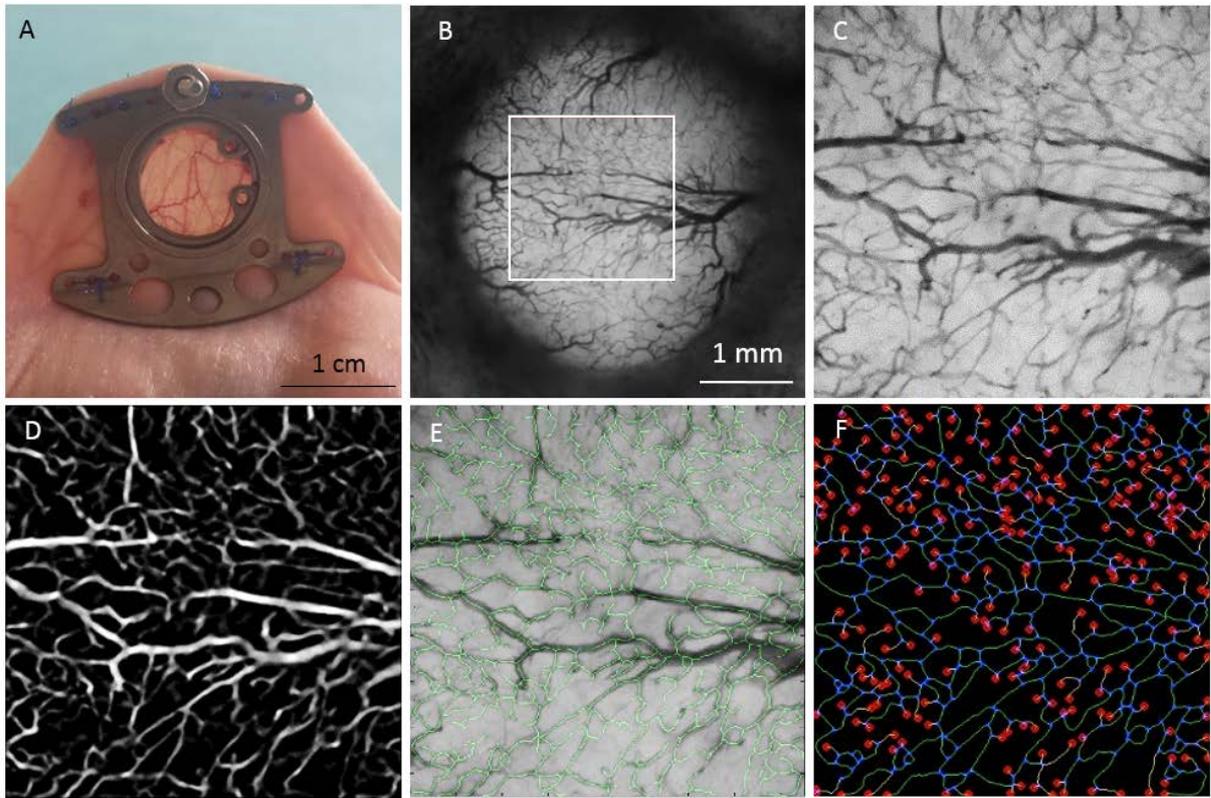


FIGURE 13 – Etapes d’analyse du réseau vasculaire tumoral avec l’algorithme. **A** Chambre dorsale implantée sur le dos d’une souris *nude*. **B** Exemple d’une tumeur 11 jours après la greffe d’un fragment de tumeur de glioblastome dont une région d’intérêt est agrandie en **C**. **D** L’image est segmentée pour extraire spécifiquement les vaisseaux sanguins. **E** Un squelette d’épaisseur de 1 pixel est formé sur le réseau vasculaire (en vert) pour permettre **F** la quantification de la longueur du réseau vasculaire, les embranchements (en bleu) et les bourgeons (en jaune)

L’importance de la croissance du réseau vasculaire tumoral vis-à-vis de la taille tumorale est défini par le rapport de la surface vasculaire à la surface tumorale (rapport V/T). Ce paramètre permet de prendre en compte les différences de diamètres vasculaires. A partir des images segmentées, il est possible d’obtenir des informations plus précises sur le réseau vasculaire. Pour cela, un squelette du réseau vasculaire est formé (Figure 13E) où tous les vaisseaux sont remplacés par une ligne de 1 pixel afin de faciliter la quantification des bourgeons et des embranchements (Figure 13F). Un bourgeon est défini comme étant un segment vasculaire de 20 à 200 μm relié à un vaisseau et ayant une extrémité libre. Un embranchement est défini comme une structure de trois segments vasculaires partageant une jonction commune en forme de Y. Des embranchements à quatre segments ont pu être observés mais nous avons choisi de ne prendre en compte que des embranchements à trois segments. Ce choix a été fait afin de réduire les faux positifs lorsque deux vaisseaux sont superposés et se croisent mais ne sont pas liés.

2.3 Procédure de validation et critères d'acceptation

La première validation de l'algorithme qui a été effectuée est une validation visuelle : il faut que l'information vasculaire visible à l'œil nu soit détectée, quelque soit le diamètre des vaisseaux et que l'analyse génère le moins d'artéfacts possibles. Pour cela, les images obtenues en microscopie intravitale ont été superposées à leurs images après squelettisation (Figure 14).

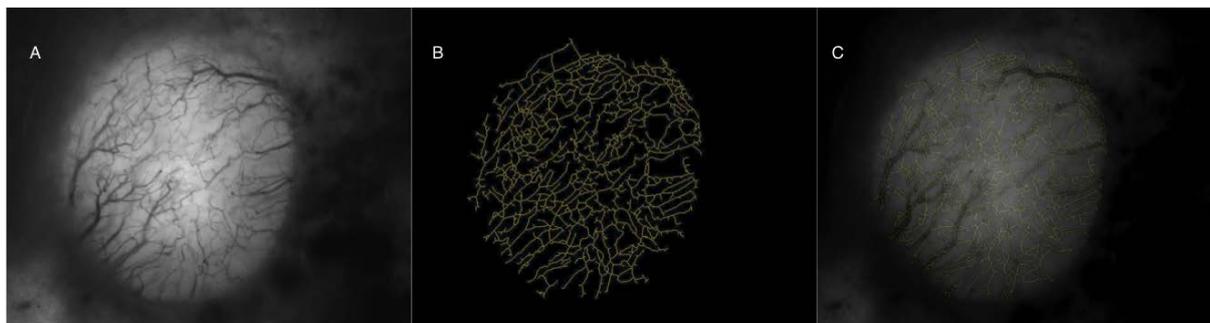


FIGURE 14 – Evaluation de la qualité de squelettisation du réseau vasculaire. **A** L'image de la tumeur observée en microscopie intravitale a été segmentée puis squelettisée (**B**). **C** La superposition de ces deux images permet de s'assurer de la qualité du traitement d'images

2.4 Discussion

L'algorithme de traitement d'images que nous proposons est un outil robuste permettant une détection fine du réseau vasculaire. Compte-tenu de nos résultats et de nos observations, nous émettons des réserves concernant deux paramètres. Tout d'abord, la surface tumorale vascularisée, représentée par le paramètre V/T , est probablement sous-estimée lorsque le réseau vasculaire est dense. En effet, lorsque les vaisseaux se croisent, les parties superposées ne sont quantifiées qu'une seule fois.

La quantification du bourgeonnement vasculaire est également remise en question pour deux raisons : la vascularisation des bourgeons et la contrainte du manque de profondeur de champ. Si l'on se réfère à la littérature sur le sujet, la vascularisation des bourgeons a longtemps été questionnée [248]. Récemment, il a été décrit que les bourgeons contiendraient un flux sanguin qui serait d'ailleurs nécessaire à leur expansion [249]. En microscopie intravitale sans utilisation de marquage fluorescent, les vaisseaux ne peuvent être visibles que grâce à leur contenu en hématies et les bourgeons n'étaient visibles qu'en fluorescence après injection d'un agent de contraste. Une partie des bourgeons quantifiés pourrait potentiellement correspondre à des bourgeons. Concernant le second questionnement, il est possible que des vaisseaux sanguins bifurquant vers l'intérieur de la tumeur soient considérés comme étant des bourgeons. Néanmoins, la qualité de segmentation et de squelettisation étant satisfaisante, cet algorithme répond à la problématique posée et est validé selon nos critères pour quantifier le réseau vasculaire.

Chapitre 3

Identification de la période de "normalisation" vasculaire à l'aide de l'algorithme de traitement d'images

Sommaire

3.1	Caractérisation structurale et morphologique des vaisseaux . . .	97
3.1.1	Choix de la zone d'intérêt à étudier	98
3.1.2	L'étude du ratio V/T est un indicateur de l'évolution de la vascularisation tumorale	99
3.1.3	Caractéristiques fines du réseau vasculaire tumoral associées à la "normalisation" vasculaire	101
3.2	Evaluation des effets du bevacizumab par analyse immunohistochimique	104
3.3	Caractérisation de la fonctionnalité vasculaire	105
3.4	Discussion	106

Ce chapitre est dédié à la présentation de la méthodologie permettant d'identifier la période de "normalisation" vasculaire à partir de paramètres vasculaires quantifiés à l'aide de l'algorithme de traitement d'images sur des réseaux vasculaires tumoraux au cours du temps et au cours du traitement par l'anti-VEGF bevacizumab, par comparaison aux paramètres quantifiés sur des réseaux vasculaires sains. Les résultats acquis sont vérifiés par analyse immunohistochimique de la densité vasculaire et par évaluation de la fonctionnalité vasculaire au cours du traitement.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Angiogenesis* (*en annexe*).

3.1 Caractérisation structurale et morphologique des vaisseaux

Le réseau vasculaire tumoral peut être comparé au paradoxe de Braess qui peut expliquer pourquoi une densité vasculaire importante donnant lieu à une trop grande possibilité d'itinéraires vasculaires différents, résulte en l'inefficacité globale du réseau vasculaire tumoral [250]. Par conséquent, cela peut expliquer l'intérêt de l'effet anti-vasculaire de la thérapie anti-angiogène dans l'amélioration de l'efficacité du réseau vasculaire.

Les observations morphologiques du réseau vasculaire en microscopie intravitale ne sont pas suffisantes pour définir un état d'amélioration du réseau vasculaire. Dans cette partie, nous étudions les données vasculaire obtenues en utilisant l'algorithme de traitement d'images que nous

avons développé. Afin de définir si le remodelage vasculaire induit par le bevacizumab correspond à une amélioration du réseau vasculaire tumoral appelée "normalisation" (*i.e.* progression vers des structures normales), nous avons recherché quels étaient les paramètres du réseau vasculaire les plus judicieux à analyser et choisi la zone d'intérêt la plus pertinente à comparer au réseau vasculaire sain de la peau de souris observé en chambre dorsale.

3.1.1 Choix de la zone d'intérêt à étudier

La région d'intérêt (ROI) et sa taille doivent être déterminées de façon à pouvoir donner des informations robustes sur le réseau vasculaire et à détecter les paramètres les plus discriminants permettant de rendre compte du remodelage vasculaire à la suite de la thérapie anti-angiogène. Ainsi, la définition de la ROI en termes de taille et de localisation permettrait de déceler l'amélioration du réseau vasculaire tumoral par comparaison à un réseau vasculaire sain, indépendamment de la taille de la tumeur et du manipulateur.

Trois types de ROIs de tailles différentes ont été choisies (Figure 15) :

- ROI de 1 mm^2 , prenant en compte les capillaires (microcirculation)
- ROI de 3 mm^2 , prenant en compte les capillaires et des vaisseaux de diamètre plus important
- ROI de $10 \text{ à } 14 \text{ mm}^2$, prenant en compte tous les vaisseaux quelque soit leur calibre. Dans les réseaux vasculaires sains, cette région prend en compte les capillaires, les artérioles et les veinules

Pour chaque ROI pour chaque image, trois analyses au plus ont été réalisées et sont représentées par la moyenne \pm déviation standard pour chaque point de mesure.

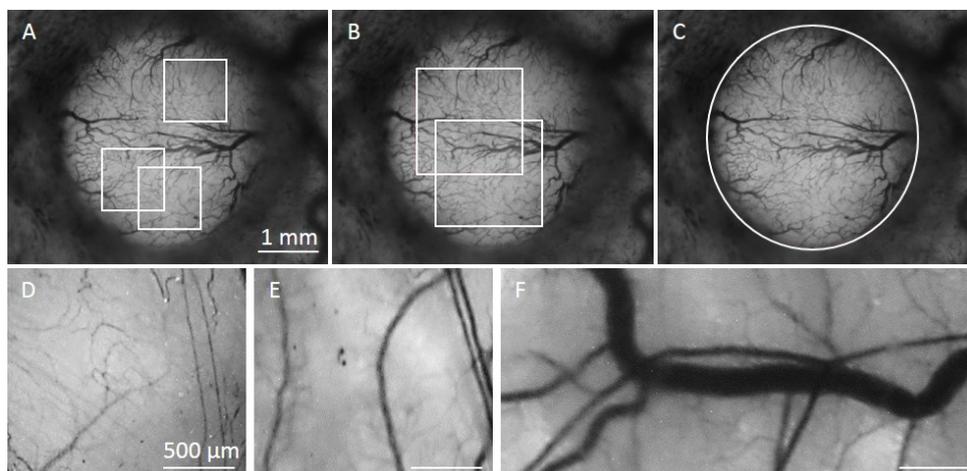


FIGURE 15 – Choix de la zone d'intérêt du réseau vasculaire à étudier. Trois régions d'intérêt (ROI) de tailles différentes ont été choisies pour des réseaux vasculaires tumoraux (A, B, C) et sains (D, E, F) incluant la microcirculation (1 mm^2 , A, D), la microcirculation des vaisseaux de taille plus importante (région intermédiaire de 3 mm^2 , B, E) ou tout type de vaisseaux (région large de $10 \text{ à } 14 \text{ mm}^2$, C, F). Chaque taille de région d'intérêt a été analysé au plus 3 fois sur le même réseau vasculaire.

En étudiant trois régions d'intérêt (ROI) de trois tailles différentes (1 mm^2 , 3 mm^2 ou $10\text{-}14 \text{ mm}^2$) sur ces réseaux vasculaires, nous avons montré que les informations obtenues par l'analyse

de données dépend du choix de la zone d'intérêt. En effet, que ce soit pour le réseau vasculaire tumoral ou sain, la quantification des paramètres (ratio V/T, embranchements/mm de vaisseau, bourgeons/mm de vaisseau, embranchements/mm² de tissu, bourgeons/mm² de tissu et longueur/mm² de tissu) était plus élevée dans les ROIs de petite taille. Par exemple, la quantification du paramètre embranchement/mm de vaisseau était bien plus élevé dans les ROIs de petite taille correspondant à une zone microcirculatoire où seuls les capillaires sont considérés, comparé aux ROIs de taille intermédiaire et large où des vaisseaux de taille plus importante et moins ramifiés sont également considérés (Figures 17). En effet, les artérioles et les veinules sont moins ramifiées que les capillaires, d'où la différence de quantification.

Le choix de la région d'intérêt à étudier est primordial. En fonction de ce choix, le moment où il est possible d'affirmer que le réseau vasculaire tumoral progresse vers une structure de réseau vasculaire normal en réponse au bevacizumab (10 mg/kg par jour) diffère et pourrait expliquer le manque de consensus dans les protocoles cliniques.

3.1.2 L'étude du ratio V/T est un indicateur de l'évolution de la vascularisation tumorale

La figure 16 compare l'évolution d'une tumeur contrôle et d'une tumeur traitée en microscopie intravitale et après segmentation par l'algorithme de traitement d'images. Le ratio V/T, qui correspond à la surface vasculaire rapportée à la surface tumorale, a été quantifié dans le temps pour les tumeurs contrôles (n = 8) et traitées (n = 7) afin de suivre l'évolution de la vascularisation tumorale en réponse au bevacizumab (10 mg/kg par jour). Durant toute la durée des expérimentations, le ratio V/T n'a globalement pas été modifié pour toutes les ROIs analysées. Cela suppose que la croissance vasculaire et tumorale sont corrélées. Au contraire, cette corrélation n'était pas retrouvée dans les tumeurs traitées et trois phases de réponses ont été mises en évidence (Figure 16C) :

- De J0 à J6, le ratio V/T diminue à cause des premiers effets de l'inhibition de la croissance vasculaire due au bevacizumab. De plus, la surface tumorale est stabilisée pendant cette période
- De J6 à J10, le ratio V/T continue de diminuer alors que la surface tumorale augmente fortement. Cela indique que le remodelage vasculaire a un impact bénéfique sur la croissance tumorale
- De J10 à J14, l'impact de l'inhibition vasculaire persistante sur la croissance tumorale apparaît avec une nouvelle stabilisation de la croissance tumorale

La croissance des tumeurs traitées était légèrement améliorée comparé aux tumeurs contrôles, particulièrement entre J8 et J12. Dans le cas des tumeurs traitées, le réseau vasculaire tumoral semble être plus efficace pour la croissance tumorale grâce à un remodelage vasculaire adéquat qui n'est pas retrouvé dans les tumeurs contrôles.

Pour savoir si le ratio V/T pouvait caractériser le phénomène de "normalisation", il a été comparé à celui quantifié dans les tissus sains, pour toutes les ROIs (Figure 16C, Tableau 1). Le ratio V/T des tissus sains n'était pas différent de celui des tumeurs contrôles. Après traitement, ce ratio était plus faible que dans les tissus sains.

En conclusion, l'évolution de la vascularisation et de la croissance des tumeurs traitées ou non nous amène à suspecter un remodelage efficace induit par le bevacizumab. Cependant, le ratio V/T analysé pour toutes les ROIs et comparé au réseau vasculaire sain n'est pas un paramètre adéquat pour affirmer qu'il y a un phénomène de "normalisation" ni pour déterminer de façon

précise quand ce phénomène apparaît et pendant combien de temps il persiste.

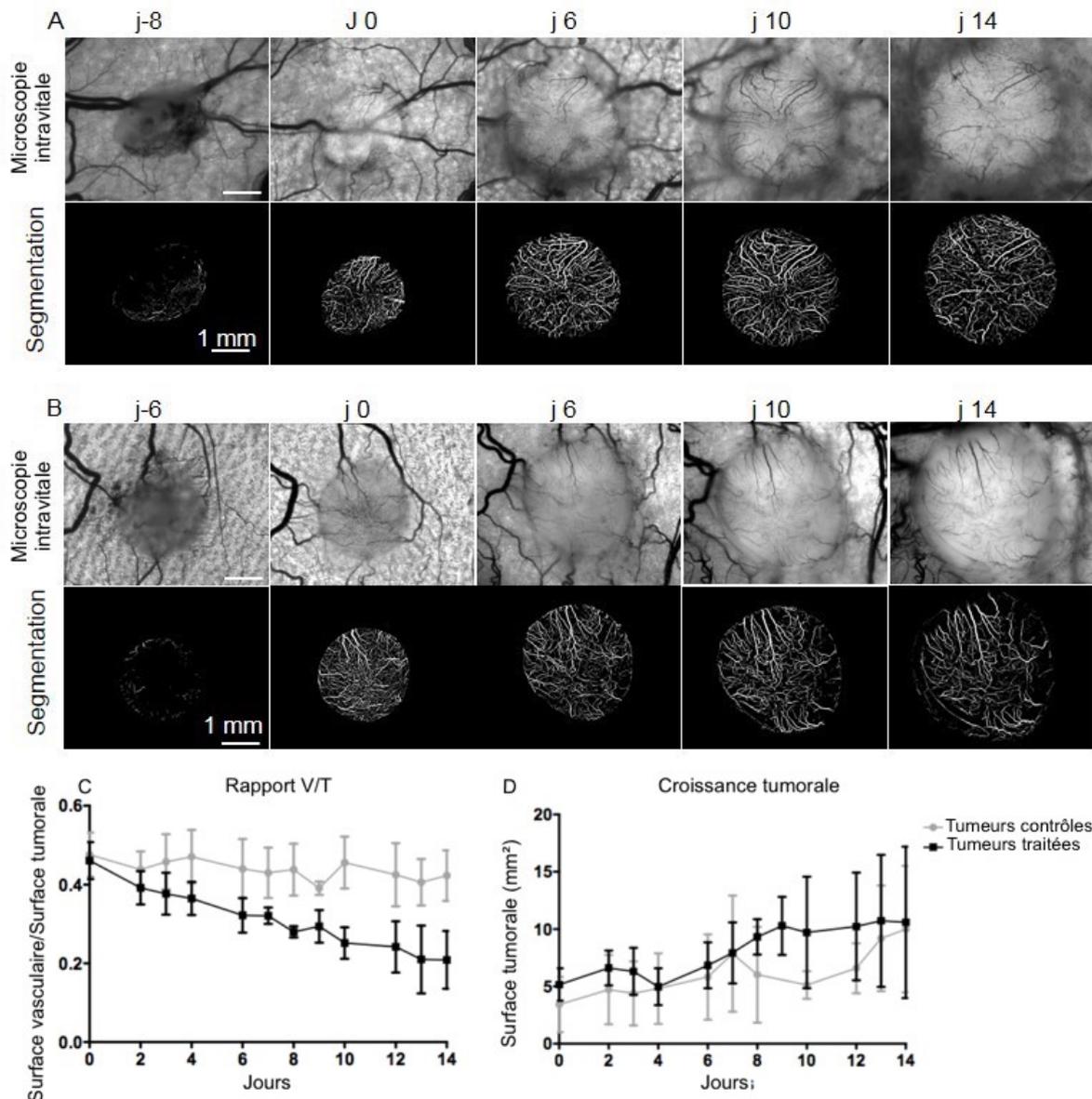


FIGURE 16 – Evolution et quantification du réseau vasculaire et de la croissance tumorale. Des fragments de tumeurs de glioblastomes issus de la lignée U87 ont été implanté dans des chambres dorsales portées par des souris *nude* et leur vascularisation a été suivie par microscopie intravitale depuis l'implantation jusqu'à la fin du protocole. Le jour 0 (J0) a été défini comme étant le début du traitement par bevacizumab, jour où la tumeur apparaît irriguée sur toute sa surface (tumeur vascularisée). **A** et **B** Exemples d'une tumeur contrôle et d'une tumeur traitée par bevacizumab à 10 mg/kg/jour, respectivement, avec les images de segmentation correspondantes. **C** Evolution de la vascularisation représentée par le ratio des surfaces vasculaire et du tissu pour des tumeurs contrôles (en gris, $n = 8$) et traitées (en noir, $n = 7$). **D** Croissance des tumeurs contrôles et traitées représentée par la mesure des surface tumorales. Chaque point de mesure représente la moyenne \pm SD.

3.1.3 Caractéristiques fines du réseau vasculaire tumoral associées à la "normalisation" vasculaire

Afin de déterminer les paramètres les plus discriminants à prendre en compte qui permettraient d'affirmer que le réseau vasculaire tumoral est dans un état de "normalisation", l'évolution des paramètres vasculaires quantifiés a été comparé entre les tumeurs contrôles et les tumeurs traitées, et avec les paramètres de réseaux vasculaires sains (Figures 17, 18, 19 et Tableau 1). La diminution de la vascularisation tumorale est le résultat de l'effet anti-angiogène (réduction du bourgeonnement) et de l'effet anti-vasculaire (réduction du nombre d'embranchements et de la longueur vasculaire). Ainsi, nous nous sommes focalisé sur ces paramètres et avons étudié leur comportement au cours du temps dans les trois ROIs définies.

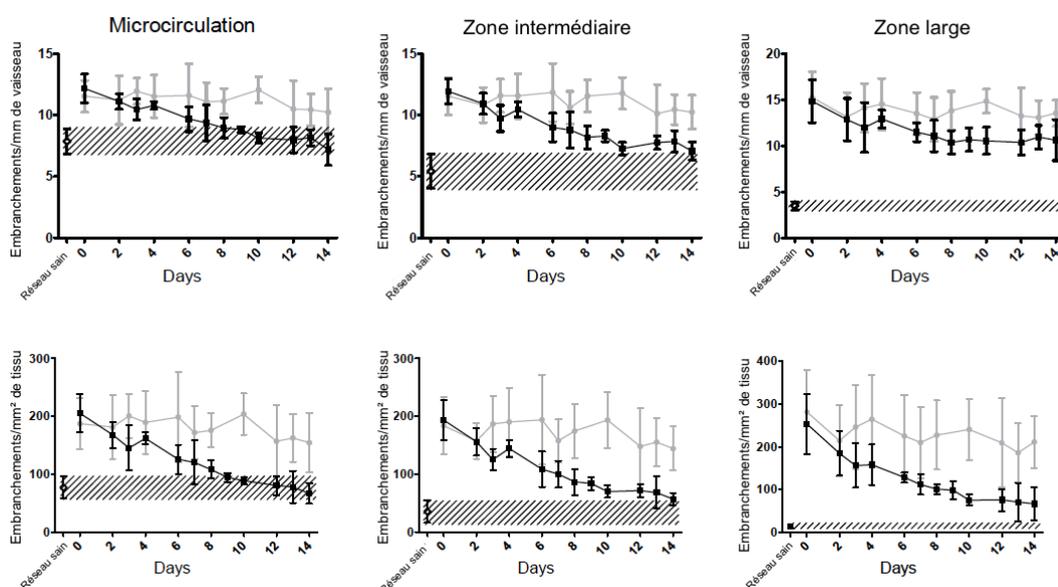


FIGURE 17 – Quantification des embranchements et comparaison au réseau vasculaire sain. Suivi du nombre d'embranchements par longueur de vaisseau en mm et du nombre d'embranchements par surface de tissu analysé en mm^2 pour les tumeurs contrôles (en gris, $n = 8$) et traitées (en noir, $n = 7$) et comparaison aux paramètres de réseaux vasculaires sains (hachures, $n = 5$). Tous les paramètres ont été quantifiés pour les trois régions d'intérêts choisies correspondant à une zone microcirculatoire (1 mm^2), à une zone de taille intermédiaire (3 mm^2) ou à une zone large (10 à 14 mm^2). Chaque région d'intérêt a été analysée au plus 3 fois sur le même réseau vasculaire et chaque point de mesure représente la moyenne \pm SD

Avec notre algorithme de traitement d'image, nous avons sélectionné après la squelettisation du réseau vasculaire, cinq paramètres qui caractérisent la structure du réseau vasculaire. Tous ces paramètres sont globalement stables dans les tumeurs contrôles au cours du temps pour toutes les ROIs analysées et diminuent de façon significative au cours du temps dans les tumeurs traitées. En considérant que le remodelage vasculaire est présent dans les tumeurs contrôles mais est inadéquat, nous avons commencé par chercher dans les tumeurs traitées quand ces paramètres diffèrent de ceux des tumeurs contrôles. Pour les trois ROIs analysées, les courbes d'évolution des embranchements, bourgeons et longueur/ mm^2 de tissu suivent la même diminution (Figures 17, 18, 19 et Tableau 1).

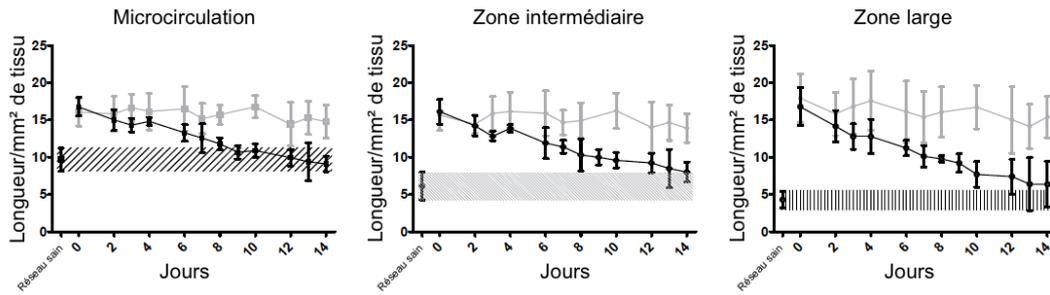


FIGURE 18 – Quantification de la longueur vasculaire comparaison au réseau vasculaire sain. Suivi de la longueur totale vasculaire (en mm) par surface de tissu analysé en mm^2 pour les tumeurs contrôles (en gris, $n = 8$) et traitées (en noir, $n = 7$) et comparaison aux paramètres de réseaux vasculaires sains (hachures, $n = 5$). Tous les paramètres ont été quantifiés pour les trois régions d'intérêts choisies correspondant à une zone microcirculatoire (1 mm^2), à une zone de taille intermédiaire (3 mm^2) ou à une zone large (10 à 14 mm^2). Chaque région d'intérêt a été analysée au plus 3 fois sur le même réseau vasculaire et chaque point de mesure représente la moyenne \pm SD

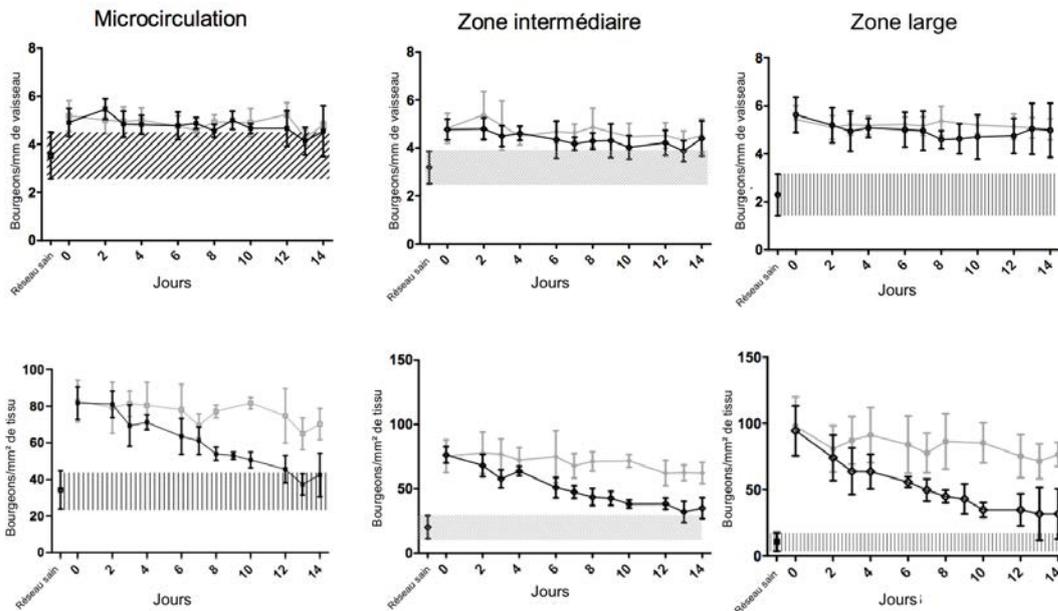


FIGURE 19 – Quantification des bourgeons vasculaires et comparaison au réseau vasculaire sain. Suivi du nombre de bourgeons par longueur de vaisseau en mm et du nombre de bourgeons par surface de tissu analysé en mm^2 pour les tumeurs contrôles (en gris, $n = 8$) et traitées (en noir, $n = 7$) et comparaison aux paramètres de réseaux vasculaires sains (hachures, $n = 5$). Tous les paramètres ont été quantifiés pour les trois régions d'intérêts choisies correspondant à une zone microcirculatoire (1 mm^2), à une zone de taille intermédiaire (3 mm^2) ou à une zone large (10 à 14 mm^2). Chaque région d'intérêt a été analysée au plus 3 fois sur le même réseau vasculaire et chaque point de mesure représente la moyenne \pm SD

Pour ces trois paramètres, les différences les plus significatives entre contrôles et traitées ont été observées entre 8 et 12 jours de traitement lorsque la croissance tumorale a repris. Cela était également corrélé avec une diminution des embranchements et bourgeons/mm de longueur vasculaire.

Pour savoir si ce remodelage vasculaire dû à l'inhibition de l'angiogenèse et à l'effet anti-vasculaire pouvait être considéré comme une progression vers une structure vasculaire saine, nous avons cherché quand les données vasculaires traitées étaient corrélées aux données vasculaires saines sur les trois ROIs (Tableau 1). Nous avons pu observer que des correspondances étaient possibles principalement seulement sur les ROIs microcirculatoires et commençaient à J8. Plus précisément, les embranchements rapportés à la longueur totale du réseau vasculaire avaient un comportement légèrement différent, ils étaient pratiquement similaires dans les régions microcirculatoires et intermédiaires mais n'étaient pas discriminant des tumeurs contrôles dans les régions d'intérêt larges.

TABLE 1 – Corrélations entre les paramètres vasculaires quantifiés dans les réseaux vasculaires sains et de tumeurs traitées. Les paramètres vasculaires des tumeurs traitées ont été quantifiés pour les trois régions d'intérêt définies. Les jours de traitements où il y a une corrélation entre ces paramètres et ceux de réseaux vasculaires sains sont identifiés pour chaque région d'intérêt analysée.

Paramètres vasculaires	Correspondances	Réseaux vasculaires sains		
	Tumeurs traitées	Microcirculation	Zone intermédiaire	Zone large
Embranchements/mm	Microcirculation	j8 à j12	-	-
	Zone intermédiaire	-	jamais	-
	Zone large	-	-	jamais
Bourgeons/mm	Microcirculation	j13	-	-
	Zone intermédiaire	-	jamais	-
	Zone large	-	-	jamais
Longueur/mm ²	Microcirculation	j9 à j12	-	-
	Zone intermédiaire	-	jamais	-
	Zone large	-	-	jamais
Embranchements/mm ²	Microcirculation	j9 à j12	-	-
	Zone intermédiaire	-	j14	-
	Zone large	-	-	jamais
Bourgeons/mm ²	Microcirculation	j12	-	-
	Zone intermédiaire	-	jamais	-
	Zone large	-	-	jamais
Rapport V/T	Microcirculation	j0	-	-
	Zone intermédiaire	-	j2 à 7	-
	Zone large	-	-	j2, j3

Entre J8 et J14, la quantification des embranchements, bourgeons et longueur du réseau vasculaire est corrélée au réseau vasculaire sain. Cela suggère que l'amélioration structurale des tumeurs traitées se produit durant la seconde semaine de traitement et est plus prononcée entre J9 et J12.

D'autre part, les paramètres vasculaires des tumeurs traitées restaient différents de ceux quantifiés dans les régions intermédiaires et larges des réseaux vasculaires sains où les vaisseaux

sanguins sont de taille plus importante et adoptent une architecture conforme à la hiérarchie artériole-capillaire-veinule.

En conclusion, les vaisseaux sanguins des tumeurs traitées ont subi un remodelage vasculaire qui a conduit, à partir de J8, à l'acquisition d'un réseau vasculaire amélioré apparemment plus fonctionnel car il est plus bénéfique à la croissance tumorale durant cette période. Les corrélations avec les données de réseaux vasculaires sains montre une progression vers des structures vasculaires normales mais uniquement si seule la microcirculation est considérée. Dans notre étude, le bevacizumab ne pourrait pas "normaliser" un réseau vasculaire à moins que celui-ci soit de type capillaire.

3.2 Evaluation des effets du bevacizumab par analyse immunohistochimique

Le marquage immunohistochimique de VEGFR-2, CD105, collagène IV et de la desmine sur des tumeurs traitées à différents temps et sur des réseaux vasculaires sains a été utilisé pour valider l'analyse faite *in vivo* avec l'algorithme (Figure 20, Tableau 2).

Nous avons d'abord analysé comment le traitement par bevacizumab modifiait l'expression de ces marqueurs par les vaisseaux sanguins au cours du temps. Le nombre de vaisseaux sanguins marqués par le collagène IV et par VEGFR-2 était élevé sans traitement à J0 (158 ± 27 et 139 ± 23 vaisseaux sanguins/mm², respectivement). Cependant, moins de vaisseaux ont été dénombrés avec les marquages CD105 et desmine (82 ± 36 et 84 ± 25 vaisseaux sanguins/mm², respectivement). Durant les 6 premiers jours de traitement, le nombre de vaisseaux sanguins marqués par VEGFR-2, CD105, la desmine et le collagène a diminué pour progresser vers une stabilisation jusqu'à la fin de l'expérimentation (J14).

TABLE 2 – Quantification du nombre de vaisseaux sanguins sur des coupes immunohistochimiques de tumeurs et comparaison aux réseaux vasculaires sains.

Marqueur	Tumeurs traitées						Sain
	jour 0	jour 2	jour 4	jour 6	jour 10	jour 14	-
Collagène IV/mm ²	158 ± 27	124 ± 14	67 ± 30	36 ± 10	16 ± 8	19 ± 6	62 ± 18
VEGFR-2/mm ²	139 ± 23	71	38 ± 8	31 ± 11	28 ± 6	26 ± 8	17 ± 6
CD105/mm ²	82 ± 36	57 ± 8	24 ± 9	22 ± 2	24 ± 9	14 ± 2	56 ± 8
Desmine/mm ²	84 ± 25	47 ± 26	25 ± 11	29 ± 14	9 ± 6	23 ± 5	14 ± 5

Tous ces marqueurs suivent la même tendance que les paramètres quantifiés avec l'algorithme après le début du traitement par bevacizumab. De la même façon que cela a été fait avec l'algorithme, nous avons recherché quand la quantification des vaisseaux en immunohistochimie était corrélée avec la quantification des vaisseaux sanguins sur réseau sain. Chaque paramètre quantifié est corrélé avec le réseau sain à des périodes différentes. Les vaisseaux marqués avec CD105 et collagène IV ont des valeurs se rapprochant des valeurs de tissu sain à 2 et 4 jours de traitement, respectivement. Cependant, cela n'a pas été observé durant la période de stabilisation vasculaire. La quantification des vaisseaux marqués avec VEGFR-2 se rapproche de valeurs normales de J6 à J14. Pour les vaisseaux marqués grâce à la desmine (péricytes), la quantification fluctue au cours du temps mais des valeurs de tissu sain ont été atteintes à J10.

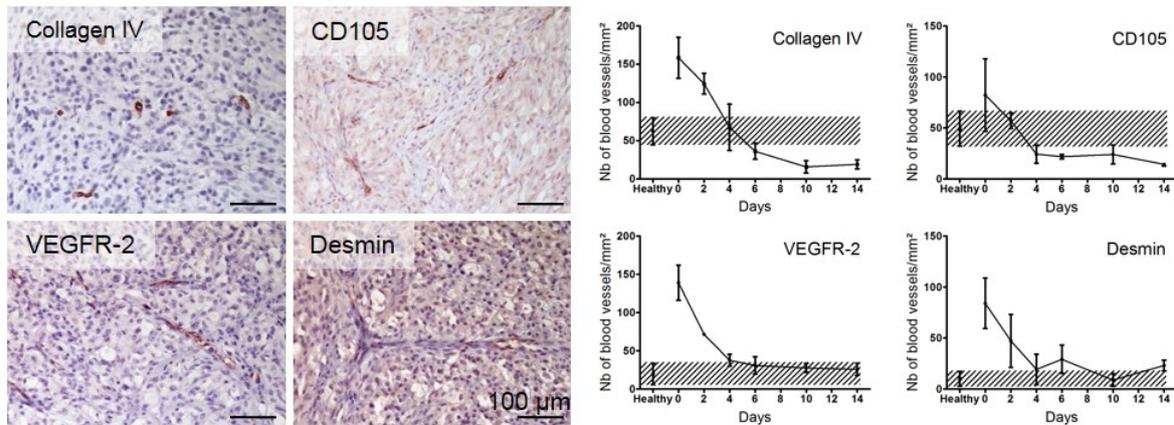


FIGURE 20 – Analyse immunohistochimique du réseau vasculaire tumoral au cours du traitement par bevacizumab et comparaison au réseau vasculaire sain. Les tumeurs de 6 lots de souris ($n = 24$ au total) ayant reçu un traitement au bevacizumab (10 mg/kg par jour, *i.p.*) ont été récupérées puis fixées dans le formol. Les cellules endothéliales sont marquées grâce à leur expression de CD105 et de VEGFR-2. La membrane basale et les péricytes sont détectés en marquant le collagène IV et la desmine, respectivement. Les images représentent les vaisseaux sanguins après 10 jours de traitement. Pour le réseau vasculaire sain, la quantification des vaisseaux sanguins a été effectuée sur des images de biopsies de peau humaine marquées avec ces anticorps et sélectionnées à partir de l'*Human Protein Atlas* ($n = 4$). Le nombre de vaisseaux sanguins exprimant chaque marqueur a été compté sur toute la surface tumorale et sur une surface de tissu équivalente pour le réseau sain. Chaque point de mesure représente la moyenne \pm SD.

Le suivi par immunohistochimie des paramètres vasculaires au cours du traitement par bevacizumab permet de confirmer la diminution de l'angiogenèse tumorale et du réseau vasculaire tumoral avec l'apparition d'un état de stabilisation. Les quatre paramètres étudiés confirment l'évolution observée et quantifiée avec l'algorithme avec un état de stabilisation commun qui se produit entre j8 et j12. Le bourgeonnement endothélial (VEGFR-2) et le recouvrement en péricytes (desmine) ont atteint des valeurs normales durant cet état de stabilisation.

En conclusion, l'analyse seule de ces quatre paramètres en immunohistochimie ne permet pas d'affirmer qu'il y a une "normalisation" du réseau vasculaire induite par bevacizumab contrairement à l'analyse effectuée avec l'algorithme. L'analyse immunohistochimique est moins efficace que notre algorithme car nous ne pouvons pas définir de région d'intérêt à étudier et nous ne pouvons donc pas savoir quels types de vaisseaux sont comparés entre un réseau vasculaire sain et tumoral.

3.3 Caractérisation de la fonctionnalité vasculaire

Afin de savoir si l'amélioration vasculaire caractérisée est pertinente sur le plan fonctionnel, nous avons cherché si et quand la fonctionnalité des vaisseaux sanguins était affectée durant le traitement par bevacizumab, *in vivo* en étudiant leur perméabilité (Figure 21) et *ex vivo* en évaluant leur capacité de perfusion et l'hypoxie tissulaire. La distribution *in vivo* du Hoechst 33342 (Figure 21A et B) et l'extravasation de dextran Texas-Red des vaisseaux sanguins (Figure

21D) nous permettent d'explorer respectivement la capacité de perfusion des vaisseaux sanguins et leur perméabilité.

Bien que la microscopie intravitale et l'immunohistochimie montrent que le réseau vasculaire observé à J0 est formé de vaisseaux sanguins denses et tortueux, la diffusion de Hoechst 33342 montre que les tumeurs sont totalement perfusées. A cet instant, nous n'avons pas observé de fuites de dextran Texas-Red et les thrombi dans les vaisseaux sanguins étaient rares. A J2, lors des premiers effets de l'inhibition vasculaire induite par le bevacizumab, la perfusion du Hoechst 33342 dans les tumeurs traitées était hétérogène et des régions non perfusées étaient présentes et coïncidaient avec la présence de thrombi occlusifs dans les vaisseaux sanguins et d'œdème dans le tissu sur les coupes de tumeurs colorées à l'HES. A J2 et J5, des fuites de dextran Texas-Red ont été observées localement dans les tumeurs. A partir de J6, la perfusion était qualitativement meilleure mais de larges régions non perfusées étaient encore présentes et associées à la présence de thrombi et d'œdèmes. A J10, les coupes de tumeurs colorées à l'HES ne montraient pas de thrombi et la perfusion était qualitativement meilleure. Cependant, à J14, les images acquises en microscopie intravitale montraient qu'une grande partie des vaisseaux sanguins étaient détruits, laissant apparaître des vestiges de vaisseaux sanguins avec des thrombi pouvant potentiellement stimuler l'angiogenèse (Figure 21D). Entre 6 et 14 jours de traitement, les vaisseaux sanguins ne montraient pas d'extravasation de dextran Texas-Red.

L'hypoxie tissulaire a été étudiée *via* l'expression du transporteur de glucose Glut-1 dans les tumeurs (Figure 21C). A J0, l'expression de Glut-1 était élevée et répartie uniformément dans toute la tumeur, bien qu'au même instant les tumeurs étaient bien perfusées. Après 2 jours de traitement par bevacizumab, l'expression de Glut-1 a diminué mais restait distribuée de façon homogène sur toute la surface de la tumeur. Entre 6 et 14 jours de traitement, l'expression de GluT-1 était réduite et non-homogène, avec une expression moins prononcée à 10 jours de traitement, indiquant que l'hypoxie était levée dans les tumeurs.

En conclusion, la distribution du Hoechst 33342, l'expression de Glut-1 et l'extravasation de dextran Texas-Red confirment la première étape du traitement par bevacizumab qui provoque une destruction du réseau vasculaire qui induit la création de thrombi dans les vaisseaux et de l'œdème tissulaire, tout cela résultant en une inefficacité de l'irrigation tissulaire et une hypoxie tissulaire élevée. Une seconde étape, à J10, montre que le réseau vasculaire tumoral est plus efficace au travers d'une forte diminution de l'expression de Glut-1 et donc de l'hypoxie, et une bonne perfusion tissulaire. A J14, la distribution du Hoechst 33342 redevient hétérogène et est accompagnée d'une reprise de l'hypoxie, probablement dues à la forte régression vasculaire.

3.4 Discussion

L'objectif de ce travail était d'introduire une nouvelle méthode permettant d'identifier précisément la période d'amélioration vasculaire induite par la thérapie anti-VEGF afin de pouvoir optimiser l'utilisation de ces thérapies dans les protocoles thérapeutiques. L'utilisation du modèle de la chambre dorsale nous a permis de disposer d'une longue période d'observation et d'évaluation de la vascularisation pour chaque tumeur, sur le même animal. Ainsi, peu d'animaux sont nécessaires pour obtenir des données fiables et reproductibles.

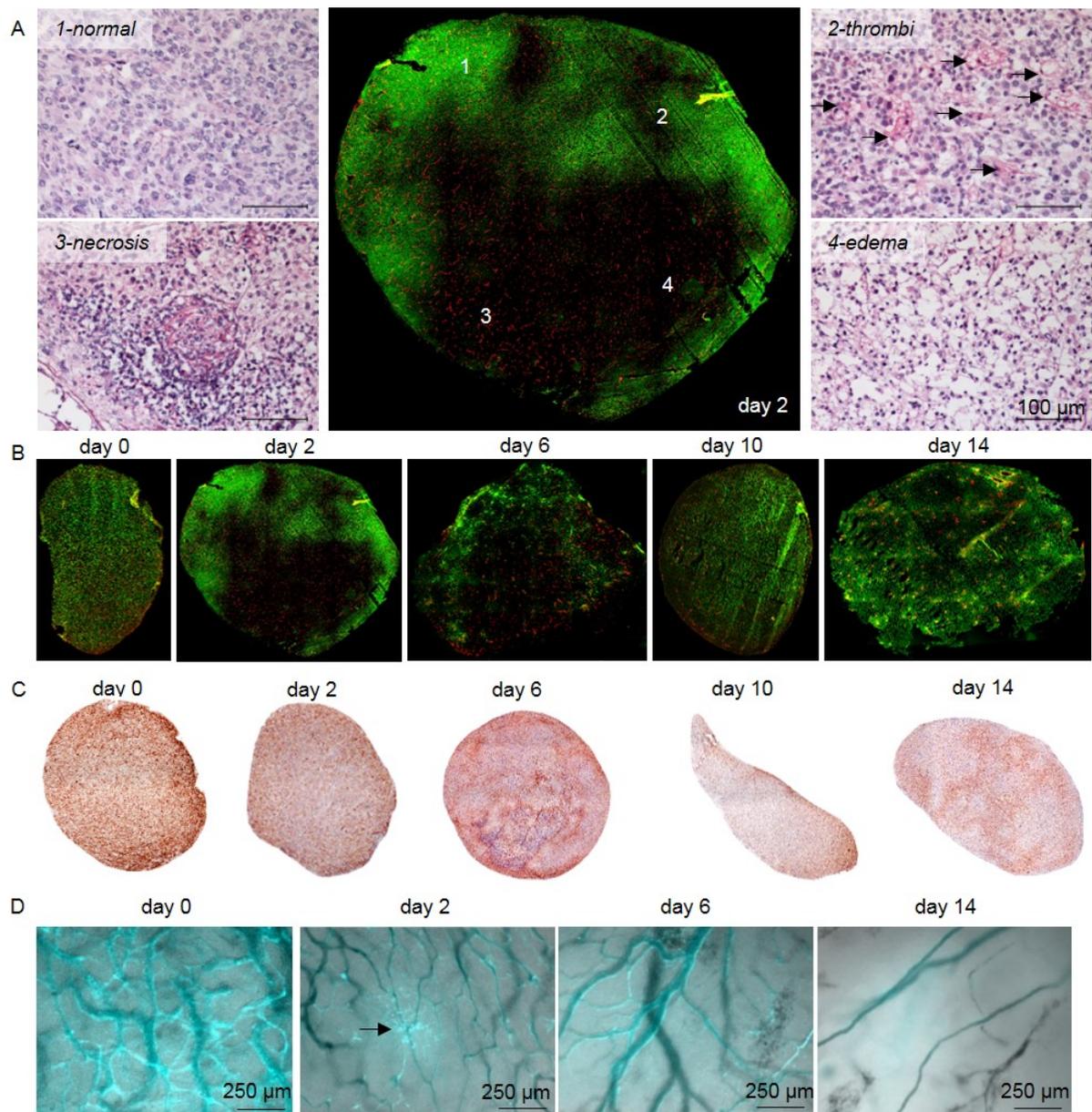


FIGURE 21 – Réponse vasculaire et tissulaire au traitement par bevacizumab. **A** Evaluation de la perfusion tissulaire d'une tumeur traitée pendant 2 jours au bevacizumab (10 mg/kg par jour) et les images colorées en HES correspondantes. Les souris ont reçu une injection intraveineuse de Hoechst 33342 (25 mg/kg) 5 minutes avant mise à mort, les tumeurs ont été congelées et marquées avec un anticorps anti-collagène IV (en rouge). Les cellules marquées par le Hoechst 33342 apparaissent en vert sur les images et montrent la capacité des vaisseaux sanguins à perfuser le tissu. La coloration HES montre le tissu normal (1), la présence de thrombi dans les vaisseaux sanguins (2, flèches), la nécrose (3) et de l'œdème (4). **B** Evolution de la perfusion dans les tumeurs, non traitée (j0) et traitées pendant 2, 6, 10 et 14 jours avec du bevacizumab. **C** Evolution de l'hypoxie dans les tumeurs révélée par l'expression du transporteur de glucose Glut-1. **D** Evaluation de la perméabilité vasculaire *in vivo*, sans traitement et au cours du traitement par bevacizumab. Les souris ont reçu une injection intraveineuse de dextran Texas-Red à 10 mg/kg avant d'être imagées. La flèche indique une fuite vasculaire.

Utilisation de l'algorithme de traitement d'images pour analyser le réseau vasculaire tumoral

Les observations en microscopie intravitale permettent de rendre compte des modifications morphologiques du réseau vasculaire tumoral au cours du temps mais ne permettent pas de mettre en évidence de phénomène de "normalisation" vasculaire. Dans les deux cas, le remodelage vasculaire qui maintient une forte densité vasculaire dans les tumeurs contrôles et la réduit dans les tumeurs traitées, favorise la croissance tumorale. Pour savoir quand le remodelage vasculaire induit par la thérapie anti-VEGF pouvait être qualifié de "normalisation" vasculaire, à savoir une progression vers des structures vasculaires normales, l'évolution des modifications induites au niveau des vaisseaux sanguins, de leur capacité de bourgeonnement et de leur embranchements a été quantifiée dans les tumeurs et dans les réseaux vasculaires sains afin de rechercher les paramètres les plus discriminants de la "normalisation" vasculaire.

L'analyse de trois régions d'intérêts (ROIs) dans les tumeurs comparés à trois ROIs dans les réseaux vasculaires sains montre que seule l'analyse des régions microcirculatoires permet de démontrer une corrélation entre les données vasculaires saines et tumorales. Cela prouve ainsi l'existence d'une réelle progression vers des structures vasculaires normales en réponse au bevacizumab (10 mg/kg par jour). D'après ces observations, il est plus judicieux de se limiter à l'analyse de régions de 1 mm² dans les zones microcirculatoires afin d'éviter de prendre en compte la hiérarchie vasculaire (artériole-capillaire-veinule) qui existe dans les réseaux vasculaires sains mais pas dans les réseaux vasculaires tumoraux. Dans les tumeurs traitées avec bevacizumab, une hiérarchie de réseau vasculaire normal ne peut jamais être atteinte compte-tenu de la vitesse de remodelage vasculaire et de la déstabilisation de la balance angiogène montrant que les tumeurs ne sont pas seulement VEGF-dépendantes.

Une première exploration de la surface tumorale vascularisée (paramètre V/T) montre que le remodelage vasculaire imposé par bevacizumab réduit bien la quantité de vaisseaux sanguins mais n'inhibe pas la croissance tumorale. Ce point est en faveur d'une amélioration du réseau vasculaire qui se produit entre 8 et 12 jours de traitement par bevacizumab et qui est en accord avec les résultats de Grépin *et al.* en préclinique [151] et de Lee *et al.* en clinique [251] où le traitement par bevacizumab n'inhibe pas la croissance tumorale. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation du paramètre V/T entre les réseaux vasculaires tumoraux et sains. Les valeurs élevées et équivalentes de V/T dans le réseau sain et le réseau tumoral non traité pourraient être le résultat de la présence de gros vaisseaux sanguins dans le tissu sain et de la présence d'un grand nombre de néo-vaisseaux dans le tissu tumoral qui permettent de compenser la surface totale de vaisseaux sains. L'analyse du ratio V/T comparé aux données de réseaux vasculaires sains permet de rendre compte du remodelage vasculaire mais ce paramètre n'est pas assez robuste pour détecter le phénomène de "normalisation" vasculaire. Ce n'est pas un paramètre discriminant.

L'analyse des paramètres vasculaires issus des images squelettisées montre que la quantification des embranchements/mm² de surface tissulaire ou /mm de longueur vasculaire dans les zones microcirculatoires sont les paramètres les plus robustes et les plus discriminants permettant de détecter la période de temps pendant laquelle le remodelage vasculaire tumoral peut être considéré comme une "normalisation" vasculaire, à savoir une progression vers des structures vasculaires normales. La comparaison au réseau vasculaire sain montre que le réseau vasculaire tumoral est amélioré d'un point de vue structural à partir de 8 jours de traitement (10 mg/kg

par jour) et ce jusque J12, lorsque le remodelage vasculaire n'est plus favorable à la croissance tumorale.

L'utilisation de techniques standard d'immunohistochimie conforte l'analyse effectuée avec l'algorithme de traitement d'images

Une partie de l'analyse algorithmique *in vivo* a pu être confirmée en utilisant des techniques immunohistochimiques standard. Les aspects morphologiques des vaisseaux sanguins tumoraux tels que leur organisation en clusters, caractéristique des tumeurs très angiogènes, ont disparu avec la thérapie anti-angiogène pour laisser place à des vaisseaux distribués de façon homogène dans le tissu et de diamètres plus fins. Cette observations est cohérente avec les données existantes et le concept de "normalisation" vasculaire [252, 128].

Nous avons montré que des vaisseaux matures et immatures étaient détruits au cours du traitement par bevacizumab. Nous avons choisi de marquer le CD105 pour identifier les vaisseaux sanguins car il est exprimé sur les cellules endothéliales actives [253] et permettrait ainsi de visualiser les *tip cells* et les *stalk cells*. Sans traitement, le dénombrement de vaisseaux sanguins exprimant CD105 n'était pas aussi élevé que le collagène IV, ce qui suggère que le réseau vasculaire tumoral n'est pas seulement composé de cellules endothéliales actives mais également d'une portion de *phalanx cells* pouvant potentiellement représenter les vaisseaux matures. Cela impliquerait que la moitié des vaisseaux sanguins sont actifs et donc probablement immatures alors que l'autre moitié serait potentiellement matures et stables, les deux types étant détruits au cours du traitement par bevacizumab. Les vaisseaux sanguins bourgeonnant détectés par leur expression de VEGFR-2, connu pour être surexprimé par les *tip cells* [49], a été réduit au cours du traitement, ce qui suggère que le bourgeonnement endothélial est réduit mais n'est pas totalement inhibé. La diminution du nombre de vaisseaux sanguins marqués par VEGFR-2 et du bourgeonnement endothélial est représentative de l'effet anti-angiogène du bevacizumab. La diminution du nombre de vaisseaux sanguins marqués par le collagène IV et des embranchements vasculaires est représentative de l'effet anti-vasculaire du bevacizumab. Notre analyse avec l'algorithme des bourgeons, des embranchements et de la longueur vasculaire démontre les effets anti-angiogène et anti-vasculaires du bevacizumab de la même façon que l'analyse immunohistochimique.

La quantification immunohistochimique des vaisseaux sanguins marqués avec le collagène IV et CD105 (Figure 20) n'ont pas permis de montrer une ressemblance aux réseaux vasculaires sains durant la période de stabilisation et ne sont donc pas considérés comme des paramètres discriminants de la "normalisation" vasculaire. L'analyse des vaisseaux sanguins tumoraux marqués avec VEGFR-2 ou la desmine montre une meilleure corrélation avec les réseaux vasculaires sains durant la phase de stabilisation. Cependant, contrairement à l'analyse effectuée avec l'algorithme, l'impossibilité de définir une région d'intérêt se limitant à la microcirculation (*i.e.* capillaires sanguins) rend la comparaison entre les réseaux vasculaires tumoraux et sains erronée et probablement peu représentative de la "normalisation" vasculaire. L'utilisation de l'algorithme pour suivre la réponse tumorale à la thérapie anti-angiogène chez le même animal, au cours du temps, a permis de caractériser la réponse au traitement de façon plus précise que l'immunohistochimie seule, tout en utilisant moins d'animaux (7 *vs* 24, respectivement).

Conclusions sur les modifications morphologiques et structurales

Nous avons démontré que le remodelage vasculaire avec le bevacizumab administré à 10 mg/kg par jour est bénéfique pour la croissance tumorale seulement entre les 8^e et 12^e de traitement. Concernant les paramètres vasculaires extraits des images squelettisées avec l'algorithme de traitement d'images, les bourgeons/mm² de surface tissulaire ou /mm de longueur vasculaire ne permettent pas de confirmer l'efficacité du remodelage vasculaire ni la "normalisation" vasculaire. L'étude du bourgeonnement *via* l'expression de VEGFR-2 en immunohistochimie et *via* la quantification avec l'algorithme n'est pas un paramètre discriminant permettant de conclure à la "normalisation" du réseau vasculaire au cours du traitement par bevacizumab.

La quantification des embranchements met en évidence un état amélioré entre 8 et 12 jours de traitement avec bevacizumab. Durant cet état, 20% à 40% de la quantité initiale de vaisseaux sanguins est présente. Tolaney *et al.* suggèrent qu'il faut un seuil minimum de densité vasculaire pour que les vaisseaux sanguins passent par un état "normalisé" avant qu'il y ait un excès de dégradation vasculaire [254]. Dans nos expérimentations, le traitement par bevacizumab a été commencé lorsque la vascularisation de la surface tumorale observée en microscopie intravitale était maximale et malgré les doses massives d'anti-VEGF que nous avons administré, l'angiogénèse n'était pas totalement inhibée mais plutôt modérée. Cela suggère que les 20% de densité vasculaire ainsi que les embranchements sont suffisants et mieux structurés et permettent de faciliter la croissance tumorale.

Modifications fonctionnelles du réseau vasculaire tumoral, confirmation de la période de "normalisation" vasculaire

De même qu'observé *in vivo* et à travers la quantification des paramètres vasculaires, la vascularisation tumorale a subi une dégradation rapide à partir de 2 jours de traitement qui a eu un impact sur la croissance tumorale. Les premières réponses au bevacizumab sont les effets anti-angiogène et anti-vasculaire qui provoquent des fuites vasculaires déclenchant la formation de thrombi qui obstruent les vaisseaux sanguins. La présence de thrombi peut renforcer l'effet anti-vasculaire en provoquant une perturbation de la barrière endothéliale [255] qui augmenterait potentiellement la perméabilité vasculaire et induirait des fuites vasculaires. La présence de thrombi occlusifs associée aux fuites vasculaires provoque la formation d'œdèmes qui augmentent la pression interstitielle et empêche le sang de circuler dans tout le tissu tumoral [78]. Cela induit le développement de régions très hypoxiques (où Glut-1 est surexprimé) présentant de petites zones de nécroses. En réponse, un remodelage vasculaire se produit entre 6 et 10 jours de traitement qui ne modifie pas de façon significative le nombre de vaisseaux sanguins mais les réorganisent afin d'obtenir un réseau vasculaire moins chaotique et moins ramifié. Ainsi, l'irrigation vasculaire au sein du tissu tumoral est rétablie et permet de réduire l'hypoxie et d'améliorer la croissance tumorale. A partir de J14, l'excès d'anti-VEGF a eu pour résultat de provoquer une régression vasculaire très importante. L'hypoxie tissulaire se rétablit et les tumeurs croissent lentement.

En conclusion, notre algorithme de traitement d'image se pose comme un outil mathématique robuste et suffisamment fiable pour caractériser, à partir d'images de microscopie, le remodelage vasculaire en réponse au traitement par bevacizumab et détecter quand le remodelage est assez efficace pour affirmer que la fonctionnalité vasculaire est rétablie *via* une meilleure circulation

sanguine dans la tumeur, une perméabilité vasculaire diminuée, une oxygénation tissulaire augmentée et une meilleure perfusion. L'analyse des réseaux vasculaires doit être limitée à une étude des régions microcirculatoire, à savoir les capillaires, où les paramètres les plus discriminants de la "normalisation" vasculaire sont les embranchements/mm² de surface tissulaire et les embranchements/mm de longueur vasculaire. L'analyse avec l'algorithme de ces deux paramètres sur des réseaux vasculaires sains comparé aux réseaux vasculaires tumoraux a permis de confirmer de réels effets "normalisants" du bevacizumab. A la dose de 10 mg/kg par jour, la "normalisation" de la néovascularisation de fragments de glioblastomes xénotransplantés chez la souris a été obtenue à partir de 8 jours de traitement et dure 4 à 5 jours.

Dans nos conditions, afin d'optimiser les protocoles à base de chimiothérapie et de radiothérapie, il semblerait optimal de débiter la chimiothérapie ou la radiothérapie 8 jours après le commencement de la thérapie journalière de bevacizumab.

Chapitre 4

Modulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse au cours du traitement

Sommaire

4.1 Les médiateurs de l'angiogenèse	113
4.1.1 VEGF et ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2	113
4.1.2 NO synthase endothéliale (eNOS)	116
4.1.3 Interleukine-8	116
4.2 Effet du bevacizumab sur l'autophagie	117
4.3 Bevacizumab et réseau vasculaire lymphatique	118
4.4 Discussion	118

Le phénomène de "normalisation" vasculaire tel que nous l'avons étudié ne prend en compte que les modifications morphologiques et fonctionnelles du réseau vasculaire tumoral au cours du traitement par bevacizumab. Or, les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement participent également à la réponse tumorale au cours du traitement et sont susceptibles de favoriser un phénotype de résistance. Ce chapitre est donc dédié à l'exploration préliminaire des effets du traitement sur la réponse tumorale en étudiant d'une part l'expression de médiateurs de l'angiogenèse et d'autre part le réseau lymphatique sur coupes de tumeurs.

4.1 Les médiateurs de l'angiogenèse

Plusieurs marqueurs ont été choisis pour évaluer l'impact du bevacizumab sur l'angiogenèse au cours du traitement, sur des coupes tumeurs prélevées sans traitement (jour 0) et au cours du traitement par le bevacizumab à 10 mg/kg/jour (jours 6, 10 et 14). Nous avons ainsi étudié l'expression du VEGF et ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, de l'interleukine-8, de la NO synthase endothéliale ainsi qu'un marqueur d'autophagie (Bnip3l). Le schéma 22 permet d'expliquer le lien entre les différents marqueurs choisis.

4.1.1 VEGF et ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2

L'anticorps utilisé dans cette étude permet la détection simultanée de trois isoformes du VEGF-A : VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅ et VEGF-A₁₈₉ libérées par les cellules humaines et par les

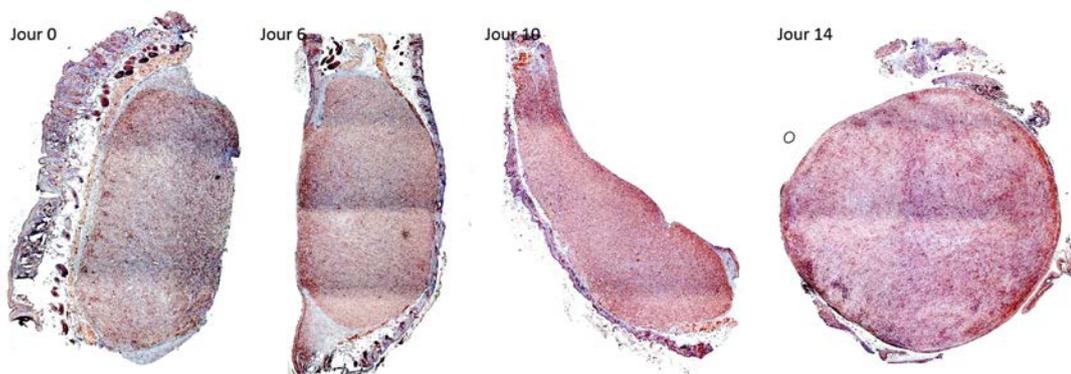


FIGURE 23 – Expression du VEGF au sein des tumeurs sans traitement au cours du traitement par bevacizumab. Les tumeurs de quatre lots de souris ($n = 16$ au total) ayant reçu ou non un traitement au bevacizumab (10 mg/kg/jour, *i.p.*) ont été récupérées puis fixées dans le formol. Le marquage du VEGF (en marron) a été effectué à l'aide d'un anticorps anti-VEGF reconnaissant trois isoformes du VEGF-A : VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅ et VEGF-A₁₈₉ libérées par les cellules humaines et par les cellules murines

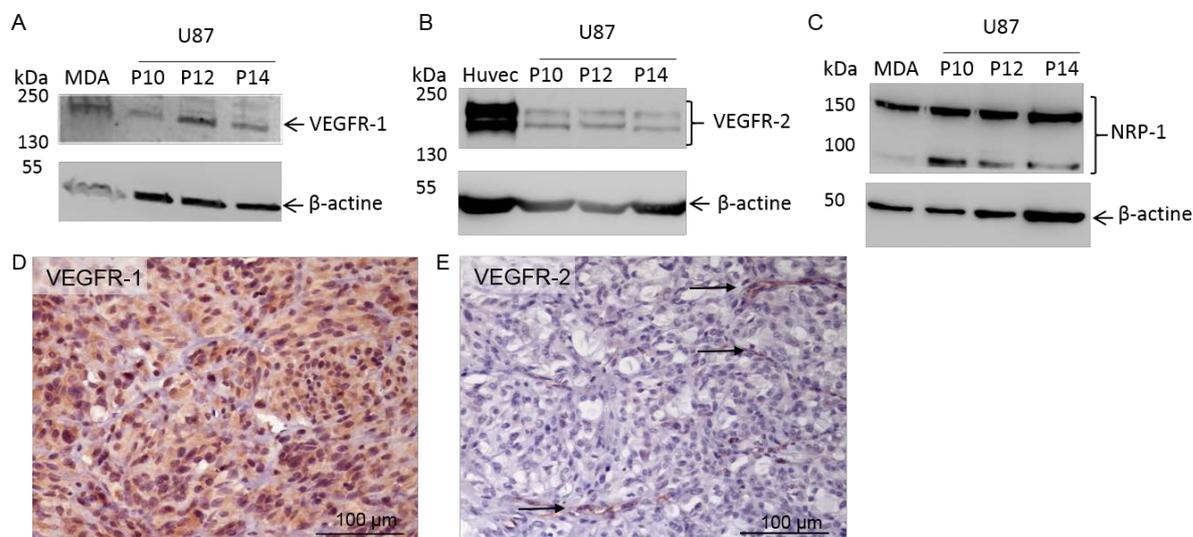


FIGURE 24 – Expression des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et du co-récepteur NRP-1 dans les cellules U87. L'analyse en Western Blot du VEGFR-1 (A), du VEGFR-2 (B) et de NRP-1 (C) a été effectuée sur des extraits protéiques de cellules U87 à trois passages différents (P10, P12 et P14). Deux lignées cellulaires ont été utilisées comme contrôles positifs : MDA-MB-231 (MDA) pour l'expression de VEGFR-1 et de NRP-1 et HUVEC pour l'expression de VEGFR-2. L'expression de la β -actine a été utilisée comme contrôle de la quantité de protéines pour chaque essai. L'expression des récepteurs VEGFR-1 (D) et VEGFR-2 (E) a été marquée sur coupes immunohistochimique de tumeurs U87 non traitées. Le marquage est représenté par une coloration marron des cellules

4.1.2 NO synthase endothéliale (eNOS)

Afin de savoir si la totalité du VEGF détecté dans les tumeurs stimule l'angiogenèse, l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) a été étudiée sur les coupes de tumeurs car il a été montré que le NO était fortement impliqué dans les effets pro-angiogènes. La figure 25 montre l'expression de la eNOS dans les tumeurs sans traitement (jour 0) et au cours du traitement par bevacizumab (jours 6, 10 et 14).

L'expression de la eNOS a été retrouvée dans les cellules tumorales, ce qui était inattendu et contribue à masquer son expression par les cellules endothéliales. L'expression de la eNOS est forte sans traitement (jour 0) et diminue au cours du traitement pour atteindre, à 10 jours, le niveau d'expression le plus faible. Étudier l'expression de la eNOS ne donne pas d'indication directe sur son niveau d'activité mais le niveau d'expression faible à 10 jours de traitement laisse suggérer que les voies de signalisation passant par la eNOS, notamment la voie VEGF/VEGFR-2, sont moins actives. Cependant, cet effet est temporaire car l'expression d'eNOS augmente à nouveau à 14 jours de traitement.

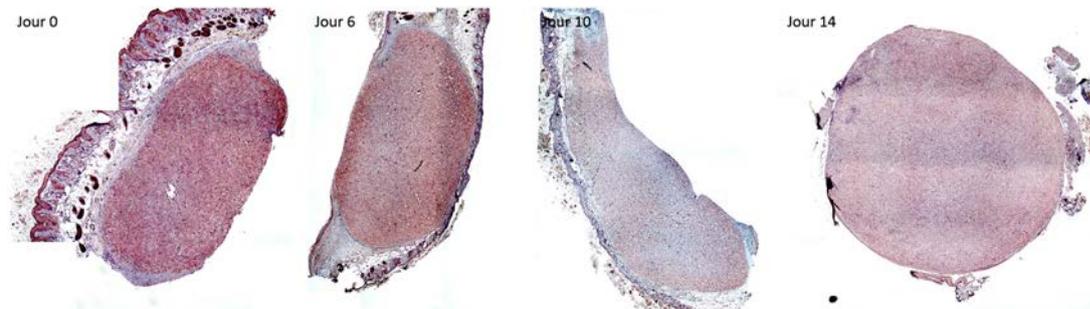


FIGURE 25 – Expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) sans traitement et au cours du traitement par bevacizumab. Les tumeurs de quatre lots de souris ($n = 16$ au total) ayant reçu ou non un traitement au bevacizumab (10 mg/kg/jour, *i.p.*) ont été récupérées puis fixées dans le formol. Le marquage de la eNOS (en marron) a été effectué à l'aide d'un anticorps reconnaissant ses formes humaine et murine

4.1.3 Interleukine-8

La libération d'interleukine-8 par les cellules tumorales a été détectée par le même anticorps sur les coupes de tumeurs (Figure 26). Sans traitement (jour 0), l'interleukine-8 n'est globalement pas exprimée par les cellules tumorales mise à part dans certaines zones localisées autour des vaisseaux sur les sites d'inflammation.

Au cours du traitement, l'expression d'IL-8 augmente peu à peu et se localise au niveau des cellules tumorales à partir de 10 jours de traitement et également autour des zones nécrotiques à 14 jours de traitement par bevacizumab.

Ainsi, à partir de 10 jours de traitement, la libération d'interleukine-8 pourrait potentiellement compenser l'inhibition de la voie VEGF/VEGFR-2 et orienter la tumeur vers un profil de croissance vasculaire indépendante du VEGF.

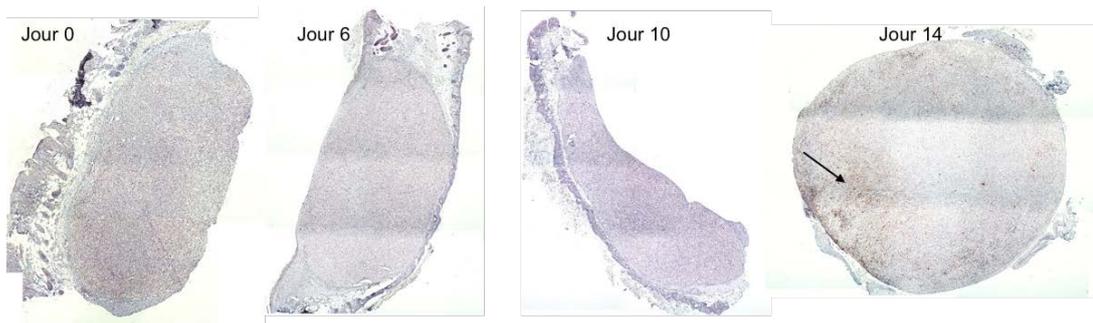


FIGURE 26 – Expression de l'interleukine-8 (IL-8) sans traitement et au cours du traitement par bevacizumab. Les tumeurs de quatre lots de souris (n = 16 au total) ayant reçu ou non un traitement au bevacizumab (10 mg/kg/jour, *i.p.*) ont été récupérées puis fixées dans le formol. Le marquage de l'IL-8 (en marron) a été effectué à l'aide d'un anticorps reconnaissant ses formes humaine et murine

4.2 Effet du bevacizumab sur l'autophagie

Le mécanisme d'autophagie permet aux cellules en général de survivre face à un stress. Lors du traitement anti-angiogène, la vascularisation tumorale diminue de façon drastique. Nos résultats présentés dans les sections précédentes montrent que le réseau vasculaire devient "normalisé" et permet de mieux subvenir aux besoins nutritifs et en oxygène de la tumeur (Glut-1, perfusion). Cependant, la raréfaction des vaisseaux sanguins laisse présumer que si ces vaisseaux sont peu fonctionnels, les cellules tumorales devraient mettre en place des mécanismes de survie tel que l'autophagie.

L'autophagie a été étudiée en recherchant l'expression de Bnip3l sur coupes histologiques de tumeurs (Figure 27). Sans traitement (jour 0), le niveau d'expression de Bnip3l est faible et homogène dans toute la tumeur. Au cours du traitement, l'expression de Bnip3l augmente progressivement et correspond à une élévation du niveau d'autophagie.

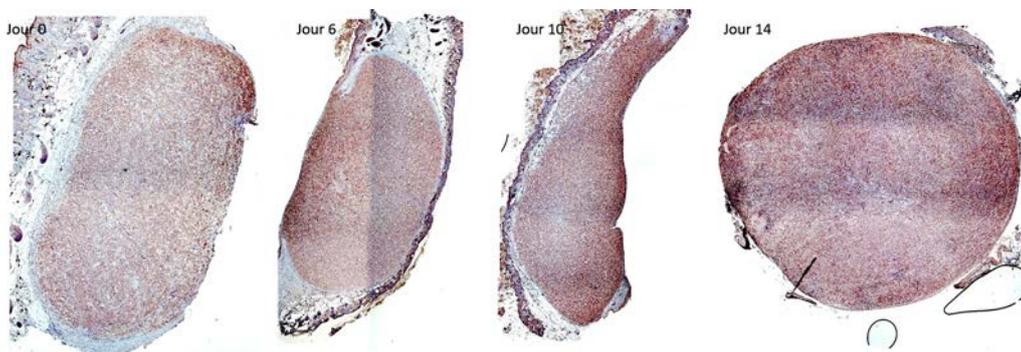


FIGURE 27 – Expression d'un marqueur de l'autophagie (Bnip3l) sans traitement et au cours du traitement par bevacizumab. Les tumeurs de quatre lots de souris (n = 16 au total) ayant reçu ou non un traitement au bevacizumab (10 mg/kg/jour, *i.p.*) ont été récupérées puis fixées dans le formol. Le marquage Bnip3l (en marron) a été effectué à l'aide d'un anticorps reconnaissant uniquement la forme humaine de la protéine

4.3 Bevacizumab et réseau vasculaire lymphatique

Dans un contexte physiologique normal, les vaisseaux lymphatiques ont une importance capitale pour le tissu. Face aux changements importants dans l'angiogenèse tumorale au cours du traitement, il est intéressant d'observer 1- s'il y a un réseau lymphatique dans la tumeur et 2- si le traitement a un impact sur ce réseau. Les vaisseaux lymphatiques ont été identifiés à l'aide du marqueur Lyve-1 sur coupes de tumeurs non traitées (jour 0) et traitées par le bevacizumab (10 mg/kg/jour) et dénombrés au cours du traitement (Figure 28).

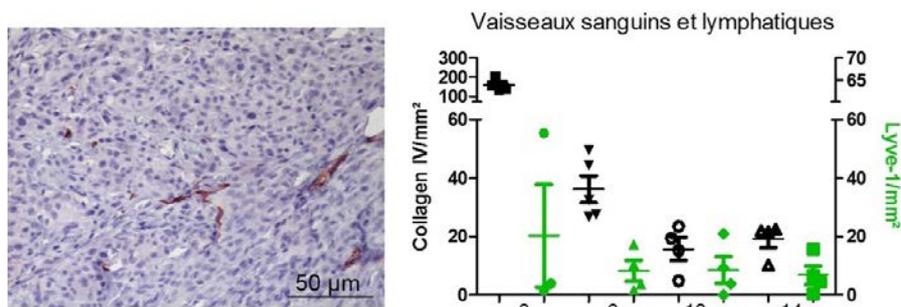


FIGURE 28 – Vaisseaux lymphatiques au cours du traitement par bevacizumab. Les vaisseaux lymphatiques sont identifiés grâce au marquage Lyve-1 (en marron). Le dénombrement des vaisseaux lymphatique a été effectué sur toute la surface tumorale de coupes de tumeurs traitées pendant 0, 6, 10 et 14 jours avec du bevacizumab (10 mg/kg, par jour) et comparé au dénombrement des vaisseaux sanguins marqués par le collagène IV

Premièrement, cette étude permet de montrer qu'avec ou sans traitement, des vaisseaux lymphatiques sont présents dans les tumeurs. La proportion de vaisseaux lymphatiques dans les tumeurs non traitées est variable mais reste globalement stable de 6 à 14 jours de traitement avec un nombre de vaisseaux oscillant entre 0 et 20/mm². La comparaison du dénombrement de vaisseaux lymphatiques aux vaisseaux sanguins montre que de 10 à 14 jours de traitement la proportion de ces deux types de vaisseaux dans les tumeurs est équivalente.

Au cours du traitement par bevacizumab il n'y a ni régression, ni développement du réseau vasculaire lymphatique. Le faible échantillon de tumeurs analysées à J0 et la disproportion entre les tumeurs analysées ce jour ne permettent pas de conclure sur la stimulation ou l'inhibition de la lymphangiogenèse provoquée par le commencement du traitement.

4.4 Discussion

Marqueurs moléculaires de la réponse au traitement par bevacizumab.

L'administration de bevacizumab permet de rééquilibrer partiellement et temporairement la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogènes, ce qui a pour effet de moduler l'angiogenèse tumorale. Le bevacizumab se fixe au VEGF circulant et au VEGF interstitiel et l'empêche d'activer VEGFR-2 dans les cellules endothéliales. A ce sujet, nous avons montré par Western blot que les cellules U87 exprimaient VEGFR-2 *in vitro* mais pas *in vivo* et qu'elles exprimaient VEGFR-1 *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, dans les tumeurs *in vivo*, le VEGF permet de stimuler à la fois la prolifération des cellules tumorales et l'angiogenèse. Par ailleurs, il est important de noter que les trois isoformes du VEGF marquées ont des affinités différentes pour les récepteurs

VEGFR-1 et VEGFR-2. D'après la littérature sur le sujet, ces trois isoformes sont sécrétées en quantité similaire par les cellules U87 [256] mais ont des effets vasculaires différents [30]. Malgré le traitement par bevacizumab, la quantité de VEGF présent dans le tissu tumoral reste globalement stable au cours du traitement, avec une légère augmentation à 14 jours. L'expression de VEGF est diffuse dans le cytoplasme des cellules, donc l'hypothèse de la séquestration dans la matrice extracellulaire peut être mise de côté.

L'expression de la NO synthase endothéliale est réduite à 10 jours de traitement, ce qui laisse supposer que la libération de NO est également réduite durant cette période. Le NO est essentiel au processus d'angiogenèse, il active la prolifération cellulaire et participe au recrutement des péricytes. Il assure la vasodilatation et empêche l'agrégation plaquettaire et inhibe l'autophagie [257, 258]. Ainsi, à 10 jours de traitement, il est possible que la quantité de NO libérée ne soit plus suffisante pour inhiber l'agrégation plaquettaire. Cela peut s'ajouter à l'effet anti-vasculaire intense et être une raison supplémentaire de la formation de thrombi visibles à 14 jours de traitement. L'angiogenèse est donc bien modulée et le niveau d'expression du VEGF mis en évidence en immunohistochimie n'est pas représentatif de l'activité angiogène, une partie du VEGF détecté pourrait correspondre à du VEGF lié au bevacizumab et donc inactif. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse du réseau vasculaire avec l'algorithme de traitement d'images et la "normalisation".

L'augmentation de l'expression de la eNOS à 14 jours de traitement qui coïncide avec une libération accrue de l'interleukine-8 par les cellules tumorales confirme qu'à 14 jours de traitement le réseau vasculaire n'est plus stable et "normalisé". En effet, l'IL-8 stimule le recrutement des polynucléaires neutrophiles qui libèrent des cytokines dont l'IL-8 et le VEGF [259] et favorisent ainsi l'angiogenèse tumorale. Il a également été montré que l'IL-8 pouvait stimuler la prolifération, la migration et le potentiel invasif des cellules tumorales [68]. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'à 14 jours de traitement, l'état "normalisé" est passé et que la tumeur entre probablement dans un état de résistance au bevacizumab ou la voie de l'IL-8 peut compenser les effets de l'inhibition de VEGF.

Le réseau lymphatique, un appui potentiel à la croissance tumorale.

La détection d'une circulation lymphatique dans une tumeur de glioblastome montre clairement l'adaptation de la tumeur à son environnement. En effet, si les cellules U87 sont implantées en orthotopique dans le cerveau, théoriquement la tumeur ne devrait pas être envahie par un réseau vasculaire lymphatique car le cerveau en est dépourvu. Or, lorsque ces cellules sont greffées en sous-cutané dans la chambre dorsale, les tumeurs présentent un réseau vasculaire lymphatique.

Avec le traitement, la proportion de vaisseaux lymphatiques dans la tumeur reste homogène entre les groupes traités. De 10 à 14 jours de traitement, il y a un équilibre entre la proportion de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques, ce qui pourrait être un argument supplémentaire en faveur de la "normalisation" du réseau vasculaire. En effet, un équilibre entre ces deux réseaux vasculaires pourrait permettre de favoriser la gestion des liquides interstitiels et d'éviter la formation d'œdèmes.

Par ailleurs, une étude de Lee *et al.* montre que la lymphangiogenèse et en particulier les cytokines libérées par les cellules endothéliales lymphatiques, telles qu'EGF ou PDGF-BB, favorisent la croissance tumorale et le recrutement des péricytes[84].

Chapitre 5

Evaluation du bénéfice thérapeutique de la "normalisation" sur la thérapie photodynamique

Sommaire

5.1	Effets vasculaires de la PDT	121
5.2	Effets du bevacizumab et de la PDT sur la croissance tumorale	122
5.3	Séquences de traitement associant le bevacizumab et la PDT, effets sur la croissance tumorale	122
5.4	Effets respectifs du bevacizumab et de la PDT	124
5.5	Discussion	125

L'identification de la période "normalisation" à l'aide de l'algorithme de traitement d'images étant en accord avec une amélioration fonctionnelle du réseau vasculaire tumoral, des expérimentations ont été conduites pour évaluer le bénéfice d'un prétraitement par le bevacizumab sur l'efficacité anti-tumorale de la thérapie photodynamique. Théoriquement, cette association présente un double intérêt dans le sens où elle permettrait d'évaluer à la fois l'efficacité du prétraitement sur la distribution du photosensibilisateur dans la tumeur et sur l'oxygénation tumorale.

5.1 Effets vasculaires de la PDT

Toutes les expérimentations associant le bevacizumab et la PDT ont été effectuées sur des modèles de tumeurs de glioblastome implantés en sous-cutané dans le pli inguinal des souris *nude*. Les effets de la PDT sur la vascularisation tumorale ont été étudiés sur le modèle de la chambre dorsale pour un cas (Figure 29). En effet, cela n'a pas été évident d'obtenir des images du réseau vasculaire tumoral après la PDT car lorsque ce traitement était effectué sur les tumeurs en chambres dorsales, l'oedème et la nécrose créés ne permettaient pas d'observer les effets vasculaires.

Dans cet exemple où la PDT a été effectuée après 6 jours de thérapie par le bevacizumab (10 mg/kg par jour), la PDT a induit une destruction totale des vaisseaux sanguins tumoraux laissant place à une tumeur probablement en hypoxie. A partir de 8 jours après la PDT, la vascularisation tumorale reprend progressivement en débutant par la périphérie de la tumeur

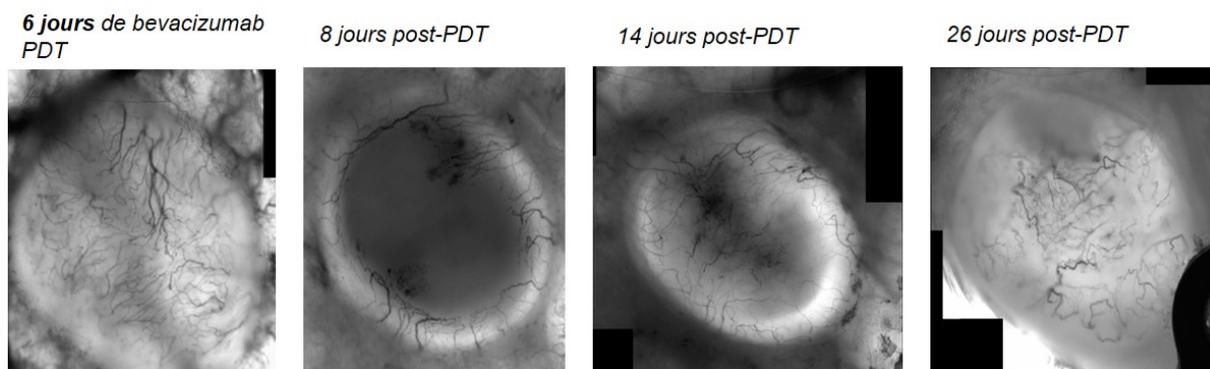


FIGURE 29 – Observation des effets vasculaires de la PDT *in vivo*. Un fragment tumoral de glioblastome issu de la lignée U87 a été implanté en chambre dorsale chez une souris *nude* ayant reçu un traitement par bevacizumab pendant 6 jours (10 mg/kg/jour). La PDT a été effectuée au sixième et dernier jour de traitement par bevacizumab par exposition à une dose de lumière 4 heures après injection de l'agent photosensibilisant (chlorine, 1,75 $\mu\text{mol/kg}$). Le réseau vasculaire a été observé par microscopie intravitale jusqu'à 26 jours après la PDT

et permet de revasculariser la tumeur. Cependant, les néo-vaisseaux formés après PDT ont un aspect beaucoup plus chaotique et tortueux que ce qui a pu être observé pour d'autres tumeurs.

5.2 Effets du bevacizumab et de la PDT sur la croissance tumorale

Les effets d'une monothérapie de bevacizumab et d'un seul traitement PDT ont été évalués sur la croissance de tumeurs de glioblastome implantées dans le pli inguinal de souris *nude* (Figure 30). Pendant les deux premiers jours, ni le traitement par bevacizumab (10 mg/kg par jour), ni la PDT n'ont d'effet sur la croissance tumorale. A partir de 2 jours, la croissance est ralentie pour les deux groupes traités. Pour les tumeurs traitées par PDT, un effet anti-tumoral tardif est perceptible 5 jours après le traitement mais est suivi d'une reprise de croissance importante. La croissance des tumeurs traitées par une monothérapie de bevacizumab est largement ralentie par rapport aux deux groupes. Dans les jours suivant la PDT, l'observation macroscopique des tumeurs laisse présumer la présence d'œdème qui rendait la mesure du volume tumoral plus fastidieuse et pourrait avoir une influence l'hétérogénéité des mesures.

5.3 Séquences de traitement associant le bevacizumab et la PDT, effets sur la croissance tumorale

Quatre séquences de traitement ont été testées afin d'évaluer l'impact de l'état de fonctionnalité du réseau vasculaire tumoral sur l'efficacité de la PDT. La figure 31 compare les volumes moyens des tumeurs après que les souris aient reçu un traitement PDT avec ou sans un prétraitement de 2, 6, 10 ou 14 jours avec du bevacizumab (10 mg/kg par jour). La PDT a été effectuée au dernier jour de traitement par le bevacizumab. Les tumeurs ayant un volume différent au

5.3. Séquences de traitement associant le bevacizumab et la PDT, effets sur la croissance tumorale

moment d'effectuer la PDT, les courbes des volumes tumoraux sont représentées de façon brute et normalisés au jour de la PDT.

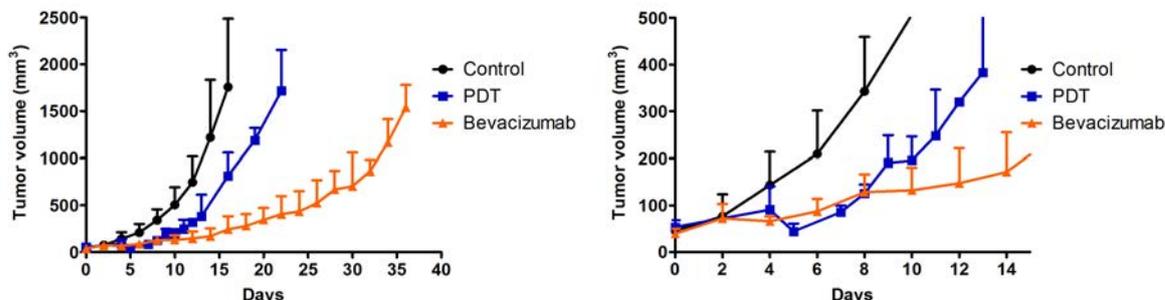


FIGURE 30 – Effets d'une monothérapie de bevacizumab ou de la PDT sur la croissance tumorale. Après implantation d'un fragment tumoral de glioblastome issu de la lignée U87 dans le pli inguinal des souris *nude*, les souris ont été divisées en trois groupes. Les souris du groupe contrôle ($n = 8$) n'ont reçu aucune thérapie. Les souris du groupe bevacizumab ($n = 5$) ont reçu un traitement par le bevacizumab (10 mg/kg/jour, *i.p.*) qui a débuté lorsque leurs tumeurs ont atteint une taille minimale de 35 mm^3 . Les souris du groupe PDT ($n = 5$) ont reçu un traitement photodynamique lorsque leurs tumeurs ont atteint une taille minimale de 35 mm^3 , soit une dose de lumière 4 heures après injection de l'agent photosensibilisant (chlorine, $1,75 \mu\text{mol/kg}$). La taille des tumeurs a été mesurée au pied à coulisse 3 à 4 fois par semaine. Le graphe de gauche représente l'évolution globale des volumes tumoraux, celui de droite est simplement un agrandissement sur les 15 premiers jours

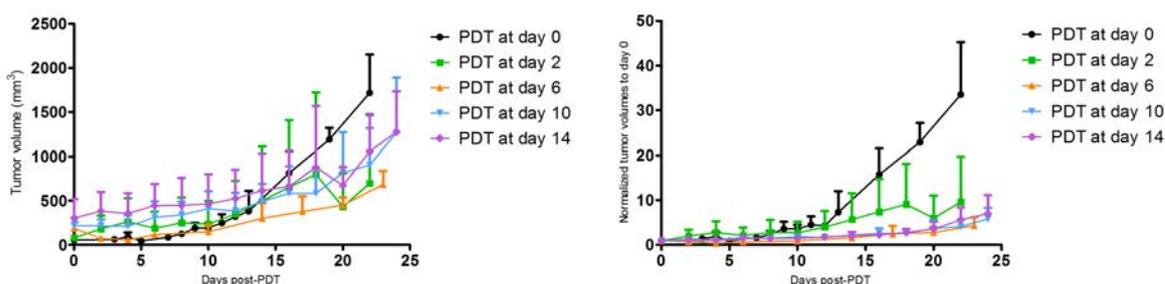


FIGURE 31 – Effets de l'association du bevacizumab et de la PDT sur la croissance tumorale. Après implantation d'un fragment tumoral de glioblastome issu de la lignée U87 dans le pli inguinal des souris *nude*, les souris ont été divisées en cinq lots. Un premier lot de souris a reçu un traitement PDT au jour 0 (taille de la tumeur $> 35 \text{ mm}^3$, $n = 5$). Les quatre autres lots ont reçu un traitement par le bevacizumab (10 mg/kg/jour, *i.p.*) pendant 2 jours ($n = 4$), 6 jours ($n = 5$), 10 jours ($n = 5$) ou 14 jours ($n = 4$) puis ont reçu un traitement PDT consistant en une dose de lumière 4 heures après injection de l'agent photosensibilisant (chlorine, $1,75 \mu\text{mol/kg}$). Le graphe de gauche représente les résultats bruts et celui de droite présente les résultats normalisés au jour de la PDT (jour 0)

La croissance des tumeurs pré-traitées pendant 6, 10 et 14 jours est largement ralentie par rapport au groupe PDT. Cependant, un prétraitement de 2 jours ne permet pas d'avoir un délai de croissance aussi important, les volumes tumoraux moyens ne sont pas significativement différents de ceux de tumeurs n'ayant reçu que la PDT.

En conclusion, un prétraitement par bevacizumab à 10 mg/kg de 6 jours au minimum est nécessaire pour observer un délai de croissance par rapport au groupe traité uniquement avec la PDT.

5.4 Effets respectifs du bevacizumab et de la PDT

Au regard de l'effet anti-tumoral important apporté par la monothérapie de bevacizumab (Figure 30), il est intéressant de rechercher quelle est la part de chacune des thérapies dans le délai de croissance observé. Pour cela, la durée de survie des souris de chacun de ces groupes ainsi que des groupes n'ayant reçu qu'une monothérapie de bevacizumab pendant 2, 6, 10 et 14 jours est représentée dans la figure 32.

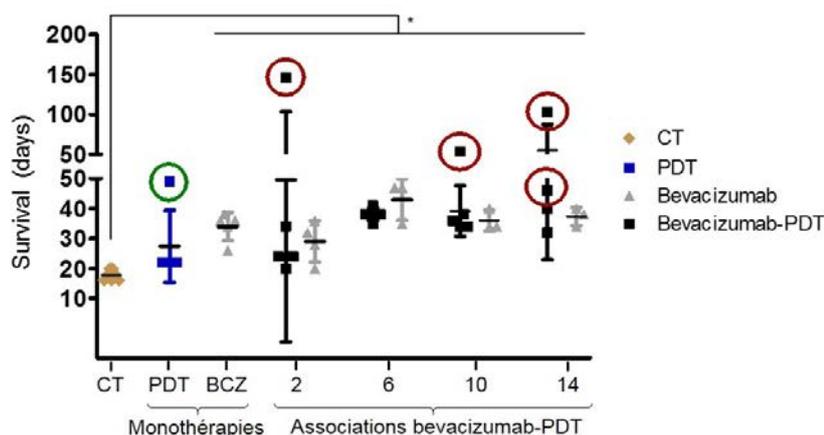


FIGURE 32 – Survie des animaux ayant été traités par le bevacizumab et la PDT. Les souris du groupe contrôle (CT, $n = 8$) n'ont pas été traitées. Les souris des groupes PDT et BCZ ont reçu respectivement un traitement par la thérapie photodynamique ($n = 5$) ou une monothérapie de bevacizumab à 10 mg/kg par jour ($n = 5$). Les souris des groupes 2, 6, 10 et 14 ont reçu un traitement par bevacizumab (10 mg/kg/jour) pendant 2, 6, 10 ou 14 jours et ont été traitées (■) ou non (▲) avec de la thérapie photodynamique après la complétion du traitement par le bevacizumab. Les individus entourés en rouge présentaient une adénomégalie suite au traitement. Les souris ont été sacrifiées lorsque la taille de leur tumeur atteignait les limites acceptable éthiquement ou lorsqu'elles présentaient des signes de souffrance. * $p < 0,05$. Test de Mann-Whitney

La durée de survie des souris ayant reçu un traitement à base de bevacizumab en monothérapie ou associé à la PDT est significativement plus élevée que celle des tumeurs contrôles. Au sein de chaque séquence d'association bevacizumab-PDT, il n'y a pas de différence significative de la survie des souris entre celles ayant reçu les deux traitements et celles ayant reçu le bevacizumab seul. Cependant, les groupes de souris ayant reçu un traitement PDT présentent une variabilité importante due à chaque fois à un individu ou plus ayant une durée de survie plus longue. Pour

ces souris, la PDT a induit une régression de la tumeur (groupes bevacizumab-PDT 2 et 14) ou un ralentissement de la croissance tumorale (groupe bevacizumab-PDT 10 et 14). Les souris dont les tumeurs ont régressé ont été sacrifiées lorsqu'elles commençaient à présenter des signes de souffrance. De plus, ces souris étaient les seules à présenter une adénomégalie caractérisée par une augmentation du volume d'un ganglion lymphatique situé à proximité du site de greffe de la tumeur. Pour la souris du groupe PDT, nous n'avions pas exploré les ganglions lymphatiques, la présence d'une adénomégalie est donc une hypothèse compte-tenu de sa durée de survie plus longue.

L'adénomégalie pourrait justifier l'allongement de la durée de survie des souris *via* la stimulation d'une réponse inflammatoire plus intense. En effet, une coloration des ganglions lymphatiques au bleu de Toluidine a permis de mettre en évidence la présence de nombreux mastocytes, ce qui suggère une réponse inflammatoire induite par la PDT (Figure 33).

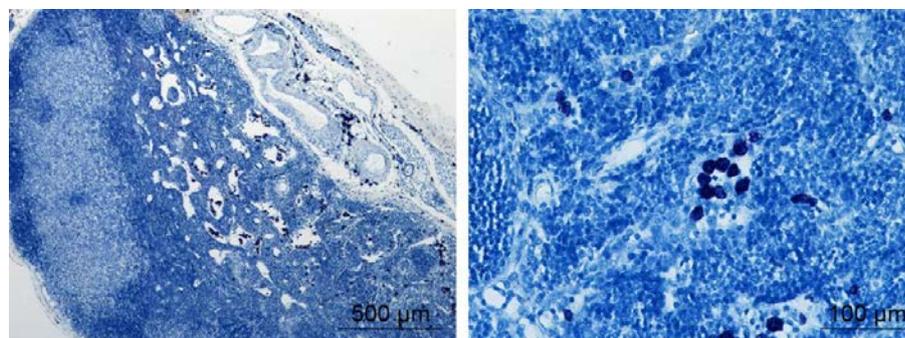


FIGURE 33 – Coloration d'un ganglion lymphatique au bleu de Toluidine montrant la présence de mastocytes. Lorsque les souris présentaient une adénomégalie, le ganglion lymphatique a été prélevé après sacrifice de la souris puis fixé en formol avant coloration au bleu de Toluidine

5.5 Discussion

La triade photosensibilisateur-oxygène-lumière sur laquelle repose le principe de la PDT nécessite d'une part que le photosensibilisateur soit distribué de façon homogène dans le tissu tumoral et d'autre part que ce tissu soit bien oxygéné.

D'après les expérimentations indiquant l'existence d'un phénomène de "normalisation" vasculaire entre 8 et 12 jours de traitement par le bevacizumab, théoriquement l'efficacité de la PDT devrait être maximale chez les souris ayant reçu 10 jours de bevacizumab puis la PDT. Or, statistiquement il n'y a pas de différence entre tous les groupes traités. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour comprendre ce phénomène.

D'après ces résultats, il semblerait que l'effet cytotoxique à court terme de la PDT sur l'inhibition de la croissance tumorale soit annihilé par les effets du bevacizumab. Une première hypothèse s'appuie sur l'effet du bevacizumab sur la voie VEGF/VEGFR-2 et les effets cytotoxiques ou cytoprotecteurs du NO. L'inhibition de la voie VEGF/VEGFR-2 provoque une diminution de la quantité de NO libéré par les cellules qui, à faible concentration, aurait un effet cytoprotecteur vis-à-vis de la PDT [189]. Cela pourrait expliquer pourquoi le délai de croissance observé lors de l'association bevacizumab-PDT n'est pas plus élevé que lorsque le bevacizumab est administré

en monothérapie.

Par ailleurs, pour quelques animaux seulement ayant reçu les deux thérapies, une adénomé-galie a été retrouvée et était corrélée avec une régression tumorale et une survie augmentée. Il est possible que l'anti-VEGF favoriserait le déclenchement d'une réponse immunitaire à long terme mais qui ne serait pas systématique. En effet, le VEGF inhibe la maturation des cellules dendritiques ainsi que la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en cellules *Natural Killer* et en macrophages et provoque ainsi une immuno-suppression [66]. En traitant avec le bevacizumab, cette immuno-suppression peut être au moins partiellement levée. Sachant que la réaction inflammatoire et la réponse immunitaire sont nécessaires au bon fonctionnement de la PDT, il est possible que la stimulation d'une réponse immunitaire soit favorisée lors du traitement. Après stimulation par les facteurs libérés par les cellules tumorales nécrotiques et apoptotiques post-PDT, les cellules dendritiques immatures deviennent matures et migrent dans les ganglions lymphatiques pour stimuler une réponse immunitaire à long terme [190]. Cela appuie le fait que les animaux ayant survécu le plus longtemps aient développé une adénopathie. Notre étude étant effectuée sur des souris *nude*, l'efficacité de la réponse immunitaire à long terme est probablement réduite due à l'absence d'une lignée lymphocytaire T.

Une dernière hypothèse pourrait expliquer pourquoi l'efficacité anti-tumorale de la PDT n'est pas augmentée de façon significative après la monothérapie de bevacizumab. Il a été montré que la PDT induisait une libération accrue de vésicules extracellulaires pouvant favoriser la reprise de croissance [260]. Si ces vésicules extracellulaires comportent de nombreux facteurs pro-angiogènes, elles peuvent induire une stimulation de la prolifération cellulaire endothéliale et tumorale.

Aussi, un biais dû au modèle d'étude a pu être introduit. Les expérimentations ayant conduit à la détermination de la période de "normalisation" ont été effectuées sur des tumeurs implantées en chambre dorsale. Or, ici les expérimentations associant le bevacizumab et la thérapie photodynamique ont été effectuées sur des tumeurs implantées dans le pli inguinal. Le réseau vasculaire de ces deux sites de greffe ainsi que les contraintes mécaniques sont différents et influencent la croissance tumorale. En effet, les tumeurs implantées dans le pli inguinal ont une vitesse de croissance plus rapide et sont de volumes plus importants que des tumeurs ayant été implantées en même temps en chambre dorsale.

Ainsi, il serait possible que la circulation sanguine ne soit pas affectée de la même façon dans ces deux modèles et pourrait représenter une explication supplémentaire à l'effet réduit de l'association des deux thérapies.

Pour conclure, l'objectif était de potentialiser les effets de la PDT grâce à la "normalisation" induite par le bevacizumab mais les conditions de traitement n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet majeur. En restant sur l'utilisation de la thérapie anti-angiogène pour favoriser la distribution du photosensibilisateur au sein de la tumeur, il serait intéressant de modifier le protocole en favorisant un ciblage vasculaire et en réduisant l'intervalle drogue-lumière. En effet, Bhuvanewari *et al.* ont montré que le ciblage vasculaire permettait d'avoir une meilleure efficacité anti-tumorale que le ciblage cellulaire, en partie du à l'augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogènes dans le cas d'un long IDL [185]. D'ailleurs, le photosensibilisateur utilisé ici, la chlorine, serait plus efficace lorsque la PDT est dirigée vers les vaisseaux sanguins et non vers les cellules tumorales [261].

Chapitre 6

Modélisation de la réponse tumorale vasculaire au traitement

Sommaire

6.1	Introduction et objectifs du modèle	127
6.2	Modélisation de l'évolution du rapport V/T	127
6.3	Modélisation de l'évolution des paramètres vasculaires discriminants de la "normalisation"	130
6.4	Conclusions et perspectives	130

Ce chapitre est dédié à la présentation d'un travail pluridisciplinaire dont l'objectif préliminaire est de créer un modèle mathématique de la réponse tumorale vasculaire à partir des données vasculaires acquises à l'aide du modèle de la chambre dorsale au cours du temps et avec ou sans traitement.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Biomedical Signal Processing and Control* (*en annexe*).

6.1 Introduction et objectifs du modèle

Afin de valoriser notre méthodologie de travail, nous avons entrepris l'élaboration d'une modélisation mathématique de l'angiogenèse tumorale dans l'objectif, à terme, de pouvoir prédire précocement la réponse aux traitements et d'adapter les protocoles thérapeutiques en conséquence.

Pour ce faire, l'originalité de notre approche a été d'utiliser des données biologiques. La plupart des modèles existants sont des modèles théoriques mettant en jeu des connaissances acquises et des hypothèses sur les cellules et leurs comportements. Ces modèles théoriques sont ensuite généralement appliqués à des données biologiques.

6.2 Modélisation de l'évolution du rapport V/T

Nous avons utilisé les données que nous avons acquises à l'aide de l'algorithme de traitement d'images afin de développer un modèle à partir de nos données biologiques pour caractériser la réponse au traitement. La partie modélisation a été réalisée par Jean-Baptiste Tylcz (PhD) [212]. Dans un premier temps, l'objectif était de tester la faisabilité de l'élaboration d'un modèle

mathématique qui nous permettrait de suivre et caractériser la réponse vasculaire à la thérapie anti-angiogène. Pour cela, nous avons choisi de ne travailler qu'avec un seul paramètre, le rapport surface vasculaire/surface tissulaire (V/T, appelé densité vasculaire dans l'article correspondant).

Afin de reproduire mathématiquement le comportement des courbes d'évolution du rapport V/T, il faut pouvoir déterminer les équations de ces courbes. En mathématique, un modèle est une représentation simplifiée d'un système. Un système traduit mathématiquement une relation cause à effet. La cause est qualifiée de paramètre d'entrée et l'effet est qualifié de paramètre de sortie. Il peut y avoir plusieurs causes qui vont être traduites par le système en plusieurs effets. De façon plus concrète, dans notre cas, la cause est représentée par l'implantation du fragment tumoral sur le réseau vasculaire et l'effet se traduit par la modification du rapport V/T au cours du temps (Figure 34).

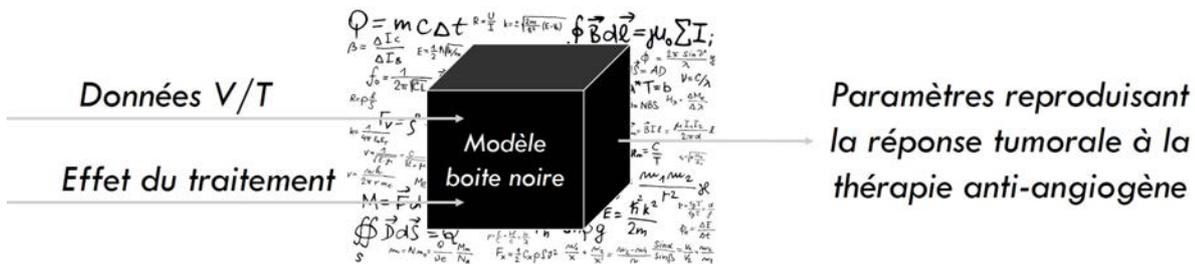


FIGURE 34 – Représentation schématique simplifiée du modèle mathématique boîte noire

Il existe différents types de modèles classés selon leur mode de conception ou leur mode d'utilisation. Ils peuvent servir à comprendre des phénomènes biologiques, à simuler un effet (*e.g.* effet thérapeutique) ou encore à prédire l'évolution d'un phénomène. Dans notre cas, le choix s'est porté sur un modèle comportementaliste dit boîte noire. Il se construit sur la base de mesures expérimentales et vise à représenter les relations entre les causes et les effets à l'aide d'équations dont les paramètres sont estimés. Un bon modèle est un modèle simple avec peu de paramètres à ajuster.

Nous présentons ici brièvement la structure du modèle, sans entrer dans le détail des équations mais afin de comprendre comment l'effet du traitement est modélisé et ce que le modèle apporte d'un point de vue biologique. La structure globale du modèle (M_G est présentée dans la figure 35. Le modèle a une structure MISO (*Multiple Input Single Output*) et comporte deux signaux d'entrée et un signal de sortie, représentés schématiquement sur un axe (x, y) , avec x pour le temps et y pour la valeur du signal. Le signal est pris en compte lorsqu'il a une valeur supérieure à zéro. Le système M_G a pour entrées deux signaux binaires $u_d(t)$ et $u_t(t)$ changeant chacun de niveau respectivement à l'implantation du fragment tumoral et au début du traitement. Ces deux signaux permettent, grâce aux équations des modèles M_d et M_t , de reconstruire deux sorties $y_d(t)$ et $y_t(t)$ représentant respectivement l'effet de la croissance vasculaire tumorale et l'effet du traitement. Finalement ces deux signaux de sortie sont combinés en un seul signal, $y_G(t)$, représentatif des effets combinés de la croissance tumorale et du traitement sur l'évolution globale du rapport V/T.

Les simulations ainsi que les données expérimentales sont représentées dans la figure 36. Le paramètre de sortie du modèle $y_G(t)$ permet de tracer la courbe représentant l'effet du traite-

ment sur le rapport V/T pour les tumeurs contrôles et pour les tumeurs traitées. La courbe de simulation du rapport V/T est corrélée à la courbe moyenne expérimentale pour les tumeurs contrôles et les tumeurs traitées.

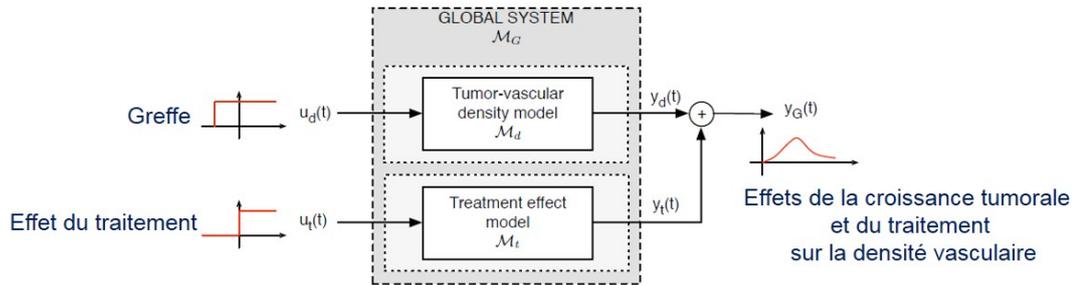


FIGURE 35 – Structure du modèle. Le système global M_G comprend deux modèles, M_d pour la modélisation de la vascularisation et M_t pour l'effet du traitement. Le premier modèle M_d est régi par un signal d'entrée $u_d(t)$ changeant de niveau au moment où la tumeur est xéngreffée en chambre dorsale. Le signal de sortie, $y_d(t)$ représente l'évolution du rapport V/T. Le second modèle M_t est régi par le signal d'entrée $u_t(t)$ changeant de niveau au moment où le traitement est administré. Le signal de sortie, $y_t(t)$ représente l'effet du traitement. Les deux signaux de sortie s'additionnent pour créer un signal $y_G(t)$ représentant l'effet combiné de la xéngreffe et du traitement (quand il est administré), sur l'évolution du rapport V/T

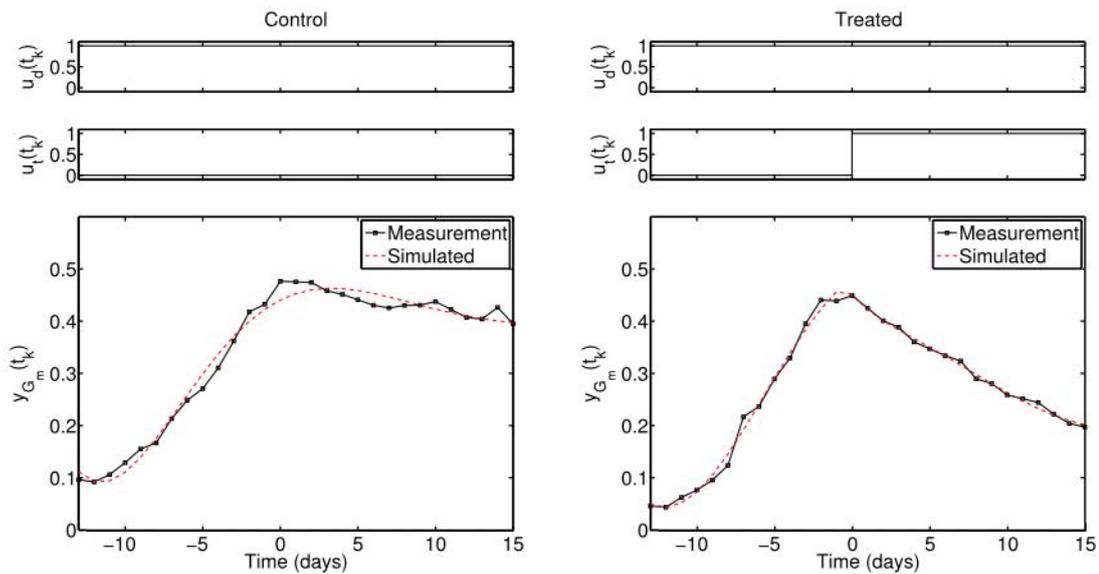


FIGURE 36 – Données expérimentales et simulées de l'évolution du rapport V/T pour les tumeurs contrôles et traitées. La courbe noire représente la moyenne des données expérimentales du rapport V/T qui ont été acquises pour 8 tumeurs contrôles et 7 tumeurs traitées. Le traitement par bevacizumab (10 mg/kg par jour) débute au jour 0, soit 14 jours post-greffe en chambre dorsale, et est représenté par le changement de niveau du paramètre d'entrée $u_t(t)$. La courbe rouge représente le signal de sortie du modèle $y_G(t)$, c'est-à-dire la simulation du paramètre V/T au cours du temps et lorsque le traitement par bevacizumab est administré au jour 0

6.3 Modélisation de l'évolution des paramètres vasculaires discriminants de la "normalisation"

Le modèle étant développé pour l'étude de l'évolution du rapport V/T, nous l'avons adapté pour modéliser l'évolution des paramètres discriminants de la "normalisation", à savoir les embranchements/mm de vaisseau et les embranchements/mm² de tissu.

6.4 Conclusions et perspectives

Grâce à ce modèle, nous pouvons évaluer différents effets du traitement sans avoir besoin de sacrifier d'animaux supplémentaires.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les paramètres les plus discriminants de la "normalisation" étaient les embranchements/mm² de surface tumorale et les embranchements/mm de longueur vasculaire. Une des perspectives serait d'adapter le modèle à ces données d'embranchements et tester l'effet de la modification de la durée de traitement. Dans nos expérimentations, nous n'avons pas fait d'analyse du réseau vasculaire tumoral lorsque le traitement était arrêté au bout de 2, 6, 10 ou 14 jours de traitement. Il serait donc intéressant de comprendre le comportement des vaisseaux sanguins pour voir pendant de combien de temps le réseau vasculaire reste "normalisé" après l'arrêt du traitement. Cela permettrait d'orienter le choix du protocole thérapeutique en terme de dose, de fréquence et de durée de traitement.

Dans une perspective à long terme, nous avons pour objectif de développer un modèle permettant de prédire précocement la réponse au traitement. L'utilisation du modèle se ferait après le début du traitement. L'acquisition de données (le moins possible) du réseau vasculaire après le début du traitement devrait pouvoir permettre de définir s'il y a une réponse au traitement et si le réseau vasculaire tend à être "normalisé". En fonction de cela, le traitement pourrait être arrêté s'il n'est pas efficace ou la dose ajustée afin de bénéficier au maximum des effets de la thérapie anti-angiogène en évitant le plus possible les effets indésirables.

Discussion générale

Au cours de ce travail de thèse, j'ai été amenée à développer une méthodologie permettant de caractériser les réseaux vasculaires sains et tumoraux à partir d'images de microscopie optique dans l'objectif d'identifier la période de "normalisation" vasculaire induite par un traitement au bevacizumab. Cela a requis un travail interdisciplinaire afin de mettre en œuvre un algorithme de traitement d'images performant capable de détecter finement le réseau vasculaire tumoral et de pouvoir ainsi quantifier les modifications morphologiques provoquées par le remodelage vasculaire peu détectables à l'œil nu d'un jour à l'autre.

La figure 37 présente un schéma récapitulatif du cheminement effectué au cours de ce travail de thèse. L'originalité de ce travail porte surtout sur la méthode d'identification de la "normalisation" vasculaire. Alors que la plupart des études précliniques utilisent les paramètres de fonctionnalité pour répondre à la question de la "normalisation", ces travaux montrent qu'il est suffisant de suivre des paramètres morphologiques vasculaires et en particulier le nombre d'embranchements. De plus, la comparaison de ces données quantitatives à celles d'un réseau vasculaire sain est une approche plutôt innovante qui valide le concept de "normalisation" en montrant que l'architecture vasculaire tumorale se rapproche d'une architecture normale.

Il serait nécessaire de confirmer ces résultats sur d'autres modèles. Dans un premier temps, il s'agirait de lever des biais ayant pu être introduits par le modèle tumoral et/ou le modèle animal en travaillant avec :

- d'autres types de tumeurs sur le modèle de la chambre dorsale chez la souris *nude*
- différents types de tumeurs sur le modèle de la chambre dorsale chez la souris immunocompétente
- un anticorps anti-VEGF murin dans le cas où des souris immunocompétentes et des tumeurs murines seraient utilisées

Dans un objectif de transposition de cette méthodologie vers un contexte clinique, il conviendrait de tester cette méthodologie sur des images de réseaux vasculaires de tumeurs humaines. Par exemple, des images d'endoscopie digestive ou vésicale pourraient correspondre au type de réseau vasculaire étudié ici. Il faudrait également disposer d'images cliniques effectuées à différents temps avant et pendant la thérapie anti-angiogène sans oublier qu'un réseau vasculaire sain est nécessaire pour qualifier les changements morphologiques vasculaires.

En ce qui concerne les résultats associant la thérapie photodynamique et le bevacizumab, des expérimentations sont en cours afin d'évaluer l'impact qu'a pu avoir la PDT sur la libération de vésicules extracellulaires et leur implication dans la reprise de croissance tumorale *via* la stimulation de l'angiogenèse. D'autre part, les dégâts cellulaires causés par la PDT font intervenir le système immunitaire et la réponse lymphocytaire T. Celle-ci n'étant pas active chez les souris *nude*, il serait intéressant d'envisager de refaire les expérimentations présentées ici sur des souris immunocompétentes.

Pour compléter ce projet, des travaux sont actuellement en cours afin d'améliorer le modèle mathématique mis en œuvre ici afin de prédire la réponse au traitement ainsi que la période de "normalisation". En effet, lorsque que le modèle a été conçu, nous n'avions utilisé que les données concernant la surface vascularisée/surface tumorale. Maintenant que nous savons qu'il faut plutôt se focaliser sur le paramètre embranchements/mm et embranchements/mm², le modèle est en cours de mise à jour.

Implantation d'un fragment tumoral en chambre dorsale en vue d'identification de la « normalisation » vasculaire à l'aide d'outils biologiques et mathématiques

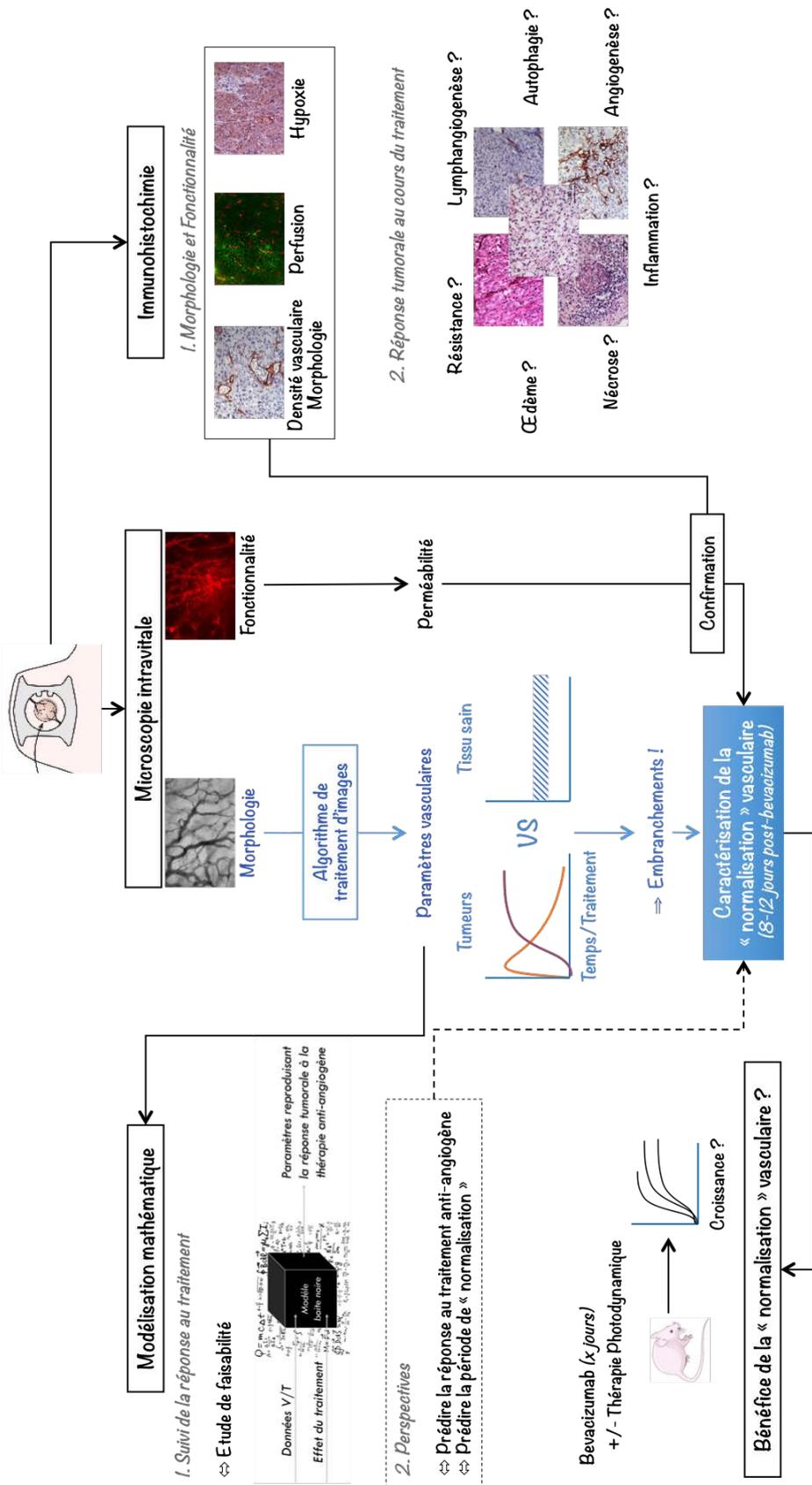


FIGURE 37 – Schéma récapitulatif de ce travail de thèse

Bibliographie

- [1] J. Folkman, "Tumor Angiogenesis : Therapeutic Implications," *New England Journal of Medicine*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186, Nov. 1971.
- [2] ———, "Anti-angiogenesis : new concept for therapy of solid tumors." *Annals of Surgery*, vol. 175, no. 3, pp. 409–416, Mar. 1972.
- [3] N. Ferrara and W. J. Henzel, "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 161, no. 2, pp. 851–858, Jun. 1989.
- [4] D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen," *Science*, vol. 246, no. 4935, pp. 1306–1309, Dec. 1989.
- [5] K. J. Kim, B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips, and N. Ferrara, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo," *Nature*, vol. 362, no. 6423, pp. 841–844, Apr. 1993.
- [6] R. H. Adams and K. Alitalo, "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 6, pp. 464–478, Jun. 2007.
- [7] A. C. Dudley, "Tumor Endothelial Cells," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, no. 3, Mar. 2012.
- [8] J. Nagy, S.-H. Chang, S.-C. Shih, A. Dvorak, and H. Dvorak, "Heterogeneity of the Tumor Vasculature," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 36, no. 03, pp. 321–331, May 2010.
- [9] J. I. Greenberg, D. J. Shields, S. G. Barillas, L. M. Acevedo, E. Murphy, J. Huang, L. Scheppeke, C. Stockmann, R. S. Johnson, N. Angle, and D. A. Cheresh, "A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation," *Nature*, vol. 456, no. 7223, pp. 809–813, Nov. 2008.
- [10] H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J. W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R. K. Jain, and D. M. McDonald, "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness," *The American journal of pathology*, vol. 156, no. 4, pp. 1363–1380, Apr. 2000.
- [11] K. Hida, N. Maishi, C. Torii, and Y. Hida, "Tumor angiogenesis—characteristics of tumor endothelial cells," *International Journal of Clinical Oncology*, vol. 21, no. 2, pp. 206–212, Feb. 2016.
- [12] S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh, A. Haskell, R. K. Jain, and D. M. McDonald, "Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors," *The American journal of pathology*, vol. 160, no. 3, pp. 985–1000, Mar. 2002.
- [13] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, no. 6, pp. 417–427, Jun. 2011.

- [14] K. Kliche, P. Jeggle, H. Pavenstadt, and H. Oberleithner, "Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium," *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, vol. 462, no. 2, pp. 209–217, Feb. 2011.
- [15] A. Eberhard, S. Kahlert, V. Goede, B. Hemmerlein, K. H. Plate, and H. G. Augustin, "Heterogeneity of Angiogenesis and Blood Vessel Maturation in Human Tumors : Implications for Antiangiogenic Tumor Therapies," *Cancer Research*, vol. 60, no. 5, pp. 1388–1393, Mar. 2000.
- [16] D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato, and A. Vacca, "The structure of the vascular network of tumors," *Cancer Letters*, vol. 248, no. 1, pp. 18–23, Apr. 2007.
- [17] D. M. McDonald and P. L. Choyke, "Imaging of angiogenesis : from microscope to clinic," *Nature medicine*, vol. 9, no. 6, pp. 713–725, Jun. 2003.
- [18] P. Baluk, S. Morikawa, A. Haskell, M. Mancuso, and D. M. McDonald, "Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors," *The American Journal of Pathology*, vol. 163, no. 5, pp. 1801–1815, Nov. 2003.
- [19] M. Sund, L. Xie, and R. Kalluri, "The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis," *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, vol. 112, no. 7-8, pp. 450–462, Aug. 2004.
- [20] S. Kaur and P. Bajwa, "A 'tete-à tete' between cancer stem cells and endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis," *Clinical and Translational Oncology*, vol. 16, no. 2, pp. 115–121, Aug. 2013.
- [21] M. E. Hardee and D. Zagzag, "Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization," *The American Journal of Pathology*, vol. 181, no. 4, pp. 1126–1141, Oct. 2012.
- [22] Y. Yang, S.-Y. Lv, W. Ye, and L. Zhang, "Apelin/APJ system and cancer," *Clinica Chimica Acta*, vol. 457, pp. 112–116, Jun. 2016.
- [23] S. Koch, S. Tugues, X. Li, L. Gualandi, and L. Claesson-Welsh, "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors," *Biochemical Journal*, vol. 437, no. 2, pp. 169–183, Jul. 2011.
- [24] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 298–307, May 2011.
- [25] M. E. Eichhorn, A. Kleespies, M. K. Angele, K.-W. Jauch, and C. J. Bruns, "Angiogenesis in cancer : molecular mechanisms, clinical impact," *Langenbeck's Archives of Surgery*, vol. 392, no. 3, pp. 371–379, Feb. 2007.
- [26] M. W. Kieran, R. Kalluri, and Y.-J. Cho, "The VEGF Pathway in Cancer and Disease : Responses, Resistance, and the Path Forward," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, no. 12, p. a006593, Dec. 2012.
- [27] Y. Zhao and A. A. Adjei, "Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy : Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor," *The Oncologist*, vol. 20, no. 6, pp. 660–673, Jun. 2015.
- [28] S. Koch and L. Claesson-Welsh, "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, no. 7, p. a006502, Jul. 2012.
- [29] S. J. Harper and D. O. Bates, "VEGF-A splicing : the key to anti-angiogenic therapeutics?" *Nature Reviews. Cancer*, vol. 8, no. 11, pp. 880–887, Nov. 2008.

-
- [30] P. Vempati, A. S. Popel, and F. Mac Gabhann, "Extracellular regulation of VEGF : isoforms, proteolysis, and vascular patterning," *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 25, no. 1, pp. 1–19, Feb. 2014.
- [31] S. M. Eswarappa and P. L. Fox, "Antiangiogenic VEGF-Ax : A New Participant in Tumor Angiogenesis," *Cancer Research*, vol. 75, no. 14, pp. 2765–2769, Jul. 2015.
- [32] H. Xin, C. Zhong, E. Nudleman, and N. Ferrara, "Evidence for Pro-angiogenic Functions of VEGF-Ax," *Cell*, vol. 167, no. 1, pp. 275–284.e6, Sep. 2016.
- [33] G. Valdés, R. Erices, C. Chacon, and J. Corthorn, "Angiogenic, hyperpermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*)," *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, vol. 6, p. 13, 2008.
- [34] J. C. Chappell, S. M. Taylor, N. Ferrara, and V. L. Bautch, "Local Guidance of Emerging Vessel Sprouts Requires Soluble Flt-1," *Developmental Cell*, vol. 17, no. 3, pp. 377–386, Sep. 2009.
- [35] J. C. Chappell, J. G. Cluceru, J. E. Nesmith, K. P. Mouillesseaux, V. B. Bradley, C. M. Hartland, Y. L. Hashambhoy-Ramsay, J. Walpole, S. M. Peirce, F. Mac Gabhann, and V. L. Bautch, "Flt-1 (VEGFR-1) coordinates discrete stages of blood vessel formation," *Cardiovascular Research*, vol. 111, no. 1, pp. 84–93, Jul. 2016.
- [36] Biooncology.com, "VEGF and the Tumor Life Cycle | BioOncology."
- [37] M. R. Akl, P. Nagpal, N. M. Ayoub, B. Tai, S. A. Prabhu, C. M. Capac, M. Gliksman, A. Goy, and K. S. Suh, "Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies," *Oncotarget*, vol. 7, no. 28, pp. 44735–44762, Jul. 2016.
- [38] R. Ronca, A. Giacomini, M. Rusnati, and M. Presta, "The potential of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 19, no. 10, pp. 1361–1377, Oct. 2015.
- [39] S. A. Kono, L. E. Heasley, R. C. Doebele, and D. R. Camidge, "Adding to the mix : fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor receptor pathways as targets in non-small cell lung cancer," *Current Cancer Drug Targets*, vol. 12, no. 2, pp. 107–123, Feb. 2012.
- [40] A. Ostman, "PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 15, no. 4, pp. 275–286, Aug. 2004.
- [41] N. E. Campbell, L. Kellenberger, J. Greenaway, R. A. Moorehead, N. M. Linnerth-Petrik, and J. Petrik, "Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis," *Journal of Oncology*, vol. 2010, 2010.
- [42] T. C. Remillard, G. Bratslavsky, S. Jensen-Taubman, W. G. Stetler-Stevenson, and D. Bourboulia, "Molecular mechanisms of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in the tumor microenvironment," *Molecular and cellular therapies*, vol. 2, Jun. 2014.
- [43] M. Mongiat, E. Andreuzzi, G. Tarticchio, and A. Paulitti, "Extracellular Matrix, a Hard Player in Angiogenesis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 11, Nov. 2016.
- [44] A. Neve, F. P. Cantatore, N. Maruotti, A. Corrado, and D. Ribatti, "Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions," *BioMed Research International*, vol. 2014, p. 756078, 2014.

- [45] H. G. Augustin, G. Y. Koh, G. Thurston, and K. Alitalo, "Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiotensin-Tie system," *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 10, no. 3, pp. 165–177, Mar. 2009.
- [46] P. Province, C. E., X. Han, N. Louis, and H. Fathallah, "Hypoxia, Angiogenesis and Mechanisms for Invasion of Malignant Gliomas," in *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications*, T. Lichtor, Ed. InTech, Feb. 2013.
- [47] J. Folkman, "Angiogenesis : an organizing principle for drug discovery?" *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 6, no. 4, pp. 273–286, Apr. 2007.
- [48] S. Rodriguez and U. Huynh-Do, "The Role of PTEN in Tumor Angiogenesis," *Journal of Oncology*, vol. 2012, 2012.
- [49] F. D. Smet, I. Segura, K. D. Bock, P. J. Hohensinner, and P. Carmeliet, "Mechanisms of Vessel Branching Filopodia on Endothelial Tip Cells Lead the Way," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 29, no. 5, pp. 639–649, May 2009.
- [50] S. M. Weis and D. A. Cheresh, "Tumor angiogenesis : molecular pathways and therapeutic targets," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 11, pp. 1359–1370, Nov. 2011.
- [51] B. Al-Husein, M. Abdalla, M. Trepte, D. L. DeRemer, and P. R. Somanath, "Anti-angiogenic therapy for cancer : An update," *Pharmacotherapy*, vol. 32, no. 12, pp. 1095–1111, Dec. 2012.
- [52] D. Ribatti, B. Nico, and E. Crivellato, "The role of pericytes in angiogenesis," *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 55, no. 3, pp. 261–268, 2011.
- [53] P. C. Stapor, R. S. Sweat, D. C. Dashti, A. M. Betancourt, and W. L. Murfee, "Pericyte Dynamics during Angiogenesis : New Insights from New Identities," *Journal of Vascular Research*, vol. 51, no. 3, pp. 163–174, 2014.
- [54] A. N. Stratman, K. M. Malotte, R. D. Mahan, M. J. Davis, and G. E. Davis, "Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation," *Blood*, vol. 114, no. 24, pp. 5091–5101, Dec. 2009.
- [55] G. P. Dunn, M. L. Rinne, J. Wykosky, G. Genovese, S. N. Quayle, I. F. Dunn, P. K. Agarwalla, M. G. Chheda, B. Campos, A. Wang, C. Brennan, K. L. Ligon, F. Furnari, W. K. Cavenee, R. A. Depinho, L. Chin, and W. C. Hahn, "Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma," *Genes & Development*, vol. 26, no. 8, pp. 756–784, Apr. 2012.
- [56] G. Bergers and L. E. Benjamin, "Angiogenesis : Tumorigenesis and the angiogenic switch," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 401–410, Jun. 2003.
- [57] D. M. Gilkes, G. L. Semenza, and D. Wirtz, "Hypoxia and the extracellular matrix : drivers of tumour metastasis," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 14, no. 6, pp. 430–439, Jun. 2014.
- [58] D. Ohlund, E. Elyada, and D. Tuveson, "Fibroblast heterogeneity in the cancer wound," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 211, no. 8, pp. 1503–1523, Jul. 2014.
- [59] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, T. Sato, H. Takahashi, and H. Takeyama, "Cancer-Associated Fibroblasts : Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth," *Cancers*, vol. 7, no. 4, pp. 2443–2458, Dec. 2015.
- [60] C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, and J. A. Varner, "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 604–617, Aug. 2008.
- [61] H. A. Goubran, J. Stakiw, M. Radosevic, and T. Burnouf, "Platelets effects on tumor growth," *Seminars in Oncology*, vol. 41, no. 3, pp. 359–369, Jun. 2014.

-
- [62] S. Sabrkhany, A. W. Griffioen, and M. G. A. Oude Egbrink, "The role of blood platelets in tumor angiogenesis," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1815, no. 2, pp. 189–196, Apr. 2011.
- [63] T. G. Walsh, P. Metharom, and M. C. Berndt, "The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis," *Platelets*, vol. 26, no. 3, pp. 199–211, Apr. 2015.
- [64] G.-O. Ahn and J. M. Brown, "Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Tumor Vasculogenesis but Not for Angiogenesis : Role of Bone Marrow-Derived Myelomonocytic Cells," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 3, pp. 193–205, Mar. 2008.
- [65] T. Voron, E. Marcheteau, S. Pernot, O. Colussi, E. Tartour, J. Taieb, and M. Terme, "Control of the immune response by pro-angiogenic factors," *Cancer Immunity and Immunotherapy*, vol. 4, p. 70, 2014.
- [66] K. M. Hargadon, "Tumor-altered dendritic cell function : implications for anti-tumor immunity," *Frontiers in Immunology*, vol. 4, p. 192, 2013.
- [67] D. J. Brat, A. C. Bellail, and E. G. V. Meir, "The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis," *Neuro-Oncology*, vol. 7, no. 2, pp. 122–133, Apr. 2005.
- [68] D. J. J. Waugh and C. Wilson, "The Interleukin-8 Pathway in Cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 21, pp. 6735–6741, Nov. 2008.
- [69] A. Sparmann and D. Bar-Sagi, "Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis," *Cancer Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 447–458, Nov. 2004.
- [70] S. C. Bir, Y. Xiong, C. G. Kevil, and J. Luo, "Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases," *Cardiovascular Research*, vol. 95, no. 1, pp. 7–18, Jul. 2012.
- [71] D. Fukumura, S. Kashiwagi, and R. K. Jain, "The role of nitric oxide in tumour progression," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 6, no. 7, pp. 521–534, Jul. 2006.
- [72] L. Ying and L. J. Hofseth, "An Emerging Role for Endothelial Nitric Oxide Synthase in Chronic Inflammation and Cancer," *Cancer Research*, vol. 67, no. 4, pp. 1407–1410, Feb. 2007.
- [73] C. Kahlert and R. Kalluri, "Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 91, no. 4, pp. 431–437, Mar. 2013.
- [74] J. Webber, V. Yeung, and A. Clayton, "Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 40, pp. 27–34, Apr. 2015.
- [75] S. Kholia, A. Ranghino, P. Garnieri, T. Lopatina, M. C. Deregibus, P. Rispoli, M. F. Brizzi, and G. Camussi, "Extracellular vesicles as new players in angiogenesis," *Vascular Pharmacology*, 2016.
- [76] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles : Exosomes, microvesicles, and friends," *The Journal of Cell Biology*, vol. 200, no. 4, pp. 373–383, Feb. 2013.
- [77] F. F. van Doormaal, A. Kleinjan, M. Di Nisio, H. R. Büller, and R. Nieuwland, "Cell-derived microvesicles and cancer," *The Netherlands Journal of Medicine*, vol. 67, no. 7, pp. 266–273, Aug. 2009.
- [78] T. P. Padera, B. R. Stoll, J. B. Tooredman, D. Capen, E. d. Tomaso, and R. K. Jain, "Pathology : Cancer cells compress intratumour vessels," *Nature*, vol. 427, no. 6976, pp. 695–695, Feb. 2004.

- [79] K. Alitalo, T. Tammela, and T. V. Petrova, "Lymphangiogenesis in development and human disease," *Nature*, vol. 438, no. 7070, pp. 946–953, Dec. 2005.
- [80] S. A. Stacker, S. P. Williams, T. Karnezis, R. Shayan, S. B. Fox, and M. G. Achen, "Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 159–172, Mar. 2014.
- [81] A. Christiansen and M. Detmar, "Lymphangiogenesis and Cancer," *Genes & Cancer*, vol. 2, no. 12, pp. 1146–1158, Dec. 2011.
- [82] S. L. Schlereth, N. Refaian, S. Iden, C. Cursiefen, and L. M. Heindl, "Impact of the Prolymphangiogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment on Lymphatic Cancer Metastasis," *BioMed Research International*, vol. 2014, p. e639058, Sep. 2014.
- [83] V. Riabov, A. Gudima, N. Wang, A. Mickley, A. Orekhov, and J. Kzhyshkowska, "Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis," *Frontiers in Physiology*, vol. 5, Mar. 2014.
- [84] E. Lee, N. B. Pandey, and A. S. Popel, "Lymphatic endothelial cells support tumor growth in breast cancer," *Scientific Reports*, vol. 4, Jul. 2014.
- [85] R. K. Jain, "Antiangiogenesis Strategies Revisited : From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia," *Cancer Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 605–622, Oct. 2014.
- [86] M. Abdelrahim, S. Konduri, R. Basha, P. A. Philip, and C. H. Baker, "Angiogenesis : an update and potential drug approaches (review)," *International Journal of Oncology*, vol. 36, no. 1, pp. 5–18, Jan. 2010.
- [87] N. Ferrara, K. J. Hillan, H.-P. Gerber, and W. Novotny, "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer," *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 3, no. 5, pp. 391–400, May 2004.
- [88] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar, "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, Jun. 2004.
- [89] S. Chatterjee, C. Wiczorek, J. Schottle, M. Siobal, Y. Hinze, T. Franz, A. Florin, J. Adamczak, L. Heukamp, B. Neumaier, and R. T. Ullrich, "Transient anti-angiogenic treatment improves delivery of cytotoxic compounds and therapeutic outcome in lung cancer," *Cancer Research*, Mar. 2014.
- [90] A. El Kaffas, A. Giles, and G. J. Czarnota, "Dose-dependent response of tumor vasculature to radiation therapy in combination with Sunitinib depicted by three-dimensional high-frequency power Doppler ultrasound," *Angiogenesis*, vol. 16, no. 2, pp. 443–454, Apr. 2013.
- [91] B. Faivre, "L'angiogenèse tumorale Thérapie anti-angiogénique et risque thrombotique, problème d'actualité." Ph.D. dissertation, Oct. 2008.
- [92] O. Karroum, J. Kengen, P. Danhier, J. Magat, L. Mignon, C. Bouzin, J. Verrax, N. Charrette, P. Starkel, P. B. Calderon, P. Sonveaux, O. Feron, V. Grégoire, B. Gallez, and B. F. Jordan, "Tumor reoxygenation following administration of Mitogen-Activated Protein Kinase inhibitors : A rationale for combination with radiation therapy," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 105, no. 1, pp. 64–71, Oct. 2012.
- [93] S. Li, N. Gill, and S. Lentzsch, "Recent advances of IMiDs in cancer therapy," *Current Opinion in Oncology*, vol. 22, no. 6, pp. 579–585, Nov. 2010.

-
- [94] B. Sennino and D. M. McDonald, "Controlling escape from angiogenesis inhibitors," *Nature reviews. Cancer*, vol. 12, no. 10, pp. 699–709, Oct. 2012.
- [95] F. Kazazi-Hyseni, J. H. Beijnen, and J. H. M. Schellens, "Bevacizumab," *The Oncologist*, vol. 15, no. 8, pp. 819–825, Aug. 2010.
- [96] F. Winkler, S. V. Kozin, R. T. Tong, S.-S. Chae, M. F. Booth, I. Garkavtsev, L. Xu, D. J. Hicklin, D. Fukumura, E. di Tomaso, L. L. Munn, and R. K. Jain, "Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation : role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases," *Cancer cell*, vol. 6, no. 6, pp. 553–563, Dec. 2004.
- [97] Y. Yoshizawa, K.-I. Ogawara, A. Fushimi, S. Abe, K. Ishikawa, T. Araki, G. Molema, T. Kimura, and K. Higaki, "Deeper penetration into tumor tissues and enhanced in vivo antitumor activity of liposomal paclitaxel by pretreatment with angiogenesis inhibitor SU5416," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 9, no. 12, pp. 3486–3494, Dec. 2012.
- [98] A. Vennepureddy, P. Singh, R. Rastogi, J. P. Atallah, and T. Terjanian, "Evolution of ramucirumab in the treatment of cancer – A review of literature," *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, p. 1078155216655474, Jun. 2016.
- [99] H. Wilke, K. Muro, E. Van Cutsem, S.-C. Oh, G. Bodoky, Y. Shimada, S. Hironaka, N. Sugimoto, O. Lipatov, T.-Y. Kim, D. Cunningham, P. Rougier, Y. Komatsu, J. Ajani, M. Emig, R. Carlesi, D. Ferry, K. Chandrawansa, J. D. Schwartz, and A. Ohtsu, "Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW) : a double-blind, randomised phase 3 trial," *The Lancet Oncology*, vol. 15, no. 11, pp. 1224–1235, Oct. 2014.
- [100] C. S. Fuchs, J. Tomasek, C. J. Yong, F. Dumitru, R. Passalacqua, C. Goswami, H. Safran, L. V. dos Santos, G. Aprile, D. R. Ferry, B. Melichar, M. Tehfe, E. Topuzov, J. R. Zalberg, I. Chau, W. Campbell, C. Sivanandan, J. Pikiel, M. Koshiji, Y. Hsu, A. M. Liepa, L. Gao, J. D. Schwartz, and J. Tabernero, "Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD) : an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial," *The Lancet*, vol. 383, no. 9911, pp. 31–39, Jan. 2014.
- [101] K. K. Ciombor and J. Berlin, "Aflibercept—a Decoy VEGF Receptor," *Current Oncology Reports*, vol. 16, no. 2, p. 368, Jan. 2014.
- [102] E. Van Cutsem, J. Tabernero, R. Lakomy, H. Prenen, J. Prausová, T. Macarulla, P. Ruff, G. A. van Hazel, V. Moiseyenko, D. Ferry, J. McKendrick, J. Polikoff, A. Tellier, R. Castan, and C. Allegra, "Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen," *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 28, pp. 3499–3506, Oct. 2012.
- [103] I. F. Tannock, K. Fizazi, S. Ivanov, C. T. Karlsson, A. Fléchon, I. Skoneczna, F. Orlandi, G. Gravis, V. Matveev, S. Bavbek, T. Gil, L. Viana, O. Arén, O. Karyakin, T. Elliott, A. Birtle, E. Magherini, L. Hatteville, D. Petrylak, B. Tombal, M. Rosenthal, and VENICE investigators, "Aflibercept versus placebo in combination with docetaxel and prednisone for treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer (VENICE) : a phase 3, double-blind randomised trial," *The Lancet. Oncology*, vol. 14, no. 8, pp. 760–768, Jul. 2013.

- [104] P. Rougier, H. Riess, R. Manges, P. Karasek, Y. Humblet, C. Barone, A. Santoro, S. As-sadourian, L. Hatteville, and P. A. Philip, "Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer," *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 49, no. 12, pp. 2633–2642, Aug. 2013.
- [105] R. Ramlau, V. Gorbunova, T. E. Ciuleanu, S. Novello, M. Ozguroglu, T. Goksel, C. Baldotto, J. Bennouna, F. A. Shepherd, S. Le-Guenec, A. Rey, V. Miller, N. Thatcher, and G. Scagliotti, "Aflibercept and Docetaxel versus Docetaxel alone after platinum failure in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer : a randomized, controlled phase III trial," *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 29, pp. 3640–3647, Oct. 2012.
- [106] K. J. Gotink and H. M. W. Verheul, "Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors : what is their mechanism of action?" *Angiogenesis*, vol. 13, no. 1, pp. 1–14, Mar. 2010.
- [107] R. J. Motzer, B. Escudier, P. Tomczak, T. E. Hutson, M. D. Michaelson, S. Negrier, S. Oudard, M. E. Gore, J. Tarazi, S. Hariharan, C. Chen, B. Rosbrook, S. Kim, and B. I. Rini, "Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma : overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial," *The Lancet Oncology*, vol. 14, no. 6, pp. 552–562, May 2013.
- [108] B. Escudier, T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, R. M. Bukowski, and TARGET Study Group, "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 356, no. 2, pp. 125–134, Jan. 2007.
- [109] T. K. Choueiri, B. Escudier, T. Powles, N. M. Tannir, P. N. Mainwaring, B. I. Rini, H. J. Hammers, F. Donskov, B. J. Roth, K. Peltola, J. L. Lee, D. Y. C. Heng, M. Schmidinger, N. Agarwal, C. N. Sternberg, D. F. McDermott, D. T. Aftab, C. Hessel, C. Scheffold, G. Schwab, T. E. Hutson, S. Pal, and R. J. Motzer, "Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR) : final results from a randomised, open-label, phase 3 trial," *The Lancet Oncology*, vol. 17, no. 7, pp. 917–927, Jul. 2016.
- [110] R. J. Motzer, T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. W. Bycott, C. M. Baum, and R. A. Figlin, "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 356, no. 2, pp. 115–124, Jan. 2007.
- [111] C. N. Sternberg, I. D. Davis, J. Mardiak, C. Szczylik, E. Lee, J. Wagstaff, C. H. Barrios, P. Salzman, O. A. Gladkov, A. Kavina, J. J. Zarbá, M. Chen, L. McCann, L. Pandite, D. F. Roychowdhury, and R. E. Hawkins, "Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma : results of a randomized phase III trial," *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 6, pp. 1061–1068, Feb. 2010.
- [112] A.-L. Cheng, Y.-K. Kang, Z. Chen, C.-J. Tsao, S. Qin, J. S. Kim, R. Luo, J. Feng, S. Ye, T.-S. Yang, J. Xu, Y. Sun, H. Liang, J. Liu, J. Wang, W. Y. Tak, H. Pan, K. Burock, J. Zou, D. Voliotis, and Z. Guan, "Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma : a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 1, pp. 25–34, Jan. 2009.
- [113] E. Raymond, L. Dahan, J.-L. Raoul, Y.-J. Bang, I. Borbath, C. Lombard-Bohas, J. Valle, P. Metrakos, D. Smith, A. Vinik, J.-S. Chen, D. Hörsch, P. Hammel, B. Wiedenmann,

-
- E. Van Cutsem, S. Patyna, D. R. Lu, C. Blanckmeister, R. Chao, and P. Ruzzniewski, "Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors," *The New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 6, pp. 501–513, Feb. 2011.
- [114] S. A. Wells, B. G. Robinson, R. F. Gagel, H. Dralle, J. A. Fagin, M. Santoro, E. Baudin, R. Elisei, B. Jarzab, J. R. Vasselli, J. Read, P. Langmuir, A. J. Ryan, and M. J. Schlumberger, "Vandetanib in Patients With Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Cancer : A Randomized, Double-Blind Phase III Trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 2, pp. 134–141, Jan. 2012.
- [115] W. T. A. van der Graaf, J.-Y. Blay, S. P. Chawla, D.-W. Kim, B. Bui-Nguyen, P. G. Casali, P. Schöffski, M. Aglietta, A. P. Staddon, Y. Beppu, A. Le Cesne, H. Gelderblom, I. R. Judson, N. Araki, M. Ouali, S. Marreud, R. Hodge, M. R. Dewji, C. Coens, G. D. Demetri, C. D. Fletcher, A. P. Dei Tos, P. Hohenberger, EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, and PALETTE study group, "Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE) : a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial," *Lancet (London, England)*, vol. 379, no. 9829, pp. 1879–1886, May 2012.
- [116] T. Facon, J. Y. Mary, C. Hulin, L. Benboubker, M. Attal, B. Pegourie, M. Renaud, J. L. Harousseau, G. Guillermin, C. Chaletteix, M. Dib, L. Voillat, H. Maisonneuve, J. Troncy, V. Dorvaux, M. Monconduit, C. Martin, P. Casassus, J. Jaubert, H. Jardel, C. Doyen, B. Kolb, B. Anglaret, B. Grosbois, I. Yakoub-Agha, C. Mathiot, H. Avet-Loiseau, and Intergroupe Francophone du Myélome, "Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06) : a randomised trial," *Lancet (London, England)*, vol. 370, no. 9594, pp. 1209–1218, Oct. 2007.
- [117] A. J. Molinari, R. F. Aromando, M. E. Itoiz, M. A. Garabalino, A. M. Hughes, E. M. Heber, E. C. C. Pozzi, D. W. Nigg, V. A. Trivillin, and A. E. Schwint, "Blood Vessel Normalization in the Hamster Oral Cancer Model for Experimental Cancer Therapy Studies," *Anticancer Research*, vol. 32, no. 7, pp. 2703–2709, Jul. 2012.
- [118] J. Segers, V. D. Fazio, R. Ansiaux, P. Martinive, O. Feron, P. Wallemacq, and B. Gallez, "Potentiation of cyclophosphamide chemotherapy using the anti-angiogenic drug thalidomide : Importance of optimal scheduling to exploit the 'normalization' window of the tumor vasculature," *Cancer Letters*, vol. 244, no. 1, pp. 129–135, Nov. 2006.
- [119] H. Quach, D. Ritchie, A. K. Stewart, P. Neeson, S. Harrison, M. J. Smyth, and H. M. Prince, "Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma," *Leukemia*, vol. 24, no. 1, pp. 22–32, Jan. 2010.
- [120] B. J. Nieves, P. A. D'Amore, and B. A. Bryan, "The function of vascular endothelial growth factor," *BioFactors*, vol. 35, no. 4, pp. 332–337, Jul. 2009.
- [121] T. Kamba and D. M. McDonald, "Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 96, no. 12, pp. 1788–1795, May 2007.
- [122] H. Huang, Y. Zheng, J. Zhu, J. Zhang, H. Chen, and X. Chen, "An Updated Meta-Analysis of Fatal Adverse Events Caused by Bevacizumab Therapy in Cancer Patients," *PLOS ONE*, vol. 9, no. 3, p. e89960, Mar. 2014.
- [123] V. Ranpura, S. Hapani, and S. Wu, "Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients : a meta-analysis," *JAMA*, vol. 305, no. 5, pp. 487–494, Feb. 2011.
- [124] Helen Chen and J. Cleck, "Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway," *Nature Reviews. Clinical Oncology*, vol. 6, no. 8, pp. 465–477, Aug. 2009.

- [125] J. Thachil, “Nitric oxide and adverse events of vascular endothelial growth factor inhibitors,” *Current Medical Research and Opinion*, vol. 27, no. 8, pp. 1503–1507, Aug. 2011.
- [126] A. C. Begg, F. A. Stewart, and C. Vens, “Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 11, no. 4, pp. 239–253, Apr. 2011.
- [127] R. K. Jain, “Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy : A new paradigm for combination therapy,” *Nature Medicine*, vol. 7, no. 9, pp. 987–989, Sep. 2001.
- [128] S. Goel, D. G. Duda, L. Xu, L. L. Munn, Y. Boucher, D. Fukumura, and R. K. Jain, “Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases,” *Physiological Reviews*, vol. 91, no. 3, pp. 1071–1121, Jul. 2011.
- [129] P. V. Dickson, J. B. Hamner, T. L. Sims, C. H. Fraga, C. Y. Ng, S. Rajasekeran, N. L. Hagedorn, M. B. McCarville, C. F. Stewart, and A. M. Davidoff, “Bevacizumab-Induced Transient Remodeling of the Vasculature in Neuroblastoma Xenografts Results in Improved Delivery and Efficacy of Systemically Administered Chemotherapy,” *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 13, pp. 3942–3950, Jul. 2007.
- [130] M. Dobosz, V. Ntziachristos, W. Scheuer, and S. Strobel, “Multispectral Fluorescence Ultramicroscopy : Three-Dimensional Visualization and Automatic Quantification of Tumor Morphology, Drug Penetration, and Antiangiogenic Treatment Response,” *Neoplasia (New York, N.Y.)*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2014.
- [131] Y. Huang, J. Yuan, E. Righi, W. S. Kamoun, M. Ancukiewicz, J. Nezivar, M. Santosuosso, J. D. Martin, M. R. Martin, F. Vianello, P. Leblanc, L. L. Munn, P. Huang, D. G. Duda, D. Fukumura, R. K. Jain, and M. C. Poznansky, “Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 43, pp. 17 561–17 566, Oct. 2012.
- [132] S. N. Rylova, E. Barnucz, M. Fani, F. Braun, M. Werner, S. Lassmann, H. R. Maecke, and W. A. Weber, “Does Imaging alpha v beta 3 Integrin Expression with PET Detect Changes in Angiogenesis During Bevacizumab Therapy ?” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 55, no. 11, pp. 1878–1884, Nov. 2014.
- [133] R. T. Tong, “Vascular Normalization by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Blockade Induces a Pressure Gradient Across the Vasculature and Improves Drug Penetration in Tumors,” *Cancer Research*, vol. 64, no. 11, pp. 3731–3736, Jun. 2004.
- [134] T. Inai, M. Mancuso, H. Hashizume, F. Baffert, A. Haskell, P. Baluk, D. D. Hu-Lowe, D. R. Shalinsky, G. Thurston, G. D. Yancopoulos, and D. M. McDonald, “Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts,” *The American journal of pathology*, vol. 165, no. 1, pp. 35–52, Jul. 2004.
- [135] F. Peng, Z. Xu, J. Wang, Y. Chen, Q. Li, Y. Zuo, J. Chen, X. Hu, Q. Zhou, Y. Wang, H. Ma, Y. Bao, and M. Chen, “Recombinant Human Endostatin Normalizes Tumor Vasculature and Enhances Radiation Response in Xenografted Human Nasopharyngeal Carcinoma Models,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, p. e34646, Apr. 2012.
- [136] C. Vangestel, C. Van de Wiele, N. Van Damme, S. Staelens, P. Pauwels, C. P. M. Reutelingsperger, and M. Peeters, “(99mTc-(CO)(3) His-annexin A5 micro-SPECT demonstrates increased cell death by irinotecan during the vascular normalization window caused by bevacizumab,” *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, vol. 52, no. 11, pp. 1786–1794, Nov. 2011.

-
- [137] C. G. Willett, D. G. Duda, E. d. Tomaso, Y. Boucher, M. Ancukiewicz, D. V. Sahani, J. Lahdenranta, D. C. Chung, A. J. Fischman, G. Y. Lauwers, P. Shellito, B. G. Czito, T. Z. Wong, E. Paulson, M. Poleski, Z. Vujaskovic, R. Bentley, H. X. Chen, J. W. Clark, and R. K. Jain, "Efficacy, Safety, and Biomarkers of Neoadjuvant Bevacizumab, Radiation Therapy, and Fluorouracil in Rectal Cancer : A Multidisciplinary Phase II Study," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 18, pp. 3020–3026, Jun. 2009.
- [138] C. G. Willett, Y. Boucher, D. G. Duda, E. d. Tomaso, L. L. Munn, R. T. Tong, S. V. Kozin, L. Petit, R. K. Jain, D. C. Chung, D. V. Sahani, S. P. Kalva, K. S. Cohen, D. T. Scadden, A. J. Fischman, J. W. Clark, D. P. Ryan, A. X. Zhu, L. S. Blazzkowsky, P. C. Shellito, M. Mino-Kenudson, and G. Y. Lauwers, "Surrogate Markers for Antiangiogenic Therapy and Dose-Limiting Toxicities for Bevacizumab With Radiation and Chemotherapy : Continued Experience of a Phase I Trial in Rectal Cancer Patients," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 31, pp. 8136–8139, Nov. 2005.
- [139] C. G. Willett, Y. Boucher, E. di Tomaso, D. G. Duda, L. L. Munn, R. T. Tong, D. C. Chung, D. V. Sahani, S. P. Kalva, S. V. Kozin, M. Mino, K. S. Cohen, D. T. Scadden, A. C. Hartford, A. J. Fischman, J. W. Clark, D. P. Ryan, A. X. Zhu, L. S. Blazzkowsky, H. X. Chen, P. C. Shellito, G. Y. Lauwers, and R. K. Jain, "Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer," *Nature medicine*, vol. 10, no. 2, pp. 145–147, Feb. 2004.
- [140] A. L. Myers, R. F. Williams, C. Y. Ng, J. E. Hartwich, and A. M. Davidoff, "Bevacizumab-induced tumor vessel remodeling in rhabdomyosarcoma xenografts increases the effectiveness of adjuvant ionizing radiation," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 45, no. 6, pp. 1080–1085, Jun. 2010.
- [141] M. C. McGee, J. B. Hamner, R. F. Williams, S. F. Rosati, T. L. Sims, C. Y. Ng, M. W. Gaber, C. Calabrese, J. Wu, A. C. Nathwani, C. Duntsch, T. E. Merchant, and A. M. Davidoff, "Improved Intratumoral Oxygenation Through Vascular Normalization Increases Glioma Sensitivity to Ionizing Radiation," *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, vol. 76, no. 5, pp. 1537–1545, Apr. 2010.
- [142] S. Matsumoto, K. Saito, Y. Takakusagi, M. Matsuo, J. P. Munasinghe, H. D. Morris, M. J. Lizak, H. Merkle, K. Yasukawa, N. Devasahayam, S. Suburamanian, J. B. Mitchell, and M. C. Krishna, "In vivo imaging of tumor physiological, metabolic and redox changes in response to the anti-angiogenic agent sunitinib : Longitudinal assessment to identify the transient vascular re-normalization," *Antioxidants & Redox Signaling*, p. 140305115604006, Mar. 2014.
- [143] L. Heijmen, E. G. W. ter Voert, C. J. A. Punt, A. Heerschap, W. J. G. Oyen, J. Bussink, C. G. J. Sweep, P. Laverman, P. N. Span, L. F. de Geus-Oei, O. C. Boerman, and H. W. M. van Laarhoven, "Monitoring hypoxia and vasculature during bevacizumab treatment in a murine colorectal cancer model," *Contrast Media & Molecular Imaging*, vol. 9, no. 3, pp. 237–245, May 2014.
- [144] F. Fack, H. Espedal, O. Keunen, A. Golebiewska, N. Obad, P. N. Harter, M. Mittelbronn, O. Bahr, A. Weyerbrock, L. Stuhr, H. Miletic, P. O. Sakariassen, D. Stieber, C. B. Rygh, M. Lund-Johansen, L. Zheng, E. Gottlieb, S. P. Niclou, and R. Bjerkvig, "Bevacizumab treatment induces metabolic adaptation toward anaerobic metabolism in glioblastomas," *Acta Neuropathologica*, Oct. 2014.
- [145] M. Pàez-Ribes, E. Allen, J. Hudock, T. Takeda, H. Okuyama, F. Viñals, M. Inoue, G. Bergers, D. Hanahan, and O. Casanovas, "Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progress-

- sion of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis,” *Cancer Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 220–231, Mar. 2009.
- [146] M. Arjaans, T. H. Oude Munnink, S. F. Oosting, A. G. T. Terwisscha van Scheltinga, J. A. Gietema, E. T. Garbacik, H. Timmer-Bosscha, M. N. Lub-de Hooge, C. P. Schroder, and E. G. E. de Vries, “Bevacizumab-Induced Normalization of Blood Vessels in Tumors Hampers Antibody Uptake,” *Cancer Research*, vol. 73, no. 11, pp. 3347–3355, Apr. 2013.
- [147] H. Wildiers, G. Guetens, G. De Boeck, E. Verbeken, B. Landuyt, W. Landuyt, E. A. de Bruijn, and A. T. van Oosterom, “Effect of anti-vascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11,” *British Journal of Cancer*, vol. 88, no. 12, pp. 1979–1986, 2003.
- [148] A. Rapisarda and G. Melillo, “Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies,” *Drug Resistance Updates*, vol. 12, no. 3, pp. 74–80, Jun. 2009.
- [149] S. Azzi, J. K. Hebda, and J. GAVARD, “Vascular permeability and drug delivery in cancers,” *Pharmacology of Anti-Cancer Drugs*, vol. 3, p. 211, 2013.
- [150] A. Ruddell, A. Croft, K. Kelly-Spratt, M. Furuya, and C. J. Kemp, “Tumors induce coordinate growth of artery, vein, and lymphatic vessel triads,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 354, May 2014.
- [151] R. Grepin, M. Guyot, M. Jacquin, J. Durivault, E. Chamorey, A. Sudaka, C. Serdjebi, B. Lacarelle, J.-Y. Scoazec, S. Negrier, H. Simonnet, and G. Pages, “Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment : the role of CXCL cytokines,” *Oncogene*, vol. 31, no. 13, pp. 1683–1694, Mar. 2012.
- [152] M. Bahramsoltani, J. Plendl, P. Janczyk, P. Custodis, and S. Kaessmeyer, “Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in vivo, ex vivo and in vitro - an overview,” *ALTEX*, vol. 26, no. 2, pp. 95–107, 2009.
- [153] O. Coutelle, L. M. Schiffmann, M. Liwschitz, M. Brunold, V. Goede, M. Hallek, H. Kashkar, and U. T. Hacker, “Dual targeting of Angiopoietin-2 and VEGF potentiates effective vascular normalisation without inducing empty basement membrane sleeves in xenograft tumours,” *British Journal of Cancer*, vol. 112, no. 3, pp. 495–503, Feb. 2015.
- [154] M. R. Mancuso, R. Davis, S. M. Norberg, S. O’Brien, B. Sennino, T. Nakahara, V. J. Yao, T. Inai, P. Brooks, B. Freemark, D. R. Shalinsky, D. D. Hu-Lowe, and D. M. McDonald, “Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 10, pp. 2610–2621, Oct. 2006.
- [155] L. Goldwirt, K. Beccaria, A. Carpentier, A. Idhah, C. Schmitt, C. Levasseur, M. Labussiere, A. Milane, R. Farinotti, and C. Fernandez, “Preclinical impact of bevacizumab on brain and tumor distribution of irinotecan and temozolomide,” *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 122, no. 2, pp. 273–281, Jan. 2015.
- [156] R. S. Heist, D. G. Duda, D. V. Sahani, M. Ancukiewicz, P. Fidias, L. V. Sequist, J. S. Temel, A. T. Shaw, N. A. Pennell, J. W. Neal, L. Gandhi, T. J. Lynch, J. A. Engelman, and R. K. Jain, “Improved tumor vascularization after anti-VEGF therapy with carboplatin and nab-paclitaxel associates with survival in lung cancer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 5, pp. 1547–1552, Feb. 2015.
- [157] S. B. Wedam, J. A. Low, S. X. Yang, C. K. Chow, P. Choyke, D. Danforth, S. M. Hewitt, A. Berman, S. M. Steinberg, D. J. Liewehr, J. Plehn, A. Doshi, D. Thomasson, N. McCarthy, H. Koeppen, M. Sherman, J. Zujewski, K. Camphausen, H. Chen, and S. M. Swain, “Antiangiogenic and Antitumor Effects of Bevacizumab in Patients With Inflammatory

-
- and Locally Advanced Breast Cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 5, pp. 769–777, Feb. 2006.
- [158] B.-B. Chen, Y.-S. Lu, C.-H. Lin, W.-W. Chen, P.-F. Wu, C.-Y. Hsu, C.-W. Yu, S.-Y. Wei, A.-L. Cheng, and T. T.-F. Shih, “A pilot study to determine the timing and effect of bevacizumab on vascular normalization of metastatic brain tumors in breast cancer,” *BMC cancer*, vol. 16, p. 466, 2016.
- [159] D.-R. Chen, C. Lin, and Y.-F. Wang, “Window of opportunity : A new insight into sequential bevacizumab and paclitaxel in two cases of metastatic triple-negative breast cancer,” *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 10, no. 3, pp. 885–888, Sep. 2015.
- [160] J. R. Hecht, E. Mitchell, T. Chidiac, C. Scroggin, C. Hagenstad, D. Spigel, J. Marshall, A. Cohn, D. McCollum, P. Stella, R. Deeter, S. Shahin, and R. G. Amado, “A Randomized Phase IIIB Trial of Chemotherapy, Bevacizumab, and Panitumumab Compared With Chemotherapy and Bevacizumab Alone for Metastatic Colorectal Cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 5, pp. 672–680, Feb. 2009.
- [161] J. Tol, M. Koopman, A. Cats, C. J. Rodenburg, G. J. Creemers, J. G. Schrama, F. L. Erdkamp, A. H. Vos, C. J. van Groenigen, H. A. Sinnige, D. J. Richel, E. E. Voest, J. R. Dijkstra, M. E. Vink-Borger, N. F. Antonini, L. Mol, J. H. van Krieken, O. Dalesio, and C. J. Punt, “Chemotherapy, Bevacizumab, and Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 6, pp. 563–572, Feb. 2009.
- [162] A. T. Falk, J. Barrière, E. François, and P. Follana, “Bevacizumab : A dose review,” *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, vol. 94, no. 3, pp. 311–322, Jun. 2015.
- [163] G. Bergers and D. Hanahan, “Modes of resistance to anti-angiogenic therapy,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 592–603, Aug. 2008.
- [164] S. Loges, T. Schmidt, and P. Carmeliet, “Mechanisms of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Development of Third-Generation Anti-Angiogenic Drug Candidates,” *Genes & Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 12–25, Jan. 2010.
- [165] F. Piludu, S. Marzi, A. Pace, V. Villani, A. Fabi, C. M. Carapella, I. Terrenato, A. Antenucci, and A. Vidiri, “Early biomarkers from dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging to predict the response to antiangiogenic therapy in high-grade gliomas,” *Neuroradiology*, vol. 57, no. 12, pp. 1269–1280, Sep. 2015.
- [166] N. Lassau, B. Coiffier, M. Kind, V. Vilgrain, J. Lacroix, M. Cuinet, S. Taieb, R. Aziza, A. Sarran, C. Labbe-Devilliers, B. Gallix, O. Lucidarme, Y. Ptak, L. Rocher, L. M. Caquot, S. Chagnon, D. Marion, A. Luciani, S. Feutray, J. Uzan-Augui, B. Benatsou, J. Bonastre, and S. Koscielny, “Selection of an early biomarker for vascular normalization using dynamic contrast-enhanced ultrasonography to predict outcomes of metastatic patients treated with bevacizumab,” *Annals of Oncology*, p. mdw280, Aug. 2016.
- [167] A. G. Sorensen, T. T. Batchelor, W.-T. Zhang, P.-J. Chen, P. Yeo, M. Wang, D. Jennings, P. Y. Wen, J. Lahdenranta, M. Ancukiewicz, E. d. Tomaso, D. G. Duda, and R. K. Jain, “A “Vascular Normalization Index” as Potential Mechanistic Biomarker to Predict Survival after a Single Dose of Cediranib in Recurrent Glioblastoma Patients,” *Cancer Research*, vol. 69, no. 13, pp. 5296–5300, Jul. 2009.
- [168] J.-V. Gaustad, T. G. Simonsen, R. Smistad, C. S. Wegner, L. M. K. Andersen, and E. K. Rofstad, “Early effects of low dose bevacizumab treatment assessed by magnetic resonance imaging,” *BMC cancer*, vol. 15, p. 900, 2015.

- [169] D. G. Duda, "Molecular Biomarkers of Response to Antiangiogenic Therapy for Cancer," *ISRN cell biology*, vol. 2012, 2012.
- [170] D. Lambrechts, H.-J. Lenz, S. de Haas, P. Carmeliet, and S. J. Scherer, "Markers of Response for the Antiangiogenic Agent Bevacizumab," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31, no. 9, pp. 1219–1230, Feb. 2013.
- [171] J. R. van Beijnum, P. Nowak-Sliwinska, E. J. M. Huijbers, V. L. Thijssen, and A. W. Griffioen, "The Great Escape; the Hallmarks of Resistance to Antiangiogenic Therapy," *Pharmacological Reviews*, vol. 67, no. 2, pp. 441–461, Mar. 2015.
- [172] D. G. Duda, C. G. Willett, M. Ancukiewicz, E. d. Tomaso, M. Shah, B. G. Czito, R. Bentley, M. Poleski, G. Y. Lauwers, M. Carroll, D. Tyler, C. Mantyh, P. Shellito, J. W. Clark, and R. K. Jain, "Plasma Soluble VEGFR-1 Is a Potential Dual Biomarker of Response and Toxicity for Bevacizumab with Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer," *The Oncologist*, vol. 15, no. 6, pp. 577–583, Jun. 2010.
- [173] J. N. Bottsford-Miller, R. L. Coleman, and A. K. Sood, "Resistance and Escape From Antiangiogenesis Therapy : Clinical Implications and Future Strategies," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 32, pp. 4026–4034, Nov. 2012.
- [174] H. Hayashi, T. Arao, K. Matsumoto, H. Kimura, Y. Togashi, Y. Hirashima, Y. Horita, S. Iwasa, N. T. Okita, Y. Honma, A. Takashima, K. Kato, T. Hamaguchi, Y. Shimada, K. Nakagawa, K. Nishio, and Y. Yamada, "Biomarkers of reactive resistance and early disease progression during chemotherapy plus bevacizumab treatment for colorectal carcinoma," *Oncotarget*, vol. 5, no. 9, pp. 2588–2595, Mar. 2014.
- [175] Q. G. D'Alessandris, M. Martini, T. Cenci, G. Capo, L. Ricci-Vitiani, L. M. Larocca, and R. Pallini, "VEGF isoforms as outcome biomarker for anti-angiogenic therapy in recurrent glioblastoma," *Neurology*, vol. 84, no. 18, pp. 1906–1908, May 2015.
- [176] D. O. Bates, P. J. Catalano, K. E. Symonds, A. H. Varey, P. Ramani, P. J. O'Dwyer, B. J. Giantonio, N. J. Meropol, A. B. Benson, and S. J. Harper, "Association between VEGF splice isoforms and progression free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 18, no. 22, pp. 6384–6391, Nov. 2012. [Online]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3602975/>
- [177] E. Tabouret, F. Boudouresque, P. Farina, M. Barrié, C. Bequet, M. Sanson, and O. Chinot, "MMP2 and MMP9 as candidate biomarkers to monitor bevacizumab therapy in high-grade glioma," *Neuro-Oncology*, vol. 17, no. 8, pp. 1174–1176, Aug. 2015.
- [178] D. Ribatti and D. Ribatti, "Tumor refractoriness to anti-VEGF therapy," *Oncotarget*, vol. 7, no. 29, pp. 46 668–46 677, Apr. 2016.
- [179] J. M. L. Ebos, C. R. Lee, W. Cruz-Munoz, G. A. Bjarnason, J. G. Christensen, and R. S. Kerbel, "Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis," *Cancer Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 232–239, Mar. 2009.
- [180] Z. S. Silva, S. K. Bussadori, K. P. S. Fernandes, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, "Animal models for photodynamic therapy (PDT)," *Bioscience Reports*, vol. 35, no. 6, p. e00265, Dec. 2015.
- [181] S. S. Lucky, K. C. Soo, and Y. Zhang, "Nanoparticles in Photodynamic Therapy," *Chemical Reviews*, vol. 115, no. 4, pp. 1990–2042, Feb. 2015.
- [182] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis,

-
- J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, "PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER : AN UPDATE," *CA : a cancer journal for clinicians*, vol. 61, no. 4, pp. 250–281, 2011.
- [183] M. Broekgaarden, R. Weijer, T. M. van Gulik, M. R. Hamblin, and M. Heger, "Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy : a molecular basis for pharmacological inhibition strategies," *Cancer Metastasis Reviews*, vol. 34, no. 4, pp. 643–690, Dec. 2015.
- [184] D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "TIMELINE : Photodynamic therapy for cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380–387, May 2003.
- [185] R. Bhuvaneswari, Y. Y. Gan, S. S. Lucky, W. W. L. Chin, S. M. Ali, K. C. Soo, and M. Olivo, "Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy," *Molecular Cancer*, vol. 7, p. 56, 2008.
- [186] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy : part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, no. 1, pp. 1–23, Mar. 2005.
- [187] V. Rapozzi, E. Della Pietra, and B. Bonavida, "Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy," *Redox Biology*, vol. 6, pp. 311–317, Dec. 2015.
- [188] B. J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J. C. Vera, T. S. Mang, A. B. Foy, S. M. Lew, A. W. Girotti, S. Jogal, P. S. LaViolette, J. M. Connelly, and H. T. Whelan, "Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors – Where do we stand?" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 12, no. 3, pp. 530–544, Sep. 2015.
- [189] A. W. Girotti, "Tumor-generated nitric oxide as an antagonist of photodynamic therapy," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 14, no. 8, pp. 1425–1432, Jul. 2015.
- [190] A. P. Castano, P. Mroz, and M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy and anti-tumour immunity," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 7, pp. 535–545, Jul. 2006.
- [191] R. Bhuvaneswari, Y. Y. Gan, K. C. Soo, and M. Olivo, "The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 14, pp. 2275–2283, Jul. 2009.
- [192] F. Li, Y. Cheng, J. Lu, R. Hu, Q. Wan, and H. Feng, "Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice : A dependence on the activities of T cells and complement C3," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 112, no. 10, pp. 3035–3043, Oct. 2011.
- [193] M. Korbelik, G. Kros, J. Kros, and G. J. Dougherty, "The Role of Host Lymphoid Populations in the Response of Mouse EMT6 Tumor to Photodynamic Therapy," *Cancer Research*, vol. 56, no. 24, pp. 5647–5652, Dec. 1996.
- [194] C. J. Gomer, A. Ferrario, M. Luna, N. Rucker, and S. Wong, "Photodynamic therapy : Combined modality approaches targeting the tumor microenvironment," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 38, no. 5, pp. 516–521, Jun. 2006.
- [195] F. Jiang, X. Zhang, S. N. Kalkanis, Z. Zhang, H. Yang, M. Katakowski, X. Hong, X. Zheng, Z. Zhu, and M. Chopp, "Combination Therapy with Antiangiogenic Treatment and Photodynamic Therapy for the Nude Mouse Bearing U87 Glioblastoma," *Photochemistry and photobiology*, vol. 84, no. 1, pp. 128–137, 2008.
- [196] R. Bhuvaneswari, G. Y. Yuen, S. K. Chee, and M. Olivo, "Hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with Avastin (bevacizumab) improves tumor response by downregulating angiogenic proteins," *Photochemical & Photobiological Sciences : Official*

Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, vol. 6, no. 12, pp. 1275–1283, Dec. 2007.

- [197] R. Bhuvaneswari, P. S. P. Thong, Y.-Y. Gan, K.-C. Soo, K. Soo, and M. Olivo, “Evaluation of hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with angiogenesis inhibitor bevacizumab using in vivo fluorescence confocal endomicroscopy,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 1, p. 011114, Feb. 2010.
- [198] D. A. Tzerkovsky, V. V. Osharin, Y. P. Istomin, E. N. Alexandrova, and M. A. Vozmitel, “Fluorescent diagnosis and photodynamic therapy for C6 glioma in combination with antiangiogenic therapy in subcutaneous and intracranial tumor models,” *Experimental Oncology*, vol. 36, no. 2, pp. 85–89, Jun. 2014.
- [199] A. Ferrario, K. F. v. Tiehl, N. Rucker, M. A. Schwarz, P. S. Gill, and C. J. Gomer, “Anti-angiogenic Treatment Enhances Photodynamic Therapy Responsiveness in a Mouse Mammary Carcinoma,” *Cancer Research*, vol. 60, no. 15, pp. 4066–4069, Aug. 2000.
- [200] A. Ferrario, C. F. Chantrain, K. v. Tiehl, S. Buckley, N. Rucker, D. R. Shalinsky, H. Shimada, Y. A. DeClerck, and C. J. Gomer, “The Matrix Metalloproteinase Inhibitor Prinomastat Enhances Photodynamic Therapy Responsiveness in a Mouse Tumor Model,” *Cancer Research*, vol. 64, no. 7, pp. 2328–2332, Apr. 2004.
- [201] A. Weiss, J. R. van Beijnum, D. Bonvin, P. Jichlinski, P. J. Dyson, A. W. Griffioen, and P. Nowak-Sliwinska, “Low-dose angiostatic tyrosine kinase inhibitors improve photodynamic therapy for cancer : lack of vascular normalization,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, pp. n/a–n/a, 2014.
- [202] N. F. Gamaleia, I. A. Lisnyak, E. D. Shishko, A. A. Mamchur, I. V. Prokopenko, and V. V. Kholin, “Chronobiological approaches to antiangiogenic photodynamic therapy of tumors : the first experimental evaluation,” *Experimental Oncology*, vol. 34, no. 4, pp. 364–366, Dec. 2012.
- [203] A. Weiss, D. Bonvin, R. H. Berndsen, E. Scherrer, T. J. Wong, P. J. Dyson, A. W. Griffioen, and P. Nowak-Sliwinska, “Angiostatic treatment prior to chemo- or photodynamic therapy improves anti-tumor efficacy,” *Scientific Reports*, vol. 5, Mar. 2015.
- [204] J. Mriouah, C. Boura, M. Thomassin, T. Bastogne, D. Dumas, B. Faivre, and M. Barberi-Heyob, “Tumor vascular responses to antivascular and antiangiogenic strategies : looking for suitable models,” *Trends in Biotechnology*, vol. 30, no. 12, pp. 649–658, Dec. 2012.
- [205] C. A. Staton, M. W. R. Reed, and N. J. Brown, “A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays,” *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 90, no. 3, pp. 195–221, Jun. 2009.
- [206] A. Uemura, S. Kusuhara, H. Katsuta, and S. Nishikawa, “Angiogenesis in the mouse retina : A model system for experimental manipulation,” *Experimental Cell Research*, vol. 312, no. 5, pp. 676–683, Mar. 2006.
- [207] D. Ribatti, “The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis,” *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, vol. 49, no. 2, pp. 131–135, 2008.
- [208] G. Dranoff, “Experimental mouse tumour models : what can be learnt about human cancer immunology?” *Nature Reviews Immunology*, Dec. 2011.
- [209] L. Eklund, M. Bry, and K. Alitalo, “Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer,” *Molecular Oncology*, vol. 7, no. 2, pp. 259–282, Apr. 2013.

-
- [210] S. I. J. Ellenbroek and J. van Rheeën, “Imaging hallmarks of cancer in living mice,” *Nature Reviews. Cancer*, vol. 14, no. 6, pp. 406–418, Jun. 2014.
- [211] K. El Alaoui-Lasmali, E.-H. Djermoune, J.-B. Tylcz, D. Meng, F. Plénat, N. Thomas, and B. Faivre, “A new algorithm for a better characterization and timing of the anti-VEGF vascular effect named “normalization”,” *Angiogenesis*, pp. 1–14, 2016.
- [212] J. B. Tylcz, K. El Alaoui-Lasmali, E. H. Djermoune, N. Thomas, B. Faivre, and T. Bastogne, “Data-driven modeling and characterization of anti-angiogenic molecule effects on tumoral vascular density,” *Biomedical Signal Processing and Control*, vol. 20, pp. 52–60, Jul. 2015.
- [213] P. Babilas, V. Schacht, G. Liebsch, O. S. Wolfbeis, M. Landthaler, R.-M. Szeimies, and C. Abels, “Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo,” *British Journal of Cancer*, vol. 88, no. 9, pp. 1462–1469, 2003.
- [214] J. Ehling, B. Theek, F. Gremse, S. Baetke, D. Mockel, J. Maynard, S.-A. Ricketts, H. Grill, M. Neeman, R. Knuechel, W. Lederle, F. Kiessling, and T. Lammers, “Micro-CT Imaging of Tumor Angiogenesis : Quantitative Measures Describing Micromorphology and Vascularization,” *The American journal of pathology*, vol. 184, no. 2, pp. 431–441, Feb. 2014.
- [215] P. Oses, M.-A. Renault, R. Chauvel, L. Leroux, C. Allières, B. Séguy, J.-M. D. Lamazière, P. Dufourcq, T. Couffinhal, and C. Duplâa, “Mapping 3-dimensional neovessel organization steps using micro-computed tomography in a murine model of hindlimb ischemia-brief report,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 29, no. 12, pp. 2090–2092, Dec. 2009.
- [216] W. Cai, K. Chen, Z.-B. Li, S. S. Gambhir, and X. Chen, “Dual-Function Probe for PET and Near-Infrared Fluorescence Imaging of Tumor Vasculature,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 48, no. 11, pp. 1862–1870, Nov. 2007.
- [217] W. J. M. Mulder, G. J. Strijkers, K. Nicolay, and A. W. Griffioen, “Quantum dots for multimodal molecular imaging of angiogenesis,” *Angiogenesis*, vol. 13, no. 2, pp. 131–134, Jun. 2010.
- [218] M. Oostendorp, K. Douma, T. M. Hackeng, A. Dirksen, M. J. Post, M. A. M. J. v. Zandvoort, and W. H. Backes, “Quantitative Molecular Magnetic Resonance Imaging of Tumor Angiogenesis Using cNGR-Labeled Paramagnetic Quantum Dots,” *Cancer Research*, vol. 68, no. 18, pp. 7676–7683, Sep. 2008.
- [219] J. M. Price, S. P. Robinson, and D. M. Koh, “Imaging hypoxia in tumours with advanced MRI,” *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of Radiopharmaceutical Chemistry and Biology*, vol. 57, no. 3, pp. 257–270, Sep. 2013.
- [220] G. E. R. Weller, M. K. K. Wong, R. A. Modzelewski, E. Lu, A. L. Klivanov, W. R. Wagner, and F. S. Villanueva, “Ultrasonic Imaging of Tumor Angiogenesis Using Contrast Microbubbles Targeted via the Tumor-Binding Peptide Arginine-Arginine-Leucine,” *Cancer Research*, vol. 65, no. 2, pp. 533–539, Jan. 2005.
- [221] N. Lassau, M. Chebil, L. Chami, S. Bidault, E. Girard, and A. Roche, “Dynamic contrast-enhanced ultrasonography (DCE-US) : a new tool for the early evaluation of antiangiogenic treatment,” *Targeted Oncology*, vol. 5, no. 1, pp. 53–58, Mar. 2010.

- [222] G. D. De Palma, F. Maione, D. Esposito, G. Luglio, M. C. Giglio, S. Siciliano, N. Gennarelli, G. Cassese, S. Campione, F. P. D'Armiento, and L. Bucci, "In vivo assessment of tumour angiogenesis in colorectal cancer : the role of confocal laser endomicroscopy," *Colorectal Disease*, vol. 18, no. 2, pp. O66–O73, Feb. 2016.
- [223] A.-C. Lesart, B. van der Sanden, L. Hamard, F. Estève, and A. Stéphanou, "On the importance of the submicrovascular network in a computational model of tumour growth," *Microvascular Research*, vol. 84, no. 2, pp. 188–204, Sep. 2012.
- [224] J. Xu, G. Vilanova, and H. Gomez, "A Mathematical Model Coupling Tumor Growth and Angiogenesis," *PLOS ONE*, vol. 11, no. 2, p. e0149422, 2016.
- [225] A. Stéphanou, S. Le Floch, and A. Chauvière, "A Hybrid Model to Test the Importance of Mechanical Cues Driving Cell Migration in Angiogenesis," *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, vol. 10, no. 1, pp. 142–166, 2015.
- [226] M. Welter and H. Rieger, "Physical determinants of vascular network remodeling during tumor growth," *The European Physical Journal E*, vol. 33, no. 2, pp. 149–163, Jul. 2010.
- [227] J. W. Baish and R. K. Jain, "Cancer, angiogenesis and fractals," *Nature Medicine*, vol. 4, no. 9, pp. 984–984, Sep. 1998.
- [228] F. Grizzi, C. Russo, P. Colombo, B. Franceschini, E. E. Frezza, E. Cobos, and M. Chiriva-Internati, "Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity : the surface fractal dimension," *BMC Cancer*, vol. 5, p. 14, Feb. 2005.
- [229] O. Heymans, J. Fissette, P. Vico, S. Blacher, D. Masset, and F. Brouers, "Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences?" *Medical Hypotheses*, vol. 54, no. 3, pp. 360–366, Mar. 2000.
- [230] L. Ichim and R. Dobrescu, "Characterization of Tumor Angiogenesis Using Fractal Measures." IEEE, May 2013, pp. 345–349.
- [231] C. Faivre, D. Barbolosi, E. Pasquier, and N. André, "A mathematical model for the administration of temozolomide : comparative analysis of conventional and metronomic chemotherapy regimens," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 71, no. 4, pp. 1013–1019, Apr. 2013.
- [232] X. Elharrar, D. Barbolosi, J. Ciccolini, C. Meille, C. Faivre, B. Lacarelle, N. André, and F. Barlesi, "A phase Ia/Ib clinical trial of metronomic chemotherapy based on a mathematical model of oral vinorelbine in metastatic non-small cell lung cancer and malignant pleural mesothelioma : rationale and study protocol," *BMC cancer*, vol. 16, p. 278, Apr. 2016.
- [233] K. D. Argyri, D. D. Dionysiou, F. D. Misichroni, and G. S. Stamatakis, "Numerical simulation of vascular tumour growth under antiangiogenic treatment : addressing the paradigm of single-agent bevacizumab therapy with the use of experimental data," *Biology Direct*, vol. 11, p. 12, 2016.
- [234] M. Rocchetti, M. Germani, F. D. Bene, I. Poggesi, P. Magni, E. Pesenti, and G. D. Nicolao, "Predictive pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling of tumor growth after administration of an anti-angiogenic agent, bevacizumab, as single-agent and combination therapy in tumor xenografts," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 71, no. 5, pp. 1147–1157, Feb. 2013.
- [235] J. Sápi, L. Kovács, D. A. Drexler, P. Kocsis, D. Gajári, and Z. Sápi, "Tumor Volume Estimation and Quasi-Continuous Administration for Most Effective Bevacizumab Therapy," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 11, p. e0142190, Nov. 2015.

-
- [236] A. Ergun, K. Camphausen, and L. M. Wein, "Optimal scheduling of radiotherapy and angiogenic inhibitors," *Bulletin of Mathematical Biology*, vol. 65, no. 3, pp. 407–424, May 2003.
- [237] U. Ledzewicz and H. Schättler, "AntiAngiogenic Therapy in Cancer Treatment as an Optimal Control Problem," *SIAM Journal on Control and Optimization*, vol. 46, no. 3, pp. 1052–1079, Jan. 2007.
- [238] S. Wilson, M. Tod, A. Ouerdani, A. Emde, Y. Yarden, A. Adda Berkane, S. Kassour, M. Wei, G. Freyer, B. You, E. Grenier, and B. Ribba, "Modeling and predicting optimal treatment scheduling between the antiangiogenic drug sunitinib and irinotecan in preclinical settings," *CPT : Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, vol. 4, no. 12, pp. 720–727, Dec. 2015.
- [239] S. Das and P. A. Marsden, "Angiogenesis in Glioblastoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 369, no. 16, pp. 1561–1563, Oct. 2013.
- [240] O. Keunen, M. Johansson, A. Oudin, M. Sanzey, S. A. A. Rahim, F. Fack, F. Thorsen, T. Taxt, M. Bartos, R. Jirik, H. Miletic, J. Wang, D. Stieber, L. Stuhr, I. Moen, C. B. Rygh, R. Bjerkvig, and S. P. Niclou, "Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 9, pp. 3749–3754, Feb. 2011.
- [241] D. Fukumura, D. G. Duda, L. L. Munn, and R. K. Jain, "Tumor Microvasculature and Microenvironment : Novel Insights Through Intravital Imaging in Pre-Clinical Models," *Microcirculation*, vol. 17, no. 3, pp. 206–225, Apr. 2010. [Online]. Available : <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1549-8719.2010.00029.x>
- [242] J. Schindelin, C. T. Rueden, M. C. Hiner, and K. W. Eliceiri, "The ImageJ ecosystem : An open platform for biomedical image analysis," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 82, no. 7-8, pp. 518–529, Aug. 2015.
- [243] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, "Fiji : an open-source platform for biological-image analysis," *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012.
- [244] M. Uhlén, L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A.-K. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Pontén, "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome," *Science (New York, N. Y.)*, vol. 347, no. 6220, p. 1260419, Jan. 2015.
- [245] L. Tirand, T. Bastogne, D. Bechet, M. Linder, N. Thomas, C. Frochot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Response surface methodology : an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions," *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, vol. 75, no. 1, pp. 244–252, Sep. 2009.
- [246] N. Wang, Z.-Y. Wang, S.-L. Mo, T. Y. Loo, D.-M. Wang, H.-B. Luo, D.-P. Yang, Y.-L. Chen, J.-G. Shen, and J.-P. Chen, "Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 134, no. 3, pp. 943–955, Feb. 2012.

- [247] H. Koide, T. Asai, K. Furuya, T. Tsuzuku, H. Kato, T. Dewa, M. Nango, N. Maeda, and N. Oku, "Inhibition of Akt (ser473) phosphorylation and rapamycin-resistant cell growth by knockdown of mammalian target of rapamycin with small interfering RNA in vascular endothelial growth factor receptor-1-targeting vector," *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 34, no. 5, pp. 602–608, 2011.
- [248] I. Geudens and H. Gerhardt, "Coordinating cell behaviour during blood vessel formation," *Development*, vol. 138, no. 21, pp. 4569–4583, Nov. 2011.
- [249] V. Gebala, R. Collins, I. Geudens, L.-K. Phng, and H. Gerhardt, "Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo," *Nature Cell Biology*, vol. 18, no. 4, pp. 443–450, Apr. 2016.
- [250] S. Kippenberger, M. Meissner, R. Kaufmann, I. Hrgovic, N. Zöllner, and J. Kleemann, "Tumor Neoangiogenesis and Flow Congestion : A Parallel to the Braess Paradox ?" *Circulation Research*, vol. 119, no. 6, pp. 711–713, Sep. 2016.
- [251] M. Lee, J.-Y. Choi, J. S. Lim, M.-S. Park, M.-J. Kim, and H. Kim, "Lack of anti-tumor activity by anti-VEGF treatments in hepatic hemangiomas," *Angiogenesis*, vol. 19, no. 2, pp. 147–153, Jan. 2016.
- [252] I. Fischer, C. H. Cunliffe, R. J. Bollo, S. Raza, D. Monoky, L. Chiriboga, E. C. Parker, J. G. Golfinos, P. J. Kelly, E. A. Knopp, M. L. Gruber, D. Zagzag, and A. Narayana, "High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin : initial observations," *Neuro-oncology*, vol. 10, no. 5, pp. 700–708, Oct. 2008.
- [253] N. A. Dallas, S. Samuel, L. Xia, F. Fan, M. J. Gray, S. J. Lim, and L. M. Ellis, "Endoglin (CD105) : A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 7, pp. 1931–1937, Apr. 2008. [Online]. Available : <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/7/1931>
- [254] S. M. Tolaney, Y. Boucher, D. G. Duda, J. D. Martin, G. Seano, M. Ancukiewicz, W. T. Barry, S. Goel, J. Lahdenrata, S. J. Isakoff, E. D. Yeh, S. R. Jain, M. Golshan, J. Brock, M. Snuderl, E. P. Winer, I. E. Krop, and R. K. Jain, "Role of vascular density and normalization in response to neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy in breast cancer patients," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 46, pp. 14325–14330, Nov. 2015.
- [255] K. Ashina, Y. Tsubosaka, K. Kobayashi, K. Omori, and T. Murata, "VEGF-induced blood flow increase causes vascular hyper-permeability in vivo," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 464, no. 2, pp. 590–595, Aug. 2015.
- [256] S.-Y. Cheng, M. Nagane, H.-J. S. Huang, and W. K. Cavenee, "Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 22, pp. 12081–12087, Oct. 1997.
- [257] Y. Chen, S. Zhang, G. Peng, J. Yu, T. Liu, R. Meng, Z. Li, Y. Zhao, and G. Wu, "Endothelial NO synthase and reactive oxygen species mediated effect of simvastatin on vessel structure and function : pleiotropic and dose-dependent effect on tumor vascular stabilization," *International Journal of Oncology*, vol. 42, no. 4, pp. 1325–1336, Apr. 2013.
- [258] Y. Ishima, A. Inoue, J. Fang, R. Kinoshita, M. Ikeda, H. Watanabe, H. Maeda, M. Otagiri, and T. Maruyama, "Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy through the generation of nitric oxide," *Cancer Science*, vol. 106, no. 2, pp. 194–200, Feb. 2015.

-
- [259] R. Schrufer, N. Lutze, J. Schymeinsky, and B. Walzog, “Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8,” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, vol. 288, no. 3, pp. H1186–H1192, Mar. 2005.
- [260] K. Aubertin, A. K. A. Silva, N. Luciani, A. Espinosa, A. Djemat, D. Charue, F. Gallet, O. Blanc-Brude, and C. Wilhelm, “Massive release of extracellular vesicles from cancer cells after photodynamic treatment or chemotherapy,” *Scientific Reports*, vol. 6, p. 35376, Oct. 2016.
- [261] M. Triesscheijn, M. Ruevekamp, M. Aalders, P. Baas, and F. A. Stewart, “Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response,” *Photochemistry and Photobiology*, vol. 81, no. 5, pp. 1161–1167, Oct. 2005.

Annexe A

A new algorithm for a better characterization and timing of the anti-VEGF vascular effect named “normalization”, *Angiogenesis*, 2016

A new algorithm for a better characterization and timing of the anti-VEGF vascular effect named “normalization”

Karima El Alaoui-Lasmali^{1,2} · El-Hadi Djermoune^{1,2,4} · Jean-Baptiste Tylcz^{1,2} · Dominique Meng^{1,2} · François Plénat^{1,2,5,6} · Noémie Thomas^{1,2,4} · Béatrice Faivre^{1,2,3}

Received: 31 July 2016 / Accepted: 29 November 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Antiangiogenics are widely used in cancer treatment in combination with chemotherapy and radiotherapy for their vascular effects. Antiangiogenics are supposed to induce morphological and functional changes in the chaotic tumor vasculature that would help enhance the therapeutic efficacy of chemotherapy and radiotherapy through the amelioration of the drug delivery or the oxygenation in the tumor, respectively. However, finding the best treatment sequence is not an easy task to achieve and no consensus has yet been established because of the lack of knowledge regarding when and for how long the vascular network is ameliorated. The aim of this work was to develop a dedicated image processing algorithm able to analyze the vascular structures on optical microscopy images of the vascular network and to follow its fine modifications *in vivo*, over time. We applied this algorithm to follow the evolution of the vascular parameters (vascularized tissue surface, branches, sprouts and length), in

response or not to anti-VEGF therapy (10 mg/kg/day) and determine precisely whether there is really a vascular “normalization” with anti-VEGF therapy in comparison with the parameters extracted from healthy vascular networks. We found that for this determination, the choice of region of interest to analyze is critical as it is important to compare only microcirculation areas and avoid areas with arteriole–venule–capillary hierarchy. The algorithm analysis allowed us to define a vascular “normalization” in treated tumors, between 8 and 12 days of bevacizumab treatment that was confirmed by standard immunohistochemical analysis, microvascular permeability assessment and immunohistological blood perfusion assessment.

Keywords Intravital imaging · Antiangiogenic therapy · Skinfold chamber · Algorithm quantification · Vascular normalization

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10456-016-9536-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Béatrice Faivre
beatrice.faiivre@univ-lorraine.fr

¹ CRAN, UMR 7039, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² CRAN, UMR 7039, CNRS, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

³ Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, Nancy, France

⁴ Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁵ Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁶ Laboratoire d’anatomopathologie, CHU Nancy-Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Introduction

The use of antiangiogenic therapy in cancer was first based on the premise that antiangiogenic therapy could starve the tumor to death by reducing its blood supply [1]. Nevertheless, the tumor vasculature can be compared to the Braess paradox, as described by Kippenberger et al. [2] as the presence of a growing number of blood vessels resulting in too many vascular itineraries would reduce the efficiency of the tumor vascular network. The reduction in the vascular density by antiangiogenic therapy would not start by starving the tumor but instead could ameliorate the efficacy of the tumor vascular network [3] and hence be beneficial for tumor growth [4]. Thus, some authors underline the potential therapeutic benefit of antiangiogenic therapy because of the functional amelioration of the

vascular network that would help enhance the therapeutic efficacy of chemotherapy and radiotherapy through the amelioration of the drug delivery in the tumor or the oxygenation of tumor, respectively [5]. Some of these described effects of the antiangiogenic agents are the modification of the shape of the blood vessels which appear thinner and less chaotic. The resulting vascular network would present a reduced vascular density associated with an enhanced pericyte coverage, a reduced permeability and globally an ameliorated tumor perfusion and oxygenation [3]. This was hypothesized by Jain et al. [6] as being a tumor vascular “normalization” described by a transition of the morphology of the tumor blood vessels to a normal-like morphology.

However, if these vascular ameliorations named “normalization” are claimed by numerous authors, for anti-VEGF therapy there is still no consensus concerning when to administrate the bevacizumab (before, during or after chemotherapy or radiotherapy), at which posology (low or high dose, daily or not) and for how long as reviewed by Falk et al. [7]. Why the absence of a consensus? This is because, to our knowledge, the literature does not characterize what the real vascular effects of anti-VEGF agents are and for how long they are beneficial. Preclinical and clinical trials showed ambiguous and some paradoxical results as some studies demonstrate the importance of antiangiogenic agents in the global outcome [8, 9] when others do not [10–12]. A better knowledge of the vascular effects of bevacizumab would allow for a better and more secure use of it in the therapeutic protocols.

However, the access to that knowledge needs adequate tools capable of both exploring precisely the vascular effects of anti-VEGF therapy and determining when the administration and the duration of the treatment are more beneficial for an antitumor effect or to enhance the therapeutic efficacy of chemotherapy or radiotherapy. To our knowledge, there is no software able to quantify precisely the vasculature of tumors *in vivo*. Only softwares developed for *in vitro* angiogenesis analysis exist, such as AngioSys (TCS Cellworks, UK), AngioQuant, Angiogenesis Analyzer for ImageJ or Wimasis [13, 14]. However, they are not robust enough as they do not permit a complete detection of the vascular network when blood vessels of various diameters coexist and when the architecture is too chaotic. Moreover, those softwares are not able to perform an automated analysis and lack precision, so they are not utilizable to quantify and understand *in vivo* the evolution of the tumor vascular network through time.

In this context, the aim of our work was to develop a dedicated image processing algorithm able to detect and analyze the vascular structures on optical microscopy images of a vascular network and to follow its fine modifications *in vivo*, over time. This dedicated image

processing algorithm should allow to extract data from several pertinent vascular parameters (vascular and tissue surfaces, branches, sprouts and length) from images of the vascular network obtained *in vivo* by optical intravital microscopy observations of human glioblastoma xenografts implanted in skinfold chambers of *nude* mice. We applied this algorithm to follow the evolution of the vascular parameters in response or not to anti-VEGF therapy administrated daily at 10 mg/kg and determine precisely whether there is really a vascular “normalization” with anti-VEGF therapy in comparison with the parameters extracted from healthy vascular networks. If it does, what parameter(s) attest it? When does the vascular amelioration happen? And for how long does it persist? The dedicated image processing algorithm and the robustness of the analysis of the vascular data was compared to immunohistochemical analysis and in addition to microvascular permeability assessment and immunohistological blood perfusion assessment.

Methods

Animals

All applicable institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in this study were conducted in accordance with the European legislation for animal handling and with the approval of the local animal ethics committee (CELM EA-2012-0018). 8–10-week-old *nude* female mice were used for the experiments (Janvier, France). Mice were housed separately once they had a skinfold chamber.

Dorsal skinfold chamber and glioblastoma xenografts implantation

Glioblastoma was chosen as a model of angiogenesis because it is a highly vascularized type of tumor [15, 16]. U87 xenografts were obtained and implanted in skinfold chambers as previously described in Tylcz et al. [17].

The dorsal skinfold chamber (APJ Trading) consists of two symmetrical titanium frames with a 1 cm² circle window of visualization. The mice were anesthetized by a single intraperitoneal injection of a mixture of xylazine (8 mg/kg, Rompun[®] 2%, Bayer Care Health) and ketamine (90 mg/kg, Imalgène[®] 500, Merial). To prevent postoperative pain and stress, mice were injected subcutaneously with a single dose of buprenorphine (0.05 mg/kg, Buprécare, Axience) and with a single dose of meloxicam (1 mg/kg, Metacam R, Boehringer Ingelheim) before the surgery.

24–48 h post-surgery, a 3 ± 1 mm² tumor fragment was placed directly on the vascular network inside the circular

window of the chamber. The vascularization of the xenografts by the murine skin vessels was observed over time in microscopy.

Visualization of the vascular network in intravital microscopy

Bright-field and fluorescence imaging of the vascular network of anesthetized mice-bearing skinfold chambers was performed 3–6 times a week using the Nikon microscope AZ100 (Nikon, France) equipped with a Digital Light DS-Qi1Mc camera, with or without a confocal device (Revolution DSD, Andor Technology, UK) and a TRITC filter (excitation wavelength = 560 ± 25 nm). Depending on the experiment, the vascular network was observed with or without the preliminary injection of a contrasting agent (10 mg/kg of Texas Red-conjugated dextran, MW 70,000 Da, Fisher Scientific, France).

Bevacizumab treatment

After complete tumor vascularization (i.e., 10–14 days after the tumor implantation), 49 mice were divided into 6 lots: one lot without treatment (day 0) and 5 lots that received daily intraperitoneal injections of 10 mg/kg of bevacizumab (Avastin[®], Roche) for 2, 4, 6, 10 or 14 days, respectively (Fig. 1).

Experiments on tumor and healthy vascular networks

Three sets of experiments were conducted (Fig. 1). (i) Thirty-two mice were treated or not with bevacizumab (10 mg/kg, daily) and used for intravital imaging, permeability assays and immunohistochemical quantification of the vascular markers chosen. In parallel, eight mice remained untreated and were used for intravital imaging. (ii) Seventeen mice were treated or not with bevacizumab (10 mg/kg, daily) and used for the perfusion assessment. Moreover, five mice were used to image the healthy skin vascular network before the implantation of the tumor fragment.

Kinetic algorithmic quantification of the vascular parameters of the healthy and tumor vascular network on IVM images

In order to detect the vascular structures observed in intravital microscopy, we developed a dedicated image processing algorithm (Fig. 2) [17]. The algorithm first needs the definition and the localization of the region of interest (ROI) which was done using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [14] which size should give robust and fine information of the vascular network, independently of the tumor size and investigator.

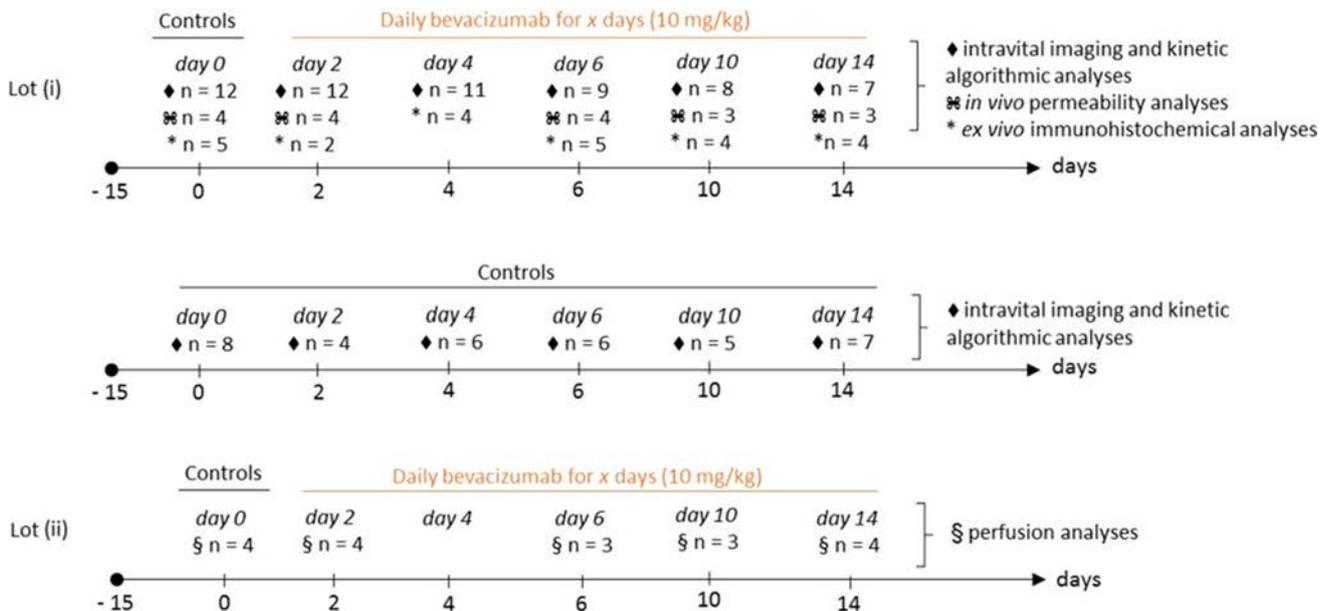
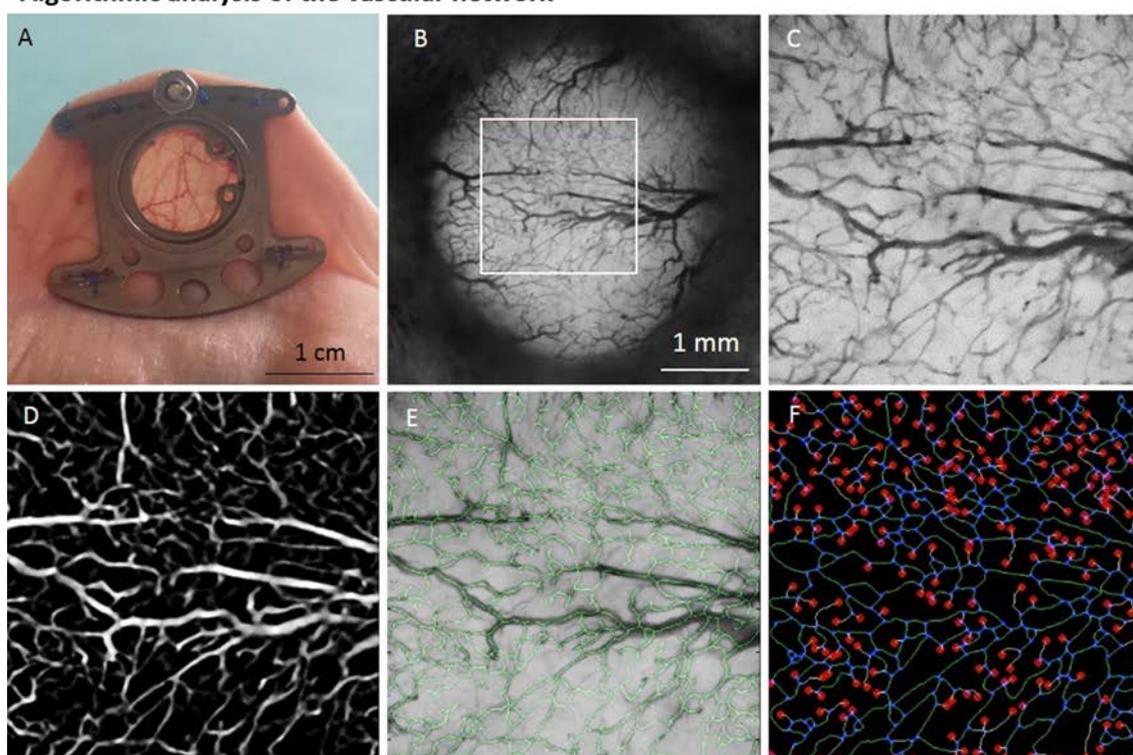


Fig. 1 Chronology of the experiments. Three sets of experiments were conducted on nude mice-bearing skinfold chambers with a U87 glioblastoma tumor fragment. Bevacizumab therapy was started for all the mice at day 0, when the tumor surface appeared completely vascularized in intravital microscopy. (i) Thirty-two mice were treated or not with bevacizumab (10 mg/kg, daily) and used for intravital imaging, permeability assays and immunohistochemical

quantification of the vascular markers chosen. In parallel, eight mice remained untreated and were used for intravital imaging. The tumors were fixed in formalin at the different time points for immunohistochemistry analyses. (ii) Seventeen mice were treated or not with bevacizumab (10 mg/kg, daily) and used for the perfusion assessment. The tumors were snap-frozen at the different time points for perfusion analyses

Algorithmic analysis of the vascular network



Choice of the Region Of Interest (ROI)

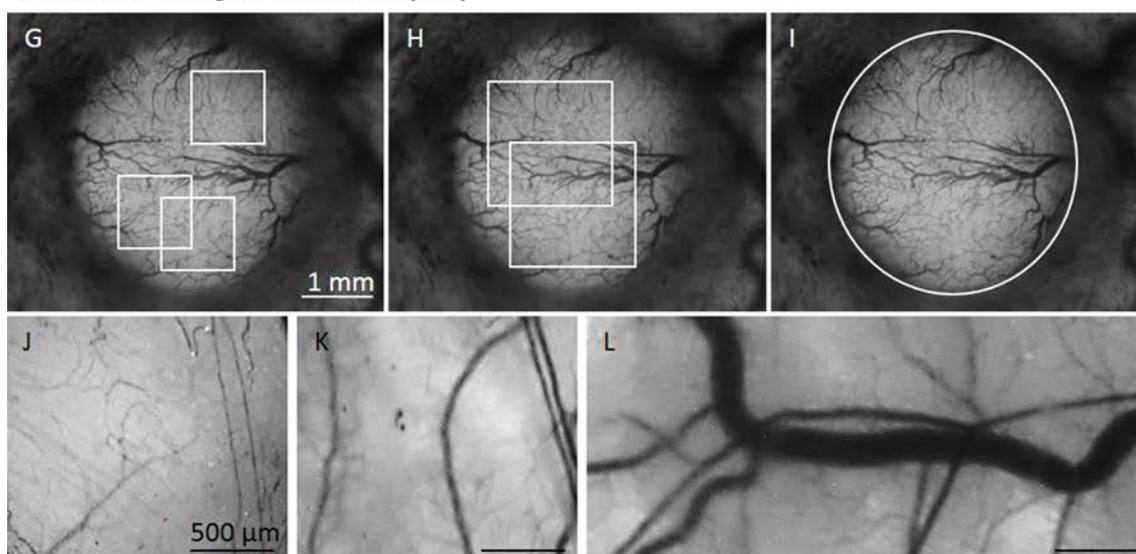


Fig. 2 Algorithmic analysis of the vascular network on intravital microscopy images of tumors implanted in skinfold chambers of mice. **a** A skinfold chamber implanted on the back of a nude mouse allowing the visualization of the skin's vascular network. **b** Example of a tumor 11 days after its implantation in the chamber and observed in bright-field microscopy. A region of interest was selected and enlarged in **(c)** to better visualize the steps of the analysis. **d** The image is segmented to extract specifically the blood vessels because of their tubular shape. **e** A skeleton of the vasculature (straight lines in

green) is made on the vascular network which allows for **(f)** the quantification of the length, branches (vascular sections in *blue*) and sprouts (vascular endings of 5–50 μm in *yellow*) of the blood vessels. Choice of the region of interest (ROI) Three different regions of interest of different sizes were chosen for tumor **(g, h, i)** and healthy **(j, k, l)** vascular networks including **g, j** the microcirculation (1 mm^2), **h, k** the microcirculation and larger vessels (intermediate area of 3 mm^2) or **i, l** all kind of vessels (large area of 10–14 mm^2). Each area was analyzed at most three times. (Color figure online)

By comparison with the healthy vascular network, this information should allow the detection of the most discriminant and decisive parameters following the vascular remodeling in response or not to an antiangiogenic therapy to choose the best therapeutic protocol. Three types of ROI of different sizes were explored: ROI of 1, 3 and 10–14 mm² that gradually take into account the capillaries (microcirculation) or the capillaries and larger blood vessels. In healthy vascular networks, the bigger region of interest takes into account the arterioles, capillaries and venules. For each type of ROI, three measures at most were conducted and are represented by the mean \pm standard deviation for each data point.

Then the developed algorithm isolates the vasculature from the tissue by applying two first-order Savitzky–Golay filters (in the horizontal and vertical directions) to estimate the background which was subtracted from the original picture. The resulting image is then segmented by the same algorithm by detecting the wire-shaped structures that characterize the blood vessels (Fig. 2d). Each pixel constituting part of the blood vessels was counted to define the ratio V/T of the blood vessels surface (V) to the tissue (tumor or healthy tissue) surface analyzed (T), and its evolution was followed over time.

Starting from the segmented image, the skeleton of the vascular network is automatically obtained where all the vessels are replaced by unitary width lines to facilitate the quantification of the vascular sprouts, branching and total length. A vascular sprout is defined as a vascular segment of length between 5 and 50 pixels (i.e., 20–200 μm) with one free end and that is linked, on its other end, to a blood vessel. A vascular branch is defined as a structure composed of three segments sharing a common junction (just like the Y letter). For all the parameters, the quantification unit is the pixel. They are converted to μm using the fact that 1 pixel = 4.12 μm .

The number of branching and sprouts was studied either as the ratio to the tissue surface analyzed (branches/mm² and sprouts/mm² of tissue) or to the total vascular length (branches/mm and sprouts/mm of vessels) quantified within the region of interest (ROI). The total length was brought back to the surface of the tissue in mm² (length/mm² of tissue).

Microvascular permeability assessment with intravital microscopy

The functionality of the blood vessels was tested on mice of the lot (i) by analyzing whether the microvascular permeability was affected or not without and during bevacizumab treatment. Mice received an intravenous injection of dextran Texas Red[®] 70 kDa at 10 mg/kg (Fisher Scientific, France) 5–10 min before intravital imaging. The

same areas of the tumors were imaged in fluorescence and in bright field. Fluorescence images were artificially colored in cyan in ImageJ software to make them appear brighter and were superimposed to the bright-field images.

Immunohistological blood perfusion assessment

The functionality of the blood vessels was also tested by analyzing their capacity to perfuse the tumor tissue through the diffusion of Hoechst 33342 (25 mg/kg, i.v., 5 min before killing, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, France) from the blood vessels to the surrounding tumor cells. On 6- μm frozen sections of the tumors, the blood vessels were detected with an anticollagen IV antibody (rabbit polyclonal, 1/2000, #20451, Novotec) that was revealed with streptavidin–biotin complex method (secondary antibody: goat polyclonal, 1/200, E0432, Dako; streptavidin—Fluoprobes 488, 1/8000, FP-BA2221, Fluoprobes, Interchim). Fluorescence images of the tumors were captured using AxioCam HRc camera on the Zeiss AxioImager.M1 with DAPI and FITC filters and analyzed with AxioVision Rel. 4.6 software (Carl Zeiss, France). Automatic mosaic acquisition was done for each tumor with each filter to detect both the cells stained with Hoechst 33342 and collagen IV. On ImageJ, the signal corresponding to the Hoechst 33342 (nuclei staining) and to the blood vessels was artificially colored in green and in red, respectively, to facilitate the distinction between perfused and non-perfused areas. Hematoxylin–eosin–safran (HES) coloration was performed on all the tumors.

Immunohistological analysis

Immunohistochemical protocol for the tumors

At the different time points, the mice of the lot (i) were killed and the tumors were fixed in formalin and embedded in paraffin. On 5- μm tumor sections, the blood vessels were detected with four different antibodies. Anticollagen IV (rabbit polyclonal, 1/2000, #20451, Novotec) staining was performed to detect the basement vascular membrane and to quantify the vascular density, anti-CD105 (rat polyclonal, 1/30, CL8983AP, Cedarlane) to mark all activated endothelial cells, anti-VEGFR-2 (rabbit polyclonal, 1/600, MA5-15556, Thermo Fisher Scientific) to mark only tip cells and antidesmin (mouse monoclonal, clone D33, Dako) to detect the accompanying cells, such as the pericytes. Each primary antibody was incubated with the tumor sections one night at +4 °C. To detect anticollagen IV and anti-VEGFR-2 antibodies, we used a method combining N-Histofine[®] Simple Stain Mouse (30 min, F/414341F, Microm Microtech) and a peroxidase substrate (ImmPACT NovarED, Eurobio). To detect anti-CD105 antibodies, the tumor

sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (1/800, 1 h, 3052-08, Southern Biotech) that was revealed by a peroxidase conjugated to streptavidin (streptavidin–HRP, 20 min, F/TS-125-HR, Microm Microtech) before incubation with the peroxidase substrate. To detect antidesmin antibodies, a kit allowing the detection of mouse antibodies on mouse tissue was used (Mousetain Kit F/414321F, Microm Microtech). Finally, the sections were counterstained with Mayer’s hematoxylin.

Quantification of the vascular parameters

Images of the tumors were captured using the Digital Light DS-Fi1 camera on the Nikon Eclipse E600 (Nikon, France). Mosaics of the whole tumors were made using the MosaicJ plugin of the Fiji software [18]. For each primary antibody, the number of blood vessels expressing the marker was counted on the entire surface to obtain a number of blood vessel/mm² of tumor.

The immunohistochemical quantification of the blood vessels on healthy vascular networks was performed on images of normal human skin biopsies marked with those antibodies. The images were selected from the Human Protein Atlas available from www.proteinatlas.org [19].

Detection of hypoxic zones

The hypoxic zones were detected by the expression of GluT-1 which was sought using an anti-GluT-1 antibody (rabbit polyclonal, 1/1000, E2844, Springbio) and a method combining N-Histofine[®] Simple Stain Mouse (30 min, F/414341F, Microm Microtech) and a peroxidase substrate (ImmPACT NovarED, Eurobio).

Results

To argue whether the vascular restructuring induced by bevacizumab corresponds to a vascular amelioration, named “normalization” (i.e., progression toward normal vascular structures) and if so, to determine the moment of apparition and the duration of the phenomenon, we characterize by using our dedicated algorithm the most judicious parameters and the most pertinent tissue area to analyze the vascular structural modifications induced by bevacizumab treatment and compare it to the healthy vascular networks of skins observed in vivo in skinfold chambers. The use of the skinfold chamber model permits the use of very few animals, over a period of 4–5 weeks, to obtain reliable and reproducible data, without having to kill the mice.

Characterization of the structural modifications induced by bevacizumab treatment, in vivo, using our dedicated algorithm

The vascular data obtained depend on the choice of region of interest (ROI)

By studying three sizes of regions of interest (ROI) on healthy and tumor vascular networks (1, 3 or 10–14 mm²), we found that the information provided by the data analysis depended on the ROI studied. Indeed, for both tumor and healthy vascular networks, the quantification of the parameters (ratio V/T , branches/mm of vessel, sprouts/mm of vessel, branches/mm² of tissue, sprouts/mm² of tissue and length/mm² of tissue) was higher in smaller ROI compared to ROI of superior size. For example, the quantification of the parameter branches/mm of vessels was much superior in the microcirculation areas where only capillaries were considered, compared to intermediate and large areas where larger, poorly branched vessels were also considered. Indeed, the arterioles and venules are less branched than the capillaries, hence the difference of pattern. Supplementary data Tables S1 and S2 confirm those observations for the other parameters studied for healthy and tumor vascular networks.

The ratio V/T permits to follow the evolution of the tumor vascularization

The overtime evolution of vascular networks in skinfold chambers of control or bevacizumab treated tumors is illustrated in Fig. 3a, b (top lines: intravital microscopy; bottom lines: after segmentation with the algorithm). From the segmentation, the algorithm determines the ratio V/T which corresponds to the ratio of the vascularized tumor surface to the tumor surface that were quantified over time for control ($n = 8$) and treated tumors ($n = 7$) to follow the evolution of the vascularization of the tumors in response to bevacizumab (10 mg/kg, daily).

The ratio V/T remained globally unchanged in control tumors during all of the experiment for all ROIs analyzed. This supposes that the tumor and vascular growth are correlated. On the contrary, in case of treatment, there was a lack of correlation between tumor and vascular growth and three phases of response could be highlighted. (1)—From day 0 to day 6, the ratio V/T decreased due to the first effects of vascular growth inhibition by bevacizumab while the tumor surface was stabilizing. (2)—Between day 6 and day 10, the ratio kept decreasing while the tumor surface strongly increased, indicating a beneficial impact of the vascular remodeling to the tumor growth. (3)—Between day 10 and day 14, the impact of the persistent vascular

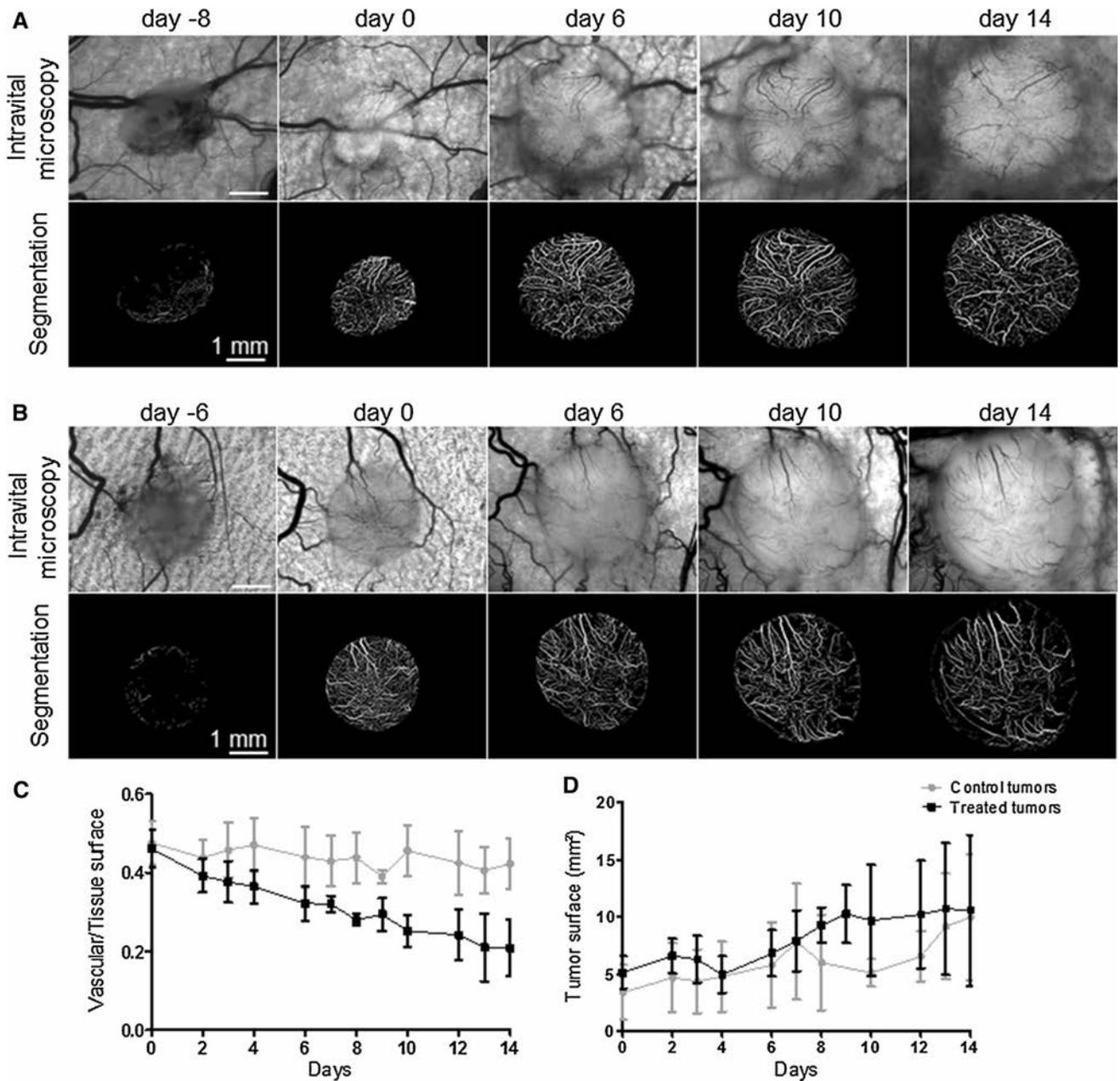


Fig. 3 Evolution of the vascular networks of two tumors in intravital microscopy and after segmentation. U87 glioblastoma tumor fragments were implanted in the skinfold chambers of *nude* mice and their vascularization was monitored by intravital microscopy from the implantation of the tumor fragment to the end of the protocol. Day 0 that was defined as the beginning of the treatment is the day when the tumor surface appears completely irrigated by the blood vessels (tumor vascularized). **a** Example of a tumor left untreated, at day 8, the tumor fragment had been deposited for 5 days. **b** Example of a

tumor treated with bevacizumab daily at 10 mg/kg starting from day 0. At day 6, the tumor fragment had been implanted for 5 days. **c** Ratio of the total vascular length in mm per surface of tissue analyzed in mm² quantified on the large ROI on the segmentation images for control (gray, *n* = 8) and treated (dark, *n* = 7) tumors. **d** Tumor growth of control and treated tumors represented by the measure of the tumor surfaces. Each *data point* represents the mean ± SD of those measures

inhibition on the tumor growth appears with the new stabilization of tumor growth (Fig. 3c, d).

Compared to control tumors, the growth of the treated tumors was slightly improved, especially between day 8 and day 12 (Fig. 3d).

To evaluate whether this ratio *V/T* could characterize a “normalization” phenomenon, this ratio was compared to the healthy tissues ratios for all ROIs studied (Fig. 3c; Table 1). The ratio *V/T* in healthy tissue was not significantly different with non-treated tumors, or after treatment,

Table 1 Identification of the period during which the vascular parameters quantified on the treated tumor vascular networks match those quantified on healthy vascular networks, in the three regions of interests (microcirculation, intermediate area and large area)

Matches Treated vascular networks	Healthy vascular networks		
	Microcirculation	Intermediate area	Large area
<i>Branches/mm</i>			
Microcirculation	Days 8–12	–	–
Intermediate area	–	Never	–
Large area	–	–	Never
<i>Sprouts/mm</i>			
Microcirculation	Day 13	–	–
Intermediate area	–	Never	–
Large area	–	–	Never
<i>Length/mm²</i>			
Microcirculation	Days 9–12	–	–
Intermediate area	–	Never	–
Large area	–	–	Never
<i>Branches/mm²</i>			
Microcirculation	Days 9–12	–	–
Intermediate area	–	Day 14	–
Large area	–	–	Never
<i>Sprouts/mm²</i>			
Microcirculation	Day 12	–	–
Intermediate area	–	Never	–
Large area	–	–	Never
<i>Ratio V/T</i>			
Microcirculation	Day 0	–	–
Intermediate area	–	Days 2–7	–
Large area	–	–	Days 2–3

it was significantly lower in treated tumors compared to healthy tissues.

The evolution of the vascularization in tumors treated or not in regard of the tumor growth leads us to suspect a really efficient vascular remodeling with bevacizumab. But the ratio V/T in all ROIs compared to healthy tissues was not an adequate parameter to affirm of a vascular “normalization” phenomena and to determine precisely when and for how long it appears.

Characteristics of the vascular network pattern associated with the vascular “normalization”

To know whether and when the vascular remodeling due to the angiogenesis inhibition (reduction in the sprouting) and the antivascular effect (reduction in the number of vascular branches and in vascular length) could be considered as a progress toward normal vascular structures, we analyzed when treated tumor data were significantly different from control data and when it matched with healthy tissue data (Fig. 4; Table 1).

All of the parameters analyzed had a globally constant stability in control tumors for all ROIs analyzed and they

decreased significantly over time in treated tumors. For all three ROIs analyzed, the curves of evolution of the vascular branches, sprouts and length/mm² of tissue followed the same decrease (Fig. 4; Table 1). For all three parameters, the most significant differences between control and treated data were observed between day 8 and day 12 when the tumor growth started again. This was correlated with a global decrease in the sprouts, branches and vascular length per surface of tumor.

The matches with healthy data were possible mainly only on the microcirculation ROIs and started at day 8. More precisely, when brought back to the total vascular length, the branches (branches/mm of vascular length) were practically similar within the microcirculation and intermediate area, but they were not discriminant from control tumors when studied in large areas. Between day 8 and up to day 14, the quantification of the branches, sprouts and length of the vascular network matched the microcirculation of healthy tissue. This suggests that the structural amelioration of the treated tumor vascular network occurs during the second week of treatment and is more pronounced precisely between day 9 and day 12. On the other hand, when focusing on the intermediate and large areas,

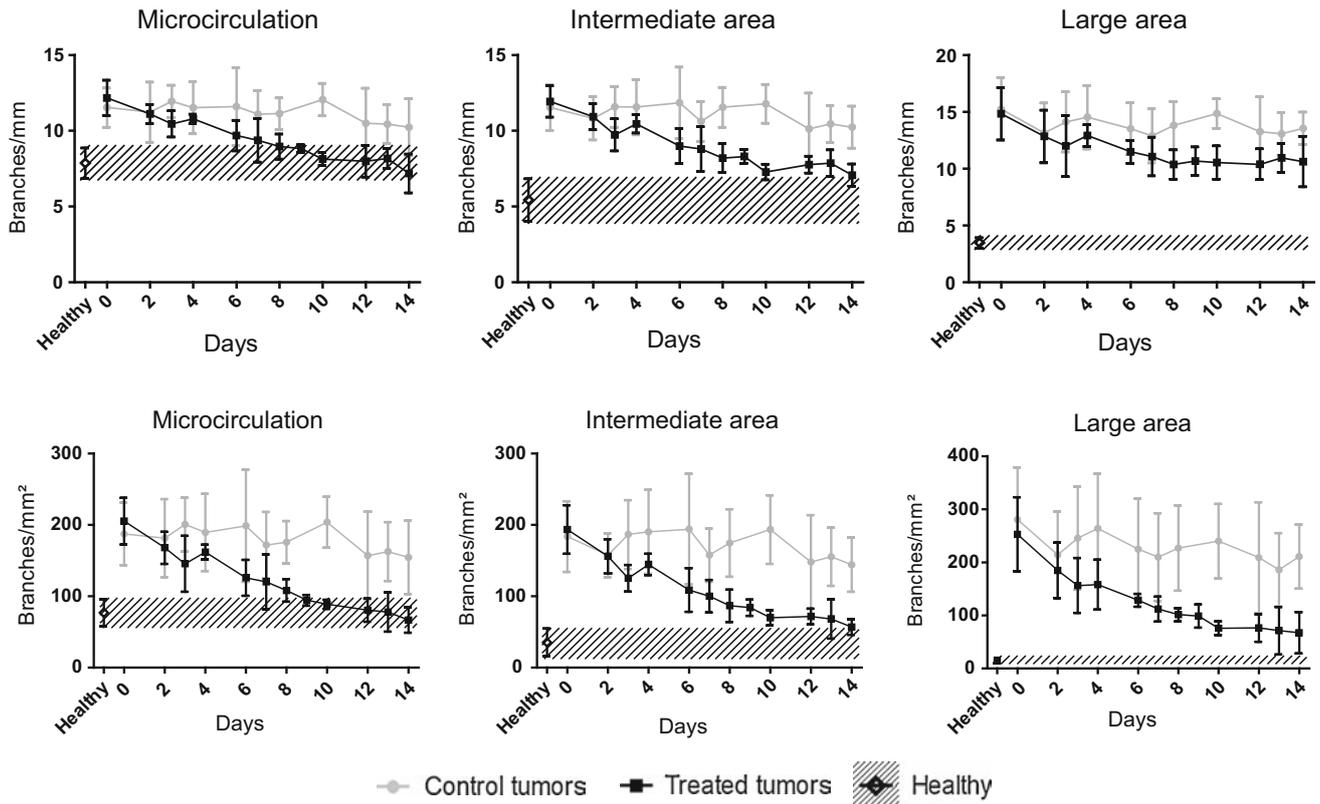


Fig. 4 Branching pattern in control and treated tumors and comparison with healthy tissue. The number of branching points was quantified on the skeleton of the vascular networks issued from the segmentation images by defining a branch as a structure composed of three segments sharing a common junction (just like the Y letter). The number of branching points was studied as its ratio to the total vascular length (branches/mm of vessels, graphs on top) and as its ratio to the tissue surface analyzed (branches/mm² of tissue surface, graphs on the bottom). Those ratios were analyzed for three different

regions of interest of different sizes for tumor and healthy vascular networks including the microcirculation (1 mm²), the microcirculation and larger vessels (intermediate area of 3 mm²) and all kind of vessels (large area of 10–14 mm²). Healthy data are represented as the mean of five measures in the hatched area to facilitate the comparison with control (gray lines, n = 8) and treated (dark lines, n = 7) tumor data. Each area was analyzed at most three times, and each data point represents the mean ± SD of those measures

the vascular parameters of treated tumors remained different from those quantified in the healthy vascular networks because the blood vessels were larger and structured according to the arteriole–venule–capillary hierarchy found in normal vascular networks but not in tumors.

Immunohistochemical analysis versus algorithmic analysis

Immunostaining of VEGFR-2, CD105, collagen IV and desmin of treated tumors at different time points and of healthy tissue was used to validate the in vivo algorithm analysis (Fig. 5; Table S3). First, we analyzed how bevacizumab treatment affects the expression of those markers by the blood vessels over time and when it matched with healthy data. The number of blood vessels marked by type IV collagen and VEGFR-2 was very high in the tumors without treatment at day 0 (158 ± 27 and 139 ± 23 blood vessels/mm², respectively). However, fewer vessels were

counted with CD105 and desmin staining (82 ± 36 and 84 ± 25 blood vessels/mm², respectively). In the first 6 days of treatment, the number of blood vessels marked by VEGFR-2, CD105, desmin and type IV collagen decreased and all progressed toward stabilization up to the end of the experiment.

All of those markers followed the same tendency as the parameters quantified with the algorithm after the start of bevacizumab treatment. They all underwent a decrease due to the antiangiogenic and antivascular effects and progressed toward stabilization state. Each parameter quantified in immunohistochemistry in tumors matched with healthy tissue at different periods. CD105 and collagen IV-stained blood vessels reached values of healthy tissue at day 2 and 4, respectively. However, this was not during the stabilization state observed previously. VEGFR-2 labeled blood vessels reached by day 6 normal values of healthy tissues and remained this way up to day 14. The number of desmin-labeled blood vessels between

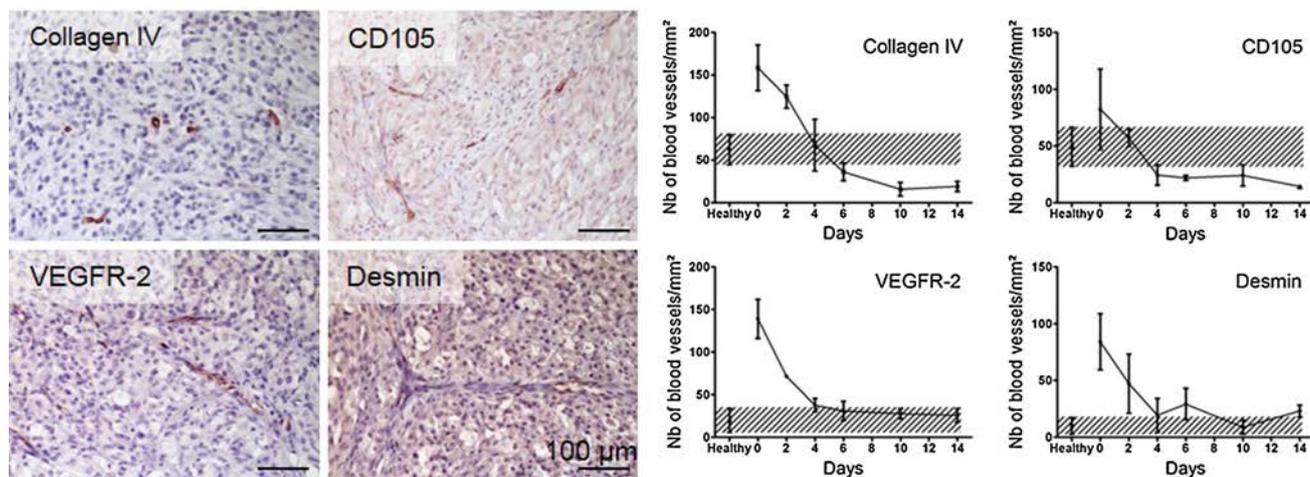


Fig. 5 Immunohistochemical analysis of the vascular network of bevacizumab treated tumors and of healthy tissues. Six batches of mice ($n = 24$ in total) were killed at days 0, 2, 4, 6, 10 and 14 after the beginning of bevacizumab and the tumors were fixed in formalin. The endothelial cells were stained thanks to their expression of CD105 and VEGFR-2, the basal membrane and the pericytes were detected using type IV collagen and desmin, respectively. The pictures on the left represent the tumor vascular network after 10 days

of treatment with bevacizumab. The quantification of the blood vessels stained with those four markers was performed on the total tumor tissue surface and is represented as mean \pm SD for each data point on the graphs. The quantification of the blood vessels on healthy vascular networks is represented in the hatched areas as the mean \pm SD of four measures performed on images selected from the Human Protein Atlas of normal human skin biopsies marked with those antibodies ($n = 4$)

day 4 and day 14 fluctuated but reached values of healthy tissue by day 10. All four parameters confirm the evolution observed and quantified with the algorithm with a common steady state that occurs between day 8 and day 12 during which the endothelial sprouting (VEGFR-2) and the pericyte coverage (desmin) reached healthy values.

Vascular functional parameters analyses

To find out whether the vascular amelioration characterized is functionally confirmed, we studied whether and how the functionality of the blood vessels was affected during bevacizumab treatment, in vivo by studying their permeability and ex vivo by evaluating both their tissue perfusion capacity and tissue hypoxia (Fig. 6). Although the vascular network at day 0 appears composed of tortuous and dense blood vessels both in intravital microscopy and in immunohistochemistry (Figs. 3, 5), the diffusion of Hoechst 33342 shows that the tumors were completely perfused (Fig. 6a, b). No dextran leakage was observable and thrombi in the blood vessels were rare.

At day 2, during the first effects of the vascular inhibition by bevacizumab, Hoechst 33342 perfusion in the treated tumor was heterogeneous and the areas lacking perfusion coincided with the presence of occlusive thrombi in the blood vessels and edema in the tumor tissue on HES-colored tumors (Fig. 6a). At 2 and 5 days of bevacizumab treatment, dextran leakage was observed locally in the tumor. By day 6, the perfusion was qualitatively better but

large non-perfused areas were still present and associated with the presence of thrombi and edema. By day 10, the perfusion was qualitatively better and the tumor tissue did not present any edema or thrombi. However, at day 14, intravital microscopy showed that more than half of the blood vessels were damaged leaving empty sleeves of vessels and potential thrombi that can further stimulate angiogenesis (Fig. 6d). Between 6 and 14 days of treatment, the blood vessels showed no extravasation of dextran.

The expression of the glucose transporter GluT-1, used to reveal hypoxia areas, was highly and uniformly expressed in the tumors at day 0 although at the same stage, tumors were well perfused (Fig. 6c). After 2 days of bevacizumab treatment, the expression of GluT-1 decreased but remained homogeneously distributed in all of the tumor tissue. The expression of GluT-1 was reduced and inhomogeneous from day 6 to day 14, with a more pronounced decrease by day 10, indicating that hypoxia was alleviated in the tumors.

The expression of the glucose transporter GluT-1, used to reveal hypoxia areas, was highly and uniformly expressed in the tumors at day 0 although at the same stage, tumors were well perfused (Fig. 6c). After 2 days of bevacizumab treatment, the expression of GluT-1 decreased but remained homogeneously distributed in all of the tumor tissue. The expression of GluT-1 was reduced and inhomogeneous from day 6 to day 14, with a more pronounced decrease by day 10, indicating that hypoxia was alleviated in the tumors.

The expression of the glucose transporter GluT-1, used to reveal hypoxia areas, was highly and uniformly expressed in the tumors at day 0 although at the same stage, tumors were well perfused (Fig. 6c). After 2 days of bevacizumab treatment, the expression of GluT-1 decreased but remained homogeneously distributed in all of the tumor tissue. The expression of GluT-1 was reduced and inhomogeneous from day 6 to day 14, with a more pronounced decrease by day 10, indicating that hypoxia was alleviated in the tumors.

Discussion

The aim of this work was to introduce a new method to identify precisely the period of vascular amelioration induced by anti-VEGF therapy in order to improve their use in therapeutic protocols. To figure out when the vascular remodeling induced by the anti-VEGF treatment could be qualified as a vascular “normalization”, the

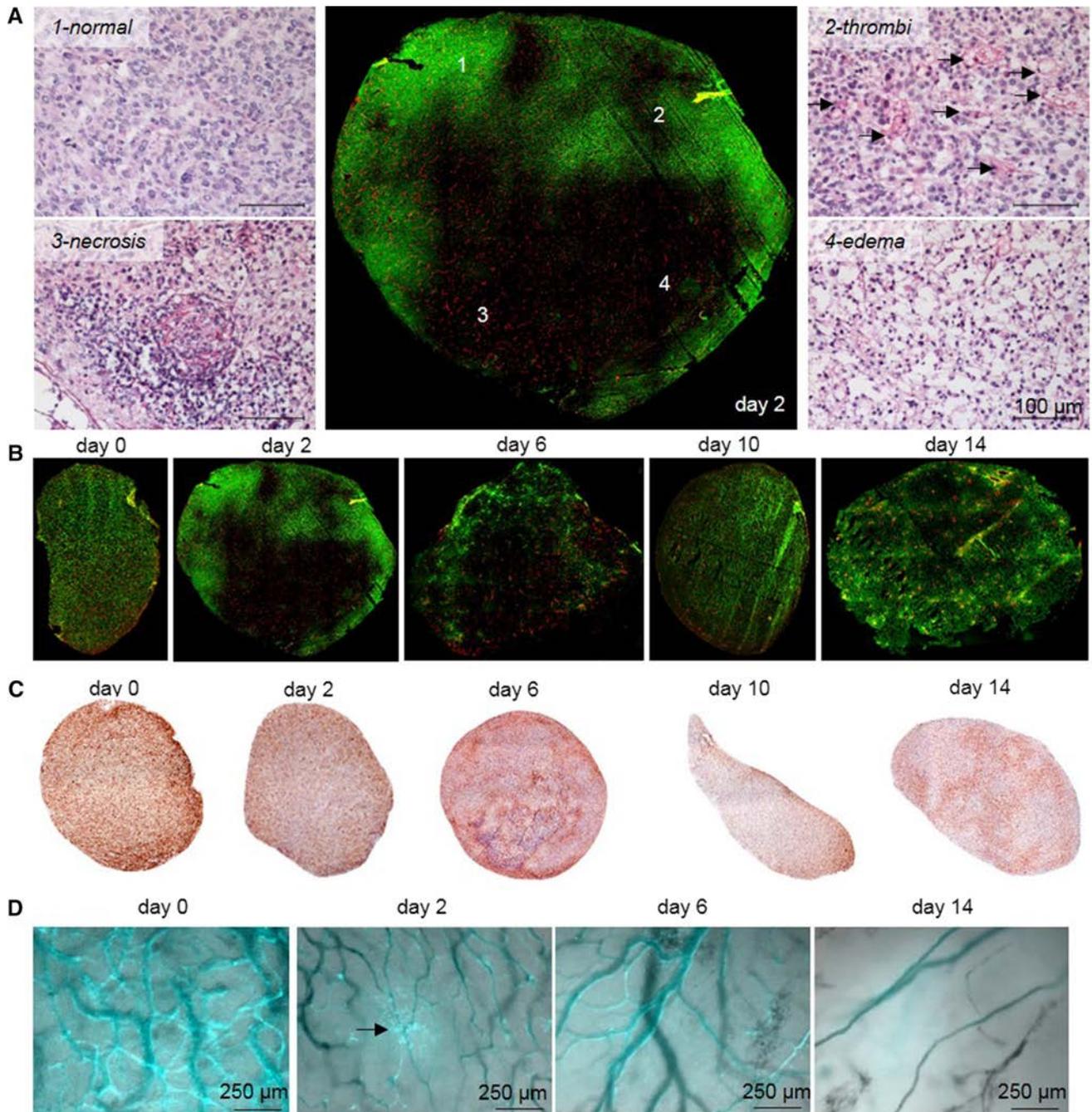


Fig. 6 Vascular and tissue response to bevacizumab treatment. **a** Evaluation of the perfusion of the tissue of a tumor treated with bevacizumab for 2 days and corresponding HES coloration. The mice received an intravenous injection of Hoechst 33342 (25 mg/kg) 5 min before killing and the tumors were salvaged, frozen and immunostained for type IV collagen (blood vessels, red). Hoechst 33342-stained cells appear in green (nuclei staining) and show the capability of the blood vessels to perfuse the tissue. The HES coloration shows the normal tumor tissue (1), the presence of thrombi in the blood vessels (2, arrows), necrosis (3) and edema (4). **b** Evolution of the perfusion rate of tumors, untreated (day 0) and

treated 2, 6, 10 and 14 days with bevacizumab at 10 mg/kg/day. **c** Evolution of hypoxia in tumors through their expression of the glucose transporter GluT-1. Six batches of mice ($n = 24$ in total) were killed at days 0, 2, 4, 6, 10 and 14 after the beginning of bevacizumab and the tumors were fixed in formalin. The expression of GluT-1 in tumors is revealed by the brown coloration of the nuclei in tumors. **d** Evaluation of the vascular permeability in vivo without and during bevacizumab therapy. Mice received an intravenous injection of dextran Texas Red R 70 kDa at 10 mg/kg before intravital imaging. The arrow indicates the plasma leakage. (Color figure online)

evolution of the fine changes in the blood vessels, in their sprouting capacity and in their branching pattern, was evaluated in tumor and healthy vascular networks to search for the most discriminant parameters of the vascular “normalization”.

The analysis of different ROIs shows that only the microcirculation area, where the vascular hierarchy (arteriole–capillary–venule) is not taken into account, could demonstrate a match between healthy and tumor vascular data allowing to prove the existence of a real progression toward normal vascular structures in response to bevacizumab (10 mg/kg, daily). In treated tumor vascular networks, with bevacizumab the normal vascular hierarchy can never be reached considering the speed of vascular remodeling and the destabilization of the angiogenic balance (not only VEGF dependent).

A primary exploration of the tumor vascularized surface (parameter V/T) showed that the vascular remodeling imposed by bevacizumab did reduce the quantity of blood vessels but did not inhibit the growth of tumors. This point is in favor of the amelioration of the vascular network that occurs between 8 and 12 days of bevacizumab treatment and is in agreement with the findings by Grepin et al. [4] where bevacizumab treatment enhances tumor growth. However, no correlation with the healthy V/T could be shown which means that this parameter is not robust enough to detect the vascular “normalization” and it is not a discriminant parameter. The non-different high values of V/T in the healthy and tumor tissue could be, respectively, the result of the presence of big blood vessels in the healthy tissue and the presence of a large number of neovessels in the tumor tissue that compensate for the surface of the healthy blood vessels.

The quantification of the branches/mm² of tissue surface or branches/mm of vascular length in the microcirculation area (Fig. 4; Table 1) is the most robust and discriminant parameters to detect the time lapse when the vascular remodeling of the tumor vascular network can be considered as a vascular “normalization”. The comparison with the healthy vascular network shows that the tumor vascular network is structurally ameliorated starting from day 8 of bevacizumab treatment (10 mg/kg, daily) until day 12, when the vascular remodeling is not favorable anymore to tumor growth.

As for the other parameters studied (sprouts/mm of vessel, sprouts/mm² of tissue), their matching with healthy data is not correlated with an efficient vascular remodeling period and thus is not discriminant parameters of the vascular “normalization” (Table 1, Tables S1 and S2).

The *in vivo* algorithmic analysis was confirmed using standard immunohistochemistry techniques. The morphological features of the blood vessels such as their organization in clusters characteristic of highly angiogenic tumors disappeared with the therapy leaving straighter

vessels. This observation is consistent with existing data and with the concept of the vascular “normalization” [3, 20]. We showed that mature and immature blood vessels are pruned during bevacizumab treatment. We chose CD105 to stain the blood vessels because it is expressed on activated endothelial cells [21], so its staining should allow the visualization of the tip cells and the stalk cells. Without treatment, we could not count as much CD105-stained blood vessels as type IV collagen which suggest that the tumor vascular network is composed not only by activated endothelial cells but also by a portion of phalanx cells possibly composing mature vessels. This would imply that half of the blood vessels are activated and thus probably immature while the other half is possibly mature and stable and both are pruned during bevacizumab therapy. Sprouting blood vessels detected by VEGFR-2, known to be overly expressed on tip cells [22], decreased during the treatment which suggests that the endothelial sprouting is reduced but not stopped. The decrease in both VEGFR-2 labeled blood vessels and the vascular sprouts is representative of the antiangiogenic effect of bevacizumab while the decrease in both type IV collagen-stained blood vessels and the vascular branches is representative of the antivascular effect of bevacizumab.

Our algorithmic analyses of the sprouts, branches and length show the antiangiogenic and antivascular effects like immunohistochemical analyses do. The immunohistochemical quantification of the tumor blood vessels marked with type IV collagen and CD105 (Fig. 5) could not show a resemblance to healthy vascular networks during the stabilization period and hence are not considered as discriminant parameters of the vascular “normalization”. The analysis of VEGFR-2 and desmin marked blood vessels shows better correlation between tumor and healthy vascular networks during the stabilization period. However, unlike with our algorithm, the impossibility to define a ROI limited to the microcirculation (i.e., capillaries) renders the comparison between tumor and healthy vascular networks in immunohistochemistry misleading and perhaps poorly representative of the vascular “normalization”. Moreover, this algorithm would allow to overcome of the technical problems encountered in immunohistochemistry where the quantification of the vascular density is subjective because it depends on the quality of the coloration, on the experimenter and on how the blood vessels are sectioned [23].

The use of the algorithm to follow the tumor response to antiangiogenic therapy in the same animal, over time, resulted in a more precise determination of the treatment response than immunohistochemistry alone while using less animals (7 vs. 24, respectively).

We have demonstrated that the vascular remodeling with bevacizumab administrated daily at 10 mg/kg is

beneficial for tumor growth only between day 8 and day 12 of treatment. The quantification of the branches features a beneficial state between 8 and 12 days of bevacizumab treatment and appears as a discriminant parameter of the vascular “normalization”. In that state, 20–40% of the quantity of blood vessels initially present remains. Tolaney et al. [21] suggest that a high baseline microvascular density may be necessary to go through a “normalized” state and not go directly into excessive vascular pruning. In our experiments, bevacizumab treatment was started when the vascularized tumor surface was at its maximum and despite the massive doses of anti-VEGF therapy administered, angiogenesis is not fully inhibited but rather moderated. This suggests that the remaining 20% of microvascular density and vascular branches are enough and better structured to allow for tumor regrowth.

Considering the vascular parameters extracted from the skeletonization of the images with the dedicated algorithm, the sprouts/mm² of tissue surface or sprouts/mm of vascular length (Fig. 4; Table 1) were not appropriate to confirm neither an efficient vascular remodeling nor a vascular “normalization”. The study of the sprouting via VEGFR-2 expression (in immunohistochemistry) and via the algorithm quantification is not a discriminant parameter to conclude of a vascular “normalization” phenomenon with bevacizumab treatment.

Corresponding to *in vivo* observations and quantification of the vascular parameters, the tumor vasculature underwent a rapid breakdown starting from 2 days of treatment that had an impact on tumor growth. The first responses to bevacizumab are the antiangiogenic and antivascular effects causing the blood vessels to leak, hence triggering the formation of thrombi that obstruct the blood vessels. The presence of thrombin might add to the antivascular effect as it induces the disruption of the endothelial barrier [22] which potentially increases the permeability and leads to blood leakage. This provokes the formation of edemas that prevents the blood to perfuse the entire tumor tissue because of the elevated interstitial pressure [24]. Hence, it probably results in the development of highly hypoxic regions (where GluT-1 was over-expressed) and presenting some small necrotic areas. In response, a vascular remodeling occurs between days 6 and 10, which does not significantly modify the number of blood vessels but reorganize them to obtain a vascular network that is less chaotic and less branched. Thus, the blood irrigation within the tumor tissue is reestablished that leads to a less hypoxic tissue and a better tumor growth. By day 14, the excess of anti-VEGF resulted in a strong vascular regression. Hypoxia is restored in some places and tumors grow very slowly.

In conclusion, our algorithm stands as a sufficiently reliable and robust mathematical tool to characterize, from

optical microscopy images, the vascular remodeling in response to bevacizumab treatment and to detect when the remodeling is efficient enough to assure that the functionality of the blood vessels is restored via a more efficient blood circulation in the tumor, less vascular permeability, better tissue oxygenation and a better perfusion. The analysis of the vascular networks must be limited to the microcirculation area, i.e., capillaries where the most discriminant parameter of the vascular “normalization” is the branches/mm² of tissue surface or branches/mm of vascular length. The algorithmic analysis of those two parameters on healthy vascular networks compared to tumor vascular networks confirmed a real “normalizing” effect of bevacizumab. At the dose of 10 mg/kg daily, the “normalization” effect of the neovascularization of glioblastoma xenografts in mice was obtained after 8 days of therapy and lasted 4–5 days.

In our conditions, in order to optimize chemotherapy- and radiotherapy-based protocols, it would seem optimal to start chemotherapy or radiotherapy 8 days after the start of daily bevacizumab therapy.

Perspectives

The method and algorithmic analysis developed here will have to be used to determine, *in vivo* in different types of tumors, the dose and duration of bevacizumab treatment required for its association with chemotherapy or radiotherapy to maximize their therapeutic efficacy. It will also be studied in a manner to predict the best protocol of administration of anti-VEGF to use in order to ensure, in the future, an optimal antitumor response in patients.

Acknowledgements This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer, “Opération réalisée avec le concours financier du conseil régional de Lorraine” and Université de Lorraine.

Compliance with ethical standard

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

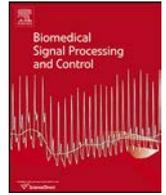
References

1. Folkman J (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175:409–416
2. Kippenberger S, Meissner M, Kaufmann R, Hrgovic I, Zöller N, Kleemann J (2016) Tumor neoangiogenesis and flow congestion: a parallel to the Braess paradox? *Circ Res* 119:711–713. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309411
3. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK (2011) Normalization of the vasculature for treatment of

- cancer and other diseases. *Physiol Rev* 91:1071–1121. doi:[10.1152/physrev.00038.2010](https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2010)
4. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, Durivault J, Chamorey E, Sudaka A, Serdjebi C, Lacarelle B, Scoazec J-Y, Negrier S, Simonnet H, Pages G (2012) Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 31:1683–1694. doi:[10.1038/onc.2011.360](https://doi.org/10.1038/onc.2011.360)
 5. Goel S, Wong AH-K, Jain RK (2012) Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harbor Perspect Med* 2:a006486. doi:[10.1101/cshperspect.a006486](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006486)
 6. Jain RK (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 7:987–989. doi:[10.1038/nm0901-987](https://doi.org/10.1038/nm0901-987)
 7. Falk AT, Barrière J, François E, Follana P (2015) Bevacizumab: a dose review. *Crit Rev Oncol Hematol* 94:311–322. doi:[10.1016/j.critrevonc.2015.01.012](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.012)
 8. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335–2342. doi:[10.1056/NEJMoa032691](https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691)
 9. McGee MC, Hamner JB, Williams RF, Rosati SF, Sims TL, Ng CY, Gaber MW, Calabrese C, Wu J, Nathwani AC, Duntsch C, Merchant TE, Davidoff AM (2010) Improved intratumoral oxygenation through vascular normalization increases glioma sensitivity to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol* 76:1537–1545. doi:[10.1016/j.ijrobp.2009.12.010](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.12.010)
 10. Arjaans M, Oude Munnink TH, Oosting SF, Terwisscha van Scheltinga AGT, Gietema JA, Garbacik ET, Timmer-Bosscha H, Lub-de Hooge MN, Schroder CP, de Vries EGE (2013) Bevacizumab-induced normalization of blood vessels in tumors hampers antibody uptake. *Cancer Res* 73:3347–3355. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-12-3518](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3518)
 11. Dobosz M, Ntziachristos V, Scheuer W, Strobel S (2014) Multispectral fluorescence ultramicroscopy: three-dimensional visualization and automatic quantification of tumor morphology, drug penetration, and antiangiogenic treatment response. *Neoplasia NY N* 16:1–13
 12. Goldwirt L, Beccaria K, Carpentier A, Idbaih A, Schmitt C, Levasseur C, Labussiere M, Milane A, Farinotti R, Fernandez C (2015) Preclinical impact of bevacizumab on brain and tumor distribution of irinotecan and temozolomide. *J Neurooncol* 122:273–281. doi:[10.1007/s11060-015-1717-1](https://doi.org/10.1007/s11060-015-1717-1)
 13. Carpentier G (2012) Documentation: angiogenesis analyzer. ImageJ. <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ.html>
 14. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW (2015) The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 82:518–529. doi:[10.1002/mrd.22489](https://doi.org/10.1002/mrd.22489)
 15. Das S, Marsden PA (2013) Angiogenesis in glioblastoma. *N Engl J Med* 369:1561–1563. doi:[10.1056/NEJMcibr1309402](https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1309402)
 16. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SAA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang J, Stieber D, Stuhr L, Moen I, Rygh CB, Bjerkvig R, Niclou SP (2011) Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 108:3749–3754. doi:[10.1073/pnas.1014480108](https://doi.org/10.1073/pnas.1014480108)
 17. Tylcz J-B, El Alaoui-Lasmali K, Djerroune E-H, Thomas N, Faivre B, Bastogne T (2015) Data-driven modeling and characterization of anti-angiogenic molecule effects on tumoral vascular density. *Biomed Signal Process Control* 20:52–60. doi:[10.1016/j.bspc.2015.04.008](https://doi.org/10.1016/j.bspc.2015.04.008)
 18. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. doi:[10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019)
 19. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szgyarto CA-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist P-H, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419. doi:[10.1126/science.1260419](https://doi.org/10.1126/science.1260419)
 20. Fischer I, Cunliffe CH, Bollo RJ, Raza S, Monoky D, Chiriboga L, Parker EC, Golfinos JG, Kelly PJ, Knopp EA, Gruber ML, Zagzag D, Narayana A (2008) High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro-Oncology* 10:700–708. doi:[10.1215/15228517-2008-042](https://doi.org/10.1215/15228517-2008-042)
 21. Tolaney SM, Boucher Y, Duda DG, Martin JD, Seoane G, Ancukiewicz M, Barry WT, Goel S, Lahdenranta J, Isakoff SJ, Yeh ED, Jain SR, Golshan M, Brock J, Snuderl M, Winer EP, Krop IE, Jain RK (2015) Role of vascular density and normalization in response to neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy in breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci* 112:14325–14330. doi:[10.1073/pnas.1518808112](https://doi.org/10.1073/pnas.1518808112)
 22. Ashina K, Tsubosaka Y, Kobayashi K, Omori K, Murata T (2015) VEGF-induced blood flow increase causes vascular hyperpermeability in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 464:590–595. doi:[10.1016/j.bbrc.2015.07.014](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.014)
 23. de Matos LL, Truffelli DC, de Matos MGL, da Silva Pinhal MA (2010) Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* 5:9–20
 24. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 427:695. doi:[10.1038/427695a](https://doi.org/10.1038/427695a)

Annexe B

Data-driven modeling and
characterization of anti-angiogenic
molecule effects on tumoral vascular
density, Biomedical Signal Processing
and Control, 2015



Data-driven modeling and characterization of anti-angiogenic molecule effects on tumoral vascular density



J.-B. Tylcz^{a,b,*}, K. El Alaoui-Lasmali^{a,b}, E.-H. Djermoune^{a,b}, N. Thomas^{a,b},
B. Faivre^{a,b}, T. Bastogne^{a,b,c}

^a Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b CNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^c INRIA, BIGS, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2014

Received in revised form 19 March 2015

Accepted 11 April 2015

Keywords:

Data-driven modeling

System identification

Image processing

Cancer

Angiogenesis

ABSTRACT

Angiogenesis is the phenomenon by which new blood vessels are created from preexisting ones. But this natural process is also involved, in a chaotic way, in tumor development. Many molecules have shown particular efficiency in inhibiting this phenomenon, hopefully leading to either: (i) a reorganization of the neovessels allowing a better tumor uptake of cytotoxic molecules (as chemotherapy) or (ii) a deprivation of the tumor vascular network with the view to starve it. However, characterizing the anti-angiogenic effects of a molecule remains difficult, mainly because the proposed physical modeling approaches have barely been confronted to *in vivo* data, which are not directly available. This paper presents an original approach to characterize and analyze the anti-angiogenic responses in cancerology that allows biologists to account for spatial and dynamical dimensions of the problem. The proposed solution relies on the association of a specific biological *in vivo* protocol using skinfold chambers, image processing and dynamic system identification. An empirical model structure of the anti-angiogenic effect of a tested molecule is selected according to experimental data. Finally the model is identified and its parameters are used to characterize and compare responses of the tested molecule.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Angiogenesis is a normal and necessary phenomenon consisting in creating new blood vessels from preexisting ones. It concerns many physiological processes during life cycle as, for example, wound healing, development of new tissues, embryonic maturation, menstrual cycles, etc.

Unfortunately, it is also involved in tumor development, especially in tumor neovascularization. As a matter of fact, at the very beginning of tumor development (i.e. before it reaches 1–3 mm³) oxygen and nutrients uptakes can be done by a simple diffusion process. But beyond a 3 mm³ threshold, to carry on their development, cancer cells over-express physiological pro-angiogenic factors, as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), in order to stimulate the angiogenesis process in favor of the tumor [1]. Nearby endothelial cells (blood vessel constituting cells) will then be activated by VEGF and will get out of their quiescent state and start the construction of a new vessel in the angiogenic signal source direction.

* Corresponding author at: Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 44 73.

Due to the permanent excess of physiological pro-angiogenic factors, the newly created blood vessels have an aberrant architecture, non-stabilized, permeable and tortuous. Therefore the tumor irrigation is not optimal and creates hypoxia areas, leading to a continuous tumor angiogenesis stimulation. Such conditions could make the tumor treatment-resistant to chemo- or radiotherapies since the lack of suitable vascularization prevents a good drug delivery or a good tumor oxygenation [2]. It has also been proved that the start of tumor growth was directly linked to neovascular development, [3], hence, it is now accepted that inhibiting angiogenesis in tumor could increase the efficiency of standard therapies [4].

However, the efficiency and secure use of anti-angiogenic drugs requires to better define their pharmacodynamic effects and consequences on tumor growth. Indeed, it will allow to determine when, how and how long these drugs should be administrated in order to optimize the therapeutic protocols.

On the other hand, the use of mathematical models has been largely democratized for various biological applications, either for characterization, prediction or control purposes. A literature review proposed by Mriouah et al., [5], published in 2012, showed that three main types of mathematical models have

been used to: (i) simulate and understand complex phenomena involved in angiogenic processes [6–8], (ii) analyze interactions between tumor and vasculature systems [9,10] and (iii) optimize anti-angiogenic therapies [11–15]. This review also emphasizes that the model structures can take various forms: temporal, spatio-temporal or multi-scale. However they were all designed from physical and biological equations, and very few behavioral modeling approaches of angiogenesis have been tested, so far. For instance, Drexler and Kovacs have used in [16–20] a state-space representation derived from a linearization process applied to a nonlinear model initially proposed in [11]. Nevertheless the relevance of this state-space model has never been assessed *in vivo*. Indeed, Mriouah et al. particularly highlight the lack of *in vivo* validation of existing models. In fact, not only very few models were confronted with real data but statistical tests are barely applied to validate the model performance. Yet, without any relevant validation tests based on *in vitro* or *in vivo* data, the credibility and medical application of mathematical models remains unlikely.

One of the main bottleneck preventing empirical modeling and practical validation is the lack of experimental data availability (in terms of quality and quantity).

In such a context, the objective of the present paper is to propose an innovative approach integrating:

- an *in vivo* protocol of experiments using skinfold chambers (real time observation of *in vivo* angiogenesis processes) applied to mice;
- image segmentation technics (access to informative biological data);
- dynamic system identification methods (data-driven modeling);

with the purpose of characterizing and comparing more accurately the anti-angiogenic treatment responses.

This paper is organized as follows. Section 2 describes material and methods performed from *in vivo* experiments to image acquisition and Section 3 presents the automatic image segmentation process by which data are extracted from images. A data-driven model structure selection is then proposed in Section 4 before being identified. Finally results are discussed in Section 4 before drawing conclusion and perspectives.

2. Material and methods

In vivo angiogenesis imaging through skinfold chambers, on nude mice, allows to visualize the creation, functionality and remodeling of blood vessels within tumor during 4–5 weeks [21].

2.1. Skinfold chamber

This chamber model is made of two titanium shields placed on either side of a skinfold on the mouse back. These shields have a central circle hole of 10 mm diameter through which each side of the skinfold is visible. The skin of one side is dissected and removed in front of one of the apertures, which is then hermetically sealed with a thin sterilized cover glass in order to visualize the skin blood vessels of the other side dermis. It is possible, by removing the cover glass then by replacing it, to implant tumor cells or to graft tumors within the visualization chamber.

The main advantages of such a system is that chambers allow repeated (almost daily) observations of both vascular network and tumor growth by *in vivo* intravital microscopy over 4–5 weeks [22]. An example of this model is presented in Fig. 1.

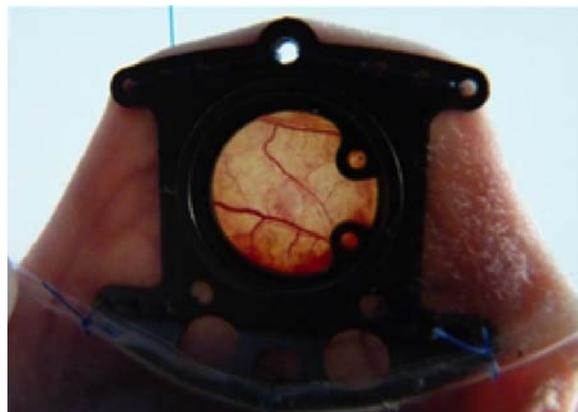


Fig. 1. Example of a xenograft and skin vascular observation from skinfold chamber placed on a nude mouse.

2.2. Animals and tumor xenografted model

The study design was approved (authorization number: CELMEA-2012-0018) by Animal Protection Bureau of the French Ministry for Fishing, Agriculture and Food and the experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles for Research Involving Animals. Using human tumor fragments requires to work with immunodeficient mice (nude) to avoid graft rejections.

Experiments were performed on 6–12-weeks-old female nude mice (nu/nu) weighting between 25 and 30 g ($n = 16$). They were provided by Janvier breeding (Le Genest St Isle, France).

Anesthesia was achieved by a single intraperitoneal injection of a Xylazine (8 mg/kg, Rompun 2%, Bayer Health Care, Puteaux, France) and Ketamine (90 mg/kg, Imalgène 500, Merial, Lyon, France) mixture. To prevent post-operative pain and stress, mice were injected subcutaneously with single doses of Buprenorphine (0.05 mg/kg, Buprécure, Axience) and Meloxicam (1 mg/kg, Metacam, Boehringer Ingelheim).

The dorsal skinfold chamber is positioned and xenograft implanted respectively at days D_{-14} and D_{-13} , see Fig. 2. The xenograft consists in placing a non-vascularized 1 mm thick tumor fragment (of 2–4 mm²) on the vascular network of the skin. We use tumor fragments derived from a human glioblastoma cell line (U87). The cells are injected subcutaneously in the flanks of nude mice to form a tumor which is then cut into small fragments that are placed on the vascular network in the skinfold chamber.

At the end of experiments, mice were killed by a lethal dose of sodium pentobarbital (Pentobarbital sodique®, CEVA Santé Animale, La Ballastière, France).

2.3. Anti-angiogenic drugs and administration protocols

Only one anti-angiogenic drug was tested: bevacizumab (Avastin®, Roche, France). It is a monoclonal antibody targeting VEGF in order to prevent the fixation of VEGF to its receptors on endothelial cells, hence hindering angiogenesis stimulation and in consequence, the angiogenesis stimulation [23,24]. When the tumor vascular network was complete (i.e. when the entire visible part of the tumor is vascularized) the mice were randomized into two batches: one treated and one control. The treated batch was daily injected intraperitoneally with bevacizumab (10 mg/kg).

2.4. Image acquisition

Picture acquisitions were made 3–6 times a week; from anesthetized mice placed on the platform of the microscope (Nikon

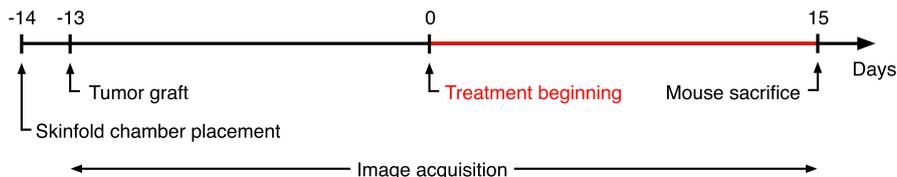


Fig. 2. *In vivo* experiments timeframe.

AZ100, Champigny sur Marne, France). The vascularization of xenografts and vascular network evolution have been followed for 28 days maximum, using transmitted light with a FITC filter (*Fluorescein isothiocyanate*) which allows to increase contrast between vessels and skin thanks to blood hemoglobin autofluorescence. Only superficial tumor vessels were observed due to the weak microscope depth of field.

The experimental setup timeframe is illustrated in Fig. 2.

3. Automatic image segmentation

A vascular network can be characterized by predicates as length between junctions, irrigation quality or cellular density. However, there is a certain lack of knowledge in comprehension of tumor vascular network features [25].

Ideally, angiogenesis analysis should be robust, reproducible and as non-supervised as possible. The observed characteristics should be multiple and directly relied on preclinical and clinical results [26]. To guarantee such constraints, an automatic image segmentation becomes necessary since it can offer many advantages:

- more reliable data (quantitative results with acceptable uncertainties);
- increased reproducibility compared to the naked eye measurements;
- data processing of large image sets in a short time;
- access to barely used physical quantities due to the difficulty of manual extraction.

3.1. Image processing

3.1.1. Region of interest

It is technically difficult to detect by computer a structure that is hardly discernible to the naked eye. In our case the tumor boundaries are too tenuous (lack of contrast). Hence in this exploratory study, the tumor segmentation was performed manually by biologist experts in order to define the region of interest (ROI). In the future, we plan to test multimodality imaging to better discriminate cancerous tissues from healthy tissues.

3.1.2. Vascular network detection

The vascular network detection step deals with the definition of pixel belonging either to vessels or to tumor tissue within the previously defined ROI. The stages of the vascular network extraction are presented in Fig. 3.

Given the sought structures type (wire-shaped and highly contrasted with respect to the background picture, i.e. of higher frequency), the first step was to detect the background (cancerous tissue) and to subtract it from the image.

Two first order Savitzky-Golay filters, [27], (one for horizontal and one for vertical directions) were used. This filter identifies, with the least-square method, a polynomial through a 25 pixels long sliding window. The window length is tunable: the shorter it is, the more sensitive to high frequency (including noise) will be the filter. Hence, each filter returns a background estimated in one direction, the final estimated background is defined as the maximum value, for each pixel, of the two directional backgrounds.

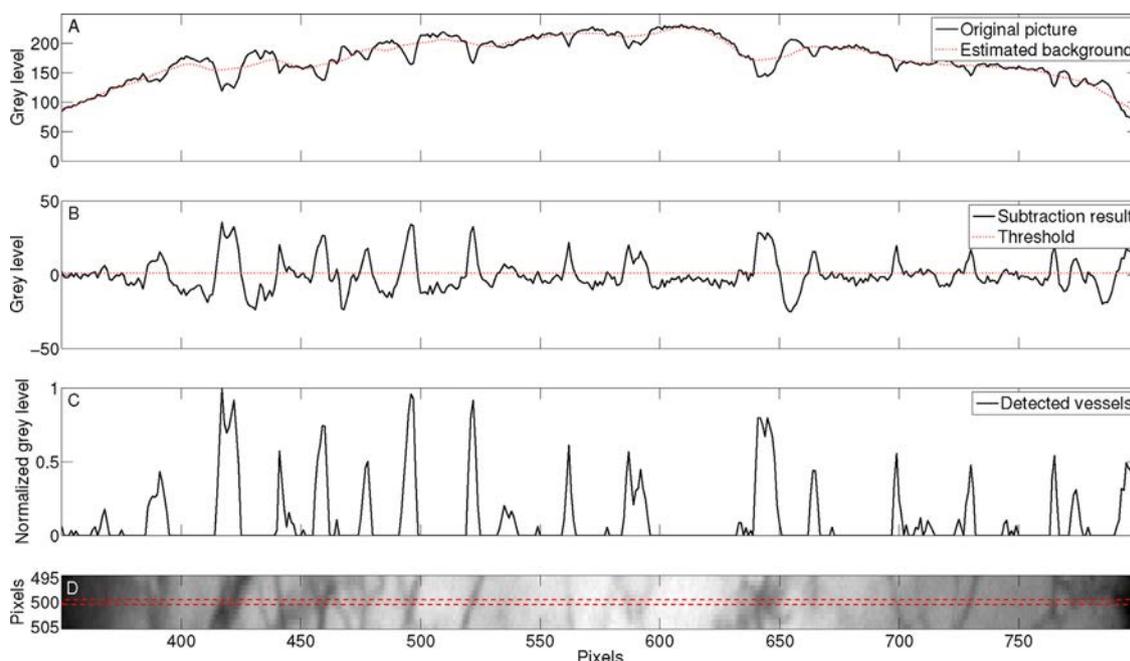


Fig. 3. Application of Savitzky-Golay filter: estimated polynomial response (in red) compared to the 500th line of original picture (in black) in A, peaks extraction (supposed to be vessels) by subtraction of the two signals in B, result is thresholded (red curve in B) and normalized in C where peaks represent blood vessels detected from original picture D. (For interpretation of the references to color in this text, the reader is referred to the web version of the article.)

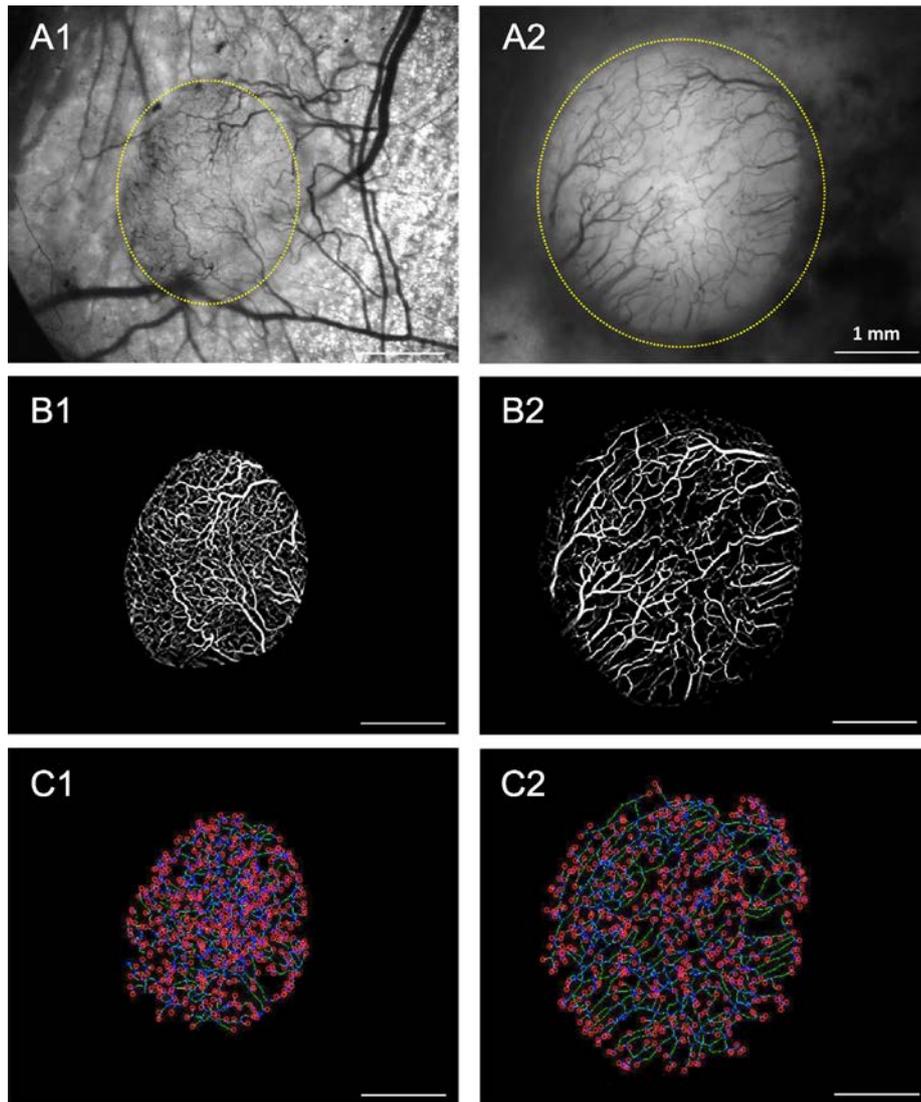


Fig. 4. Example of segmentation process on a control (left) and treated tumor (right) at day +7: manual segmentation (ROI) of cancerous tissues is done in yellow on step A, vessel segmentation is performed on step B (vessels are in white), step C presents the quantification (blue and red circles) on the skeletonized vascular network (green lines) (For interpretation of the references to color in this text, the reader is referred to the web version of the article.).

In order to extract vessels, the original picture and the estimated background are subtracted and thresholded. The threshold value is fixed at 3% of the original picture maximum intensity. Finally, a calibration step is performed to keep only the wire-shaped structures, i.e. having:

- a minimum number of consecutive pixels by line and column;
- a minimum size, whatever the direction.

These parameters were empirically fixed and depend on the searched elements size. They have been tested on a first set of images before being validated on a second one. An example of the final blood vessel segmentation is presented in Figs. 4B_{1,2}.

3.1.3. Skeletonization

This step allows to simplify the picture to ease detection and quantification algorithms application. It consists in refining every structure (blood vessels) till having unitary width lines (just like fire in a grass field). A routine implemented on Matlab was used on our images to remove pixels on the boundaries of objects while

preventing structures breaks. Examples of results are presented in Figs. 4C_{1,2}.

3.2. Quantification and data processing

Access to physical quantities on tumor-vascular network evolution is the keystone which allows system identification of angiogenesis model. These quantities, or signals, must be measured from *in vivo* experimental 2D image sequences.

The previous segmentation and skeletonization steps are necessary to quantify different predicates through time: tumor area, total endothelial cells area (blood vessels), vascular density (ratio between tumor and vessel areas), amount of junctions, amount of vascular sprouts (small length newly created vessels), vascular network total length, etc.

Nevertheless, as previously said, macroscopic images were taken almost everyday, it means that the sampling period is not constant (varying between 1 and 3 days). Hence, data had to be interpolated in order to be used with common system identification algorithms. This has been done by a classical linear interpolation routine on Matlab with a new sampling period of 1 day.

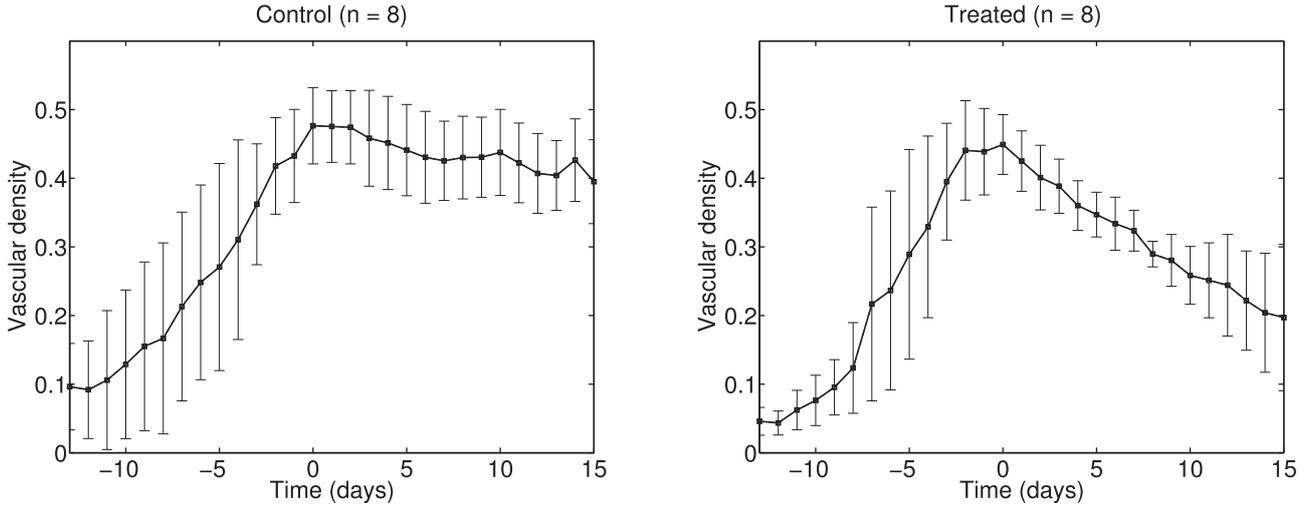


Fig. 5. Mean signals and their standard deviation of tumor-vascular density for control (left) and treated mice (right).

4. Data-driven modeling and system identification

System identification consists in searching a mathematical model of a dynamic system from its input/output signals. This model is characterized by a structure and parameters that need to be chosen and adjusted, in order to reproduce the input/output behavior of the studied system. The model structure can be based on *a priori* knowledge (from physics or biological equations, as used in [19] for example) where parameters have biological meanings or it can only rely on input/output signals behavior. Unlike classic physical modeling approaches, behavioral model structures remain more parsimonious (minimally parametrized) and easy to compute or simulate [28]. In this section, we propose to use the parameters of behavioral model structures as numeric indicators of the anti-angiogenic efficiency. The comparison of the estimated values for each model parameter allows us to assess more precisely the effects of new treatments with respect to reference molecules.

In our case, it is known that tumor-vascular density can be a marker for cancer evolution and, of course, for survival prognostics. In fact, this signal, taking into account both tumor and endothelial cells areas, appears to be one of the most informative measurable quantity in angiogenesis studies. As presented in Fig. 5, it is clear that treatment by bevacizumab affects the angiogenic dynamic of tumors. Next paragraph presents the data-driven modeling process that estimates and thus quantifies this anti-angiogenic effect.

4.1. Modeling process

The effects of treatment on tumor growth and vascular network development could be considered, in a control point of view, as a

system whose behavior is deviated from its natural dynamics by the effect of an external input variable. This MISO (Multiple Input Single Output) structure \mathcal{M}_G , presented in Fig. 6, contains two sub-blocks:

- angiogenesis dynamics (\mathcal{M}_d);
- treatment dynamics (\mathcal{M}_t).

Where $y_G(t)$, the global output, is the vascular density response measured from *in vivo* macroscopic images, as described in Section 3. This variable is composed of the natural growth response of the tumor angiogenesis system $y_d(t)$ and of the treatment effect on it, $y_t(t)$. Each block is controlled by a specific input signal:

- $u_d(t)$ is a step signal defining when tumor is grafted on the mouse;
- $u_t(t)$ is the amount of anti-angiogenic agent injected to the studied mouse, approximated by a step signal beginning at day 0.

4.1.1. Structure selection

Continuous-time (CT) model structures were preferred to discrete-time representations for convenience reasons. Indeed, with a CT model the estimated parameters are independent of the sample time period, the method is then reproducible on different data sets, and the estimates will therefore be comparable. Moreover, some recent developments in system identification applied to the modeling of continuous-time systems from sampled data have been proposed in [29].

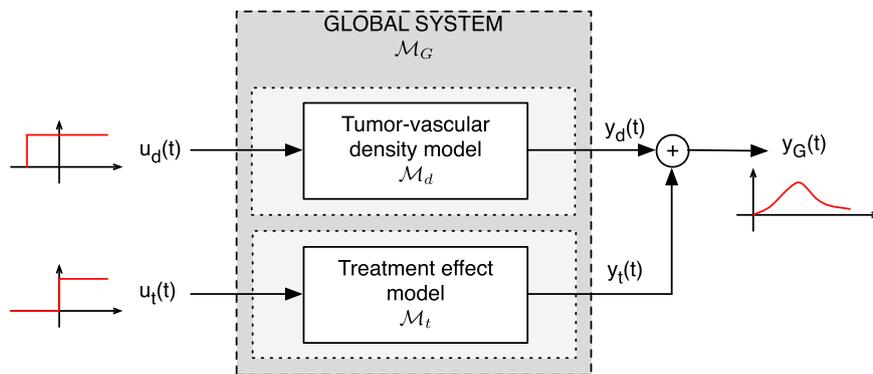


Fig. 6. Input/output representation of angiogenic phenomenon and treatment effect models, where $u_d(t)$ and $u_t(t)$ are respectively the grafting and treatment inputs and $y_d(t)$ and $y_t(t)$ are their corresponding outputs combined in $y_G(t)$.

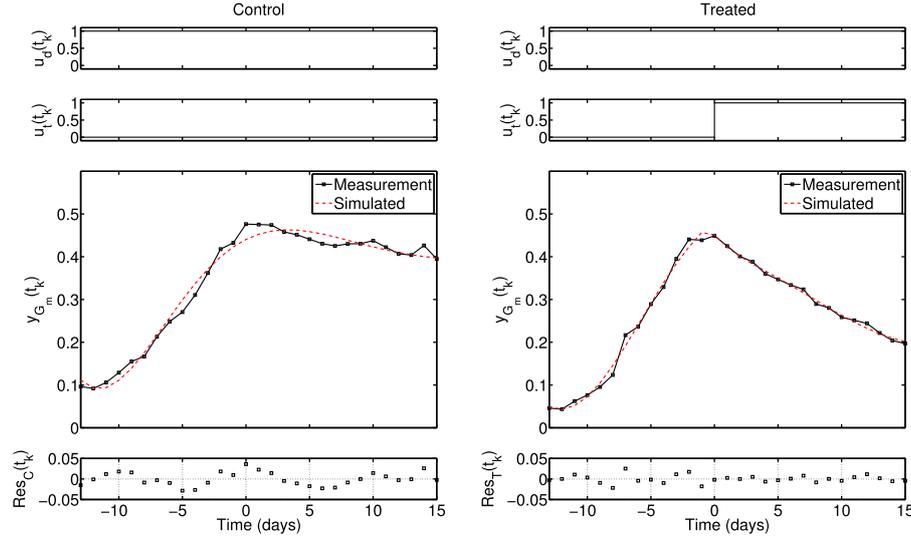


Fig. 7. Measurements and estimated outputs for control and treated batches. Input signals and residuals are respectively plotted above and below.

An Output Error (OE) equation was chosen for both systems \mathcal{M}_d and \mathcal{M}_t :

$$\mathcal{M} : y(t) = \frac{B(p)}{F(p)}u(t) \quad (1)$$

with

$$B(p) = b_0p^{n_b} + b_1p^{n_b-1} + \dots + b_{n_b}$$

$$F(p) = p^{n_f} + f_1p^{n_f-1} + \dots + f_{n_f}.$$

where p is the differential operator (i.e. $x(t)p^n = d^n x(t)/dt^n$). The parameter vector is defined as $\theta = [b_0, \dots, b_{n_b}, f_1, \dots, f_{n_f}]$. In such a structure, indices n_b and n_f define respectively the numerator and denominator orders.

It is assumed that the input and output signals denoted $\{u(t_k); y(t_k)\}$, are sampled at discrete times t_1, \dots, t_N . The measured output is described as follows:

$$y_m(t_k) = y(t_k) + e(t_k). \quad (2)$$

where $e(t_k) \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2)$ denotes the random residuals between the observed and explained responses, and σ^2 corresponds to the variance of this Gaussian white noise.

The complete model structure is then given by:

$$\mathcal{M}_G : \begin{cases} y_G(t) = \frac{B_d(p)}{F_d(p)} u_d(t) + \frac{B_t(p)}{F_t(p)} u_t(t) \\ y_{G_m}(t_k) = y_G(t_k) + e(t_k) \end{cases} \quad (3)$$

with $B_d(p)$, $F_d(p)$, $B_t(p)$ and $F_t(p)$ four polynomials of orders $\{n_{b_d}, n_{f_d}, n_{b_t}, n_{f_t}\} \in \mathbb{N}^+$. Selecting a model structure consists in choosing suitable values for those four indices by looking for the best compromise between behavioral fitting (high orders) and simplicity (low orders). Let \mathbb{M} be a set of model structures (of increasing complexity) that compete for the description of the global system:

$$\mathbb{M} = \{\mathcal{M}_{G_i}, i = 1, \dots, n_m\} \quad (4)$$

where n_m is the number of tested order combinations. Akaike's information criterion, [30], was selected to find the most parsimonious model structures. In fact, the AIC promotes fitting accuracy while penalizing high dimensional ($\dim(\theta)$) structures guaranteeing a parsimoniously parametrized model. Two criteria (the first one computed with control data and the second one with treated

data) were computed for each combination and the selected structure is obtained as follows:

$$\hat{\mathcal{M}}_G = \arg \min_{\mathcal{M}_{G_i} \in \mathbb{M}} \left(\frac{AIC_{cont}(\mathcal{M}_{G_i}) + AIC_{treat}(\mathcal{M}_{G_i})}{2} \right) \quad (5)$$

where $AIC_{cont}(\mathcal{M}_{G_i})$ and $AIC_{treat}(\mathcal{M}_{G_i})$ are the two criteria computed from control and treated data. 64 structures were tested using Matlab System Identification Toolbox and selected orders are $n_{b_d} = 0$, $n_{f_d} = 2$, $n_{b_t} = 1$ and $n_{f_t} = 1$.

Finally, the selected global model structure of tumor-vascular density development and treatment effect becomes:

$$\hat{\mathcal{M}}_G : \begin{cases} y_G(t) = \frac{b_{d_0}}{p^2 + f_{d_1}p + f_{d_2}} u_d(t) + \frac{b_{t_0}p + b_{t_1}}{p + f_{t_1}} u_t(t) \\ y_{G_m}(t_k) = y_G(t_k) + e(t_k) \end{cases} \quad (6)$$

4.2. Continuous-time system identification

Various statistical methods have been proposed to solve CT parameter estimation issues formulated in both time and frequency domains. However, only the Simplified Refined Instrumental Variable method for Continuous-time Systems (SRIVC) has been used herein. The SRIVC method has proven to be very efficient in a number of practical cases and is one of the very few methods that can be interpreted in optimal statistical terms, so providing an estimate of the parametric error covariance matrix and therefore estimate of the confidence bounds on the parameter estimates [31]. It presents the clear advantage to be simple to use since the CT parameters are directly estimated from sampled data. The conversion stage which can be delicate is therefore avoided. A SRIVC routine is now embedded in SITB Matlab toolbox (System Identification Toolbox 8.0, released in 2012) and allows to identify CT model from sampled data. This recursive algorithm is based on the instrumental variable method, [30], initialized by a first least squares estimation step. The inputs/outputs signal derivatives, needed to compute the regression vector, are computed by a state-variable filter. The cut-off frequency of this filter is fixed to a sufficiently high value to take into account all the system time constants [31]. This method was used to estimate the parameters of the model (6).

4.3. Estimation results and model falsification

Measured and simulated outputs are presented with their corresponding inputs in Fig. 7. Residuals, defined as:

$$Res(t_k) = y_{G_m}(t_k) - y_{G_{sim}}(t_k) \tag{7}$$

are also presented.

4.3.1. Fitting and stochastic analysis

Both simulated outputs fit quite well the measurements, the goodness of fit, computed as follows:

$$FIT = 100 \left(1 - \frac{\|y_{G_{sim}}(t_k) - y_{G_m}(t_k)\|_2}{\|y_{G_m}(t_k) - \mu_{y_{G_m}}\|_2} \right) \tag{8}$$

with $\mu_{y_{G_m}}$, the mean of $y_{G_m}(t_k)$, was estimated between 87% and 92%.

However, in order to entirely validate the stochastic assumptions formulated in Section 4.1.1 (especially on $e(t_k)$ whiteness), the statistical properties of the residuals have been graphically assessed by comparing:

- 1 the residual autocovariance function with a Kronecker's delta function inside a 99% confidence interval;
- 2 the residual quantiles spread with respect to one from a normal law.

Results are presented in Fig. 8.

4.3.2. Parameter analysis

Parameter estimates are presented in Table 1 with their coefficients of variation ($c_v = |\hat{\sigma}_\theta/\theta| \times 100$, where $\hat{\sigma}_\theta$ is the standard deviation of the parameter estimated by bootstrapping with $N_{sim} = 200$).

Table 1

Parameter estimates and coefficients of variation c_v for control and treated batches.

Batch	Param.	Estimate	c_v (%)
Control	b_{d_0}	0.023	12
	f_{d_1}	0.23	13
	f_{d_2}	0.057	10
	b_{t_0}	0	–
	f_{t_1}	0	–
Treated	b_{d_0}	0.021	18
	f_{d_1}	0.16	35
	f_{d_2}	0.051	19
	b_{t_0}	–0.032	45
	f_{t_1}	–0.068	22
		0.35	50

4.4. Sensitivity analysis

In order to assess the impact of each parameter on the output signal, we have performed a sensitivity analysis based on the model estimated from the treatment batch data. For every simulation of the model ($N_{sim} = 500$), one of the parameters was assigned a value randomly picked according to a uniform law defined on $[0.9 \times \hat{\theta}, 1.1 \times \hat{\theta}]$ (corresponding to a 20% variation range) while the others parameters were kept to their estimated nominal values. The simulated output signals were then centered and normalized and are presented in Fig. 9.

Results show that four parameters are more sensitizing ($b_{d_0}, f_{d_2}, b_{t_1}$ and f_{t_1}) than the other ones. As presented on their corresponding figures, these parameters mainly affect the increase dynamics and steady states of the system. Such features can easily be interpreted in a biological way as vascular network set up and rearrangement phases. The biological interpretation of these parameters is discussed in the next section.

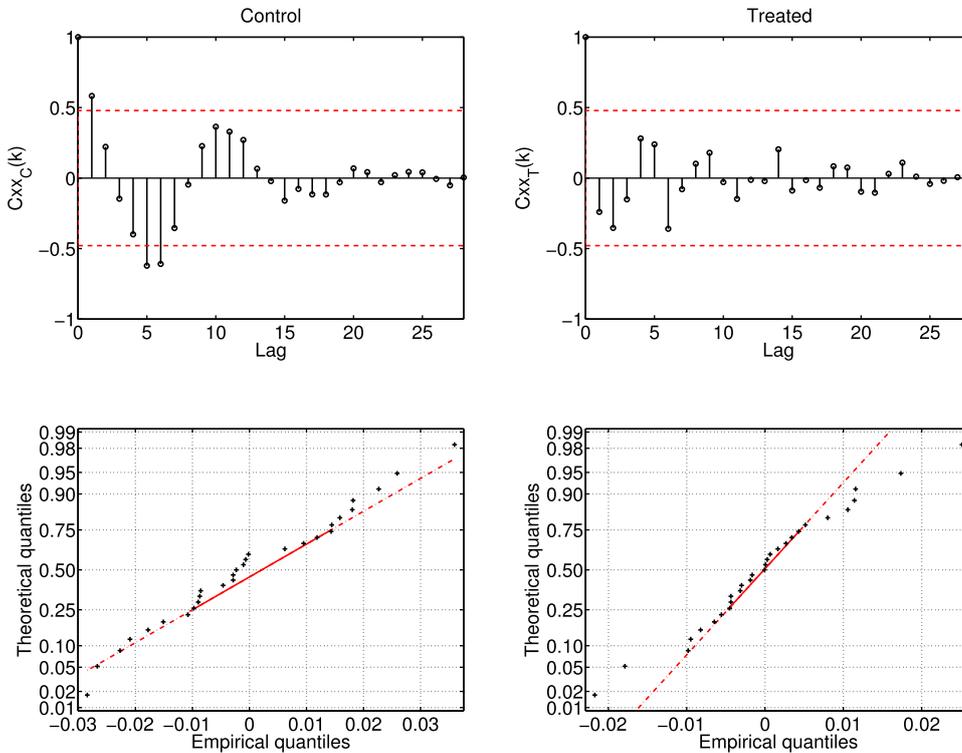


Fig. 8. Residuals autocorrelation functions within a 99% confidence interval at top for control and treated data sets and quantile–quantile plots below. These curves show acceptable results in both independence and normality terms.

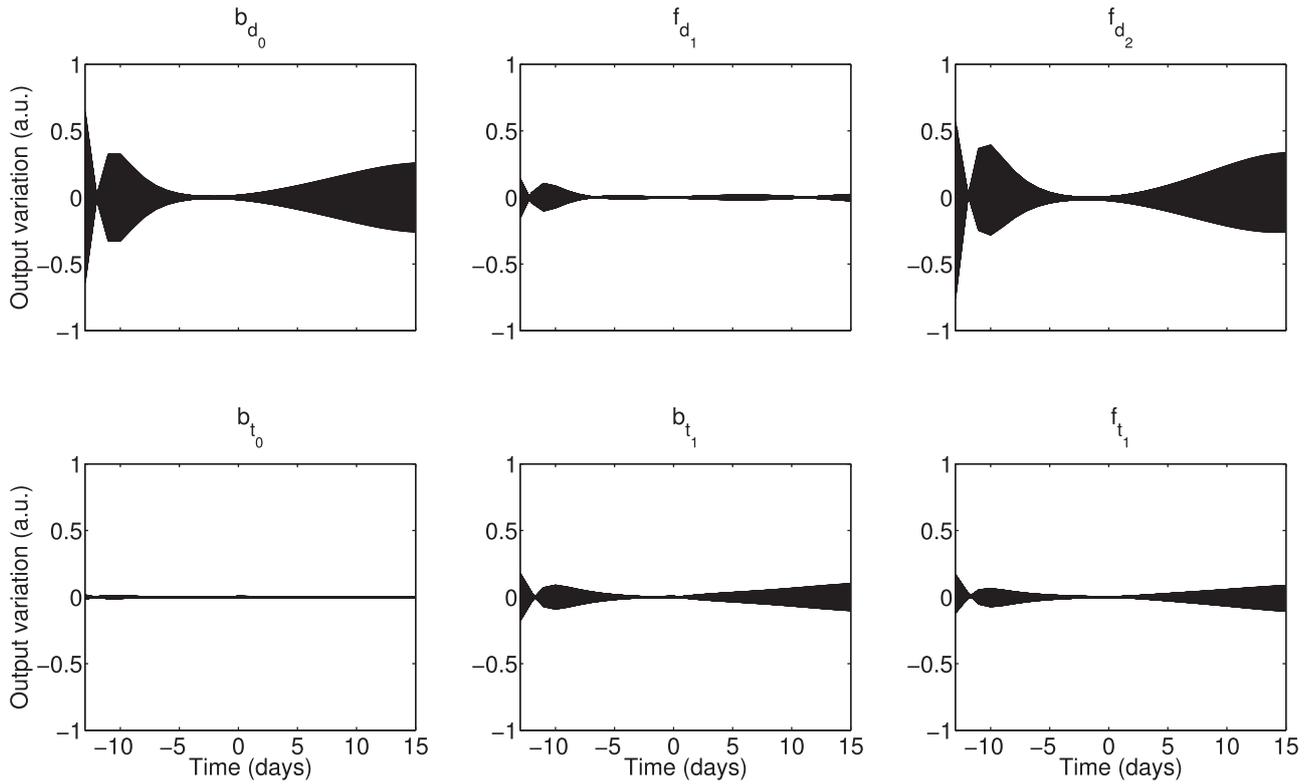


Fig. 9. Normalized variation ranges of output signal $y_C(t)$ for a $\pm 10\%$ variation on each parameters.

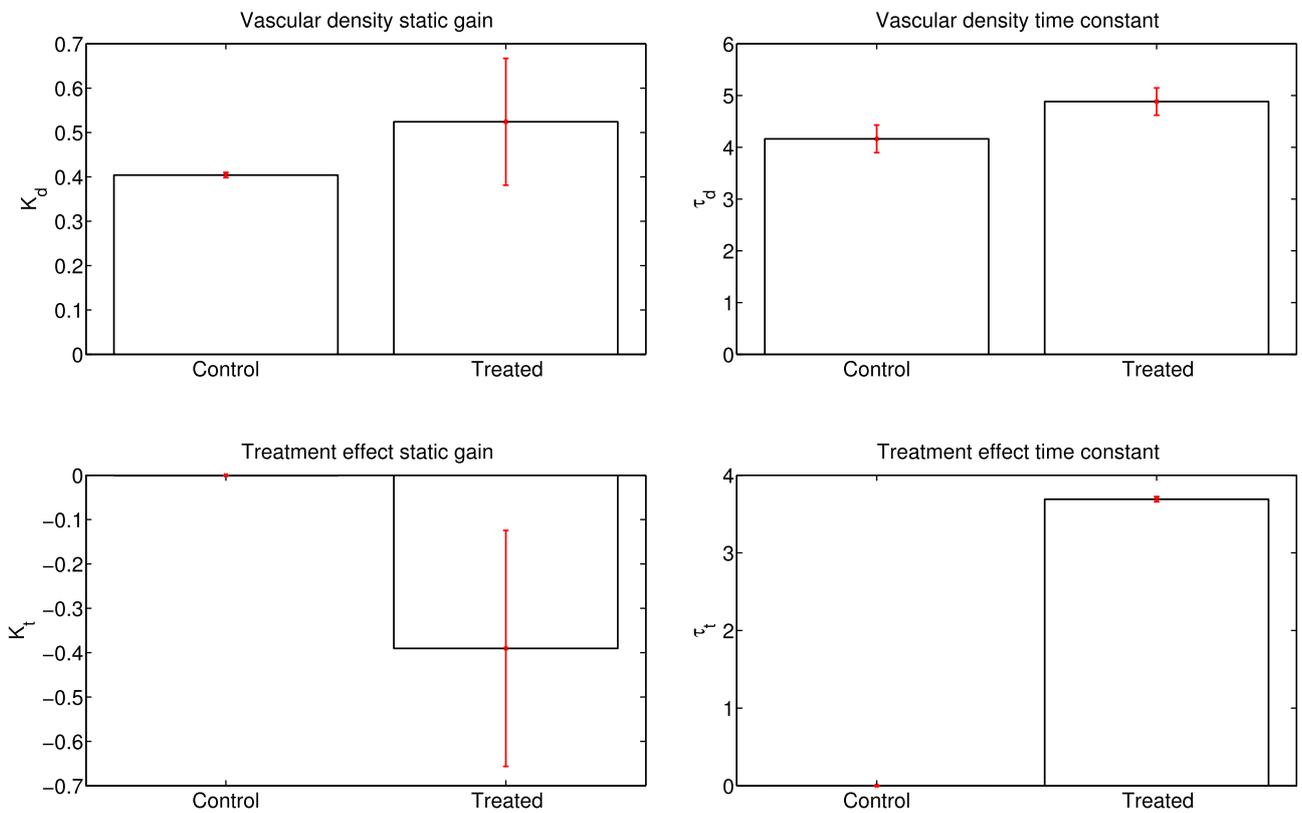


Fig. 10. Meta-parameter estimates and their standard deviation obtained by bootstrapping.

5. Discussion

Macroparameters as static gains and time constants can be used to easily characterize the dynamics of tumor-vascular density development or treatment effect. These macroparameters are defined as follows:

- Static gains: $K_d = b_{d_0}/f_{d_2}$ and $K_t = b_{t_1}/f_{t_1}$
- Time constants: $\tau_d = 1/|\lambda_d|$ and $\tau_t = 1/|\lambda_t|$ with λ_i the roots of polynomial $F_i(p)$ where $i = \{d, t\}$.

In our case, as shown in Fig. 10, the tumor natural growth dynamics are equivalently estimated from control or treatment data sets (i.e. parameters b_{d_0} , f_{d_1} and f_{d_2}), which confirms the choice on the model structure.

However, these plots also highlight the regularization effect of bevacizumab. Indeed the negative static gain for the treatment effect part of the model indicates a tumor-vascular density decrease mainly due to the vascular network rearrangement caused by (i) the anti-vascular effect of the molecule (destruction of blood vessels) but also to (ii) its anti-angiogenic ability (inhibition of new sprouts creation leading to fewer neovessels). The time constants are not compared to each other in this pilot study. Nevertheless they could be useful to compare the pharmacokinetics of the competitive drugs.

6. Conclusion

The objective of this paper was to propose an innovative and integrative data-driven modeling approach that was able to estimate and compare anti-angiogenic effects of therapeutic molecules on tumor-vascular density. The proposed method was confronted with experimental *in vivo* data obtained from a user-independent image segmentation process of tumors macroscopic pictures. The approach has proven its efficiency by successfully reproducing the tumor and vascular behaviors and by producing parameter estimates which can be interpreted and compared to assess the treatment effects. In short terms perspectives, it is planned to extend the previous behavioral modeling to the amount junctions and vascular sprouts as well as the total length of the vascular network.

Further experiments will be carried out to assess the model ability to discriminate different treatment doses and their consequences on vascular network and tumor growth.

Finally, this model could also be used for predictive purposes in order to foretell when the optimal normalization window occurs, during which the effects of an anti-cancer therapy (such as chemotherapy or radiation therapies) could be potentialized [32,33].

References

- [1] M.E. Eichhorn, A. Klepsies, M.K. Angele, K.-W. Jauch, C.J. Bruns, Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact, *Langenbecks Arch. Surg.* 392 (2007) 371–379.
- [2] P. Carmeliet, R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature* 473 (2011) 298–307.
- [3] G.H. Algire, H.W. Chalkley, W.E. Earle, F.Y. Legallais, H.D. Park, E. Shelton, E.L. Schilling, Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. III. Vascular reactions of mice to fibroblasts treated *in vitro* with methylcholanthrene, *J. Natl. Cancer Instit.* 11 (1950) 555–580.
- [4] S. Goel, D.G. Duda, L. Xu, L.L. Munn, Y. Boucher, D. Fukumura, R.K. Jain, Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases, *Physiol. Rev.* 91 (3) (2011) 1071–1121.
- [5] J. Mriouah, C. Boura, M. Thomassin, T. Bastogne, B. Faivre, M. Barberi-Heyob, Tumor vascular responses to anti-vascular and -angiogenic strategies: looking for suitable models, *Trends Biotechnol.* 30 (12) (2012) 649–658.

- [6] A.R.A. Anderson, A.J. Chaplain, Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis, *Bull. Math. Biol.* 60 (1998) 857–900.
- [7] M.A.J. Chaplain, Mathematical modeling of angiogenesis, *J. Neuro-Oncol.* 50 (2000) 37–51.
- [8] U. Ledzewicz, A. d’Onofrio, H. Schättler, Tumor development under combination treatments with anti-angiogenic therapies, *Math. Methods Models Biomed.* (2012) 311–337.
- [9] R.K. Sachs, L.R. Hlatky, P. Hahnfeldt, Simple ODE models of tumor growth and anti-angiogenic or radiation treatment, *Math. Comput. Model.* 33 (2001) 1297–1305.
- [10] A. D’Onofrio, A. Gandolfi, A family of models of angiogenesis and anti-angiogenesis anti-cancer therapy, *Math. Med. Biol.* 26 (2009) 63–95.
- [11] P. Hahnfeldt, D. Panigrahy, J. Folkman, L. Hlatky, Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy, *Cancer Res.* 59 (1999) 4770–4775.
- [12] A. Ergun, K. Camphausen, L.M. Wein, Optimal scheduling of radiotherapy and angiogenic inhibitors, *Bull. Math. Biol.* 65 (2003) 407–424.
- [13] U. Ledzewicz, H. Schättler, Optimal and suboptimal protocols for a class of mathematical models of tumor anti-angiogenesis, *J. Theor. Biol.* 252 (2008) 295–312.
- [14] A. d’Onofrio, U. Ledzewicz, H. Maurer, H. Schättler, On optimal delivery of combination therapy for tumors, *Math. Biosci.* 222 (1) (2009) 13–26.
- [15] D.A. Drexler, L. Kovács, Z.B.J. Sági, I. Harmati, Model-based analysis and synthesis of tumor growth under angiogenic inhibition: a case study, in: *Proc. 18th IFAC World Congress*, Milano, Italy, 2011.
- [16] D. Drexler, J. Sapi, A. Szeles, I. Harmati, A. Kovacs, L. Kovacs, Flat control of tumor growth with angiogenic inhibition, in: *7th IEEE International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics*, 2012, pp. 179–183.
- [17] L. Kovacs, J. Sapi, T. Ferenci, P. Szalay, D. Drexler, G. Eigner, P. Sas, B. Kiss, I. Harmati, M. Kozlovsky, Z. Sapi, Model-based optimal therapy for high-impact diseases, in: *17th IEEE International Conference In Intelligent Engineering Systems*, 2013, pp. 209–214.
- [18] J. Sapi, D. Drexler, L. Kovacs, Parameter optimization of hinf controller designed for tumor growth in the light of physiological aspects, in: *14th IEEE International Symposium on Computational Intelligence and Informatics*, 2013, pp. 19–24.
- [19] A. Szeles, D. Drexler, J. Sapi, I. Harmati, L. Kovacs, Model-based angiogenic inhibition of tumor growth using feedback linearization, in: *52nd IEEE Conference on Decision and Control*, 2013, pp. 2054–2059.
- [20] L. Kovacs, A. Szeles, J. Sapi, D. Drexler, I. Rudas, I. Harmati, Z. Sapi, Model-based angiogenic inhibition of tumor growth using modern robust control method, *Comput. Methods Progr. Biomed.* (2014).
- [21] P. Vajkoczy, M.D. Menger, B. Vollmar, E.L. Schilling, P. Schmiedek, K.P. Hirth, A. Ullrich, T.A. Fong, Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor su5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy, *Neoplasia* 1 (1999) 31–41.
- [22] M.D. Menger, M.W. Laschke, B. Vollmar, Scope and perspectives of intravital microscopy—bridge over from *in vitro* to *in vivo*, *Immunol. Today* 14 (1993) 519–522.
- [23] F. Kazazi-Hyseni, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, Bevacizumab, *Oncologist* 15 (8) (2010) 819–825.
- [24] O.L. Chinot, W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, A.F. Carpentier, K. Hoang-Xuan, P. Kavan, D. Cernea, A.A. Brandes, M. Hilton, L. Abrey, T. Cloughesy, Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma, *New Engl. J. Med.* 370 (8) (2014) 709–722.
- [25] E. Forkas, J.H. Im, S. Hill, S. Yameen, M. Stratford, J. Beech, W. Hackl, S.M. Maira, E.J. Bernhard, W.G. McKenna, Dual inhibition of the PI3K/mTOR pathway increases tumor radiosensitivity by normalizing tumor vasculature, *Cancer Res.* 72 (2012) 239–248.
- [26] C.A. Staton, M.W.R. Reed, N.J. Brown, A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays, *Int. J. Exp. Pathol.* 90 (2009) 195–221.
- [27] S.J. Orfanidis, *Introduction to Signal Processing*, Pearson Education, 1996.
- [28] E. Walter, L. Pronzato, *Identification of Parametric Models from Experimental Data*, Springer-Verlag, Masson, 1997.
- [29] F. Garnier, L. Wang (Eds.), *Identification of Continuous-time Models From Sampled Data*, Springer-Verlag, London, 2008.
- [30] L. Ljung, *System Identification: Theory For The User*, 2nd ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1999.
- [31] P.C. Young, H. Garnier, M. Gilson, Refined instrumental variable identification of continuous-time hybrid Box-Jenkins models, in: *Identification of Continuous-time Models From Sampled Data (Advances in Industrial Control)*, Springer, 2008.
- [32] N. Ferrara, VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 795–803.
- [33] C.G. Willett, D.G. Duda, E. di Tomaso, Y. Boucher, M. Ancukiewicz, D.V. Sahani, J. Lahdenranta, D.C. Chung, A.J. Fischman, G.Y. Lauwers, P. Shellito, B.G. Czito, T.Z. Wong, E. Paulson, M. Poleski, Z. Vujaskovic, R. Bentley, H.X. Chen, J.W. Clark, R.K. Jain, Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: A multidisciplinary phase II study, *J. Clin. Oncol.* 27 (18) (2009) 3020–3026.

Résumé

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de caractériser les effets de l'anti-VEGF Bevacizumab (Avastin) sur le réseau vasculaire tumoral *in vivo*, au cours du temps, à l'aide du modèle de la chambre dorsale chez la souris nude. Les images du réseau vasculaire tumoral acquises par microscopie intravitale ont été analysées par un algorithme de traitement d'images développé au sein de notre équipe, permettant de mettre en évidence les modifications morphologiques induites par le traitement et d'isoler des paramètres discriminants de la « normalisation » vasculaire, par comparaison à un réseau vasculaire sain. La période de « normalisation » vasculaire détectée par notre outil a été confortée par l'analyse de la fonctionnalité des vaisseaux sanguins au cours du temps, *in vivo* et par une analyse immunohistochimique des vaisseaux sanguins tumoraux et du tissu tumoral. A travers des essais préliminaires *in vivo*, en regard des résultats de ce travail concernant une fenêtre de "normalisation", nous avons cherché à vérifier l'hypothèse d'un bénéfice d'un traitement anti-VEGF préalablement à la thérapie photodynamique (PDT) sur des tumeurs de glioblastome xénotransplantées en sous-cutané et en chambre dorsale. L'efficacité de la PDT est décrite comme étant dépendante d'une d'oxygénation tumorale suffisante et d'une distribution maximale de l'agent photosensibilisant au coeur des tumeurs. Parallèlement à ces travaux, nous avons cherché en équipe pluridisciplinaire à développer un modèle mathématique de la réponse au bevacizumab à partir de données biologiques réelles obtenues sur le même modèle *in vivo* et permettant pour l'avenir de simuler les réponses à différentes doses et différentes durées de traitement, toujours à des fins d'optimisation des protocoles thérapeutiques.

Mots-clés: Angiogenèse, Microscopie intravitale, Outils mathématiques, Bevacizumab, Thérapie Photodynamique.

Abstract

The main aim of this work was to characterize the effects of the anti-VEGF Bevacizumab (Avastin) on the tumor vascular network, *in vivo*, over time, thanks to the skin fold chamber model on the nude mouse. Images of the vascular network obtained using intravital microscopy were analyzed by a dedicated image processing algorithm developed within our research team, allowing to highlight the morphological modifications induced by the treatment and to isolate discriminating parameters of the vascular "normalization", by comparison to healthy vascular networks. The vascular "normalization" period detected with our tool was comforted by the analysis of the functionality of the blood vessels over time, *in vivo* and by an immunohistochemical analysis of the blood vessels and of the tumor tissue. In preliminary *in vivo* experiments, we tried to verify the hypothesis of the benefits of an anti-VEGF treatment prior to photodynamic therapy (PDT) on glioblastoma xenografts implanted subcutaneously or in the skin fold chamber. The efficacy of PDT is described as being dependent on tumor oxygenation and on the distribution of the photosensitizing agent within the tumor. In parallel to this work, we tried as a pluridisciplinary team to develop a mathematical model of the tumor response to bevacizumab using biological data obtained on the same *in vivo* model and that will allow in the future to simulate the response for different doses and different treatment durations, for the optimization of therapeutic protocols.

Keywords: Angiogenesis, Intravital microscopy, Mathematical tools, Bevacizumab, Photodynamic therapy.

